CÍNTIA RIBAS MARTORELLI

**Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com
ênfase na determinação do fator de crescimento de
fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo
urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos
a terapia com células-tronco mesenquimal**

São Paulo
2016

CÍNTIA RIBAS MARTORELLI

Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal

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.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dra. Márcia Mery Kogika

De acordo:

Orientador

São Paulo
2016

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3395
FMVZ

Martorelli, Cíntia Ribas

Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal / Cíntia Ribas Martorelli. -- 2016.
156 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Mery Kogika.

1. Canina. 2. Hiperfosfatemia. 3. Fosfatúria. 4. FGF-23. 5. Célula-tronco. I. Título.

ERRATA

MARTORELLI, C. R. Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal.

[Sequential evaluation of calcium and phosphorus metabolism with emphasis on measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and urinary fractional excretion of phosphorus (uFEP) in dogs with chronic kidney disease treated with mesenchymal stem cell]. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Página	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	156 f.	155 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo de cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células-tronco”, protocolado sob o nº 2768/2012, utilizando 40 (quarenta) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. DRa. Márcia Mery Kogika, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 28/11/2012.

We certify that the Research “Sequential evaluation of calcium and phosphorus metabolism of dogs with chronic kidney disease with stem cell therapy”, protocol number 2768/2012, utilizing 40 (forty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Márcia Mery Kogika, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 11/28/2012.

São Paulo, 29 de novembro de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

HOSPITAL VETERINÁRIO

À Ilustríssima Senhora
Professora Doutora Márcia Mery Kogika

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto – “Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo de cães com doença renal crônica submetidos à terapia com células tronco”, desenvolvido pela Pós-Graduada Cínthia Ribas, sob a sua responsabilidade, previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais dessa Faculdade, foi analisado e atende às normas da Comissão de Ética deste Hospital, que acompanhará administrativamente sua execução. Substituição do responsável, inserção de novos colaboradores e mudanças na metodologia proposta deverão ser imediatamente comunicadas a esta Comissão, bem como, as datas de suspensão ou término do projeto.

São Paulo, 16 de julho de 2013.

Prof. Dr. Fernando José Benesi
Presidente da Comissão de Ética Hospitalar
HOVET-FMVZ-USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARTORELLI, Cínthia Ribas

Título: **Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal**

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

Dedico este trabalho especialmente aos meus pais, **Valdir e Onélia**, a quem amo incondicionalmente e a quem devo tudo que sou, sendo eles os meus maiores exemplos de seres humanos, que me ensinaram e ensinam importantes coisas que temos que ter na vida como amor, força, perseverança, honestidade, determinação e coragem, sempre me ensinando com grande sabedoria que a vida lhes proporcionaram.

Dedico também ao meu marido **André Fernando**, que tanto amo e que sempre me deu muito apoio, incentivo, amor e carinho, sendo companheiro de todos os momentos.

Dedico também aos meus “filhos felinos” **Thierry e Leroy** por fazerem parte da minha vida e me fazerem um ser humano melhor a cada dia, ensinando-me em pequenos gestos que a vida é bela e cheia de significados maravilhosos, sempre me fazendo sentir abençoada e feliz, e por me permitir sentir o amor puro de Deus.

Muito obrigada, sem vocês nada seria possível!

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo apoio financeiro do estudo referente ao Projeto Temático (Processo nº 2010/19012-0.) e à Professora Lucia da Conceição Andrade da Disciplina de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo como Pesquisadora Responsável pelo referido Projeto junto à FAPESP.

À CAPES pela bolsa de estudo no período de novembro de 2012 a fevereiro de 2016.

Em especial, à minha orientadora, Márcia Mery Kogika, por todos os ensinamentos, orientações, juntamente com seu companheirismo e torcida para o caminho da vitória. Quero também agradecer pela grande oportunidade em conhecer o caminho encantador da pesquisa, e por ter tido a possibilidade de poder ser sua orientada. Agradeço também pela confiança, pela amizade, pelas oportunidades, pelos desafios propostos e por toda dedicação durante a pesquisa. Serei sempre grata.

À todos os médicos veterinários Khadine Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Bruna Maria P. Coelho, Vera Fortunato Wirthl e Andréa Cerqueira Andrade, residentes, enfermeiros e funcionários do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pelo auxílio durante a pesquisa.

À todos os funcionários que faz ou fizeram parte do Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, à Maria Helena da Silva Pelissari, Edna Santana dos Santos, Creide Donizete Costa, Clara Mori e Claudia Regina Stricagnolo e Samantha Ive Miyashiro pela colaboração nos exames e nas técnicas laboratoriais.

À todos os professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo pela contribuição na minha formação profissional como professora e pesquisadora. À todos os proprietários de cães atendidos durante o estudo que permitiram e colaboraram com a execução deste projeto de pesquisa e com meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus amigos de jornada Douglas Segalla Caragelasco e Fernanda Chicharo Chacar, pelo companheirismo, aprendizado e amizade e, ainda, a Fernanda Chicharo Chacar pelas sugestões relevantes durante a análise dos resultados.

Agradeço também aos tutores dos cães do estudo que permitiram a realização do projeto de pesquisa, e dessa forma ajudando a medicina veterinária progredir, bem como pelos ensinamentos proporcionados relacionados a vida.

RESUMO

MARTORELLI, C. R. **Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal.** [Sequential evaluation of calcium and phosphorus metabolism with emphasis on measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and urinary fractional excretion of phosphorus (uFEP) in dogs with chronic kidney disease treated with mesenchymal stem cell]. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A hiperfosfatemia está relacionada com o hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) e com a progressão da doença renal crônica (DRC). A retenção de fósforo estimula a síntese do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), o qual promove fosfatúria, com o objetivo de evitar o aparecimento de hiperfosfatemia. Atualmente, o tratamento disponível para DRC é de manutenção e, portanto, novas estratégias para evitar a progressão da DRC seriam de grande relevância. Recentemente têm sido demonstrado o papel da célula-tronco mesenquimal (CTM) em minimizar os mecanismos inflamatórios e imunológicos envolvidos na progressão da DRC. Portanto, o estudo teve como hipótese de que a CTM possa evitar ou controlar a progressão para o HPTSR, investigada por meio da avaliação de biomarcadores do metabolismo de fósforo, ou seja, as concentrações sérica de fósforo (sP), FGF-23, cálcio total e cálcio ionizado, bem como a excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) em cães com DRC nos estágios 2 (Grupo A) e 3 (Grupo B), submetidos ou não a terapia com CTM, bem como investigar se os valores elevados de FGF-23 estariam relacionados com o menor tempo de sobrevida. Trata-se de um estudo prospectivo, longitudinal, duplo-cego e randomizado em que foram avaliados 22 cães com DRC, tratados com solução fisiológica (SF) ou CTM, avaliados a cada 30 a 45 dias em 12 momentos (T0 a T12). No Grupo A (n= 9; SF: n= 6, CTM: n= 3) todos os cães eram normofosfatêmicos no momento inicial do acompanhamento (T0) e foi observado níveis elevados de FGF-23 em 33,3% dos cães (3 de 9), assim como o aumento de uFEP foi detectado em 33,3% dos casos (3 de 9). A média $\pm$ EPM dos valores de FGF-23 sérico do Grupo A foi de $481,5 \pm 75,23$ pg/mL. Já no Grupo B (n = 13; SF: n = 6, CTM: n = 7), todos os cães apresentaram altas concentrações séricas de FGF-23 desde T0 (média $\pm$ EPM de

12744 ± 6879pg/mL), sendo que 53,8% dos cães eram normofosfatêmicos. A média ± EPM de fósforo sérico em T0, T6 e T12 ou momento do óbito no Grupo A e B foi de 3,74 ± 0,13mg/dL e 6,40 ± 0,54mg/dL. Ao longo do curso da doença, o desenvolvimento de hiperfosfatemia foi observada em apenas 11,1% dos cães do Grupo A e em 84,6% dos cães do Grupo B. O Grupo B (SF e CTM) apresentou valores mais elevados de FGF-23 do que o Grupo A (SF e CTM), e foi detectada diferença estatística entre os dois grupos. A uFEP nos cães dos Grupos A e B em T0, T6 e T12 ou óbito obteve média ± EPM de 20,93 ± 3,92% e 24,05 ± 2,22%, respectivamente. Além disso, a sobrevida foi menor no Grupo B, a qual estava associada com hiperfosfatemia intensa, altas concentrações de FGF-23 e diminuição da uFEP. Dessa forma, em cães DRC normofosfatêmicos, a presença de aumentos de uFEP e de FGF-23 parece terem atuado como marcador precoce do HPTSR. Em contrapartida, nos estágios tardios da DRC, o aumento de FGF-23 associado a diminuição da uFEP pode indicar mau prognóstico. Em relação à terapia com CTM nos cães com DRC, de acordo com o número de cães avaliados e os resultados obtidos, não foi possível concluir de forma contundente sobre o efeito da terapia com CTM na doença renal crônica de curso natural em cães, entretanto, os resultados obtidos foram relevantes, pois suscitaram questões quanto ao momento ou o estágio da DRC que seria o mais adequado para a indicação da terapia celular para que os efeitos benéficos possam ser obtidos. Assim, ainda se faz necessária a condução de mais pesquisas com um número maior de cães com DRC para avaliar efeito da CTM em evitar o distúrbio no metabolismo mineral, bem como a progressão da DRC em cães.

Palavras-chave: Canina. Hiperfosfatemia. Fosfatúria. FGF-23. Célula-tronco.

ABSTRACT

MARTORELLI, C. R. **Sequential evaluation of calcium and phosphorus metabolism with emphasis on measurement of fibroblast growth factor 23 (FGF-23) and urinary fractional excretion of phosphorus (uFEP) in dogs with chronic kidney disease treated with mesenchymal stem cell.** [Avaliação sequencial do metabolismo de cálcio e fósforo com ênfase na determinação do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) de cães com doença renal crônica submetidos a terapia com células-tronco mesenquimal]. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Hyperphosphatemia is associated with renal secondary hyperparathyroidism (SRHP) and chronic kidney disease (CKD) progression. Phosphorus retention stimulates the synthesis of fibroblast growth factor 23 (FGF-23), which promotes phosphaturia in order to avoid the onset of hyperphosphatemia. Conservative treatment of CKD is currently available and new strategies are needed and welcome to avoid the progression of renal injury. Recent studies have shown the role of mesenchymal stem cell (MSC) in minimizing inflammatory and immunological mechanisms known as mediators of CKD progression. Therefore, it was hypothesized that MSCs could avoid or control the progression to SRHP, assessed by serum phosphorus (sP), FGF-23, total and ionized calcium and fractional excretion of phosphorus (uFEP) in CKD dogs in Stages 2 (Group A) and 3 (Group B), also was investigated whether high values of FGF-23 could be associated with shorter survival time. Prospective, double-blind, randomized and longitudinal study was conducted enrolling 22 dogs with CKD treated with saline solution (SS) or MSC, which were evaluated every 30 to 45 days in 12 moments (T0 to T12). In Group A (n = 9; SS: n = 6, CTM: n = 3) all dogs were normophosphatemic at the beginning of the follow-up (T0) and high levels of FGF-23 were already detected in 33.3% of dogs (3 of 9), as well as increased in uFEP (33.3%; 3 of 9). The mean $\pm$ SEM of serum FGF-23 in Group A was 481.50 ± 75.23 pg/mL. In Group B (n = 13; SS: n = 6, MSC: n = 7), all dogs showed high concentrations of serum FGF-23 since T0 (mean $\pm$ SEM of 12744 ± 6979 pg/mL), and normophosphatemia detected in 53.8% of them. The mean $\pm$ SEM of serum phosphorus at T0, T6 and T12 or death in Group A and B was 3.74 ± 0.13 mg/dL and 6.40 ± 0.54 mg/dL. Hyperphosphatemia developed during the follow-up in only 11.1%

of the dogs of Group A and 84.6% of the dogs of Group B. Group B (SS and MSC) had higher levels of FGF-23 than Group A (SS and MSC), and difference between those groups detected. The uFEP in dogs of Groups A and B at T0, T6 and T12 or death obtained mean $\pm$ SEM of $20.93 \pm 3.92\%$ and $24.05 \pm 2.22\%$, respectively. Furthermore, the survival rate was lower in Group B, which was associated with severe hyperphosphatemia, high values of serum FGF-23 and decreased uFEP. Therefore in normophosphatemic CKD dogs, the increased in uFEP and high levels of FGF-23 may act as an early marker of SRHP. However, in later stages of CKD, increased levels of serum FGF-23 associated with decreased uFEP and hyperphosphatemia may indicate poor prognosis. Regarding to the MSC therapy in dogs with CKD, the number of dogs involved and also according to the results, it still has not allowed to conclude the effect of therapy with mesenchymal stem cell in spontaneous chronic kidney disease; however, the results obtained raised important questions such as the time or the stage of CKD that could be more suitable for the use of stem cell therapy in order to get its beneficial effects. Therefore, further studies are needed, including greater number of dogs with CKD and then to evaluate the effect or action of MSC to avoid disturbances in mineral metabolism as well as the progression of CKD in dogs.

Keywords: Canine. Hyperphosphatemia. Hyperparathyroidism. Phosphaturia. FGF-23. Stem cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema ilustrativo da calcitriol <i>trade-off hypothesis</i> no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) em cães com doença renal crônica (DRC) – São Paulo - 2016	33
Figura 2 -	Esquema ilustrativo da teoria que explica o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) nos estágios bem iniciais (“very early”) da doença renal crônica (DRC) a partir da teoria do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) – São Paulo - 2016	35
Figura 3 -	Esquema ilustrativo da teoria que explica o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) nos estágios iniciais (“early”) da doença renal crônica (DRC) a partir da teoria do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) – São Paulo - 2016	36
Figura 4 -	Esquema ilustrativo do papel do FGF-23 nos estágios avançados da doença renal crônica (DRC) contribuindo para a progressão do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) – São Paulo, 2016	37
Figura 5 -	Esquema ilustrativo demonstrando a teoria klothocêntrica no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) – São Paulo - 2016.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados do intra-ensaio do kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) com amostras de soro canino e valor do coeficiente de variação (CV; %) – São Paulo - 2016	52
Tabela 2 -	Resultados do inter-ensaio do kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) com amostras de soro canino e valor do coeficiente de variação (CV; %) – São Paulo - 2016.	53
Tabela 3 -	Identificação dos cães clinicamente normais - Grupo C (C1 a C15), com prontuário de identificação no nosocômio, idade (em meses), definição racial, sexo (M: macho; F: fêmea), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo - 2016.....	59
Tabela 4 -	Valores séricos individuais de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL), cálcio total (Catt; mg/dL), cálcio iônico (iCa; mmol/L) e fósforo (sP; mg/dL), da creatinina urinária (uCr; mg/dL), da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) e do fator de crescimento de fibroblastos 23 sérico (FGF-23; pg/mL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 25% (perc 25%), percentil 75% (perc 75%) e variação dos valores de normalidade (VN) de cães clinicamente normais (Grupo C de C1 a C15), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016.....	60
Tabela 5 -	Identificação dos cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo A (A1 a A9), classificados como estágio 2 de acordo com o estagiamento proposto pela IRIS, com sub-grupos A-SF (cães que receberam solução fisiológica) e A-CTM (cães que receberam célula-tronco mesenquimal - CTM) com prontuário de identificação no nosocômio, idade (em meses), definição racial, sexo (M: macho; F: fêmea), e tempo em que ocorreu o óbito durante o estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo - 2016.	61
Tabela 6 -	Tipo de dieta ingerida pelos cães do Grupo A (A-SF e A-CTM) ao longo do período de acompanhamento – São Paulo - 2016	61
Tabela 7 -	Presença de alterações decorrentes da disfunção renal observadas antes e ao longo do período de acompanhamento, e o tratamento preconizado em cães doentes renais crônicos do Grupo A (A – SF e A-CTM) – São Paulo - 2016	62

Tabela 8 -	Valores individuais da concentração sérica de creatinina (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM), segundo o período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	63
Tabela 9 -	Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	64
Tabela 10 -	Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016.	65
Tabela 11 -	Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc. 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	66
Tabela 12 -	Valores individuais de fósforo sérico (mg/dL) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	66
Tabela 13 -	Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e	

percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	67
Tabela 14 - Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	68
Tabela 15 - Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	69
Tabela 16 - Valores de quartis de FGF-23 sérico dos cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0, T6 e T12 relacionadas com a idade (em meses), as concentrações séricas de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL) e fósforo (sP; mg/dL), e a excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) – São Paulo - 2016.	73
Tabela 17 - Identificação dos cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B (B1 a B13), classificados como estágio 3 de acordo com o estagiamento proposto pela IRIS, com sub-grupos B-SF (cães que receberam solução fisiológica) e B-CTM (cães que receberam células-tronco mesenquimal) com prontuário de identificação no nosocômio, idade (em meses), definição racial, sexo (M: macho; F: fêmea), e tempo em que ocorreu o óbito durante o estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo - 2016	81
Tabela 18 - Tipo de dieta ingerida pelos cães do Grupo B (B-SF e B-CTM) durante o estudo – São Paulo - 2016.	81
Tabela 19. Presença de alterações decorrentes da disfunção renal observadas antes e ao longo do período de acompanhamento, e o tratamento preconizado em cães doentes renais crônicos do Grupo B (B-SF e B-CTM) – São Paulo - 2016	82

Tabela 20 - Valores individuais da concentração sérica de creatinina (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	83
Tabela 21 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	84
Tabela 22 - Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	85
Tabela 23 - Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016.	86
Tabela 24 - Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016.	87
Tabela 25 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil	

25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	88
Tabela 26 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016	89
Tabela 27 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	90
Tabela 28 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	91
Tabela 29 - Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	92
Tabela 30 - Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.....	93
Tabela 31 - Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (Máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam	

solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	94
Tabela 32 - Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) em cães com doença renal crônica no estágio 3 (B – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016.	95
Tabela 33 - Valores de quartis de FGF-23 sérico em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0, T6 e T12, bem como idade (em meses), concentração sérica de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL), fósforo (sP; mg/dL), e excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) – São Paulo - 2016.	100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curvas-padrão obtida no kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) a partir de amostra padrão comercial- São Paulo - 2016	54
Gráfico 2 -	Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	70
Gráfico 3 -	Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.	71
Gráfico 4 -	Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016	75
Gráfico 5 -	Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A-CTM) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016.....	75
Gráfico 6 -	Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016	76
Gráfico 7 -	Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0, T6 e T12– São Paulo - 2016.....	76
Gráfico 8 -	Valores da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	77
Gráfico 9 -	Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0 e T6 – São Paulo - 2016	78
Gráfico 10 -	Box plot dos valores da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP; %) em cães do Grupo A que receberam solução	

fisiológica (A-SF) e dos cães que receberam célula-tronco mesenquimal (A-CTM) avaliados no conjunto dos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	78
Gráfico 11 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	97
Gráfico 12 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	98
Gráfico 13 - Box plot da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A e Grupo B nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	99
Gráfico 14 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016.....	103
Gráfico 15 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016.....	103
Gráfico 16 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo sérico (mg/dL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	104
Gráfico 17 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	104
Gráfico 18 - Box plot da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães do Grupo A e do Grupo B nos tempos T0,T6,12 – São Paulo - 2016.....	105
Gráfico 19 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016....	106
Gráfico 20 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016	107

Gráfico 21 - Box plot dos valores de excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) e dos cães que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	107
Gráfico 22 - Box plot dos valores de excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A e do Grupo B nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016.....	108
Gráfico 23 - Curva de Kaplan-Meier referente a sobrevida dos cães com DRC no Grupo A (estágio 2) e Grupo B (estágio 3) associado ao aumento dos níveis séricos de FGF-23 em T0	114
Gráfico 24 - Curva de Kaplan-Meier referente a sobrevida dos cães com DRC no Grupo B (estágio 3) associado ao aumento dos níveis séricos de FGF-23 em T0 – São Paulo - 2016	115
Gráfico 25 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A e Grupo B em T0 – São Paulo - 2016	116
Gráfico 26 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A-SF e Grupo A-CTM em T0 – São Paulo - 2016	116
Gráfico 27 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo B-SF e Grupo B-CTM em T0 – São Paulo - 2016	117
Gráfico 28 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A e Grupo B em T6 – São Paulo - 2016	117
Gráfico 29 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A-SF e Grupo A-CTM em T6 – São Paulo - 2016	118
Gráfico 30 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo B-SF e Grupo B-CTM em T6 – São Paulo - 2016	118
Gráfico 31 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A e Grupo B em T12 – São Paulo - 2016	119
Gráfico 32 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo A-SF e Grupo A-CTM em T6 – São Paulo - 2016	119

Gráfico 33 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), Grupo B-SF e Grupo B-CTM em T12 ou óbito – São Paulo - 2016.....	120
---	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
2 REVISÃO DE LITERATURA	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 ANIMAIS.....	46
3.2 MÉTODOS	48
3.2.1 Exame de urina.....	48
3.2.2 Determinação da concentração sérica de ureia e creatinina	49
3.2.3 Determinação da pressão arterial sistêmica.....	49
3.2.4 Dosagem de íons e eletrólitos.....	50
3.2.5 Dosagem sérica de FGF-23	50
3.2.6 Validação do FGF-23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Inc) para a espécie canina.....	51
3.2.7 Determinação da excreção fracionada de fósforo na urina.....	55
4 Células-tronco mesenquimais	55
4.1 Separação de células-tronco mesenquimais a partir do cordão umbilical humano	55
4.2 Diferenciação das células-tronco mesenquimais	56
4.3 Injeção de células-tronco mesenquimais.....	57
5 Análise estatística	58
5 RESULTADOS	59
5.1 GRUPO C (CÃES CLINICAMENTE NORMAIS)	59
5.2 GRUPO A (DRC – ESTÁGIO 2).....	60
5.3 GRUPO B (DRC – ESTÁGIO 3)	80
5.4 EFEITOS ADVERSOS OBSERVADOS DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAL.....	111

6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DOS CÃES DO GRUPO B.....	112
7 DISCUSSÃO	121
8 LIMITAÇÕES	141
9 CONCLUSÕES	143
REFERÊNCIAS.....	144

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é a doença renal mais frequentemente diagnosticada nos cães, a qual é caracterizada pela perda gradual de néfrons funcionais, sendo dessa maneira progressiva e irreversível, com consequente perda das funções renais. A progressão da DRC ocorre em parte como consequência do processo de adaptação dos néfrons remanescentes, devido ativação de mecanismos compensatórios tais como hiperfiltração, hipertensão e hipertrofia glomerular, seguida de sobrecarga tubular e inflamação intersticial, dando origem ao “meganéfron”, com o objetivo de compensar a falta dos néfrons funcionais. Entretanto, com a progressão da DRC ocorrerá redução gradativa da taxa de filtração glomerular (TFG), resultando em azotemia e, posteriormente, em uremia (ROUDEBUSH et al., 2010; BARTGES, 2012; POLZIN, 2013).

A redução da TFG culmina em diminuição na excreção de fósforo e posterior hiperfosfatemia, a qual está envolvida no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR), o que contribui com a progressão da DRC (CORTADELLAS et al., 2009; CORTADELLAS et al., 2010; GEDDES et al., 2013a). Atualmente, em humanos e gatos com DRC, sabe-se que mesmo na presença de normofosfatemia, o HPTSR já pode estar acontecendo nos estágios iniciais da DRC, demonstrado por meio de valores elevados do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) (FINCH et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; GEDDES et al., 2013b). Dessa forma, a investigação precoce do HPTSR apenas pela concentração sérica de fósforo não permite identificar o início da retenção de fósforo, uma vez que o FGF-23 pode estar aumentado em pacientes com DRC normofosfatêmicos (FINCH et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2010).

O FGF-23 é uma fosfatonina envolvida no metabolismo mineral, que é sintetizado pelas células ósseas, como osteoblastos, mas principalmente por osteócitos. Os efeitos do FGF-23 é promover a fosfatúria e por meio da redução da absorção intestinal de fósforo, e também causa diminuição no nível do calcitriol (vitamina D ativa). Para que essas ações ocorram, o FGF-23 necessita que seu receptor (FGFR) se ligue a um co-fator chamado Klotho, o qual é uma proteína de membrana, encontrado primariamente no túbulo contorcido distal (TCD), e em

menor quantidade no túbulo contorcido proximal (TCP) (GALVÃO et al., 2013; DOMINGUEZ et al., 2013).

O HPTSR tem etiologia multifatorial. Existe uma complexa interação entre os níveis séricos de fósforo, cálcio iônico, FGF-23, paratormônio (PTH), calcidiol (25(OH)-vitamina D) e o calcitriol (1,25(OH)-vitamina D) durante a evolução da DRC (GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016).

Até o momento algumas teorias têm sido estudadas e discutidas para explicar a fisiopatologia e o desenvolvimento do HPTSR em pacientes com doença renal crônica, e estas incluem: (1) a teoria clássica conhecida como *“trade-off hypothesis”* em que se acreditava que a hiperfosfatemia era o fator principal desencadeante do HPTSR; (2) *“calcitriol trade-off hypothesis”*, que enfatiza a diminuição dos níveis de calcitriol como promotor do aparecimento do HPTSR associado a hiperfosfatemia; (3) a terceira teoria refere-se ao papel do FGF-23, o qual promove fosfatúria e diminui a absorção intestinal de fósforo por meio da redução dos níveis de calcitriol desde os estágios iniciais da DRC até os estágios avançados, e por último (4) a teoria “Klothocêntrica” que defende que a deficiência de Klotho é o principal fator que leva ao desenvolvimento de DRC e do HPTSR (CORTADELLAS et al., 2010; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

No que se refere ao diagnóstico do HPTSR, pode-se indicar diferentes determinações sanguíneas tais como concentração sérica de fósforo, cálcio total e iônico, dosagem de FGF-23 e PTH, bem como mensuração dos metabólitos da vitamina D (calcitriol, calcidiol e 24,25-hidroxilase) (NAGODE, CHEW, PODELL, 1996; CORTADELLAS et al., 2010; CHEW, 2011; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a ; POLZIN, 2013; FOSTER, 2016). Na urina podemos quantificar o fósforo para posterior cálculo da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP), que é definida como a fração de fósforo que não é reabsorvida, a qual é excretada na urina (DIBARTOLA; CHEW; JACOBS, 1980; LAROUTE et al., 2005; BENNETT et al., 2006; LEFEBVRE et al., 2008; VADEN, 2009; MARTINEZ; CARVALHO, 2010; LEFEBVRE, 2011; PRESSLER, 2013). Nos pacientes com DRC, a mensuração da uFEP tem como objetivo avaliar se o mecanismo de fosfatúria está ativado em decorrência da ação do FGF-23 e do PTH, com o intuito de evitar a hiperfosfatemia nos estágios iniciais da DRC. Já nos estágios avançados da DRC, a diminuição de uFEP associada ao aumento de FGF-23 pode indicar mau prognóstico, além de ser um indício da deficiência de Klotho, como já foi demonstrado em pacientes humanos

com DRC (GUTIERREZ et al., 2005; CRAVER et al., 2013; DOMINGUEZ et al., 2013). Portanto, o uso de marcadores precoces como uFEP e FGF-23 em pacientes caninos com DRC e normofosfatemia pode trazer informações mais precoces em relação ao desenvolvimento do HPTSR.

Atualmente, o tratamento da DRC em cães é conservativo, a fim de retardar a progressão da DRC, por meio da correção das complicações decorrente da perda das funções renais tais como dos distúrbios ácido-base e hidreletrolítico, bem como da anemia (normocítica normocrômica não regenerativa), da hipertensão arterial sistêmica (HAS) e da hiperfosfatemia (ROUDEBUSH et al., 2010; BARTGES, 2012; POLZIN, 2013). A restrição de fósforo na dieta é o primeiro passo que há anos vem sendo preconizada para a prevenção ou correção da hiperfosfatemia, sendo esta uma característica importante das dietas de prescrição renal (BROWN et al., 1991; NAGODE, CHEW, PODELL, 1996; BURKHOLDER, 2000; ELLIOT et al., 2000; ROSS et al., 2006; CHEW, 2011; GEDDES et al., 2013a). De acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS) para os cães com DRC, o valor ideal para a concentração sérica de fósforo nos estágios 2, 3 e 4 é de 3,5 a 4,5mg/dL, 3,5 a 5,0mg/dL e 3,5 a 6,0mg/dL, respectivamente. A IRIS recomenda que a dieta hipofosfórica seja indicada a partir do estágio 2 da DRC (IRIS, 2013; POLZIN, 2013). Após introdução de dieta hipofosfórica, o animal deve ser monitorado em um período de quatro a seis semanas, e se caso o controle de fósforo ainda não esteja adequado, faz-se necessário o uso de quelantes intestinais de fósforo (ROUDEBUSCH et al., 2010; POLZIN, 2013; GEDDES et al., 2013a; IRIS, 2015).

Com o recente progresso na pesquisa sobre o tratamento com as células-tronco, têm-se discutido sobre a possibilidade de regeneração tecidual ou, principalmente, da sua ação em minimizar os mecanismos de auto-perpetuação da lesão renal, tanto inflamatórios quanto imunológicos (LANGE et al., 2005; CAO et al., 2010; LIM et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; ZUCCONI et al., 2011), sinalizando como uma nova ferramenta na terapia da DRC em cães (LIM et al., 2016).

Dessa forma, no presente estudo, a hipótese foi avaliar se houve diminuição na progressão do HPTSR e da DRC pelo emprego da terapia com a célula-tronco mesenquimal (CTM), observando se os cães doentes que receberam a referida terapia não desenvolveriam hiperfosfatemia, e elevação dos valores de FGF-23 associado ao aumento da uFEP, ou que essas alterações somente ocorreriam em fases mais tardias ou avançadas da doença. Essas variáveis foram comparadas aos

dados observados nos cães DRC que receberam apenas solução fisiológica, ou seja, aqueles com DRC que foram submetidos apenas a terapia de manutenção rotineiramente preconizada.

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar se a administração de célula-tronco mesenquimal em cães com DRC nos estágios 2 e 3 pode trazer benefícios no sentido de retardar o desenvolvimento do distúrbio do metabolismo de cálcio e fósforo e minimizar a velocidade de progressão da doença renal, avaliado sequencialmente por meio da determinação sérica de fósforo, cálcio total, cálcio iônico e FGF-23 e mensuração da excreção fracionada de fósforo na urina, bem como avaliar a sobrevida associada com valores de FGF-23.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na medicina veterinária, a doença renal crônica (DRC) em cães tem prevalência de 0,5% a 7,0% (LUND; ARMSTRONG; KIRK, 1999; WATSON, 2001), sendo considerada uma das doenças renais mais comuns nesta espécie, independentemente da raça e da idade (LESS, 2004; POLZIN; ROSS; OSBORNE, 2009), e está associada com alta morbidade e mortalidade. A DRC é definida pela presença de alteração estrutural e/ou funcional em um ou em ambos os rins. A DRC apresenta evolução lenta, caracterizada pela perda progressiva de néfrons, e inúmeras das funções renais podem ficar comprometidas (POLZIN, 2013; BARTGES, 2012; POLZIN, 2013).

Os rins apresentam um importante papel na regulação do equilíbrio de fósforo, pois atuam como a via primária de excreção de fósforo. Somente com a perda considerável de grande número de néfrons (aproximadamente de 75% para os cães) é possível detectar a diminuição na taxa de filtração glomerular (TFG) pelos exames laboratoriais de rotina (concentrações de ureia e creatinina sérica) e nesta fase, conseqüentemente, ocorre também menor excreção renal de fósforo, resultando em hiperfosfatemia (POLZIN, 2013; GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

Nas fases iniciais da DRC, antes da perda de 75% dos néfrons, já pode ocorrer a diminuição da excreção renal de fósforo e os valores séricos oscilarem na variação de mínima para a máxima, ainda na faixa considerada de normalidade; este fato pode ocorrer caso o valor normal para aquele indivíduo era no valor mínimo de normalidade e que quando este atingisse o valor superior, já poderia ser considerado patológico. A adaptação dos túbulos renais quando ocorre a retenção sanguínea de fósforo leva aos efeitos fosfatúricos decorrentes das ações do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) e do paratormônio (PTH) (GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

O FGF-23 é uma proteína com 251 aminoácidos sintetizada pelos osteócitos e osteoblastos. Os efeitos do FGF-23 incluem promover diminuição da concentração sérica de fósforo por meio do aumento da excreção renal e também por diminuir a absorção intestinal de fósforo secundária a redução dos níveis de calcitriol, uma vez

que o FGF-23 inibe a atividade enzimática da 1-alfa-hidroxilase (DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

O FGF-23 apresenta duas porções, sendo que a porção N-terminal do FGF-23 se liga a receptores nos tecidos, e a porção C-terminal se liga ao Klotho. Para que o FGF-23 exerça suas ações é necessária a presença de Klotho, o qual é uma proteína transmembrana que atua como co-receptor para o FGF-23. Os rins é o maior sítio de Klotho, mas o Klotho também é expresso em outros locais, como cérebro, coração, testículo, cólon, pâncreas, glândula paratireoide e tiroide. Nos rins, o Klotho é encontrado primariamente nos túbulos contorcidos distais e em menor proporção no TCP, mas sendo neste segmento onde ocorre a sua ação com o FGF-23 (DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

Em pacientes humanos com doença renal crônica tem sido estudado diferentes teorias para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR). São quatro teorias: (1) a teoria clássica conhecida como *“trade-off hypothesis”* em que se acreditava que a hiperfosfatemia era o fator principal desencadeante do HPTSR; (2) a outra teoria chamada de *“calcitriol trade-off hypothesis”*, que enfatiza a diminuição dos níveis de calcitriol como promotor do aparecimento do HPTSR associado a hiperfosfatemia; (3) a terceira teoria que se refere ao papel do FGF-23 promovendo fosfatúria, como também a diminuição da absorção intestinal de fósforo por meio da redução dos níveis de calcitriol desde os estágios iniciais da DRC até estágios mais tardios e, por ultimo, (4) a teoria “Klothocêntrica” que defende que a deficiência de Klotho é o principal fator que leva ao desenvolvimento de DRC e, consequentemente, do HPTSR (GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016).

A teoria clássica que explica o desenvolvimento do HPTSR é chamada de *“trade-off hypothesis”*, a qual se inicia pela perda gradual de néfrons funcionais com menor excreção renal de fósforo e posterior aparecimento de hiperfosfatemia. Nesse momento, a concentração sérica de cálcio iônico tende a diminuir, como consequência do aumento da concentração de fósforo, pois a fração de cálcio quelado com o fósforo aumenta. A hipocalcemia relacionada a fração iônica estimula a síntese de PTH, o qual tem efeito hipercalcêmico. Nesta teoria acreditava-se que a hiperfosfatemia exercia efeito direto no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal pelo aumento na síntese do PTH (SLATOPOLSKY et al., 1971;

SLATOPOLSKY et al., 1972; LAZARETTI et al., 2006; CORTADELLAS et al., 2010). Entretanto, nessa teoria o importante papel do calcitriol não é citado, uma vez que a redução nos níveis de calcitriol não permite inibir a síntese de PTH pela glândula paratireóide (CORTADELLAS et al., 2010; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a).

Na DRC existe poucos túbulos renais viáveis que possam manter a ativação da 25-OH vitamina D (calcidiol) de modo adequado a partir da ação da enzima mitocondrial 1-alfa-hidroxilase, a qual converte o calcidiol (25-OH vitamina D) em calcitriol (1,25-OH vitamina D). Assim, uma vez que os níveis de calcitriol encontram-se reduzidos não ocorrerá eficiente absorção intestinal de cálcio, o que promoveria hipocalcemia e estimularia a maior síntese de PTH. Por isso, posteriormente, foi proposto uma nova explicação para o desenvolvimento do HPTSR, chamada de “*calcitriol trade-off hypothesis*” (CORTADELLAS et al., 2010; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a).

A “*calcitriol trade-off hypothesis*” (Figura 1) descreve que na DRC ocorre perda gradual de néfrons e, conseqüentemente, resultando na diminuição de túbulos renais funcionais, e como a ativação do calcidiol ocorre no interior dos túbulos, essa conversão será comprometida ao longo da progressão da DRC. Além disso, esta teoria sustenta a hipótese de que a hiperfosfatemia também contribui com a deficiência de calcitriol, por meio da inibição da enzima 1-alfa-hidroxilase. Como o calcitriol está envolvido no processo de inibição da síntese de PTH, tal inibição não ocorrerá de modo eficiente e os níveis de PTH se tornarem elevados. Nos estágios iniciais da DRC, o PTH estimula a atividade da enzima 1-alfa-hidroxilase e ainda há conversão do calcidiol em calcitriol, no entanto, conforme a DRC progride, ocorre a perda desse mecanismo e, assim, nos estágios avançados há o aumento da concentração sérica de PTH o que acarreta em diversos efeitos deletérios para o organismo, bem como contribui para a progressão da DRC (CORTADELLAS et al., 2010; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da “*calcitriol trade-off hypothesis*” no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) em cães com doença renal crônica (DRC) – São Paulo - 2016

Adaptado: CHEW, DJ; DIBARTOLA, SP; SCHENCK, PA. Canine and Feline Nephrology and Urology. Elsevier, 2010

Os órgãos-alvo clássicos de ação do PTH são os ossos e os rins. Estudos prévios demonstraram que na DRC este hormônio também pode causar alterações nas funções cerebral, cardíaca, muscular (músculo liso), pulmonar, linfocitária, eritrocitária, pancreática, adrenal e testicular. O PTH, portanto, também atua como uma toxina urêmica, e sua ação é mediada pela maior entrada intracelular de cálcio; quando esse processo se torna contínuo, ocorre inibição da oxidação mitocondrial e da produção de ATP, promovendo a disfunção e morte celular (POLZIN, 2013; CORTADELLAS et al., 2010; GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016).

Ainda, nos estágios iniciais da DRC é difícil a identificação dos fatores que possa desencadear o HPTSR, uma vez que a hipocalcemia, a hiperfosfatemia e a redução do calcitriol são compensadas pelo início com o aumento da síntese de PTH; dessa maneira, a inibição da síntese de calcitriol já poderá ocorrer nos estágios iniciais da DRC (TAN et al., 1997; POLZIN; ROSS; OSBORNE, 2009; POLZIN, 2013). No entanto, o estudo de Cortadellas et al. (2010) demonstrou que o hiperparatireoidismo secundário renal já estava presente em cães doentes renais crônicos no estágio 1, corroborando-se, assim, com a hipótese de que a retenção de

fósforo sérico já pode iniciar nos primeiros estágios de evolução da DRC, antes mesmo de ser detectada a azotemia intensa.

No que se refere à ação do PTH nos estágios iniciais da DRC, o PTH também promove fosfatúria, pois inibe os co-transportadores de sódio-fosfato (NaPi-2a e Napi-2c) impedindo a reabsorção renal de fósforo no TCP e que teria como objetivo evitar a hiperfosfatemia. Além disso, o aumento da síntese de PTH ocorre na tentativa de se restabelecer a concentração normal de cálcio iônico no sangue por meio de três mecanismos: (1) aumento da reabsorção de cálcio na alça de Henle, no túbulo distal e no ducto coletor; (2) aumento da reabsorção de cálcio nos ossos e; (3) pela formação de calcitriol a partir do calcidiol, pois estimula a atividade enzimática da 1-alfa-hidroxilase nos rins (KAPLAN et al., 1979; FUCAGAWA et al., 1991; POLZIN; ROSS; OSBORNE, 2009; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016).

A terceira teoria enfatiza o papel do FGF-23 na fisiopatologia do HPTSR. Recentemente, estudos demonstraram que FGF-23 pode estar envolvido na gênese do HPTSR (ISAKOVA et al., 2011; DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016; SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016). O FGF-23 é uma fosfatonina com ação fostatúrica que tem como objetivo evitar a hiperfosfatemia, pois promove fosfatúria, inibindo a reabsorção tubular renal de fósforo, observado pelo aumento da excreção fracionada urinária de fósforo (GUTIERREZ et al., 2005; DOMINGUÉZ et al., 2013). Além disso, o FGF-23 inibe a atividade da enzima 1-alfa-hidroxilase, o que promove diminuição nos níveis de calcitriol, favorecendo o desenvolvimento do HPTSR, desde os estágios iniciais. Dessa maneira, a síntese de PTH não é inibida pelo calcitriol com a mesma eficiência, o que acarreta no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a ; FOSTER, 2016). Em pacientes humanos com DRC, o aumento precoce do FGF-23 além de promover redução no nível de calcitriol, irá favorecer indiretamente o aumento da síntese de PTH, favorecendo o desenvolvimento do HPTSR, e isso pode ocorrer até mesmo antes de apresentar fosfatúria (WILLIAMS, 2009; OLIVEIRA et al., 2010). Ainda em pacientes humanos com DRC, a concentração de FGF-23 aumenta gradualmente antes do aparecimento de hiperfosfatemia e, além disso, existe correlação negativa significativa entre os níveis de FGF-23 e a taxa de filtração glomerular (OLIVEIRA et al., 2010; HORI; SHIMIZU; FUKUMOTO, 2011; ISAKOVA et al., 2011).

De acordo com Galvão et al. (2013), no estágio bem inicial da DRC (Figura 2) em que já se detecta redução da taxa de filtração glomerular, este processo promove retenção de fósforo e, conseqüentemente, estimula a síntese de FGF-23, a fim de promover fosfatúria, além de reduzir a absorção intestinal de fósforo devido a diminuição de calcitriol. Essas ações do FGF-23 permite que a concentração sérica de fósforo permaneça dentro do valor de normalidade.

Figura 2 - Esquema ilustrativo da teoria que explica o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) nos **estágios bem iniciais (“very early”)** da doença renal crônica (DRC) a partir da teoria do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) – São Paulo - 2016

Adaptado: CHEW, DJ; DIBARTOLA, SP; SCHENCK, PA. Canine and Feline Nephrology and Urology. Elsevier, 2010

Posteriormente, com a progressão da DRC, ocorre maior declínio da taxa de filtração glomerular decorrente da maior perda de néfrons viáveis e, conseqüentemente, menor excreção de fósforo, resultando no aparecimento de hiperfosfatemia intensa e valores ainda mais elevados de FGF-23 (Figura 3). Como a DRC está em progressão, existe maior perda de túbulos funcionais, o que também colabora com a diminuição da síntese de calcitriol, pois a atividade enzimática da 1-alfa-hidroxicatálise ficará comprometida. A redução na síntese de calcitriol resulta na diminuição da concentração sérica de cálcio iônico, o que estimula a síntese e secreção do PTH. Assim, a alta concentração de FGF-23 na DRC pode resultar na deficiência de calcitriol desde os estágios iniciais (GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da teoria que explica o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) nos **estágios iniciais (“early”)** da doença renal crônica (DRC) a partir da teoria do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) – São Paulo - 2016

Adaptado: CHEW, DJ; DIBARTOLA, SP; SCHENCK, PA. Canine and Feline Nephrology and Urology. Elsevier, 2010

Nos estágios mais avançados da DRC, o FGF-23 também tem importante envolvimento na perpetuação do HPTSR (Figura 4), uma vez que nesses estágios existe um maior comprometimento da função renal secundário a perda de maior número de néfrons funcionais, com consequente desenvolvimento de hiperfosfatemia muito mais intensa. Além disso, como resultado da redução do parênquima renal, a diminuição na produção de calcitriol torna-se mais grave, resultante da redução de maior número de túbulos renais. Dessa forma, uma outra consequência é a hipocalcemia que se torna mais importante, pois esta continua estimulando a síntese de PTH na tentativa de reverter a hipocalcemia, porém nos estágios tardios esse mecanismo não é efetivo. Ademais, com a redução do número de néfrons ou de túbulos viáveis, a falta de Klotho (nos túbulos distais e proximais) se tornaria mais grave, não permitindo que as ações do FGF-23 possam ser efetuadas com eficiência, causando a resistência da ação do FGF-23 nos rins e na glândula paratireoide e, consequentemente, com posterior aumento exacerbado dos níveis séricos de FGF-23. Assim, o FGF-23 por sua vez promove maior degradação do calcitriol por meio do aumento da atividade enzimática da 24-hidroxiase, a qual é estimulada pelo FGF-23 para promover catabolismo do calcitriol. Nesse momento,

os níveis séricos de cálcio tornam-se mais reduzidos e a hiperfosfatemia mais intensa, que irá contribuir para a progressão do HPTSR (GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; FOSTER, 2016).

Figura 4 - Esquema ilustrativo do papel do FGF-23 nos **estágios avançados** da doença renal crônica (DRC) contribuindo para a progressão do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) – São Paulo - 2016

Adaptado: CHEW, DJ; DIBARTOLA, SP; SCHENCK, PA. Canine and Feline Nephrology and Urology. Elsevier, 2010

A teoria mais recente foi denominada de teoria Klothocêntrica (Figura 5) em que a deficiência de Klotho é o fator primário no desenvolvimento de DRC e consequentemente do HPTSR, uma vez que a deficiência de Klotho causa resistência à ação do FGF-23 (GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; DOMINGUÉZ et al., 2013; FOSTER, 2016). Estudo prévio com ratos demonstrou que aqueles que apresentavam deficiência de Klotho, também tinham deficiência na ação do FGF-23, além de hiperfosfatemia e diminuição da síntese de calcitriol (SHIMADA et al., 2004). Em outro estudo, ratos que apresentavam grande quantidade de Klotho (*overexpression*) foi demonstrado o efeito anti-envelhecimento (KUROSU et al., 2005; KURO-O, 2009).

Figura 5 - Esquema ilustrativo demonstrando a **teoria klothocêntrica** no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) – São Paulo - 2016

Fonte: https://www.researchgate.net/figure/221857286_fig2_Fig-2-Variations-in-FGF23-Klotho-PTH-active-vitamin-D-and-phosphate-levels-during

Com o intuito de avaliar o efeito fosfatúrico do FGF-23, propõe-se a determinação da excreção fracionada de fósforo urinária (DOMINGUÉZ et al., 2013; CRAVER et al., 2015), pois os rins são responsáveis pela conservação e/ou excreção de eletrólitos, para evitar deficiência ou excesso dos mesmos na corrente sanguínea (LEFEBVRE et al., 2008; CHEW, 2011; LEFEBVRE, 2011; PRESSLER, 2013).

A excreção fracionada de um eletrólito na urina é definido como a fração do eletrólito que foi filtrado, mas não foi reabsorvido e, conseqüentemente, excretado na urina (LAROUTE et al., 2005; LEFEBVRE et al., 2008; VADEN, 2009; MARTINEZ; CARVALHO, 2010; LEFEBVRE, 2011; PRESSLER, 2013). Em cães saudáveis, a uFEP até 40% é considerada normal segundo as referências na espécie em que a variável foi determinada em um só momento (DIBARTOLA; CHEW; JACOBS, 1980; LAROUTE et al., 2005; BENNETT et al., 2006; VADEN, 2009). Entretanto para os cães com DRC, até o momento, não existe estudos de investigação da uFEP de forma sequencial ou prospectiva.

O fósforo é filtrado livremente pelo glomérulo e reabsorvido nos túbulos renais, principalmente no túbulo contorcido proximal (TCP). Entretanto a taxa de reabsorção depende de diversos fatores, tais como: teor de fósforo na dieta, ação de hormônios como o PTH e a taxa de filtração glomerular. O cálculo da excreção fracionada de fósforo na urina é realizado a partir da relação entre as concentrações urinária e sérica de fósforo e corrigida baseada nas concentrações de creatinina urinária e sérica (BENNETT et al., 2006; VADEN, 2009; LEFEBVRE et al., 2008; LEFEBVRE, 2011; PRESSLER, 2013). Embora seja recomendado que para os estudos experimentais a excreção fracionada seja realizada em volume de urina produzida em 24 horas, a amostra de urina obtida em um momento ou pontual ou de uma coleta pode ser utilizada, aplicando-se a fórmula do cálculo da excreção fracionada do eletrólito na urina (BENNETT et al., 2006; LEFEBVRE et al., 2008; LEFEBVRE, 2011; PRESSLER, 2013).

O aumento na excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP) pode indicar retenção de fósforo antes mesmo do desenvolvimento da hiperfosfatemia nos estágios iniciais da doença renal crônica. No entanto, nos estágios mais avançados, a uFEP pode não mais atuar como um mecanismo compensatório em virtude da redução do número de nefrônios funcionais e talvez possa ser utilizada como um indicador de gravidade da disfunção renal (CHEW, 2011; GUTIERREZ et al., 2005; DOMINGUÉZ et al., 2013).

Sabe-se que a hiperfosfatemia está envolvida no desenvolvimento do HPTSR em animais com DRC. Assim, o manejo para minimizar a retenção de fósforo é uma indicação terapêutica muito importante em cães com DRC (FINCO et al., 1992; FINCO, 1995; HOUSTON et al., 2013; ROUDEBUSH et al., 2010; POLZIN, 2013). Entretanto, face ao exposto, a monitoração apenas da concentração sérica de fósforo pode não ser o suficiente para evitar o desenvolvimento do HPTSR, uma vez que já foi demonstrado que o HPTSR já pode ocorrer mesmo em condição de normofosfatemia, como foi demonstrado em pacientes humanos e gatos com DRC (GUTIERREZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010; QUARLES et al., 2012; DOMINGUÉZ et al., 2013; FINCH et al., 2013; GEDDES et al., 2013a; GEDDES et al., 2013b; WAN et al., 2013; PARKER, GILOR, CHEW, 2015; HOKAMP; NABITY, 2016).

Ademais, estudos prévios em humanos com DRC tem demonstrado redução nos níveis de Klotho, associado ao aumento sérico de FGF-23, e que sugere que

valores elevados de FGF-23, associado a diminuição da uFEP, pode suscitar como um indício da reduzida expressão de Klotho nos rins (GUTIERREZ et al., 2005; CRAVER et al., 2013; DOMINGUÉZ et al., 2013).

Nos cães com DRC, o tratamento de manutenção ou conservativo tem como objetivo retardar a progressão da doença, uma vez que se trata de processo de lesão progressiva e irreversível, relacionadas as complicações decorrente da perda das funções renais tais como com o desenvolvimento de hiperfosfatemia, de alterações no equilíbrio ácido-base e hidreletrolítico, bem como de anemia (normocítica normocrômica não regenerativa) e hipertensão arterial sistêmica, além da síndrome urêmica, a qual acomete diferentes sistemas orgânicos, como trato gastrointestinal, neurológico, cárdiorrespiratório e endócrino (CHEW, 2011; POLZIN, 2013).

A restrição de fósforo na dieta é o primeiro passo para prevenção ou correção da hiperfosfatemia, com o objetivo de evitar a progressão do HPTSR. Dessa forma, a alimentação do paciente renal deve ser hipofosfórica e indicada a partir do estágio 2 da DRC. Além disso a dieta de prescrição renal deve apresentar proteínas de alto valor biológico, adição de ácidos graxos ômega-3, propriedade alcalinizante a fim de evitar a acidose metabólica e alta densidade energética (POLZIN et al., 1989; NAGODE, CHEW, PODELL, 1996; BROWN et al., 1998; BURKHOLDER, 2000; JACOB et al., 2002; ROUDEBUSH et al., 2010; POLZIN, 2011; POLZIN, 2013; FRITSCH, JEWELL, 2016).

A *International Renal Interest Society* (IRIS), composto por um grupo de veterinários atuantes na nefrologia veterinária, estabeleceu o valor sérico de fósforo que poderia ser o ideal para ser mantido nos estágios 2, 3 e 4 da DRC, tanto em cães como em gatos no ano de 2006. A restrição de fósforo foi inicialmente investigada em meados dos anos 70 em um estudo experimental de DRC com cães nefrectomizados e que foi demonstrado que aqueles cães que foram alimentados com dieta de manutenção, ou seja, sem restrição de fósforo, observou-se que a medida que ocorria redução da TFG, os valores séricos de PTH aumentaram, entretanto o aumento de PTH não ocorreu nos cães que alimentados com dieta extritamente restrita em fósforo (SLATOPOLSKY et al., 1971). Posteriormente, um outro estudo demonstrou que a medida em que havia redução da TFG, e também ocorrendo a restrição de fósforo na dieta, a concentração de PTH não aumentava (SLATOPOLSKY et al., 1972). Em um outro estudo experimental realizado em cães

nefrectomizados foi observado que os cães que foram alimentados com dieta hipofosfórica apresentaram maior tempo de sobrevida (BROWN et al., 1991). Em 2002 foi realizado um estudo com cães com DRC de ocorrência natural, de delineamento duplo-cego, e foi constatado que mesmo nos estágios mais avançados da DRC, a sobrevida seria maior quando os cães eram alimentados com dieta hipofosfórica, além de se observar diminuição do número de as crises urêmicas (JACOB et al., 2002).

Os efeitos da dieta de prescrição renal, bem como o tempo de sobrevida, também foram avaliados em gatos com DRC nos estágios 2 e 3. Em um estudo realizado por Ross et al. (2006), prospectivo e duplo-cego, um total de 45 gatos foram acompanhados por um período de dois anos e observou-se que o grupo alimentado com a dieta prescrita para doença renal apresentou concentrações séricas de ureia e fósforo significativamente menor que o grupo que submetido a dieta de manutenção, porém não foi detectada diferença em relação aos valores séricos de creatinina e PTH. Ainda, o grupo que recebeu a dieta renal apresentou maior tempo de sobrevida. Um outro estudo realizado em gatos com DRC, também obteve foi observado maior tempo de sobrevida, menores valores séricos de ureia e fósforo nos gatos que foram alimentados com dieta renal (ELLIOT et al., 2000).

Até o momento, não há citação de publicações de estudos do efeito da restrição dietética de fósforo em relação as concentrações séricas de FGF-23 em cães e gatos.

A evidência da literatura veterinária indiretamente sugere que a manutenção de concentrações séricas de fósforo, de acordo com a *International Renal Interest Society* (IRIS), para cada estágio da DRC pode aumentar a sobrevida, além de prevenir ou reverter HPTSR em cães e gatos (POLZIN, 2013; IRIS, 2015). É amplamente aceito o uso associado de quelantes intestinais de fósforo quando apenas a dieta hipofosfórica não é capaz de evitar e controlar a hiperfosfatemia (NAGODE, CHEW, PODELL, 1996). No entanto, até o momento, não existem estudos clínicos controlados que avaliem o efeito dos quelantes intestinais de fósforo em cães com doença renal crônica de ocorrência natural (GEDDES et al., 2013a).

De acordo com a IRIS para os cães com DRC, os valores ideais para as concentrações séricas de fósforo nos estágios 2, 3 e 4 é de 3,5 a 4,5mg/dL, 3,5 a 5,0mg/dL e 3,5 a 6,0mg/dL, respectivamente (GEDDES et al., 2013a; POLZIN, 2013; IRIS, 2015). Após introdução de dieta hipofosfórica, o animal deve ser monitorado

em um período de quatro a seis semanas, e se caso o controle de fósforo ainda não esteja adequado, faz-se necessário o uso de quelantes intestinais de fósforo, como por exemplo, hidróxido de alumínio e carbonato de cálcio (GEDDES et al., 2013a; POLZIN, 2013).

Recentemente, diversos estudos tem sugerido o uso de célula-tronco mesenquimal como uma nova opção de tratamento na doença renal crônica, encorajado a partir de estudos realizado em ratos e camundongos, bem como na espécie felina e canina (CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; QUIMBY et al., 2011; VILLANUEVA et al., 2011; QUIMBY et al., 2013; QUIMBY; DOW, 2015; LIM et al., 2016).

Com o recente progresso na pesquisa sobre a terapia com as células-tronco, tem-se discutido sobre o potencial de regeneração de tecidos acometidos. Assim, tratamentos que visam a possibilidade de regeneração tecidual, ou mesmo de minimizar os mecanismos de auto-perpetuação da lesão renal (inflamatórios e imunológicos), têm sido propostos como uma nova e esperançosa estratégia terapêutica na DRC (MOLLURA; HARE; RABB, 2003; YOKOO et al., 2006; BRODIE; HUMES, 2005). Porém, no caso de lesão renal grave com perda importante da massa renal, não se sabe se a administração de células-tronco poderá trazer algum benefício nesses pacientes, uma vez que as células renais apresentam diferentes funções (MOLLURA; HARE; RABB, 2003; BRODIE; HUMES, 2005; YOKOO et al., 2006).

Estudos em ratos investigaram o potencial da célula-tronco mesenquimal (CTM) em se incorporar no parênquima renal para dar origem a novas células tubulares, mas o processo foi relativamente ineficaz (MORIGI et al., 2004; KITAMURA et al., 2005; ZERBINI et al., 2006; KIM et al., 2007; O'BRIEN; BARRY, 2009; ZUBKO; FRISHMAN, 2009; CHOI, KIM, HWANG, 2010; ASANUMA; MELDRUM; MELDRUM, 2010). As CTMs podem apresentar efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos por efeito parácrino e, desta forma, auxiliar na melhora da função renal por reduzir a inflamação e a fibrose usualmente envolvidas na progressão da DRC (CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2011). Estudos prévios demonstraram que a CTM podem ser administradas por via intravenosa (IV) em humanos e roedores, porem em roedores foi relatado a ocorrência de tromboembolismo pulmonar quando administrada rapidamente por via intravenosa (DEAK et al., 2010). Outras vias para

a aplicação incluem a artéria renal e a administração direta no parênquima renal ou no espaço subcapsular renal (CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2011). Entretanto, a via intravenosa foi a via de administração com melhores resultados referente aos efeitos parácrinos (TOGEL et al., 2005).

Assim, estudos focalizando tais investigações parecem ser encorajadores, pois não se sabe se é possível a regeneração estrutural das mesmas e de suas respectivas funções (YOKOO et al., 2006). Estudos recentes de pesquisadores brasileiros (ALEXANDRE et al., 2009; SEMEDO et al., 2010) em ratos demonstraram que as células-tronco hematopoiéticas (originadas da medula óssea) podem contribuir para a formação de células renais, incluindo as células mesangiais, epiteliais tubulares e podócitos.

As células-tronco são definidas como aquelas capazes de se diferenciar em linhagens celulares especializadas (MOLLURA; HARE; RABB, 2003). São classicamente divididas em dois grandes grupos: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas ou somáticas. A medula óssea e o cordão umbilical apresentam múltiplos tipos de células-tronco e os principais grupos são: hematopoiéticas, mesenquimais, células progenitoras adultas multipotentes e as “side population cells” (KRAUSE; THEISE; COLLEXTOR, 2001).

A obtenção ou a purificação das células-tronco é o cerne da questão, pois é de suma importância para que se possa garantir o isolamento de células purificadas e não imunogênicas e, assim, não ocorrer o comprometimento do estudo. Desta forma, estudos interespecíes têm sido propostos, devido a possibilidade de purificação e identificação adequada das células, pois está na dependência da existência de marcadores específicos que possam assegurar a obtenção do tipo adequado de células (KRAUSE; THEISE; COLLEXTOR, 2001).

Ainda devido a grande dificuldade na extração de grande quantidade de células-tronco, o cultivo celular tem sido empregado com a finalidade de obter quantidade de célula adequada para a terapia (IVANOVIC; BOIRON, 2009). Já existem diversos estudos demonstrando a segurança de aplicação de célula-tronco mesenquimal humana em diversas espécies animais, até mesmo em animais não-imunossuprimidos, o que se deve provavelmente à ação imunomoduladora encontrada neste tipo de célula (LANGE et al., 2005; CAO et al., 2010; LIM et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; ZUCCONI et al., 2011). Vieira et al. demonstraram que

em cães não-imunossuprimidos a célula-tronco mesenquimal humana foi segura (VIEIRA et al., 2011).

Levando tal fato em consideração, a opção pela utilização de célula-tronco mesenquimal oriundas do cordão umbilical de humanos no protocolo de terapia dos cães com doença renal crônica parece ser uma boa opção, pois são células possíveis de serem isoladas de forma purificada, apresentam baixa imunogenicidade e modulam / suprimem a resposta imunológica pela interação com linfócitos T, linfócitos B, células natural-killer e células dendríticas, além de serem capazes de se diferenciar em vários tipos celulares de origem mesenquimal (RYAN, BARRY, MURPHY, 2005; STAGG; GALIPEAU, 2007).

A célula-tronco mesenquimal não expressa moléculas co-estimulatórias necessárias para a ativação completa de células T (BASSI; AITA, 2011), o que pode levar à anergia destas células. Elas também são capazes de migrar a tecidos inflamados e participar de processos regenerativos. Há estudos de co-transplante de células-tronco mesenquimais em transplante de células-tronco hematopoiéticas demonstrando melhora da ação do enxerto e até mesmo a possibilidade de menor reação enxerto *versus* hospedeiro (BATIWALLA; HEMATTI, 2009).

Recentemente foi realizado dois estudos em gatos com DRC de curso natural com o uso de CTM, sendo que em um estudo a administração de CTM foi por via intra-renal guiado por ultrassom (QUIMBY et al., 2011) e em outro estudo por via intravenosa (QUIMBY et al., 2013), entretanto nessas referidas investigações, não foi observada melhora significativa da função renal quando avaliada pela concentração sérica de creatinina, apenas uma melhora moderada quando analisada a partir da determinação da TFG (QUIMBY et al., 2011; QUIMBY et al., 2013).

No nosso conhecimento, o presente estudo em cães com DRC é a primeira investigação com delineamento prospectivo e longitudinal na medicina veterinária em que se avalia o metabolismo mineral de cães doentes renais crônicos submetidos a terapia com célula-tronco mesenquimal de origem humana. A hipótese seria de que a terapia com CTM poderá diminuir a progressão da DRC, observando-se que os cães doentes que receberam a referida terapia não desenvolveriam hiperfosfatemia, e/ou aumento na concentração sérica de FGF-23, como também diminuição na excreção fracionada de fósforo na urina que poderia estar associada ao não controle adequado dos níveis fosfatêmicos. Em suma, a hipótese do estudo

seria de que a administração de célula-tronco mesenquimal (CTM) em cães com DRC, nos estágios 2 e 3, possa trazer benefícios no sentido de retardar a alteração do metabolismo de cálcio e fósforo nos estágios 2 e 3 da DRC.

Portanto, o estudo teve como objetivo específico avaliar, sequencialmente, dois grupos de cães com DRC no estágio 2 (Grupo A) e no estágio 3 (Grupo B), sendo que todos os cães receberam a terapia usualmente preconizada (medicamentosa e/ou dietética), e foram divididos em sub-grupos, ou seja, os que receberam solução fisiológica (SF) e aqueles que foram submetidos a terapia com célula-tronco mesenquimal (CTM), e avaliados por exames laboratoriais, de acompanhamento sequencial, referentes ao metabolismo de cálcio e fósforo por meio da mensuração sérica de fósforo, cálcio total e cálcio iônico, bem como dosagem sérica de FGF-23 e determinação da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP), bem como avaliar a sobrevida associada aos valores de FGF-23.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Todos os cães foram provenientes do atendimento do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais - Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET - FMVZ/USP). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais, protocolado sob o número 2768 / 2012.

Para cumprir com os objetivos propostos foram definidos três grupos:

O grupo denominado como **Grupo C** foi composto por 15 cães clinicamente normais. Todos os animais do grupo C foram submetidos a realização de exames laboratoriais tais como: hemograma com contagem de plaquetas; ureia e creatinina; albumina e proteínas totais; alanino aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA); colesterol e triglicérides; cálcio total e fósforo; hemogasometria; eletrólitos (sódio, potássio, cloreto e cálcio iônico); exame de urina e urocultura; exame ultrassonográfico abdominal e aferição da pressão arterial sistólica, a fim de excluir enfermidades. Também foi determinado os valores de FGF-23 sérico e realizado o cálculo da uFEP, para estabelecer um valor de normalidade, o qual foi obtido a partir dos valores de percentil 25% e 75%.

Para os **Grupos A e B**, foram selecionados 22 cães com diagnóstico de DRC (estágio 2, n=9; estágio 3, n=13), de acordo com o estagiamento proposto pela IRIS (estágio 2: creatinina sérica = 1,4 a 2,0 mg/dL; estágio 3: 2,1 a 5,0 mg/dL).

Para que os cães DRC avaliados compusessem o grupo de estudo, foi adotado como critério de inclusão a presença de anormalidades nos exames complementares relacionados a detecção de alteração renal. Dessa forma para ser incluído era necessário a presença de azotemia persistente (após excluir azotemias pré ou pós-renal), isostenúria e/ou alteração morfológica dos rins ao exame ultrassonográfico, o qual foi realizado nos tempos T0, T6 e T12, sendo que no momento T0, todos os cães doentes renais crônicos selecionados já deveriam apresentar alteração morfológica dos rins como um dos critérios de inclusão para o

estudo. Todos os cães que foram considerados candidatos para inclusão no estudo foram acompanhados por um período aproximado de três meses antes de T0.

Os critérios de exclusão para a seleção de cães com DRC incluíram: endocrinopatias, neoplasias, hepatopatias, neuropatias, insuficiência cardíaca congestiva, terapia prévia com células-tronco, histórico de alterações neurológicas, piometra e doenças infecciosas (como leishmaniose, erliquiose, hemoparasitoses e leptospirose). Ao longo de estudo, não foi adotado nenhum critério de exclusão.

Os cães com DRC foram divididos em dois grupos da seguinte forma: **Grupo A** – cães com DRC no estágio 2 (n=9), submetidos a terapia usualmente preconizada (medicamentosa e/ou dietética) e administração de solução fisiológica (**Grupo A – SF, n=6**) e o outro grupo de cães com DRC no estágio 2, que além de submetidos a terapia usualmente preconizada (medicamentosa e dietética), receberam a aplicação de células-tronco mesenquimal (**Grupo A – CTM, n=3**); e **Grupo B** – cães com DRC no estágio 3 (n=13), submetidos a terapia usualmente preconizada (medicamentosa e dietética) e administração de solução fisiológica (**Grupo B – SF, n=6**) e outros cães com DRC no estágio 3, submetidos a terapia usualmente preconizada (medicamentosa e dietética) e com aplicação de célula-tronco mesenquimal (**Grupo B – CTM, n=7**). Os cães com DRC foram acompanhados em 12 ocasiões, com intervalo de 30 a 45 dias, exceto em três cães do Grupo A e em três cães do Grupo B, os quais seus respectivos tutores tiveram maior dificuldade em cumprir o tempo de intervalo proposto inicialmente. O tempo T0 foi denominado para o momento da administração de SF ou de CTM e os intervalos de avaliações por T1 a T12 sucessivamente, exceto para os que vieram a óbito antes do término do tempo de acompanhamento proposto. Os cães que foram acompanhados com maior intervalo de tempo foram os cães A6 (entre T8 a T9: 57 dias), A7 (entre T8 a T9: 56 dias), A9 (entre T2 a T3: 64 dias e entre T4 a T5: 71 dias), B2 (entre T4 a T5: 52 dias), B5 (entre T0 a T1: 54 dias e entre T3 a T4: 58 dias) e B13 (entre T5 a T6: 79 dias).

Todos os cães doentes renais crônicos foram submetidos ao tratamento conservador, por meio da correção, quando necessário, do distúrbio hidreletrolítico e ácido-base, do controle da pressão arterial sistêmica, do uso de dieta renal (hipofosfórica), do controle da hiperfosfatemia, e do tratamento de afecções concomitantes que pudessem contribuir para a progressão da DRC, tal como a infecção do trato urinário (POLZIN, 2013).

Todos os cães (cl clinicamente normais e DRC) foram submetidos à mensuração da pressão arterial sistólica e à coleta de sangue para realização de exames subsidiários tais como hemograma, contagem de plaquetas, ureia e creatinina, cálcios total e iônico, fósforo, albumina, proteínas totais, colesterol, triglicérides, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), hemogasometria e eletrólitos (sódio, potássio e cloreto), além da coleta de urina para exame de urina, urocultura e determinações de creatinina e fósforo.

A descrição dos materiais e métodos que foram utilizados durante o estudo segue na sequencia.

3.2 MÉTODOS

Todas as amostras de sangue e urina foram coletadas no período matutino em jejum alimentar de 12 horas, a fim de evitar alterações nas mensurações decorrentes do ciclo cicardiano. O sangue foi coletado das veias jugular externa, cefálica ou safena e acondicionada em frascos com EDTA e outro com gel ativador da coagulação.

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese ou cateterização uretral (apenas em machos) e processadas em até uma hora para a urocultura e de até 12 horas para o exame de urina, bem como para dosagem do fósforo urinário, após a coleta. Além disso, o sobrenadante das amostras de urina foi armazenado a temperatura de -70°C .

3.2.1 Exame de urina

As amostras foram avaliadas com relação às características físico-química e o sedimento urinário analisado em microscopia óptica, bem como realizada a urocultura conforme as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP.

3.2.2 Determinação da concentração sérica de ureia e creatinina

As amostras foram avaliadas conforme as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP, utilizando-se kits comerciais: ureia (ureia CE, ref 27, Labtest) e creatinina sérica (creatinina K, ref 96, colorimétrico – picrato alcalino – Jaffé, Labtest).

3.2.3 Determinação da pressão arterial sistêmica

A pressão arterial sistêmica foi mensurada pelo método indireto com *Doppler*, e foi considerada apenas a mensuração da pressão sistólica. O paciente foi ambientalizado em local calmo e quieto, na ausência de outros animais e, se possível, na presença do tutor, por um período mínimo de dez minutos. A mensuração foi realizada antes do exame físico, da coleta de material biológico ou de qualquer intervenção terapêutica nasocomial. Foi realizada tricotomia entre os coxins carpal e metacarpiano, e utilizado gel acústico para o uso do transdutor de ultrassom (Modelo 811-B Doppler Ultrasonic Flow Detector, Parks Medical Electronics, Inc - Oregon, EUA) para a detecção do fluxo sanguíneo na artéria mediana (BROWN et al., 2007).

Foram utilizados manguitos que apresentasse, aproximadamente, a largura de 40% da medida total da circunferência do membro torácico (ao nível do terço médio de radio e ulna). Caso não houvesse manguito com a medida exata, foi indicado aquele com a medida imediatamente superior, a fim de evitar superestimação dos valores de pressão arterial na leitura. Era permitido que o paciente fosse mantido em decúbito esternal, lateral direito, lateral esquerdo ou estar sentado, desde que o membro utilizado na mensuração estivesse na mesma altura da válvula aórtica. Sempre que possível, as aferições foram realizadas pelo mesmo operador, mantendo-se também o animal na mesma posição e atitude. Ainda, foram realizadas seis mensurações, sendo a primeira delas descartada. O valor considerado como a pressão arterial sistêmica sistólica do paciente (em mm Hg) foi

dado pela média aritmética das demais medidas. Nos casos de dúvida quanto à mensuração, com o paciente calmo, foi trocado o local de colocação do manguito e procedido nova leitura. A definição de hipertensão sistêmica ($>160\text{mm Hg}$) ou não foi confirmada após duas mensurações sequenciais, com intervalo de aproximadamente 7 dias entre elas. Para os cães normotensos, foi feita uma reavaliação em 1 a 2 meses (BROWN et al., 2007; STEPIEN, 2010). A pressão arterial foi mensurada ao longo do período de acompanhamento.

3.2.4 Dosagem de íons e eletrólitos

Em todos os momentos de avaliação (T0 a T12), as determinações de cálcio iônico e cálcio total no soro e da hemogasometria de sangue venoso foram realizadas no analisador bioquímico automático (Labmax 240, Labtest®) e nos equipamentos Cobas B 221 (Roche®) e Radiometer (ABL80 Flex), respectivamente. A dosagem sérica de fósforo foi determinada com o kit comercial Phosphorus (Biosystems) no aparelho Labmax 240, também determinado em todos os momentos de avaliação (T0 a T12).

3.2.5 Dosagem sérica de FGF-23

A dosagem sérica de FGF-23 foi realizada pelo método imunoenzimático (ELISA) com o kit humano FGF-23- ELISA Kit (Kainos Laboratories, Inc, Japão) nos tempos 0, 6 e 12 (T0, T6 e T12) nos cães com DRC e pontualmente nos cães clinicamente normais (Grupo C).

O método imunoensaio enzimático apresenta dois anticorpos monoclonais murinos específicos que ligam-se ao FGF-23. Um anticorpo é imobilizado no poço da placa de microtitulação para captura. O outro anticorpo é conjugado com HRP (*horseradish peroxidase*) para detecção. Na primeira reação, uma amostra contendo FGF-23 é incubada com o anticorpo imobilizado num poço de microtitulação. O FGF-23 na amostra é capturado com o anticorpo. No final desta reação, o poço é lavado

para remover o FGF-23 não ligado e outros componentes. Na segunda reação, este FGF-23 imobilizado é incubado com anticorpo marcado com HRP para formar um complexo "sanduíche". No final desta reação, o poço é lavado para remover os componentes não ligados. Na reação enzimática, o complexo sanduíche imobilizado no poço é incubado com uma solução de substrato e depois medido por um leitor espectrofotométrico de placas de microtitulação. A atividade enzimática do complexo ligado ao poço é diretamente proporcional à quantidade de FGF-23 na amostra. Uma curva padrão é gerada traçando a absorbância em relação a cada concentração de FGF-23 padrão. A concentração de FGF-23 na amostra é determinada a partir desta curva.

Os valores de FGF-23 foram avaliados individualmente nos tempos T0, T6 e T12 (ou óbito).

Em cada um dos tempos avaliados, foram determinados os valores dos quartis de FGF-23 a partir do percentil de 25%, mediana e percentil 75% de cada grupo de cães com DRC (Grupos A e B). Assim, em cada grupo, os quartis foram determinados de acordo com o tempo da coleta (T0, T6 e T12) do Grupo A (SF e CTM) e do Grupo B (SF e CTM).

3.2.6 Validação do FGF-23 ELISA kit (Kainos Laboratories, Inc) para a espécie canina

O kit comercial de FGF-23-ELISA (Kainos Laboratories, Inc, Japão) foi validado para a espécie canina, antes de serem realizadas as mensurações de FGF-23 nos cães do presente estudo. As determinações foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Professor Ramiro Toribio do College of Veterinary Medicine, da The Ohio State University em Ohio nos Estados Unidos da América.

Foram utilizadas 10 amostras de soro canino para o ensaio da validação do kit ELISA de FGF-23 (Kainos Laboratories, Inc), cuja origem não era dos eram os cães com DRC que foram selecionados para o estudo com a CTM. As amostras foram selecionadas de acordo com a expectativa clínica quanto às diferentes concentrações séricas de FGF-23 e, assim, foram consideradas e denominadas como: aumentadas (HIGH; n=4; Amostras #7 a #10), normais (NORMAL; n=3;

Amostras #4 a #6) ou diminuídas (LOW; n=3; Amostras #1 a #3). As amostras consideradas como HIGH foram obtidas a partir de cães com DRC no estágio 4 e hiperfosfatemia intensa (fósforo sérico > 6,9mg/dL) em que era esperado valores elevados de FGF-23 sérico; as amostras classificadas como NORMAL foram coletadas de cães com DRC no estágio 1 (creatinina sérica <1,4mg/dL e que estava associada a presença de pelo menos um marcador de lesão renal, como alteração morfológica do parênquima renal ao exame ultrassonográfico ou isostenúria e que, ainda, não apresentasse hiperfosfatemia, sendo a concentração de fósforo sérico de 4,2 a 4,6mg/dL) em que era esperado não observar alteração importante nos valores de FGF-23; e as amostras categorizadas como LOW foram provenientes de cães clinicamente normais e sem evidências de lesão renal e que apresentassem concentração de fósforo sérico inferior a 2,3mg/dL e que, assim, era esperado valor de FGF-23 normal, ou possivelmente inferior as amostras HIGH e LOW.

Para a determinação do coeficiente de variação **no intra-ensaio** (precisão) em uma mesma amostra (HIGH, NORMAL ou LOW, e padrão), o FGF-23 foi determinado em quatro mensurações consecutivas (Tabela 1).

Para a realização do **inter-ensaio**, o FGF-23 foi mensurado em três ocasiões ou dias diferentes, utilizando-se três diferentes kits, sendo que as mensurações foram realizadas em duplicata (Tabela 2). No Gráfico 1 está apresentada as curvas-padrão do FGF-23 obtidas em quatro diferentes kits a partir da amostra padrão fornecida no kit, e que de certa forma também foi avaliado o paralelismo diluicional do teste.

Tabela 1 - Resultados do intra-ensaio do kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) com amostras de soro canino e valor do coeficiente de variação (CV; %) – São Paulo - 2016

Amostra	mín. e máx. para concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) na mesma amostra, repetida em quatro mensurações	Intra-ensaio CV (%)
Amostra #1	262,5 – 275,6	1,9
Amostra #2	195,8 – 211,0	3,0
Amostra #3	182,1 – 204,5	4,3
Amostra #4	284,4 – 296,2	1,6
Amostra #5	380,5 – 414,0	3,6
Amostra #6	368,9 – 382,6	1,4
Amostra #7	12460,3 a 13556,9	3,3
Amostra #8	18311,4 – 18738,5	2,3
Amostra #9	24822,1 – 26889,8	2,9
Amostra #10	58870,1 – 64664,6	3,7
Média		2,8

Legenda: mín.: mínimo; máx.: máximo; CV: coeficiente de variação.

Tabela 2 - Resultados do inter-ensaio do kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) com amostras de soro canino e valor do coeficiente de variação (CV; %) – São Paulo - 2016

Amostra	mín. e máx. para concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) das mesmas amostra em três diferentes dias / placas (duplicata)	Inter-ensaio CV (%)
Amostra #1	219,5 – 275,6	6,6
Amostra #2	181,3 – 211,0	7,6
Amostra #3	162,2 – 204,5	6,3
Amostra #4	209,1 – 296,2	14,9
Amostra #5	324,0 – 523,9	14,7
Amostra #6	335,9 – 395,1	4,2
Amostra #7	11013,7 – 13556,9	6,8
Amostra #8	15948,6 – 20163,6	7,8
Amostra #9	20176,0 – 26889,8	8,9
Amostra #10	45142,9 – 64184,1	10,5
Média		8,8

Legenda: mín.: mínimo; máx.: máximo; CV: coeficiente de variação.

Gráfico 1 - Curvas-padrão obtida no kit FGF-23 ELISA (Kainos Laboratories) a partir de amostra padrão comercial- São Paulo - 2016

3.2.7 Determinação da excreção fracionada de fósforo na urina

A determinação da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP) foi realizada a partir de uma alíquota de urina para dosagem de fósforo urinário, coletada no período da manhã em jejum alimentar de 12 horas, juntamente com a coleta concomitante de sangue para dosagem sérica de fósforo e creatinina. A urina foi coletada de forma asséptica por cistocentese ou cateterismo uretral (apenas para cães machos) para dosagem urinária de fósforo, a qual foi realizada no aparelho Randox Daytona (Randox®), nessa mesma amostra também foi realizado o exame de urina e a urocultura a fim de assegurar ausência de hematúria e bacteriúria. A urina foi centrifugada por 10 minutos a 1000rpm, e o sobrenadante estocado em freezer numa temperatura de -80°C em frascos eppendorfs estéreis. O cálculo da uFEP foi determinado utilizando a fórmula descrita (BENNETT et al., 2006; VADEN, 2009; PRESSLER, 2013) que segue abaixo:

$$\text{uFEP (\%)} = \frac{(\text{fósforo urinário}) / (\text{fósforo sérico})}{(\text{creatinina urinária}) / (\text{creatinina sérica})} \times 100$$

4 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

4.1 Separação de células-tronco mesenquimais a partir do cordão umbilical humano

Esta etapa foi realizada pelo grupo de pesquisa de Nefrologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP), coordenado pela Profa. Dra. Lúcia da Conceição Andrade. Neste estudo foram utilizadas células-tronco mesenquimais (CTM) de cordão umbilical humano obtido no pós-parto de mulheres voluntárias, após serem orientadas sobre o objetivo do procedimento e concordar com o termo de consentimento. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Hospital Universitário (HU-USP) (1278/13), pela Comissão Interna para Avaliação de Projetos de Pesquisa (CIAPP) da Clínica

Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (276/10) e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina na Universidade de São Paulo, que inclui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEP-FMUSP) (0003/11).

As células-tronco mesenquimais (CTM) foram provenientes do estroma do cordão umbilical humano ou da geleia de Wharton. O cordão foi transportado em um frasco refrigerado a 4°C, o qual foi adicionado antibiótico e PBS (*Phosphate Buffer Solution*). Após a coleta e o transporte, o processamento foi feito de forma estéril em uma cabina de biossegurança tipo II. Posteriormente, o cordão foi lavado com PBS e cortado em pedaços de cerca de 0,5 cm², que foram aderidos em placas de seis poços e acrescentado o meio de cultura α -MEM (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), que foi suplementado com 20% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), estreptomicina 100ug/ml, penicilina 100U/ml, (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e incubados a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5% (ThermoForma, Estados Unidos). A cada 3 dias foi realizado a troca do meio de cultura. As garrafas foram tripsinizadas quando as células atingiram 80 a 90% de confluência, seguido pela expansão das células em cultura até a passagem 4 (P4), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido. Método Explant.

Os *explants* foram mantidos por 15 a 25 dias, enquanto que o meio de cultura foi trocado de 2 a 3 vezes por semana. Os *explants* foram retirados quando as células atingiram 80% de confluência. As placas foram tripsinizadas (Gibco, Estados Unidos) e por fim, a cultura foi expandida para garrafas de 25cm² na primeira passagem e em 75 cm² nas demais passagens.

4.2 Diferenciação das células-tronco mesenquimais

Uma vez cultivadas, para a caracterização funcional das células-tronco mesenquimais foram aplicados três testes de plasticidade: (1) diferenciação adipogênica, (2) diferenciação osteogênica e (3) diferenciação condrogênica, conforme descritos no protocolo de diferenciação de células-tronco mesenquimais

utilizadas nos cães com DRC. Células-tronco mesenquimais da primeira ou segunda passagem foram cultivadas em meio de cultura α -MEM até atingirem confluência, quando o meio de cultura α -MEM foi trocado pelo meio de cultura de indução de adipogênese (meio basal de diferenciação de adipócito STEMPRO® com suplemento para adipogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA), osteogênese (meio basal de diferenciação de osteócito STEMPRO® com suplemento para osteogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA) ou condrogênese (meio basal de diferenciação de condrócito STEMPRO® com suplemento para condrogênese STEMPRO® (Life Technologies, Waltham, EUA). Para avaliar a adipogênese, níveis de diferenciação foram examinados por microscopia, com coloração de Oil Red, que permite a visualização de vesículas adiposas presentes nas células. Para a avaliação da diferenciação osteogênica, as células foram analisadas por microscopia com coloração vermelho de alizarina, que visualiza sais de cálcio. Para confirmar a diferenciação condrogênica, foi utilizada a coloração Alcian blue, com a visualização de polissacarídeos sulfatados.

4.3 Injeção de células-tronco mesenquimais

Após o descongelamento das células, foi feita ressuspensão delas em soro fisiológico, com recontagem e diluição para que 10^6 células/kg fossem injetadas em cada animal, num volume de 500 microlitros por cão. As células foram injetadas nos cães por veia periférica lentamente, diluídas em solução fisiológica. As seringas já com conteúdo (SF apenas ou CTM) era identificado com o nome do animal, sem que fosse possível identificar a presença ou não de CTM nas mesmas. Todas as seringas foram protegidas com papel alumínio e mantidas sob refrigeração até o momento da aplicação.

5 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o software Graphpad Prism® 7.0a. Todas as variáveis foram calculadas em todos os cães tais como média, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 25% e percentil de 75%. Os valores que foram considerados na faixa de normalidade para a uFEP e o FGF-23 foram obtidos a partir dos cães clinicamente normais (Grupo C) pelos valores de percentil 25% e do percentil 75%. Os valores de FGF-23 sérico também foram analisados de acordo com os quartis nos Grupos A e B e nos diferentes tempos, ou seja, em T0, T6 e T12, sendo que o cálculo do quartil foi realizado a partir do cálculo da mediana, percentis 25% e 75%. Para avaliação de diferença estatística entre os Grupos A (SF e CTM) e B (SF e CTM) foi aplicado o teste D'Agostino-Pearson Omnibus e para testar a normalidade, posteriormente o teste de Mann-Whitney para as variáveis FGF-23, uFEP e fósforo sérico, uma vez que os dados das referidas variáveis apresentaram distribuição não-paramétrica. Para comparar os valores de FGF-23 do Grupo C com o Grupo A (A-SF e A-CTM) foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para realização da correlação entre FGF-23 e uFEP, entre FGF-23 e fósforo sérico e entre uFEP e fósforo sérico, foi aplicada a correlação de Spearman, após utilizado o teste D'Agostino-Pearson Omnibus. Os gráficos de box plot foram realizados no software Graphpad Prism® 7.0a. Foi considerado diferença estatística significante quando valor de P foi inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 GRUPO C (CÃES CLINICAMENTE NORMAIS)

Os cães do Grupo C (n=15) apresentaram idade média $\pm$ EPM de $48,4 \pm 9,7$ meses (mínimo de 8 e máximo de 108 meses), sendo machos (53,3%) e fêmeas (46,7%) em frequência similar (Tabela 3). Os cães sem raça definida (SRD) foram relativamente mais frequentes (n=9; 60,0%), e as demais raças corresponderam a 6,7% cada e incluíram golden retriever, pinscher, yorkshire, pitbull e bull terrier (Tabela 3). Na Tabela 4 estão inclusos os valores individuais das concentrações sérica de ureia, creatinina, fósforo, cálcio total e iônico, além da creatinina urinária, excreção urinária fracionada de fósforo e concentrações séricas de FGF-23. Em relação aos valores de normalidade considerados para fins de comparação com os valores obtidos nos cães com DRC, foi adotado como faixa de normalidade para este estudo o intervalo dos valores de percentil 25% e de percentil 75% (Tabela 4).

Tabela 3 – Identificação dos cães clinicamente normais - Grupo C (C1 a C15) quanto a idade (em meses), definição racial e sexo (M: macho; F: fêmea), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo – 2016

nº	Idade (meses)	Peso (kg)	Raça	Sexo
C1	60	6,8	Pinscher	Macho
C2	84	17,0	SRD	Fêmea
C3	12	21,6	SRD	Macho
C4	24	6,9	Teckel	Macho
C5	12	29,1	Golden retriever	Macho
C6	08	21,0	SRD	Fêmea
C7	08	16,8	SRD	Fêmea
C8	08	15,3	SRD	Fêmea
C9	60	34,2	SRD	Fêmea
C10	108	3,2	Yorkshire	Macho
C11	24	16,0	SRD	Macho
C12	96	31,5	Pitbull	Fêmea
C13	108	24,5	Bull terrier	Fêmea
C14	54	18,0	SRD	Macho
C15	60	12,0	SRD	Macho

Legenda: C: cães clinicamente normais; M: macho; F: fêmea; SRD: sem raça definida

Tabela 4 – Valores séricos individuais de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL), cálcio total (Catt; mg/dL), cálcio iônico (iCa; mmol/L) e fósforo (sP; mg/dL), da creatinina urinária (uCr; mg/dL), da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) e do fator de crescimento de fibroblastos 23 sérico (FGF-23; pg/mL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 25% (perc 25%), percentil 75% (perc 75%) e variação dos valores de normalidade (VN) de cães clinicamente normais (Grupo C de C1 a C15), atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016

C	sU	sCr	Catt	iCa	sP	uCr	uFEP	FGF-23
C1	32,8	0,77	8,76	1,328	2,24	0,77	20,75	144,6
C2	38,1	0,79	9,22	1,389	1,53	0,79	28,89	254,6
C3	36,1	0,73	10,89	1,393	4,01	0,73	8,35	371,1
C4	35,3	1,09	9,32	1,384	3,47	1,09	21,10	248,3
C5	35,0	0,98	9,48	1,446	2,32	0,98	30,66	236,3
C6	53,4	0,83	9,89	1,455	5,42	0,83	8,97	288,6
C7	38,3	0,95	9,62	1,466	5,36	0,95	12,19	322,3
C8	51,2	1,07	9,89	1,437	5,71	1,07	8,29	359,6
C9	49,3	0,61	9,89	1,398	2,72	0,61	0,90	184,5
C10	38,7	0,66	8,73	1,358	3,70	0,66	2,69	145,0
C11	43,2	0,75	9,48	1,342	1,86	0,75	6,36	422,7
C12	33,0	1,10	7,47	1,346	2,94	1,10	67,60	223,5
C13	25,2	1,00	9,33	1,434	2,46	1,00	2,83	230,0
C14	46,0	0,84	8,11	NR	3,91	0,84	10,15	274,6
C15	28,1	0,89	8,03	NR	3,55	0,89	66,26	245,5
Média	38,9	0,87	9,21	1,390	3,41	0,87	19,73	263,4
Mediana	38,1	0,84	9,33	1,393	3,47	0,84	10,15	248,3
DP	8,25	0,16	0,87	0,046	1,31	0,16	21,21	79,68
EPM	2,13	0,04	0,22	0,013	0,34	0,04	5,47	20,57
CV	21,2	17,94	9,46	3,31	38,32	17,94	107,50	30,25
Mín.	25,2	0,61	7,47	1,328	1,53	0,61	0,90	144,6
Máx.	53,4	1,10	10,89	1,466	5,71	1,10	67,60	422,7
Perc 25%	33,0	0,75	8,73	1,352	2,32	0,75	6,36	223,5
Perc 75%	46,0	1,00	9,89	1,442	4,01	1,00	28,89	322,3
VN	20 - 40*	Até 1,4**	9,0 - 11,5*	1,2 - 1,5*	Até 4,5**	-	6,36 - 28,89	223,5 - 322,3

Legenda: NR: não realizado; Obs: os valores de normalidade de uFEP e de FGF-23 foram estabelecidos a partir dos valores de percentil 75% e percentil 25% dos cães clinicamente normais – Grupo C; *Os valores de normalidade para concentração sérica de ureia (sU), cálcio total (Catt) sérico e cálcio iônico (iCa) foram adotados do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET – FMVZ/USP); **: Os valores de creatinina sérica (sCr) e de fósforo sérico (sP) foram retirados do estagiamento proposto pela International Renal Interest Society (IRIS), e de trabalhos com cães doentes renais crônicos previamente publicados (CORTADELLAS et al., 2010; ROUDEBUSH et al., 2010; CHEW, 2011; POLZIN, 2013; GEDDES et al., 2013a).

5.2 GRUPO A (DRC – ESTÁGIO 2)

Os cães do Grupo A (n=9) apresentaram idade média $\pm$ EPM de $107,1 \pm 22,8$ meses (mínimo de 24 e máximo de 192 meses), sendo que 55,5% eram fêmeas (Tabela 5). Quanto à distribuição racial, o poodle (n=2) e o shih tzu (n=2) foram as raças mais frequentes (correspondendo a 22,2% cada), as demais raças incluíram lhasa apso (n=1; 11,1%), golden retriever (n=1; 11,1%); labrador retriever (n=1; 11,1%), pug (n=1; 11,1%), buldogue americano (n=1; 11,1%) (Tabela 5). A dieta que

os cães com DRC do Grupo A receberam está descrita na Tabela 6. Nenhum dos animais do Grupo A fizeram uso de quelante intestinal de fósforo. Na Tabela 7 está descrito sobre a presença de alterações decorrentes da disfunção renal que os animais do Grupo A já apresentavam ou que desenvolveram ao longo do período de acompanhamento do estudo.

Tabela 5 – Identificação dos cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo A (A1 a A9), classificados como estágio 2 de acordo com o estagiamento proposto pela IRIS, com sub-grupos A-SF (cães que receberam solução fisiológica) e A-CTM (cães que receberam célula-tronco mesenquimal - CTM) com prontuário de identificação no nosocômio, idade (em meses), peso (kg), definição racial, sexo (M: macho; F: fêmea), e tempo em que ocorreu o óbito durante o estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo – 2016.

Grupo	Cão DRC	Idade	Peso (kg)	Raça	Sexo	Óbito no estudo?
A-SF	A1	24	28,7	Bulldogue americano	F	Não
	A2	120	8,8	Pug	M	Não
	A3	36	33,6	Golden retriever	F	Não
	A4	144	42,0	Labrador retriever	M	Não
	A5	25	11,6	Shih tzu	F	Não
	A6	180	6,6	Lhasa apso	M	Não
A-CTM	A7	192	3,2	Poodle	F	Não
	A8	168	4,2	Poodle	M	Não
	A9	75	5,0	Shih tzu	F	Não

Legenda: **A**: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS); **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica; **CTM**: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal; **SRD**: sem raça definida; M: macho; F: fêmea

Tabela 6 - Tipo de dieta ingerida pelos cães do Grupo A (A-SF e A-CTM) ao longo do período de acompanhamento – São Paulo - 2016

Grupo A-SF	Dieta
A1	Comercial (para cães nefropatas)
A2	Caseira (hipofosfórica)
A3	Comercial (para cães nefropatas)
A4	Comercial (para cães nefropatas)
A5	Comercial (para cães nefropatas)
A6	Comercial (para cães nefropatas) + caseira (hipofosfórica)
Grupo A-CTM	Dieta
A7	Comercial (para cães nefropatas)
A8	Comercial – manutenção (cães adultos)
A9	Comercial – manutenção (cães adultos)

OBS: Caseira: composta por arroz, peito de frango, cenoura, chuchu, sal e óleo de girassol; Comercial: variação de proteínas de 14,0 a 14,5% e fósforo de 0,17 a 0,30% na matéria seca (MS); A-SF: cães com DRC no estágio 2 que receberam solução fisiológica; A-CTM: cães com DRC no estágio 2 que receberam célula-tronco mesenquimal.

Tabela 7 - Presença de alterações decorrentes da disfunção renal observadas antes e ao longo do período de acompanhamento, e o tratamento preconizado em cães doentes renais crônicos do Grupo A (A – SF e A-CTM) – São Paulo - 2016

Grupo A-SF	Complicação?	Qual?	Tempo (T)	Tratamento
A1	Sim	Acidose metabólica	Antes de T0	BIC - VO
A2	Não	-	-	-
A3	Não	-	-	-
A4	Não	-	-	-
A5	Não	-	-	-
A6	Sim	Acidose metabólica	Antes de T0	BIC - VO
Grupo A-CTM	Complicação?	Qual?	Tempo (T)	Tratamento
A7	Não	-	-	-
A8	Sim	Acidose metabólica	T7	BIC - VO
A9	Não	-	-	-

Legenda: BIC: bicarbonato de sódio; VO: via oral; A-SF: cães com DRC no estágio 2 que receberam solução fisiológica; A-CTM: cães com DRC no estágio 2 que receberam célula-tronco mesenquimal.

Os resultados referentes às concentrações sérica de ureia e creatinina, bem como das variáveis relacionadas ao metabolismo de cálcio e fósforo (FGF-23 sérico, fósforo sérico, excreção fracionada de fósforo na urina, cálcio total e cálcio iônico) dos cães DRC do Grupo A (Grupo A-SF e Grupo A-CTM) estão representados nas Tabelas 8 a 16.

Tabela 8 – Valores individuais da concentração sérica de creatinina (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM), segundo o período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A-SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A-CTM	A7	A8	A9
T0	1,7	1,6	2,0	1,6	1,5	1,5	T0	1,3	1,5	1,7
T1	1,9	1,7	1,9	1,6	1,6	1,4	T1	1,8	1,8	2,1
T2	1,9	1,4	2,1	1,5	1,8	1,5	T2	1,0	2,1	1,8
T3	1,8	1,5	1,9	1,5	1,5	1,3	T3	0,9	NR*	1,7
T4	1,8	1,9	1,8	2,0	1,5	1,4	T4	1,2	1,9	1,8
T5	1,8	1,2	2,1	1,9	1,4	1,4	T5	NR*	2,3	1,9
T6	1,9	1,6	1,9	2,0	1,5	1,5	T6	1,0	2,1	1,9
T7	2,4	1,4	1,8	1,8	1,4	1,5	T7	1,1	1,9	1,9
T8	2,1	1,5	2,0	1,8	1,4	2,2	T8	1,1	1,9	1,9
T9	2,2	1,7	1,9	1,8	1,3	1,7	T9	1,2	1,9	1,9
T10	2,6	1,3	2,0	1,9	1,5	1,4	T10	1,2	1,7	1,9*
T11	2,8	1,5	2,2	1,7	1,4	1,5	T11	1,1	1,8	
T12	2,4	1,6	1,9	1,6	1,1	2,0	T12	1,1	1,9	
Média	2,1	1,5	1,9	1,7	1,4	1,6	Média	1,2	1,9	1,9
Mediana	1,9	1,5	1,9	1,8	1,5	1,5	Mediana	1,1	1,9	1,9
DP	0,34	0,18	0,11	0,17	0,15	0,25	DP	0,22	0,19	0,11
CV	16,19	12,0	5,79	10,0	10,71	15,62	CV	18,33	10,0	5,79
EPM	0,10	0,05	0,03	0,05	0,04	0,07	EPM	0,06	0,06	0,03
Mín.	1,7	1,2	1,8	1,5	1,1	1,3	Mín.	0,9	1,5	1,7
Máx.	2,8	1,9	2,2	2,0	1,8	2,2	Máx.	1,8	2,3	2,1
Perc 75%	2,4	1,6	2,0	1,9	1,5	1,5	Perc 75%	1,2	1,9	1,9
Perc 25%	1,8	1,4	1,9	1,6	1,4	1,4	Perc 25%	1,1	1,8	1,8

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

Tabela 9 – Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A – SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A - CTM	A7	A8	A9
T0	54,5	39,8	68,5	68,5	57,8	62,4	T0	134,6	96,5	87,2
T1	63,4	39,5	90,0	54,8	76,6	53,9	T1	104,4	115,4	120,6
T2	70,0	32,7	67,2	66,8	77,8	58,8	T2	113,7	133,7	89,5
T3	74,9	40,2	101,1	47,6	72,1	82,9	T3	68,8	NR*	83,8
T4	52,3	33,2	57,4	54,7	69,4	71,0	T4	99,5	144,3	91,2
T5	69,9	36,8	53,1	79,9	88,1	81,9	T5	NR*	160,5	95,7
T6	96,3	43,6	54,4	75,4	58,1	82,8	T6	64,7	116,0	101,9
T7	113,6	48,1	72,2	62,3	52,4	104,4	T7	97,3	92,1	89,7
T8	88,5	45,2	62,0	56,2	70,0	194,0	T8	75,6	107,4	99,7
T9	74,3	53,4	62,5	64,6	54,6	150,4	T9	66,4	127,1	78,5
T10	75,0	38,0	61,3	72,6	66,3	108,8	T10	77,0	110,0	78,5*
T11	86,6	36,6	64,4	83,0	50,9	101,3	T11	63,4	66,9	
T12	74,8	43,4	61,8	56,8	60,9	137,4	T12	73,0	127,1	
Média	76,5	40,8	67,4	64,9	65,8	99,2	Média	86,5	116,4	92,4
Mediana	74,8	39,8	62,5	64,6	66,3	82,9	Mediana	76,3	115,7	89,7
DP	16,72	5,87	13,77	10,77	11,19	40,68	DP	22,92	24,88	12,06
EPM	4,64	1,63	3,82	2,99	3,104	11,28	EPM	6,61	7,18	3,64
CV	21,86	14,39	20,43	16,59	17,01	41,01	CV	26,50	21,37	13,05
Mín.	52,3	32,7	53,1	47,6	50,9	53,9	Mín.	63,4	66,9	78,5
Máx.	113,6	53,4	101,1	83,0	88,1	194,0	Máx.	134,6	160,5	120,6
Perc 75%	87,5	44,4	70,3	74,0	74,3	123,1	Perc 75%	103,2	132,1	99,7
Perc 25%	66,6	36,7	59,3	55,5	56,2	66,7	Perc 25%	67,0	99,2	83,8

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

Tabela 10 - Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

Grupo	Cão DRC	T	FGF-23	sP	uFEP
A - SF	A1	T0	683,0	4,2	9,3
		T6	856,3	5,0	2,6
		T12	862,2	4,6	11,8
	A2	T0	178,7	3,9	15,8
		T6	175,7	3,2	10,4
		T12	62,6	4,0	19,7
	A3	T0	263,4	4,2	7,0
		T6	245,6	3,5	6,7
		T12	288,9	4,0	13,3
	A4	T0	298,4	3,0	5,3
		T6	273,8	3,8	7,8
		T12	NR**	2,9	5,8
	A5	T0	NR**	1,9	4,6
		T6	NR**	3,8	NR***
		T12	NR**	2,9	NR***
	A6	T0	NR**	3,6	26,8
		T6	NR**	4,5	42,9
		T12	NR**	4,1	22,5
	Média		380,8	3,73	13,53
	Mediana		273,8	3,85	9,85
	DP		281,4	0,72	10,77
	CV		73,89	19,32	79,60
	EPM		84,86	0,17	2,76
	Mín.		62,6	1,90	2,60
	Máx.		862,2	5,00	42,90
	Perc 75%		683,0	4,17	19,7
	Perc 25%		178,7	3,27	5,8

Legenda: **A**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS) – Grupo A; **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo A-SF; NR**: não realizado – amostra armazenada para futura dosagem; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina.

Tabela 11 – Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc. 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

Grupo	Cão DRC	T	FGF-23	sP	uFEP
A - CTM	A7	T0	1065,5	4,2	NR
		T6	723,6	4,4	NR
		T12	712,9	4,0	NR
	A8	T0	505,5	3,7	28,7
		T6	508,1	3,6	28,1
		T12	NR**	2,9	68,7
	A9	T0	NR**	3,4	50,9
		T6	NR**	3,4	51,0*
	Média		703,1	3,70	45,48
	Mediana		712,9	3,65	50,90
	DP		228,5	0,46	15,38
	CV		32,50	12,31	33,82
	EPM		102,2	0,16	6,88
	Mín.		505,5	2,90	28,10
	Máx.		1065,5	4,40	68,70
	Perc 75%		894,6	4,05	51,00
	Perc 25%		506,8	3,40	28,70

Legenda: **A**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS) – Grupo A; **CTM**: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal – Grupo A-CTM; NR**: não realizado – amostra armazenada para futura dosagem; *: animal acompanhado até T10; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina.

Tabela 12 – Valores individuais de fósforo sérico (mg/dL) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A – SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A – CTM	A7	A8	A9
T0	4,2	3,9	4,2	3,0	1,9	3,6	T0	4,2	3,7	3,4
T1	2,7	3,8	3,7	NR*	3,1	4,5	T1	3,6	3,6	3,6
T2	2,9	3,0	3,4	3,4	2,1	3,6	T2	3,6	NR*	3,1
T3	4,3	3,4	3,0	2,3	2,5	3,9	T3	3,0	3,4	2,8
T4	3,6	3,4	2,9	3,5	3,3	4,1	T4	3,6	4,1	3,9
T5	3,2	3,3	3,2	4,0	3,8	4,5	T5	3,8	4,0	3,0
T6	5,0	3,2	3,5	3,8	3,8	4,5	T6	4,4	3,6	3,4
T7	3,8	3,9	3,0	3,0	2,8	4,4	T7	4,6	2,8	2,9
T8	4,0	4,6	3,3	3,3	2,9	4,9	T8	4,6	3,6	3,5
T9	4,3	4,1	2,8	2,8	2,9	3,9	T9	4,6	3,4	3,6
T10	3,2	3,2	4,5	2,9	3,3	4,4	T10	4,5	3,1	3,9*
T11	5,4	4,5	3,6	2,6	1,9	3,8	T11	3,6	3,0	
T12	4,6	4,0	4,0	2,9	2,9	4,1	T12	4,0	2,9	
Média	3,9	3,7	3,5	3,1	2,9	4,2	Média	4,0	3,4	3,4
Mediana	4,0	3,8	3,4	3,0	2,9	4,1	Mediana	4,0	3,5	3,4
DP	0,81	0,51	0,51	0,49	0,63	0,40	DP	0,51	0,42	0,36
EPM	0,22	0,14	0,14	0,14	0,17	0,11	EPM	0,14	0,12	0,11
CV	20,77	13,78	14,57	15,81	21,72	9,52	CV	12,75	12,35	10,59
Mín.	2,7	3,0	2,8	2,3	1,9	3,6	Mín.	3,0	2,8	2,8
Máx.	5,4	4,6	4,5	4,0	3,8	4,9	Máx.	4,6	4,1	3,9
Perc 75%	4,4	4,0	3,8	3,5	3,3	4,5	Perc 75%	4,5	3,7	3,6
Perc 25%	3,2	3,2	3,0	2,8	2,3	3,8	Perc 25%	3,6	3,0	3,0

Legenda: **A**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS) – Grupo A; **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo A-SF; **CTM**: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal – Grupo A-CTM; NR*: não realizado – amostra insuficiente; *: animal acompanhado até T10; Obs: sP recomendado pela IRIS para o estágio 2 da DRC em cães $\leq 4,5$ mg/dL.

Tabela 13 – Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A – SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A - CTM	A7	A8	A9
T0	9,33	15,78	7,03	5,30	4,61	26,80	T0	NR***	28,69	50,88
T1	3,92	30,72	2,70	7,30	10,71	7,85	T1	NR***	17,41	71,73
T2	1,38	14,66	5,40	12,19	NR***	7,70	T2	NR***	38,76	80,96
T3	2,60	14,57	13,36	6,07	NR***	28,42	T3	NR***	25,46	47,19
T4	2,64	24,71	14,05	2,56	NR***	27,11	T4	NR***	71,60	81,47
T5	10,35	36,80	16,98	8,48	25,60	29,02	T5	NR***	38,74	NR***
T6	2,65	10,37	6,69	7,81	NR***	42,97	T6	NR***	28,06	51,02
T7	13,37	22,69	12,41	NR***	26,94	NR***	T7	NR***	NR***	NR***
T8	12,82	8,66	15,77	10,19	NR***	47,92	T8	NR***	NR***	77,91
T9	18,13	11,52	13,54	11,22	NR***	34,86	T9	NR***	28,90	76,73
T10	15,73	9,51	NR***	15,12	NR***	26,80	T10	NR***	21,39	*NR***
T11	15,27	12,28	14,32	8,53	NR***	NR***	T11	NR***	64,68	
T12	11,77	19,74	13,27	5,79	NR***	22,52	T12	NR***	68,70	
Média	9,23	17,85	11,29	8,38	16,96	27,45	Média	NR***	39,31	67,24
Mediana	10,35	14,66	13,32	8,15	18,15	27,11	Mediana	NR***	28,90	74,23
DP	6,21	8,51	3,70	3,59	0,95	11,66	DP	NR***	19,94	15,72
EPM	1,87	2,57	1,17	1,13	0,67	3,89	EPM	NR***	6,65	6,42
CV	67,28	47,67	32,77	42,84	5,60	42,48	CV	NR***	50,72	23,38
Mín.	1,38	8,66	5,40	2,56	25,60	7,70	Mín.	NR***	21,39	47,19
Máx.	18,13	36,80	16,98	15,12	26,94	47,92	Máx.	NR***	71,60	81,47
Perc 75%	15,3	22,7	14,7	11,5	26,9	38,9	Perc 75%	NR***	66,7	81,1
Perc 25%	2,6	10,4	10,9	6,0	25,6	24,7	Perc 25%	NR***	26,8	50,1

Legenda: **A**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 2 (IRIS) – Grupo A; **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo A-SF; **CTM**: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal – Grupo A-CTM; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina; *: animal acompanhado até T10.

Tabela 14 – Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL) e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A – SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A - CTM	A7	A8	A9
T0	10,7	10,4	10,7	11,7	9,8	10,0	T0	12,6	10,1	10,1
T1	11,9	10,9	11,2	10,7	9,9	9,2	T1	11,8	10,9	10,0
T2	11,9	10,5	10,6	9,9	NR*	10,4	T2	10,5	10,5	11,1
T3	11,9	11,1	10,9	9,8	10,1	10,2	T3	10,5	9,6	10,1
T4	10,9	10,2	10,6	11,0	10,1	9,1	T4	10,3	10,1	10,3
T5	10,5	9,2	10,7	9,7	7,0	9,5	T5	NR*	10,4	10,6
T6	11,6	10,0	10,1	9,9	10,0	9,9	T6	10,7	8,9	10,9
T7	11,5	10,3	10,9	9,7	9,3	10,4	T7	10,7	10,2	10,5
T8	10,7	10,8	11,1	8,7	9,7	11,4	T8	10,1	9,5	9,9
T9	11,6	10,1	10,7	9,4	9,3	10,9	T9	10,5	9,6	10,2
T10	10,5	8,9	10,3	9,1	10,1	9,7	T10	10,9	9,9	10,8*
T11	11,0	9,7	10,5	8,2	9,8	9,3	T11	9,9	9,2	
T12	10,7	10,0	10,3	9,5	9,7	10,7	T12	10,7	9,8	
Média	11,2	9,5	10,7	9,8	9,6	10,0	Média	10,8	9,9	10,4
Mediana	11,0	10,1	10,7	9,7	9,8	10,0	Mediana	10,6	9,9	10,3
DP	0,56	0,63	0,32	0,93	0,85	0,70	DP	0,74	0,55	0,40
EPM	0,15	0,17	0,09	0,26	0,25	0,19	EPM	0,21	0,15	0,12
CV	5,00	6,63	2,99	9,49	8,85	7,00	CV	6,85	5,55	3,85
Mín.	10,5	2,0	10,1	8,2	7,0	9,1	Mín.	9,9	8,9	9,9
Máx.	11,9	11,1	11,2	11,7	10,1	11,4	Máx.	12,6	10,9	11,1
Perc 75%	11,7	10,6	10,9	10,3	10,1	10,5	Perc 75%	10,8	10,3	10,8
Perc 25%	10,7	9,8	10,4	9,2	9,4	9,4	Perc 25%	10,3	9,5	10,1

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

Tabela 15 – Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), e da média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) ao longo do período de acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

A – SF	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A - CTM	A7	A8	A9
T0	1,558	1,404	1,502	1,372	1,405	1,282	T0	1,515	1,327	1,432
T1	1,420	1,309	1,490	1,383	1,364	1,390	T1	1,514	1,302	1,408
T2	1,581	1,455	1,367	1,317	1,368	1,344	T2	1,367	1,326	1,372
T3	1,440	1,394	1,527	1,280	1,343	1,369	T3	1,370	1,361	1,237
T4	1,364	1,384	1,502	1,280	1,357	1,400	T4	1,326	1,304	1,353
T5	1,393	1,371	1,500	1,240	1,345	1,349	T5	1,324	1,374	NR*
T6	1,519	1,427	1,380	1,336	1,402	1,348	T6	1,380	1,371	NR*
T7	1,429	1,456	1,390	1,334	1,368	1,399	T7	1,509	1,288	NR*
T8	1,310	1,333	1,480	1,194	1,340	1,312	T8	1,380	1,353	1,420
T9	1,469	1,382	1,453	1,259	1,342	1,430	T9	1,302	1,302	1,360
T10	1,432	1,444	1,425	1,284	1,510	1,395	T10	1,429	1,357	1,350*
T11	1,367	1,365	1,401	1,290	1,360	1,400	T11	1,375	1,375	
T12	NR*	1,318	1,422	1,247	1,467	1,310	T12	1,335	1,335	
Média	1,440	1,388	1,449	1,293	1,382	1,364	Média	1,394	1,336	1,367
Mediana	1,431	1,384	1,453	1,284	1,364	1,369	Mediana	1,375	1,335	1,37
DP	0,080	0,049	0,054	0,054	0,052	0,044	DP	0,075	0,031	0,061
EPM	0,023	0,014	0,015	0,0149	0,0145	0,0122	EPM	0,021	0,008	0,0216
CV	5,55	3,53	3,73	4,18	3,76	3,22	CV	5,38	2,32	4,46
Mín.	1,310	1,309	1,367	1,194	1,340	1,282	Mín.	1,302	1,288	1,24
Máx.	1,581	1,456	1,527	1,383	1,510	1,430	Máx.	1,469	1,366	1,417
Perc 75%	1,507	1,436	1,501	1,335	1,404	1,400	Perc 75%	1,429	1,361	1,410
Perc 25%	1,374	1,349	1,396	1,253	1,344	1,328	Perc 25%	1,331	1,303	1,351

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

No **Grupo A-SF**, a mensuração de FGF-23 sérico foi realizada em quatro (A1, A2, A3 e A4) dos seis cães do referido grupo. Os valores de FGF-23 apresentaram-se normais nos animais A2, A3 e A4, e apenas o cão A1 apresentou FGF-23 sérico aumentado que perdurou durante todo o período de acompanhamento, porém mantendo-se nos mesmos patamares. O coeficiente de variação (CV) dos valores de FGF-23 obtidos nos cães do Grupo A-SF nos diferentes tempos (T) ao longo do acompanhamento foi de 73,9%. Já no **Grupo A-CTM**, a mensuração de FGF-23 sérico foi realizada em dois (A7 e A8) dos três cães pertencentes a este grupo (A7, A8 e A9) e o FGF-23 sérico encontrava-se aumentado em todos os cães avaliados (A7 e A8), e o CV dessa variável ao longo dos tempos de acompanhamento foi de 32,5%.

Nas Tabelas 10 (Grupo A-SF, Gráfico 2) e 11 (Grupo A-CTM, Gráfico 3), observa-se que o Grupo A-CTM apresentou concentrações séricas mais elevadas de

FGF-23 quando comparadas com o Grupo A-SF e, também, com o Grupo C (cães clinicamente normais) (Tabela 4). A média $\pm$ erro padrão da média (EPM) da concentração sérica de FGF-23 do Grupo A-SF foi de $380,30 \pm 84,86$ pg/mL, variando de 62,6 a 862,2 pg/mL, enquanto que a média $\pm$ EPM dos valores de FGF-23 do Grupo A-CTM foi de $703,10 \pm 102,20$ pg/mL, variando de 505,50 a 1065,50 pg/mL. Os valores individuais do FGF-23 obtidos nos tempos T0, T6 e T12 dos cães dos Grupos A-SF e A-CTM estão apresentados nas Tabelas 10 e 11, bem como nos Gráficos 2 e 3, respectivamente. Comparando-se os valores de FGF-23 do Grupo C com o Grupo A (A-SF e A-CTM), foi detectada diferença (Mann-Whitney; $P=0,011$).

A mediana da concentração sérica de FGF-23 para o Grupo A foi de 402,0 pg/mL, enquanto que a média $\pm$ EPM foi de $481,5 \pm 75,2$ pg/mL (mín. de 62,6 e máx. de 1066,0 pg/mL) com valores de percentil 75% e 25% igual a 720,9 e 250,1 pg/mL, respectivamente.

Gráfico 2 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

OBS: - - -: representa a faixa de normalidade de FGF-23 sérico baseado nos dados obtidos a partir do grupo de cães clinicamente normais (até 322,3pg/mL). Obs: nos cães A5 e A6, não foi possível mensurar o FGF-23 sérico.

Gráfico 3 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A-CTM) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

BS: - - - representa a faixa de normalidade de FGF-23 sérico baseado nos dados obtidos a partir do grupo de cães clinicamente normais (até 322,3pg/mL). Obs: no cão A9 não foi possível dosar o FGF-23 sérico.

No referente ao **Grupo A (A-SF e A-CTM)**, para fins de análise das associações do FGF-23 sérico com o fósforo, ureia e creatinina sérica e a excreção fracionada de fósforo na urina, definiu-se os quartis que foram obtidos a partir dos valores de FGF-23 daquele grupo, nos diferentes tempos – T0, T6 e T12 (Tabelas 10 e 11; Tabela 16). Assim, para o tempo T0, foram definidos os seguintes valores de FGF-23: quartil 1 (até 242,1 pg/mL), quartil 2 (242,2 a 402,0 pg/mL), quartil 3 (402,1 a 778,6 pg/mL) e quartil 4 (maior que 778,7 pg/mL). Para o mesmo Grupo A em T6, os valores de quartis foram: quartil 1 (até 228,0 pg/mL), quartil 2 (228,1 a 389,7 pg/mL), quartil 3 (389,8 a 756,8 pg/mL) e quartil 4 (maior que 756,9 pg/mL). E para o tempo T12 no Grupo A, os valores de quartis incluíram: quartil 1 (até 119,1 pg/mL), quartil 2 (119,2 a 500,9 pg/mL), quartil 3 (501,0 a 824,9 pg/mL) e quartil 4 (maior que 825,0 pg/mL) (Tabela 16).

Observando os quartis de 1 a 4 (Tabela 16) de FGF-23 no **Grupo A** no **momento T0**, nota-se que no quartil 1, a hiperfosfatemia não foi constatada (fósforo sérico >4,5mg/dL), como também não houve aumento da uFEP. No quartil 2, apesar da existência de discreto aumento das concentrações de ureia e creatinina que indica maior perda da capacidade renal de excreção, ainda não foi constatada

hiperfosfatemia e nem aumento de uFEP. Ainda, no quartil 3 em que a concentração de ureia sérica era mais elevada, ainda foi observada normofosfatemia, mas com discreto aumento de uFEP no cão A8 (uFEP = 28,69%). Já no quartil 4 do tempo T0, o valor de ureia sérica foi o maior quando comparado com os outros quartis e, ainda, havia normofosfatemia, já em relação a uFEP, não foi possível mensurar no cão A7 pela dificuldade em coletar a urina. Em **momento T6**, as variáveis se comportaram-se de forma semelhante ao tempo T0, e no quartil 3, ainda o cão A8 normofosfatêmico apresentava o maior valor de uFEP (28,06%), entretanto o cão A1 que estava no quartil 3 em T0 em que a uFEP era de 9,33%, no momento T6 apresentou aumento do FGF-23 e, assim, neste tempo encontrava-se no quartil 4; este cão A1 apresentou hiperfosfatemia (5,0mg/dL) e a uFEP mais diminuída (2,65%). No relativo ao **momento T12**, o cão A1 ainda permaneceu no quartil 4 e, ainda, discretamente hiperfosfatêmico e persistindo a uFEP diminuída (11,77%) (Tabela 16).

Levando-se em consideração como faixa de normalidade do FGF-23 obtidos a partir dos cães clinicamente normais do presente estudo de 223,5 a 322,3 pg/mL (Tabela 4), no Grupo A, a partir do quartil 2, o FGF-23 já poder ser considerado alterado e, praticamente, todos os animais e como também nos momentos avaliados apresentaram normofosfatemia, com exceção apenas do cão A1 no momento T6 no quartil 4 (Tabela 16).

Tabela 16 – Valores de quartis de FGF-23 sérico dos cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ou células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0, T6 e T12 relacionadas com a idade (em meses), as concentrações séricas de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL) e fósforo (sP; mg/dL), e a excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) – São Paulo - 2016

GRUPO A-T0	QUARTIL 1	QUARTIL 2	QUARTIL 3	QUARTIL 4
	FGF-23 até 242,1 (pg/mL)	FGF-23 de 242,2 a 402,0 (pg/mL)	FGF-23 de 402,1 a 778,6 (pg/mL)	FGF-23 > 778,7 (pg/mL)
	n = 1	n = 2	n = 2	n = 1
Idade (meses)	120 (A2)	36 (A3); 144 (A4)	24 (A1); 168 (A8)	192 (A7)
sU (mg/dL)	39,8 (A2)	68,5 (A3); 68,5 (A4)	54,5 (A1); 96,5 (A8)	134,6 (A7)
sCr (mg/dL)	1,6 (A2)	2,0 (A3); 1,6 (A4)	1,7 (A1); 1,5 (A8)	1,3 (A7)
sP (mg/dL)	3,9 (A2)	4,1 (A3); 3,0 (A4)	4,2 (A1); 3,7 (A8)	4,2 (A7)
uFEP (%)	15,78 (A2)	7,03 (A3); 5,3 (A4)	9,33 (A1); 28,69 (A8)	NR*** (A7)
GRUPO A-T6	QUARTIL 1	QUARTIL 2	QUARTIL 3	QUARTIL 4
	FGF-23 até 228,0 (pg/mL)	FGF-23 de 228,1 a 389,7 (pg/mL)	FGF-23 de 389,8 a 756,8 (pg/mL)	FGF-23 > 756,9 (pg/mL)
	n = 1	n = 2	n = 2	n = 1
Idade (meses)	126 (A2)	42 (A3); 150 (A4)	198 (A7); 174 (A8)	30 (A1)
sU (mg/dL)	43,6 (A2)	54,4 (A3); 75,4 (A4)	64,7 (A7); 116,0 (A8)	96,3 (A1)
sCr (mg/dL)	1,6 (A2)	1,6 (A3); 2,0 (A4)	1,0 (A7); 2,1 (A8)	1,9 (A1)
sP (mg/dL)	3,2 (A2)	3,5 (A3); 3,8 (A4)	4,4 (A7); 3,6 (A8)	5,0 (A1)
uFEP (%)	10,37 (A2)	6,69 (A3); 7,81 (A4)	NR (A7); 28,06 (A8)	2,65 (A1)
GRUPO A-T12	QUARTIL 1	QUARTIL 2	QUARTIL 3	QUARTIL 4
	FGF-23 até 119,1 (pg/mL)	FGF-23 de 119,2 a 500,9 (pg/mL)	FGF-23 de 501,0 a 824,9 (pg/mL)	FGF-23 > 825,0 (pg/mL)
	n = 1	n = 3	n = 2	n = 2
Idade (meses)	132 (A2)	48 (A3)	204 (A7)	36 (A1)
sU (mg/dL)	43,4 (A2)	61,8 (A3)	73,0 (A7)	74,8 (A1)
sCr (mg/dL)	1,6 (A2)	1,6 (A3)	1,1 (A7)	2,4 (A1)
sP (mg/dL)	4,0 (A2)	4,0 (A3)	4,0 (A7)	4,6 (A1)
uFEP (%)	19,74 (A2)	13,27 (A3)	NR*** (A7)	11,77 (A1)

Legenda: NR***: não realizado – não foi possível coletar urina.

Nos cães do Grupo A (estágio 2), como foi adotado como valor alvo para a concentração sérica de fósforo (sP) até 4,5mg/dL, baseado nas diretrizes da IRIS, nota-se que nos três cães com DRC que eram normofosfatêmicos (<4,5mg/dL) (Tabela 12), os valores de FGF-23 já apresentavam-se elevados (>322,30pg/mL) (Tabelas 10 e 11). No cão **A1**, o FGF-23 em T0 era de 683,0pg/ml e sP de 4,2mg/dL, no cão **A7** a concentração sérica de FGF-23 em T0 era de 1065,5pg/mL e sP = 3,7mg/dL e no momento T6, o FGF-23 de 723,6pg/mL e sP de 3,6mg/dL. O cão **A8** deste Grupo A apresentou FGF-23 em T0 de 505,5pg/mL e sP de 3,0mg/dL e em T6,

o FGF-23 era de 508,1pg/mL e sP de 3,8mg/dL. Dentre os cães do Grupo A, apenas o cão A1 (11,1%) apresentou discreta hiperfosfatemia ao longo do acompanhamento nos momentos T6 (P = 5,0 mg/dL), T11 (P = 5,4 mg/dL) e T12 (P = 4,6 mg/dL) (Tabela 12). Dentre os cães do Grupo A-CTM não foi observada hiperfosfatemia que tivesse sido sustentada ao longo do período de acompanhamento, sendo que em T0 todos os cães do Grupo A estavam normofosfatêmicos (Tabela 12; Gráfico 7).

Não houve diferença das concentrações séricas de fósforo entre os cães do Grupo C e do Grupo A (Mann-Whitney; $P=0,3307$). Na comparação entre os Grupos A-SF (Gráfico 4) e A-CTM (Gráfico 5), observou-se que as concentrações séricas de fósforo foram semelhantes entre os dois sub-grupos do Grupo A (Gráficos 6 e 7), porém não foi possível avaliar se houve diferença estatística em virtude do número de cães de cada sub-grupo.

Gráfico 4 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016

Obs: faixa cinza refere-se ao valor de sP ideal para cães com DRC no estágio 2 de acordo com a International Renal Interest Society (IRIS).

Gráfico 5 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A-CTM) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016

Obs: faixa cinza refere-se ao valor de sP ideal para cães com DRC no estágio 2 de acordo com a International Renal Interest Society (IRIS); Obs: T2 de A8 – não realizado – amostra insuficiente.

Gráfico 6 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: --- representa a faixa de valor sérico de fósforo ideal preconizada para o estágio 2 em cães com doença renal crônica (DRC), de acordo com a IRIS.

Gráfico 7 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: --- representa a faixa de valor sérico de fósforo ideal preconizada para o estágio 2 em cães com doença renal crônica (DRC), de acordo com a IRIS.

No que se refere à excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP), os valores

considerados de normalidade foram obtidos a partir dos cães clinicamente normais (C1 a C15) e, assim, foi adotado para este estudo como valor de normalidade para uFEP até 28,89% (Tabela 4). No Grupo A-SF, somente o cão A6 apresentou aumento da uFEP a partir de T6 que foi de 42,97% (Tabela 13 e Gráfico 8) e já no Grupo A-CTM (Tabela 13 e Gráfico 8) nos dois cães (A8 e A9) em que foi possível determinar a uFEP, observou-se o aumento da uFEP no cão A8 a partir de T4 até T12 (T4 = 71,60%; T5 = 38,74%; T9 = 28,90%; T10 = 21,39%; T11 = 64,68% e T12 = 68,70%) e no cão A9, o aumento desde T0 até T9 (variação de 47,19% a 81,47%) (Gráfico 9).

Não foi observado diferença significativa entre os cães do Grupo C quando comparados com os cães do Grupo A (Unpaired t test; $P=0,9869$), sendo que o Grupo A – CTM apresentou maiores valores de uFEP (Tabela 13 e Gráfico 9). No Grupo A-SF, a média $\pm$ EPM em T0, T6 e T12 foi de $13,53 \pm 2,76\%$ (mín. de 2,60 e máx. de 42,90%), enquanto que no Grupo A-CTM em T0, T6 e T12 obteve-se média $\pm$ EPM de $45,48 \pm 6,88\%$ (mín. de 28,10 e máx. de 68,70%) (Tabela 13 e Gráficos 8 e 10).

Gráfico 8 - Valores da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: ---: representa a faixa de normalidade de uFEP (até 28,89%) baseado nos dados obtidos a partir do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C).

Gráfico 9 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A que receberam células-tronco mesenquimal (A – CTM) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: - - -: representa a faixa de normalidade de uFEP (até 28,89%) baseado nos dados obtidos a partir do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C). Obs: não foi possível obter amostra de urina para o uFEP do cão A7.

Gráfico 10 - Box plot dos valores da excreção fracionada de fósforo urinária (uFEP; %) em cães do Grupo A que receberam solução fisiológica (A-SF) e dos cães que receberam célula-tronco mesenquimal (A-CTM) avaliados no conjunto dos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

No que se refere aos valores de cálcio total (Tabela 14) e de cálcio iônico (Tabela 15) do Grupo A, foi observado que 33,3% dos cães (3 do total de 9 cães) apresentaram aumento na concentração sérica de cálcio total, e 44,4% (4 do total de 9 cães) hipercalcemia iônica. Os animais, e os respectivos tempos, que apresentaram concentrações séricas de cálcio total aumentado ($>11,5\text{mg/dL}$) foram: cão A1 ($T1 = 11,9$; $T2 = 11,9$; $T3 = 11,9$; $T6 = 11,6$ e $T9 = 11,6\text{mg/dL}$); cão A4 ($T0 = 11,7\text{mg/dL}$); e cão A7 ($T0 = 12,6$ e $T1 = 11,8\text{ mg/dL}$). Já os cães que apresentaram hipercalcemia iônica ($>1,500\text{mmol/L}$) do Grupo A foram: cão A1 ($T0 = 1,558$; $T2 = 1,581$ e $T6 = 1,519\text{ mmol/L}$); cão A3 ($T0 = 1,502\text{ mmol/L}$); cão A5 ($T10 = 1,510\text{ mmol/L}$); e cão A7 ($T0 = 1,515$; $T1 = 1,514$ e $T7 = 1,509\text{mmol/L}$). Portanto, os cães A1 e A7 foram os que apresentaram hipercalcemia tanto total como iônica.

Hipocalcemia (concentração de cálcio total inferior a $9,0\text{mg/dL}$) observada pela concentração de cálcio total foi encontrada em 33,3% dos cães (3 do total de 9 cães) e foram os seguintes animais: cão A2 ($T10 = 8,9\text{mg/dL}$); cão A4 ($T11 = 8,2\text{mg/dL}$); e cão A8 ($T6 = 8,9\text{mg/dL}$). No que tange a hipocalcemia iônica ($<1,200\text{mmol/L}$), foi observada em apenas um cão do Grupo A em um momento apenas (A4: $T8 = 1,194\text{mmol/L}$) (Tabelas 14 e 15).

Em relação a dieta dos cães do Grupo A (Tabela 6), os cães alimentados com dieta comercial hipofosfórica correspondeu a 55,5% (5 de 9) e os demais dos quatro cães que compuseram esse grupo, receberam dieta caseira hipofosfórica balanceada e/ou dieta comercial de manutenção (com níveis de fósforo um pouco mais elevados). Os dois cães que receberam dieta comercial de manutenção foram os que apresentaram valores mais elevados de uFEP quando comparado com os demais cães deste mesmo grupo. A média $\pm$ EPM de uFEP em $T0$, $T6$ e $T12$ dos cães que recebiam dieta comercial hipofosfórica foi em $T0$ de $7,20 \pm 1,16\%$, em $T6$ de $5,70 \pm 1,58\%$ e em $T12$ de $10,30 \pm 2,29\%$, observando-se, sempre, valores abaixo da normalidade (uFEP do Grupo C $< 28,89\%$), enquanto que os cães A8 e A9 que foram alimentados com dieta comercial para manutenção apresentaram valores de uFEP mais elevados ao longo do período de acompanhamento, com média $\pm$ EPM de $39,31 \pm 6,65\%$ e $67,24 \pm 6,42\%$, respectivamente. Ao avaliar cada sub-grupo, observa-se que os todos os cães do sub-grupo A-SF receberam dieta hipofosfórica, enquanto que os cães do sub-grupo A-CTM foram alimentados com dieta comercial para manutenção (sem restrição de fósforo) e apresentaram maiores

valores de uFEP.

Em resumo, dentre os cães doentes renais crônicos do **Grupo A** (Grupo A-SF e Grupo B-CTM) não ocorreu nenhum óbito durante o estudo. Do Grupo A, dos seis cães em que o FGF-23 sérico foi mensurado, desses 50% já apresentavam valores aumentados de FGF-23 mesmo na presença de normofosfatemia. Além disso, ao avaliar os tempos T0, T6 e T12, os valores da uFEP mantiveram-se abaixo do valor de normalidade quando comparado a partir do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C < 28,89%) em que apenas dois animais (A6 e A9) apresentaram elevação da uFEP, mas apenas em uma ocasião (T6). Também foi observado aumento das concentrações séricas de FGF-23, associado a normofosfatemia e aumento da uFEP no cão A8 (T0). Quando foi analisado todos os cães que compuseram o Grupo A em T0, T6 e T12, obteve-se média $\pm$ EPM de $20,93 \pm 3,92\%$ para a uFEP. Ainda, ao avaliar cada sub-grupo (A-SF e A-CTM) nota-se que o Grupo A-CTM apresentou valores mais elevados da uFEP quando comparado com o A-SF, no entanto não foi possível verificar a existência de diferença estatística em virtude do número reduzido de cães do Grupo A-CTM (n=3).

5.3 GRUPO B (DRC – ESTÁGIO 3)

Os cães do Grupo B (n=13) apresentaram idade média $\pm$ EPM de $117,1 \pm 16,2$ meses (mínimo de 24 e máximo de 204 meses), sendo que os machos representaram 53,8% (Tabela 17). Quanto à definição racial, poodle (n=2) e yorkshire (n=2) corresponderam a 15,4% cada, as demais raças incluíram shih tzu (n=1; 7,7%), terrier brasileiro (n=1; 7,7%), golden retriever (n=1; 7,7%), pinscher (n=1; 7,7%), lhasa apso (n=1; 7,7%), pastor alemão (n=1; 7,7%), pitbull (n=1; 7,7%) e apenas um cão sem raça definida (7,7%).

Na sequência seguem os valores referentes aos momentos ou tempos T0, T6 e T12, bem como os valores individuais ao longo do período de observação (T0 a T12) das variáveis mensuradas no soro como ureia, creatinina, fósforo, cálcio total e cálcio iônico, e na urina da excreção urinária fracionada de fósforo (uFEP), além da concentração sérica de FGF-23 (Tabelas 17 a 33). A dieta dos cães com

DRC do Grupo B está descrita na Tabela 18. A ocorrência de complicações decorrentes da disfunção renal, associada a progressão da DRC, está descrita na Tabela 19.

Tabela 17 – Identificação dos **cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B (B1 a B13)**, classificados como estágio 3 de acordo com o estagiamento proposto pela IRIS, com sub-grupos **B-SF** (cães que receberam solução fisiológica) e **B-CTM** (cães que receberam células-tronco mesenquimal) com prontuário de identificação no nosocômio, idade (em meses), peso (kg), definição racial, sexo (M: macho; F: fêmea), e tempo em que ocorreu o óbito durante o estudo, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP - São Paulo - 2016

Grupo	Cão DRC	Idade (meses)	Peso (Kg)	Raça	Sexo	Estágio DRC	Óbito no estudo?
B-SF	B1	24	4,5	Shin tzu	F	3	Não
	B2	120	5,9	Poodle	M	3	Sim (em T5)
	B3	144	3,5	Yorkshire	M	3	Sim (em T3)
	B4	192	8,6	Terrier brasileiro	M	3	Não
	B5	92	41,5	Pastor alemão	F	3	Não
	B6	63	6,6	Lhasa apso	F	3	Sim (em T4)
B-CTM	B7	24	26,5	Golden retriever	F	3	Sim (em T9)
	B8	120	2,6	Yorkshire	M	3	Não
	B9	132	2,9	Pinscher	M	3	Não
	B10	120	42,0	Pitbull	M	3	Sim (em T2)
	B11	204	7,3	SRD	F	3	Sim (em T4)
	B12	192	3,8	Poodle	F	3	Sim (em T1)
	B13	96	3,7	Teckel	M	3	Sim (em T6)

Legenda: **B**: grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo B-SF; **CTM**: grupo que recebeu célula tronco mesenquimal – Grupo B-CTM; SRD: sem raça definida; M: macho; F: fêmea.

Tabela 18 - Tipo de dieta ingerida pelos cães do Grupo B (B-SF e B-CTM) durante o estudo – São Paulo - 2016

Grupo B-SF	Dieta
B1	Comercial (para cães nefropatas)
B2	Comercial (para cães nefropatas)
B3	Caseira
B4	Comercial (para cães nefropatas)
B5	Comercial (para cães nefropatas)
B6	Comercial (para cães nefropatas)
Grupo B-CTM	Dieta
B7	Comercial (para cães nefropatas)
B8	Comercial (para cães nefropatas)
B9	Caseira
B10	Comercial (para cães nefropatas)
B11	Caseira
B12	Comercial (para cães nefropatas)
B13	Comercial (para cães nefropatas)

OBS: Caseira: variada, pois os tutores desses animais não seguiam nenhuma recomendação dietética; Comercial: variação de % proteínas de 14,0 a 14,5%, fósforo de 0,17 a 0,30% na matéria seca (MS); B-SF: Grupo de cães com DRC no estágio 3 que receberam solução fisiológica; B-CTM: Grupo de cães com DRC no estágio 3 que receberam célula-tronco mesenquimal.

Tabela 19 - Presença de alterações decorrentes da disfunção renal observadas antes e ao longo do período de acompanhamento, e o tratamento preconizado em cães doentes renais crônicos do Grupo B (B-SF e B-CTM) – São Paulo - 2016

Grupo B-SF	Complicação?	Qual?	Tempo (T)	Tratamento
B1	Sim	Hiperfosfatemia	T1	Hidróxido de alumínio - VO
B2	Sim	Anemia discreta	T1	-
B3	Sim	Hiperfosfatemia/ acidose metabólica	T0 / T1	Hidróxido de alumínio – VO, BIC - VO
B4	Sim	Acidose metabólica	T0	BIC - VO
B5	Sim	Anemia discreta	T0	-
B6	Sim	Acidose metabólica	T2	BIC – VO, citrato de potássio - VO
Grupo B-CTM	Complicação?	Qual?	Tempo (T)	Tratamento
B7	Sim	Acidose metabólica/ hiperfosfatemia	T2 / T5	BIC – VO, hidróxido de alumínio - VO
B8	Sim	Acidose metabólica / hiperfosfatemia	T7 / T6	BIC – VO, carbonato de cálcio - VO
B9	Sim	Acidose metabólica/ anemia / hiperfosfatemia	T0 / T0 / T8	BIC – VO, eritropoetina em T6 - SC
B10	Sim	Anemia / Acidose metabólica	T0 / T1	Eritropetina em T0 – SC, BIC – VO, hidróxido de alumínio - VO
B11	Sim	Anemia / Acidose metabólica / hiperfosfatemia	T0 / T0 / T0	BIC – VO, hidróxido de alumínio - VO
B12	Não	-	-	-
B13	Sim	Acidose metabólica / hiperfosfatemia	T1 / T3	BIC - VO

Legenda: BIC: bicarbonato de sódio; VO: via oral; SC: via subcutânea; B-SF: Grupo de cães com DRC no estágio 3 que receberam solução fisiológica; B-CTM: Grupo de cães com DRC no estágio 3 que receberam célula-tronco mesenquimal.

Os resultados referentes às concentrações sérica de ureia e creatinina, bem como das variáveis relacionadas ao metabolismo de cálcio e fósforo (FGF-23 sérico, fósforo sérico, excreção fracionada de fósforo na urina, cálcio total e cálcio iônico) dos cães DRC do Grupo B (Grupo B-SF e Grupo B-CTM) estão representados nas Tabelas 20 a 33.

Tabela 20 – Valores individuais da concentração sérica de creatinina (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B - CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	2,5	2,4	2,7	2,4	2,8	2,4	T0	4,2	2,3	2,1	4,7	4,4	3,2	2,5
T1	2,2	1,9	3,0	2,4	3,1	2,4	T1	4,7	2,3	1,8	6,3	4,3	2,6†	3,2
T2	2,5	1,8	3,9	2,9	2,9	NR*	T2	4,6	2,6	2,7	7,1†	4,1		2,4
T3	2,5	2,5	3,4†	2,6	3,0	2,3†	T3	5,9	2,7	3,1		4,2		3,1
T4	2,4	3,8		2,5	3,4**		T4	5,4	2,7	2,9		4,3†		2,8
T5	2,5	2,1†		3,1			T5	4,9	2,5	2,8				3,7
T6	2,7			3,1			T6	6,1	2,8	2,4				4,0†
T7	2,9			2,7			T7	6,2	2,5	2,6				
T8	3,0			2,6			T8	6,5	2,9	2,9				
T9	3,1			3,3			T9	12,9†	3,1	2,1				
T10	3,1			3,3			T10		3,5	3,0				
T11	2,9			3,4			T11		3,3	3,3				
T12	2,8			4,1			T12		3,6	3,3				
Média	2,7	2,4	3,2	2,9	3,0	2,4	Média	6,1	2,8	2,7	6,0	4,3	2,9	3,1
Mediana	2,7	2,2	3,2	2,9	3,0	2,4	Mediana	5,6	2,7	2,8	6,3	4,3	2,9	3,1
DP	0,29	0,73	0,52	0,49	0,23	0,06	DP	2,50	0,43	0,47	1,22	0,11	0,42	0,59
EPM	0,08	0,30	0,26	0,14	0,10	0,03	EPM	0,79	0,11	0,13	0,70	0,05	0,30	0,22
CV	10,7	30,4	16,2	16,9	7,7	2,5	CV	40,9	15,4	17,4	20,3	2,6	14,5	19,0
Min.	2,2	1,8	2,7	2,4	2,8	2,3	Min.	4,2	2,3	1,8	4,7	4,1	2,6	2,4
Máx.	3,1	3,8	3,9	4,1	3,4	2,4	Máx.	12,9	3,6	3,3	7,1	4,4	3,2	4
Perc 75%	2,9	2,8	3,8	3,3	2,8	2,3	Perc 75%	6,3	3,2	3,0	7,1	4,3	3,2	3,7
Perc 25%	2,5	1,9	2,8	2,5	3,2	2,4	Perc 25%	4,7	2,5	2,2	4,7	4,1	2,6	2,5

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

Tabela 21 – Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75% e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6
T0	92,3	183,2	271,2	63,0	101,1	212,0
T1	101,9	133,2	338,1	64,9	66,1	219,4
T2	90,2	134,6	311,4	70,0	68,4	NR*
T3	77,9	163,4	316,0†	98,3	64,5	221,0†
T4	100,8	292,8		146,8	83,1**	
T5	83,2	136,2†		153,9		
T6	129,5			161,1		
T7	101,2			162,2		
T8	97,7			179,3		
T9	117,2			223,6		
T10	114,0			157,4		
T11	85,8			202,8		
T12	119,8			283,9		
Média	100,9	173,9	309,2	151,3	76,6	217,5
Mediana	100,8	149,8	313,7	157,4	68,4	219,4
DP	15,5	61,6	27,9	65,3	15,5	4,8
EPM	4,3	25,1	13,9	18,1	6,9	2,8
CV	15,36	35,40	9,01	43,17	20,20	2,20
Mín.	77,9	133,2	271,2	63,0	64,5	212,0
Máx.	129,5	292,8	338,1	283,9	101,1	221,0
Perc 75%	115,6	210,6	332,6	191,1	65,3	212,0
Perc 25%	88,0	134,3	281,3	84,1	92,1	221,0

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

Tabela 22 – Valores individuais da concentração sérica de ureia (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%0 e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo – 2016

B-CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	171,30	153,30	185,80	252,60	318,80	300,70	200,70
T1	222,90	196,00	154,70	310,00	247,90	190,40†	274,30
T2	210,90	182,90	188,00	336,30†	201,70		252,70
T3	237,70	283,60	256,50		280,60		246,10
T4	199,80	204,10	226,70		202,90†		195,80
T5	213,70	206,00	183,80				196,40
T6	354,90	277,30	230,40				240,30†
T7	258,80	282,60	227,90				
T8	276,50	276,60	277,70				
T9	456,00†	336,30	187,10				
T10		320,60	303,60				
T11		330,70	335,30				
T12		322,40	291,70				
Média	238,5	259,4	234,5	299,6	250,4	245,5	229,5
Mediana	222,9	277,3	227,9	310,0	247,9	245,5	240,3
DP	85,38	62,91	55,07	42,80	50,56	77,99	31,62
EPM	27,00	17,45	15,27	24,71	22,61	55,15	11,95
CV	35,80	24,25	23,48	14,28	20,19	31,77	13,78
Mín.	171,3	153,3	154,7	252,6	201,7	190,4	195,8
Máx.	354,9	336,3	335,3	336,3	318,8	300,7	274,3
Perc 75%	296,1	321,5	284,7	336,3	299,7	300,7	252,7
Perc 25%	208,1	200,1	186,5	252,6	202,3	190,4	196,4

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

Tabela 23 – Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016

Grupo	Cão DRC	Tempo (T)	FGF-23	sP	uFEP
B - SF	B1	T0	1738,1	4,4	11,2
		T6	1592,3	5,0	16,8
		T12	NR**	4,9	22,8
	B2	T0	957,6	4,5	24,3
		T5†	1022,2	5,4	13,8
	B3	T0	1865,5	6,1	13,6
		T3†	17524,1	11,8	18,1
	B4	T0	1096,9	4,1	19,2
		T6	16156,4	4,3	31,5
		T12	843,9	5,7	17,5
	B5	T0	NR**	3,6	35,9
		T6	**	**	**
	B6	T0	NR**	8,5	12,3
		T4	†*	†*	65,74†
	Média		4755,2	5,7	23,29
	Mediana		1592,3	4,9	18,11
	DP		6870,0	2,31	14,14
	EPM		2290,0	0,66	3,92
	CV		144,47	40,46	60,73
	Mín.		843,9	3,6	11,20
	Máx.		17524,0	11,8	65,74
	Perc 75%		9011,0	6,0	24,30
	Perc 25%		989,9	4,3	13,80

Legenda: **B**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **SF**: grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo B-SF; NR**: não realizado dosagem; †: óbito; **:animal acompanhado até T3; †*: óbito em T4.

Tabela 24 – Valores séricos de FGF-23 (pg/mL) e fósforo (sP; mg/dL) e da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B – CTM), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.), máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%), avaliados nos tempos T0, T6 e T12, atendidos no HOVET – Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – São Paulo - 2016

Grupo	Cão DRC	Tempo (T)	FGF-23	sP	uFEP
B - CTM	B7	T0	3208,3	3,7	16,54
		T6	13150,8	6,6	NR***
		T9†	184581	16,0	11,6
	B8	T0	1227,9	3,7	15,6
		T6	5296,6	6,9	35,6
		T12	12898,5	7,8	18,5
	B9	T0	1045,5	2,5	38,0
		T6	1737,2	5,6	15,7
		T12	1553,2	7,5	15,5
	B10	T0	4417,2	5,0	20,1
		T2†	2544,4	13,4	12,7
	B11	T0	8122,5	6,6	36,9
		T4†	22209,8	6,4	42,5
	B12	T0	14193,2	5,3	24,1
		T1†	6153,8	4,9	32,6
	B13	T0	3424,6	6,1	32,2
		T6†	2780,9	6,8	24,8
	Média		16973,3	6,7	24,56
	Mediana		2994,6	6,4	22,10
	DP		43591,0	3,23	9,91
	EPM		10572,0	0,79	2,48
	CV		256,8	48,00	40,34
	Mín.		1046,0	2,5	11,6
	Máx.		184581,0	16,0	42,5
	Perc 75%		13025,0	6,9	33,35
	Perc 25%		2141,0	5,0	15,67

Legenda: **B**- grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **CTM**: grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal – Grupo B-CTM; **†**: óbito; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina.

Tabela 25 – Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6
T0	4,4	4,5	6,1	4,1	3,6	8,5
T1	10,0	5,1	10,6	3,5	4,0	8,4
T2	6,2	3,9	9,7	4,4	4,0	NR*
T3	4,4	4,8	11,8†	3,8	3,8	7,1†
T4	4,4	9,1		4,6	3,7**	
T5	4,7	5,4†		4,2		
T6	5,0			4,3		
T7	5,0			4,4		
T8	5,1			5,2		
T9	5,3			4,8		
T10	4,8			4,2		
T11	4,0			4,9		
T12	4,9			5,7		
Média	5,2	5,5	8,8	4,5	3,8	8,4
Mediana	4,9	4,8	9,7	4,4	3,8	8,4
DP	1,53	1,85	2,46	0,58	0,18	0,78
EPM	0,42	0,76	1,23	0,16	0,08	0,45
CV	5,2	5,5	8,8	4,5	4,7	8,4
Mín.	4,0	3,9	6,1	3,5	3,6	8,4
Máx.	10,0	9,1	10,6	5,7	4,0	8,5
Perc 75%	5,2	6,3	11,5	4,8	3,6	8,5
Perc 25%	4,4	4,3	7,0	4,1	4,0	7,1

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **SF:** grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo B-SF; NR: não realizado; †: óbito; **: animal B5 acompanhado até T4; NR*: não realizado – amostra insuficiente; Obs: sP recomendado pela IRIS para o estágio 3 da DRC em cães $\leq 5,0$ mg/dL.

Tabela 26 – Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	3,7	3,7	2,5	5,0	6,6	5,4	6,1
T1	3,8	4,0	3,2	8,1	5,7	4,9†	7,7
T2	4,6	4,6	4,4	13,4†	7,1		3,1
T3	4,6	4,4	4,6		10,5		6,5
T4	4,7	4,5	5,8		6,4†		4,8
T5	6,2	5,0	5,4				6,4
T6	6,6	6,9	5,6				6,8†
T7	6,3	5,7	3,7				
T8	6,9	5,8	6,0				
T9	16,0†	6,6	3,0				
T10		5,9	3,1				
T11		6,4	4,5				
T12		7,8	7,4				
Média	6,34	5,48	4,55	8,83	7,26	5,15	5,91
Mediana	5,45	5,70	4,50	8,10	6,60	5,15	6,40
DP	3,59	1,23	1,44	4,25	1,88	0,35	1,51
EPM	1,13	0,34	0,40	2,45	0,84	0,25	0,57
CV	56,59	22,51	31,62	48,09	25,89	6,87	25,60
Mín.	3,7	3,7	2,5	5	5,7	4,9	3,1
Máx.	16	7,8	7,4	13,4	10,5	5,4	7,7
Perc 75%	6,7	6,5	5,7	13,4	8,8	5,4	6,8
Perc 25%	4,4	4,5	3,1	5,0	6,0	4,9	4,8

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **CTM:** grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal – Grupo B-CTM; **†:** óbito; Obs: sP recomendado pela IRIS para o estágio 3 da DRC em cães $\leq 5,0$ mg/dL.

Tabela 27 – Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6
T0	11,24	24,34	15,60	19,16	35,56	12,36
T1	8,81	14,91	19,14	17,92	NR***	75,28
T2	9,24	42,28	26,35	20,21	42,91	NR***
T3	12,62	15,50	18,10	33,77	43,16	65,74†
T4	6,98	19,68		22,08	**NR***	
T5	14,57	13,83		22,65		
T6	16,80			31,52		
T7	19,77			28,44		
T8	18,96			30,82		
T9	25,70			7,96		
T10	16,10			20,12		
T11	2,31			30,10		
T12	22,83			17,48		
Média	14,30	21,76	19,80	23,25	40,54	51,12
Mediana	14,57	17,59	18,62	22,08	42,91	65,74
DP	6,64	10,78	4,61	7,32	4,32	33,91
EPM	1,84	4,40	2,31	2,03	2,49	19,58
CV	46,43	49,54	23,28	31,48	10,66	66,33
Mín.	2,31	13,83	15,60	7,96	35,56	12,36
Máx.	25,70	42,28	26,35	33,77	43,16	75,28
Perc 75%	19,4	28,8	24,5	30,5	43,2	75,3
Perc 25%	9,0	14,6	16,2	18,5	35,6	12,4

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **SF:** grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo B-SF; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina; †: óbito; **: animal acompanhado até T4.

Tabela 28 – Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) e máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	16,54	15,64	38,05	20,12	36,90	24,09	32,25
T1	20,24	78,10	12,28	21,52	37,39	32,63†	NR***
T2	45,02	12,74	27,20	12,67†	53,68		NR***
T3	26,72	47,53	19,88		44,02		4,07
T4	NR***	57,05	48,69		42,50†		NR***
T5	35,32	27,48	48,61				NR***
T6	NR***	35,62	15,67				24,80†
T7	27,45	29,42	47,81				
T8	49,53	25,00	5,55				
T9	11,56†	28,64	13,72				
T10		27,63	16,83				
T11		28,08	10,68				
T12		18,48	15,46				
Média	29,05	33,19	24,65	18,10	42,90	28,36	17,28
Mediana	27,09	28,08	16,83	20,12	42,50	28,36	16,39
DP	13,43	18,10	15,69	4,76	6,78	6,04	14,60
EPM	4,75	5,02	4,35	2,75	3,03	4,27	8,43
CV	46,2	54,53	63,65	26,28	15,81	21,2	84,49
Mín.	11,56	12,74	5,56	12,67	36,90	24,09	4,07
Máx.	49,53	78,10	48,69	21,52	53,68	32,63	32,25
Perc 75%	42,6	41,6	42,9	21,5	48,8	32,6	32,2
Perc 25%	17,5	21,7	13,0	12,7	37,1	24,1	4,1

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **CTM:** grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal – Grupo B-CTM; NR: não realizado; †: óbito; NR***: não realizado – não foi possível coletar urina.

Tabela 29 – Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B - SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6
T0	12,0	9,5	10,0	10,6	9,2	10,8
T1	12,5	10,4	10,4	11,3	9,3	10,2
T2	12,8	9,1	11,5	10,6	9,2	NR*
T3	11,9	8,8	11,7†	11,5	9,6	10,5†
T4	11,9	6,2		11,1	8,4**	
T5	11,7	8,1†		11,6		
T6	11,3			11,5		
T7	12,4			11,2		
T8	13,3			11,3		
T9	13,6			12,5		
T10	12,3			11,4		
T11	11,1			11,0		
T12	11,4			10,7		
Média	12,2	8,8	10,6	11,2	9,1	10,5
Mediana	12,0	9,1	10,4	11,3	9,2	10,5
DP	0,75	1,44	0,83	0,51	0,44	0,28
EPM	0,21	0,59	0,41	0,14	0,20	0,16
CV	6,16	16,32	7,82	4,52	4,83	2,71
Mín.	11,1	6,2	10,0	10,6	8,4	10,2
Máx.	13,6	10,4	11,5	12,5	9,6	10,8
Perc 75%	12,65	9,72	11,65	11,50	8,80	10,81
Perc 25%	11,55	7,62	10,10	10,85	9,40	10,24

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **SF:** grupo que recebeu solução fisiológica – Grupo B-SF; NR*: não realizado – amostra insuficiente; †: óbito; **: animal acompanhado até T4.

Tabela 30 – Valores individuais da concentração sérica de cálcio total (mg/dL), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	12,2	11,1	9,8	12,3	11,5	14,0	9,6
T1	12,0	10,9	9,6	10,3	11,9	11,4†	11,7
T2	11,9	11,6	10,1	10,2†	12,1		11,0
T3	14,5	12,8	10,6		12,1		11,8
T4	13,4	11,6	8,9		12,0†		11,4
T5	12,9	10,9	9,7				10,4
T6	13,5	10,9	6,7				9,0†
T7	13,4	11,0	10,9				
T8	13,6	9,9	10,5				
T9	12,1†	10,8	10,1				
T10		10,7	15,0				
T11		10,7	9,7				
T12		10,6	7,2				
Média	12,95	11,04	9,91	10,93	11,92	12,70	10,70
Mediana	13,15	10,90	9,80	10,30	12,00	12,70	11,00
DP	0,87	0,68	1,97	1,18	0,25	1,84	1,08
EPM	0,27	0,19	0,55	0,68	0,11	1,30	0,41
CV	6,69	6,18	19,90	12,48	2,35	0	7,80
Mín.	11,9	9,9	6,7	10,2	11,5	11,4	9,0
Máx.	14,5	12,8	15,0	12,3	12,1	14,0	11,8
Perc 75%	13,53	11,35	10,55	12,30	12,10	14,00	11,70
Perc 25%	12,08	10,70	9,25	10,20	11,70	11,40	9,60

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS) – Grupo B; **CTM:** grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal – Grupo B-CTM; **†:** óbito.

Tabela 31 – Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (Máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – SF	B1	B2	B3	B4	B5	B6
T0	1,412	1,339	1,283	1,454	1,380	1,500
T1	1,510	1,360	1,298	1,460	1,366	1,430
T2	1,550	1,320	1,302	1,420	1,300	1,319
T3	1,463	1,173	1,317†	1,454	1,360	1,409
T4	1,505	0,805		1,535	1,305**	1,424†
T5	1,408	1,097†		1,496		
T6	1,541			1,410		
T7	1,591			1,432		
T8	1,621			1,370		
T9	1,621			1,410		
T10	1,451			1,406		
T11	1,576			1,426		
T12	1,513			1,420		
Média	1,520	1,180	1,300	1,438	1,340	1,416
Mediana	1,513	1,247	1,300	1,426	1,360	1,424
DP	0,072	0,212	0,014	0,043	0,040	0,065
EPM	0,020	0,086	0,007	0,012	0,020	0,029
CV	4,74	17,97	1,08	2,99	2,980	4,59
Mín.	1,408	0,805	1,283	1,370	1,300	1,319
Máx.	1,621	1,360	1,302	1,535	1,400	1,500
Perc 75%	1,584	1,344	1,313	1,457	1,300	1,465
Perc 25%	1,457	1,024	1,287	1,410	1,400	1,364

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

Tabela 32 – Valores individuais da concentração sanguínea de cálcio iônico (mmol/L), bem como média, mediana, desvio-padrão (DP), erro padrão da média (EPM), coeficiente de variação (CV; %), mínimo (mín.) máximo (máx.), percentil 75% (perc 75%) e percentil 25% (perc 25%) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) em cães com doença renal crônica no estágio 3 (B – CTM) ao longo do acompanhamento (T0-T12) – São Paulo - 2016

B – CTM	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13
T0	1,452	1,393	1,377	1,503	1,509	1,522	1,350
T1	1,490	1,420	1,520	1,481	1,504	1,559†	1,304
T2	1,475	1,302	NR*	1,358†	1,405		1,373
T3	1,507	1,351	1,328		1,385		1,260
T4	1,444	1,229	1,407		1,388†		1,346
T5	1,406	1,270	1,198				1,236
T6	1,319	1,278	1,047				1,019†
T7	1,303	1,334	1,332				
T8	1,385	1,194	1,359				
T9	1,175†	1,259	1,360				
T10		1,284	1,301				
T11		1,290	1,270				
T12		1,247	0,894				
Média	1,396	1,296	1,283	1,447	1,438	1,541	1,270
Mediana	1,425	1,284	1,303	1,481	1,405	1,541	1,304
DP	0,103	0,064	0,168	0,078	0,063	0,026	0,121
EPM	0,033	0,018	0,048	0,045	0,028	0,018	0,046
CV	7,41	4,93	13,11	5,40	4,37	1,70	9,54
Mín.	1,175	1,194	0,894	1,358	1,385	1,522	1,019
Máx.	1,507	1,420	1,520	1,503	1,509	1,522	1,373
Perc 75%	1,479	1,343	1,373	1,503	1,507	1,559	1,350
Perc 25%	1,315	1,253	1,216	1,358	1,387	1,522	1,236

Legenda: **B-** grupo de cães com doença renal crônica no estágio 3 (IRIS); **CTM:** grupo que recebeu célula-tronco mesenquimal; NR*: não realizado – amostra insuficiente; †: óbito.

No que se refere à concentração sérica de FGF-23 nos momentos T0, T6 e T12, observou-se que 100% dos cães do Grupo B apresentaram valores aumentados (>322,30pg/mL) quando comparados com os cães do Grupo C, como também com os cães do Grupo A. Ainda, há diferença significativa dos valores séricos de FGF-23 entre os cães dos Grupos A e B (Mann Whitney test; $P < 0,0001$) (Gráfico 13).

No **Grupo B-SF**, a mensuração de FGF-23 sérico foi realizada em quatro (B1, B2, B3 e B4) dos seis cães do referido grupo, e foi observado valores aumentados nesses quatro cães citados (Tabela 23). O coeficiente de variação das concentrações séricas de FGF-23 obtido nos cães do Grupo B-SF, nos diferentes tempos (T0, T6 e T12 ou até o óbito) ao longo do acompanhamento, foi de 144,47% (Tabela 23). Neste Grupo B-SF, apenas o cão B1 apresentava-se normofosfatêmico na presença de valores elevados de FGF-23 (Tabelas 23 e 25).

Na avaliação de todos os cães do Grupo B-SF em que a determinação sérica de fósforo foi realizada nos tempos T0, T6 e 12 ou até antes do óbito, foi observado que quatro do total de seis cães do Grupo B-SF (Tabelas 23 e 25) encontravam-se hiperfosfatêmicos ($>5,0\text{mg/dL}$) e como também valores séricos aumentados de FGF-23 (Tabela 23), entretanto, os valores da uFEP em T0, T6 e T12 encontravam-se abaixo de 28,89% (Tabela 27). Observou-se correlação positiva moderada entre os os valores de FGF-23 e de fósforo sérico nos cães DRC (Spearman correlation; $r=0,4089$; $P=0,0019$). Também foi encontrado correlação positiva importante entre os valores séricos de creatinina e FGF-23 nos cães do presente estudo (Spearman correlation; $r=0,8390$; $P<0,0001$).

Já nos cães do **Grupo B-CTM**, a concentração sérica de FGF-23 foi mensurada em todos animais desse referido grupo (B7 a B13). Todos os cães do Grupo B-CTM apresentaram valores elevados de FGF-23 sérico (Tabela 24). O coeficiente de variação (CV) dos valores de FGF-23 obtidos nos cães do Grupo B-CTM nos diferentes tempos ao longo do acompanhamento foi de 256,80% (Tabela 24).

Ao comparar os níveis de FGF-23 entre cães do Grupo B-SF (Gráfico 11) e Grupo B-CTM (Gráfico 12), não foi detectada diferença (Mann Whitney test; $P=0,0662$), entretanto observa-se que os valores de FGF-23 nos cães do Grupo B-CTM apresentaram-se mais elevados do que nos cães do Grupo B-SF (Tabelas 23 e 24). A mediana da concentração sérica de FGF-23 para o Grupo B-SF (Tabela 23; Gráfico 11) foi de $1592,3\text{ pg/mL}$ (mín. de $843,9$ e máx. de $16156,4\text{ pg/mL}$) com média $\pm$ EPM de $4755,2 \pm 2290,0\text{ pg/mL}$, enquanto que para os cães do Grupo B-CTM (Tabela 24; Gráfico 13) a mediana foi de $2994,6\text{ pg/mL}$ (mín. de $1045,5$ e máx. de $22209,8\text{ pg/mL}$) com média $\pm$ EPM de $16973,3 \pm 1057,0\text{ pg/mL}$.

Gráfico 11 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo – 2016

Gráfico 12 - Valores individuais da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo – 2016

Gráfico 13 - Box plot da concentração sérica de FGF-23 (pg/mL) em cães com doença renal crônica do Grupo A e do Grupo B relacionados a todos os valores obtidos nos tempos T0,T6 e T12 – São Paulo - 2016

No referente ao **Grupo B (B-SF e B-CTM)**, para fins de análise das associações do FGF-23 sérico com o fósforo, ureia e creatinina sérica e a excreção fracionada de fósforo na urina, definiu-se os quartis (Tabela 33) que foram obtidos a partir dos valores de FGF-23 desses grupos, nos diferentes tempos (Tabelas 23 e 24). Assim os valores de quartis foram divididos da seguinte forma **no momento T0**: quartil 1 (até 1096,9 pg/mL), quartil 2 (1097,0 a 1866,0 pg/mL), quartil 3 (1866,1 a 14193,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 14193,1 pg/mL). **No momento T6**, os valores de quartis foram definidos como: quartil 1 (até 1700,9 pg/mL), quartil 2 (1701,0 a 4039,0 pg/mL), quartil 3 (4039,1 a 13902,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 13902,1 pg/mL). **No momento T12**, os valores de quartis de FGF-23 foram: quartil 1 (até 1419,0 pg/mL), quartil 2 (1420,0 a 4467,0 pg/mL), quartil 3 (4467,1 a 18696,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 18696,1 pg/mL).

Tabela 33 – Valores de quartis de FGF-23 sérico em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ou células-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0, T6 e T12, bem como idade (em meses), concentração sérica de ureia (sU; mg/dL), creatinina (sCr; mg/dL), fósforo (sP; mg/dL), e excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) – São Paulo - 2016

GRUPO B-T0	QUARTIL 1 FGF-23 até 1096,9 (pg/mL)	QUARTIL 2 FGF-23 de 1097,0 a 1866,0 (pg/mL)	QUARTIL 3 FGF-23 de 1866,1 a 14193,0 (pg/mL)	QUARTIL 4 FGF-23 >14193,1 (pg/mL)
	n = 3	n = 3	n = 4	n = 1
Idade (meses)	120 (B2); 192 (B4); 132 (B9)	24 (B1); 144 (B3); 120 (B8)	24 (B7); 120 (B10); 204 (B11); 96 (B13)	192 (B12)
sU (mg/dL)	183,2 (B2); 63,0 (B4); 185,8 (B9)	92,3 (B1); 271,6 (B3); 153,3 (B8)	171,3 (B7); 252,6 (B10); 318,8 (B11); 200,7 (B13)	300,7 (B12)
sCr (mg/dL)	2,5 (B2); 2,4 (B4); 2,1 (B9)	2,5 (B1); 2,4 (B3); 2,3 (B8)	4,2 (B7); 4,7 (B10); 4,4 (B11); 2,5 (B13)	3,2 (B12)
sP (mg/dL)	4,5 (B2); 4,1 (B4); 2,5 (B9)	4,4 (B1); 6,1 (B3); 3,7 (B8)	3,7 (B7); 5,0 (B10); 6,6 (B11); 6,1 (B13)	5,4 (B12)
uFEP (%)	24,3 (B2); 19,16 (B4); 38,05 (B9)	11,20 (B1); 15,6 (B3); 15,64 (B8)	16,54 (B7); 20,12 (B10); 36,9 (B11); 32,25 (B13)	24,09 (B12)
GRUPO B-T6 ou óbito	QUARTIL 1 FGF-23 até 1700,9 (pg/mL)	QUARTIL 2 FGF-23 de 1701,0 a 4039,0 (pg/mL)	QUARTIL 3 FGF-23 de 4039,1 a 13902,0 (pg/mL)	QUARTIL 4 FGF-23 >13902,1 (pg/mL)
	n = 1	n = 2	n = 2	n = 1
Idade (meses)	30 (B1); 126 (B2)	138 (B9); 126 (B10); 102 (B13)	30 (B7); 126 (B8); 198 (B12)	150 (B3); 198 (B4); 210 (B11)
sU (mg/dL)	129,5 (B1); 64,5 (B2)	230,4 (B9); 336,3 (B10); 240,3 (B13)	354,9 (B7); 277,3 (B8); 190,4 (B12)	316,0 (B3); 161,0 (B4); 202,9 (B11)
sCr (mg/dL)	2,7 (B1); 5,0 (B2)	2,4 (B9); 7,1 (B10); 4,0 (B13)	6,1 (B7); 2,8 (B8); 4,9 (B12)	3,4 (B3); 3,1 (B4); 4,3 (B11)
sP (mg/dL)	5,0 (B1); 5,4 (B2)	5,6 (B9); 13,4 (B10); 6,8 (B13)	6,6 (B7); 6,9 (B8); 6,8 (B12)	11,8 (B3); 4,3 (B4); 6,4 (B11)
uFEP (%)	16,8 (B1); 13,83 (B2)	15,67 (B9); 12,67 (B10); 6,8 (B13)	11,56 (B7); 35,62 (B8); 24,8 (B12)	18,10 (B3); 31,52 (B4); 42,5 (B11)
GRUPO B-T12 ou óbito	QUARTIL 1 FGF-23 até 1419,9 (pg/mL)	QUARTIL 2 FGF-23 de 1420,0 a 4467,0 (pg/mL)	QUARTIL 3 FGF-23 de 4467,1 a 18696,0 (pg/mL)	QUARTIL 4 FGF-23 >18696,1 (pg/mL)
	n = 1	n = 3	n = 2	n = 2
Idade (meses)	204 (B4)	144 (B9)	132 (B8)	36 (B7)
sU (mg/dL)	283,9 (B4)	291,7 (B9)	322,4 (B8)	456,0 (B7)
sCr (mg/dL)	4,1 (B4)	3,3 (B9)	7,8 (B8)	12,9 (B7)
sP (mg/dL)	5,7 (B4)	7,4 (B9)	7,8 (B8)	16,0 (B7)
uFEP (%)	17,48 (B4)	15,46 (B9)	18,48 (B8)	11,56 (B7)

OBS: animais que foram a óbito e tempo: B2 (T5), B3 (T3), B6 (T4), B7 (T9), B10 (T2), B11 (T4), B12 (T1) e B13 (T6); o cão B1 em T12 não tem FGF-23 sérico dosado; o cão B5 e B6 não tem FGF-23 dosado em nenhum momento.

Observando os valores de FGF-23 segundo os quartis de 1 a 4 (Tabela 33) no **Grupo B** (estágio 3) nos momentos T0, T6 e T12, foi observado que no **momento T0**, no quartil 1, os valores de ureia sérica variaram de 63,0 a 185,8mg/dL, na presença de normofosfatemia, e detectado aumento de uFEP somente no cão B9 (38,05%). No quartil 2, os valores séricos de ureia aumentaram em comparação com o quartil 1, variando de 92,3 a 271,6mg/dL, e nesse quartil foi detectada hiperfosfatemia (> 5,0mg/dL) em um cão (B3), e sem o aumento da

uFEP. No quartil 3, os valores séricos de ureia e creatinina tornaram-se mais exacerbados (ureia variou de 171,3 a 318,8mg/dL), e hiperfosfatemia foi detectada em 50% dos cães e com aumento da uFEP em dois cães (B11 e B13). Já no quartil 4, ocorreu hiperfosfatemia sem aumento da uFEP. No **momento T6**, mesmo na presença de normofosfatemia, o FGF-23 já estava aumentado, e não houve aumento da uFEP. No quartil 2 em T6, da mesma forma que em T0, ocorreu aumento na concentração sérica de ureia e creatinina, e foi constatada hiperfosfatemia, entretanto a uFEP manteve-se nos patamares similares ao quartil 1. No quartil 3 em T6, a azotemia foi mais intensa, sendo que os cães B7 e B12 evoluíram para o estágio 4 da DRC, e a presença de hiperfosfatemia em três cães (B7, B8 e B12) e aumento da uFEP em B8 e B12. Em contrapartida no quartil 4 em T6, somente o cão B4 encontrava-se nesse quartil, mas este cão no momento anterior estava no quartil 4 e não foi observada hiperfosfatemia, entretanto a uFEP estava aumentada (31,52%). Já no **momento T12**, o quartil 1 foi caracterizado por normofosfatemia e uFEP considerada ainda normal. No quartil 2, houve piora da concentração de creatinina e com evolução para o estágio 4 da DRC, observando-se hiperfosfatemia e diminuição da uFEP em comparação ao quartil 1. No que se refere ao quartil 3 em T12, o valor de ureia e creatinina sérica mantiveram-se similares ao quartil anterior, associada a hiperfosfatemia e a manutenção da diminuição da uFEP. E por fim, no quartil 4, foi observada intensa azotemia, hiperfosfatemia intensa, assim como valores menores da uFEP quando comparados aos quartis anteriores (Tabela 33).

Nos animais do Grupo B (estágio 3) foi considerado hiperfosfatemia quando o valor de fósforo sérico apresentava-se superior a 5,0mg/dL, conforme proposto pela IRIS (Tabelas 25 e 26). Dessa forma, hiperfosfatemia foi observada em 84,6% (n=11) dos cães do Grupo B em algum momento durante o tempo de acompanhamento (Tabelas 25 e 26; Gráficos 14 a 17). Se for considerada apenas os cães do Grupo B-SF (Gráficos 14 e 16), 83,3% apresentou hiperfosfatemia (5 de 6), e no Grupo B-CTM (Gráficos 15 e 17) esta foi observada em 85,7% dos casos (6 de 7). Como mencionado anteriormente, quando comparado os valores séricos de fósforo do Grupo B com o Grupo A, foi observada diferença estatística (Mann Whitney test; $P < 0,0001$), entretanto, quando da comparação dos cães do Grupo B-SF com os cães do Grupo B-CTM, não foi observada diferença estatística (Mann

Whitney test; $P=0,1688$). Também não foi encontrada correlação entre os valores de fósforo sérico e de uFEP (Spearman correlation; $r= 0,0621$; $P=0,6346$).

O coeficiente de variação das concentrações de fósforo sérico dos cães do Grupo B-SF e Grupo B-CTM, ao longo dos momentos de acompanhamento, de T0 a T12, variaram de 3,8 a 8,8% e de 6,8 a 56,6%, respectivamente (Tabelas 25 e 26). A média $\pm$ EPM ao longo do período de acompanhamento de T0 a T12 nos animais do Grupo B-SF foram: B1 = $5,2 \pm 0,42\text{mg/dL}$; B2 = $5,5 \pm 0,76\text{mg/dL}$; B3 = $8,8 \pm 1,23\text{mg/dL}$; B4 = $4,5 \pm 0,16\text{mg/dL}$; B5 = $3,8 \pm 0,08\text{mg/dL}$ e B6 = $8,4 \pm 0,45\text{mg/dL}$ (Tabela 25), e no grupo B-CTM no período de T0 a T12, observa-se média $\pm$ EPM de: B7 = $6,3 \pm 1,13\text{mg/dL}$; B8 = $5,5 \pm 2,45\text{mg/dL}$; B9 = $4,5 \pm 0,40\text{mg/dL}$; B10 = $8,8 \pm 2,45\text{mg/dL}$; B11 = $7,3 \pm 0,84\text{mg/dL}$; B12 = $5,1 \pm 0,25\text{mg/dL}$ e B13 = $5,9 \pm 0,57\text{mg/dL}$ (Tabela 26).

Vale ressaltar que no momento T0, 53,8% dos cães do Grupo B que eram normofosfatêmicos ($sP < 5,0\text{mg/dL}$) (Tabelas 25 e 26) já apresentavam valores elevados de FGF-23, e que incluem os cães B1 ($sP = 4,4\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 1738,1\text{pg/mL}$), B2 ($sP = 4,5\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 957,6\text{pg/mL}$), B4 ($sP = 4,1\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 1096,9\text{pg/mL}$), B7 ($sP = 3,7\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 3208,3\text{pg/mL}$), B8 ($sP = 3,7\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 1227,9\text{pg/mL}$), B9 ($sP = 2,5\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 1045,5\text{pg/mL}$) e B10 ($sP = 5,0\text{mg/dL}$ e $\text{FGF-23} = 4417,2\text{pg/mL}$) na comparação dos valores séricos de fósforo entre os cães dos Grupos A e B (Gráfico 18), observa-se que a concentração sérica de fósforo foi maior nos cães do Grupo B, e nota-se diferença significativa (Mann Whitney test; $P < 0,0001$).

Gráfico 14 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016

Legenda: ---: refere-se ao valor de fósforo sérico ideal (até 5,0mg/dL) para cães DRC no estágio 3, de acordo com a IRIS.

Gráfico 15 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) ao longo do período de observação (T0 a T12) – São Paulo - 2016

Legenda: ---: refere-se ao valor de fósforo sérico ideal (até 5,0mg/dL) para cães DRC no estágio 3, de acordo com a IRIS.

Gráfico 16 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo sérico (mg/dL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

OBS: - - -: refere-se ao valor de fósforo sérico (até 5,0mg/dL) proposto para o estágio 3 de acordo com a IRIS.

Gráfico 17 - Valores individuais da concentração sérica de fósforo (mg/dL) em cães com doença renal crônica (DRC) do Grupo B que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: - - -: refere-se valor de fósforo sérico (até 5,0mg/dL) proposto para o estágio 3 de acordo com a IRIS.

Gráfico 18 - Box plot da concentração sérica de fósforo (sP; mg/dL) em cães do Grupo A e do Grupo B relacionados a todos os valores obtidos nos tempos T0,T6,12 – São Paulo - 2016

Os valores da uFEP (%) do Grupo B-SF e Grupo B-CTM nos tempos T0,T6 e T12 estão apresentados nos Gráficos 19 e 20, bem como os valores individuais ao longo do período de acompanhamento nas Tabelas 27 e 28.

No que se refere aos valores da uFEP dos cães do Grupo B-SF (Tabela 27; Gráfico 19), foi constatado valores aumentados (>28,89%) nos animais B2 (T2 = 42,28%), B5 (T2 = 42,91%; T3 = 43,16%), B6 (T1 = 75,28%; T3 = 65,74%), confirmando que 50% (3 de 6) dos animais do Grupo B-SF apresentaram valores elevados de uFEP (Tabela 27; Gráficos 19 e 20). Enquanto que no grupo B-CTM (Tabela 28; Gráfico 20), foi observado aumento da uFEP nos cães B7 (T2 = 45,02%; T8 = 49,53%), B8 (T1 = 78,10%; T3 = 47,53%; T4 = 57,05%; T7 = 29,42%), B9 (T4 = 48,69%; T5 = 48,61%; T7 = 47,81%), B11 (T2 = 53,68%; T3 = 44,02%; T4 = 42,50%), B12 (T1 = 32,63%) e B13 (T0 = 32,25%), o que correspondeu a 85,71% de cães do Grupo B-CTM com aumento da uFEP, confirmando que valores maiores e aumentados da uFEP aumentados foram mais frequente no Grupo B-CTM. Entretanto, na comparação da uFEP do Grupo B-SF e do Grupo B-CTM (Gráfico 21)

não foi detectada diferença estatística (*Unpaired t test*; $P=0,3234$) e, também, não houve correlação entre os valores de FGF-23 e da uFEP (Spearman correlation; $r=0,2476$; $P=0,0711$).

Ainda em relação a uFEP, não foi detectada diferença significativa entre os cães do Grupo C e os cães do Grupo B nos tempos T0, T6 e T12 (Mann Whitney; $P=0,0642$), apesar do Grupo B – CTM ter apresentado valores maiores da uFEP do que o Grupo B-SF (Tabelas 27 e 28). No Grupo B-SF, a média $\pm$ EPM da uFEP foi de $19,7 \pm 2,2\%$ (mín. 11,2 e máx. 35,9%), enquanto que para o Grupo B-CTM, esta foi de $23,5 \pm 2,8\%$ (mín. 7,9 e máx. 42,5%) (Gráfico 21).

Entretanto, a avaliação da uFEP do Grupo A (SF e CTM) em comparação com o Grupo B (SF e CTM) (Gráfico 22), a média $\pm$ EPM foi de $13,3 \pm 2,6\%$ para o Grupo A, e para o Grupo B de $21,9 \pm 1,8\%$, e foi constatada diferença significativa entre esses grupos (Mann Whitney test; $P = 0,0022$) (Gráfico 22).

Gráfico 19 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: - - -: refere-se valor de referência para uFEP, obtido a partir dos cães clinicamente normais (grupo C).

Gráfico 20 - Valores individuais da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães do Grupo B que receberam células-tronco mesenquimal (B-CTM) nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo – 2016

OBS: Valor de referência para uFEP, obtido a partir dos cães clinicamente normais (grupo C).

Gráfico 21 - Box plot dos valores de excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo B que receberam solução fisiológica (B-SF) e dos cães que receberam célula-tronco mesenquimal (B-CTM) relacionados a todos os valores obtidos nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

Gráfico 22 - Box plot dos valores de excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP; %) em cães com doença renal crônica do Grupo A e do Grupo B relacionados a todos os valores obtidos nos tempos T0, T6 e T12 – São Paulo - 2016

Referente às concentrações séricas de cálcio total no Grupo B-SF (Tabela 29), neste Grupo B-SF, a hipercalcemia ($\text{Catt} > 11,5\text{mg/dL}$) foi detectada nos animais B1 ($T_0 = 12,0$; $T_1 = 12,5$; $T_2 = 12,8$; $T_3 = 11,9$; $T_4 = 11,9$; $T_5 = 11,7$; $T_7 = 12,4$; $T_8 = 13,3$; $T_9 = 13,6$ e $T_{10} = 12,3\text{mg/dL}$), B3 ($T_3 = 11,7\text{mg/dL}$), B4 ($T_5 = 11,6$ e $T_9 = 12,5\text{mg/dL}$), e a hipocalcemia ($\text{Catt} < 9,0\text{mg/dL}$) foi observada nos cães B2 ($T_3 = 8,8$; $T_4 = 6,2$ e $T_5 = 8,1\text{mg/dL}$) e B5 ($T_4 = 8,4\text{mg/dL}$). Já na avaliação pelo valor de cálcio iônico (iCa) (Tabela 31), pôde-se observar hipercalcemia iônica ($\text{iCa} > 1,5\text{mmol/L}$) nos animais B1 ($T_1 = 1,510$; $T_2 = 1,550$; $T_4 = 1,505$; $T_6 = 1,541$; $T_7 = 1,541$; $T_8 = 1,621$; $T_9 = 1,621$; $T_{11} = 1,576$ e $T_{12} = 1,513\text{mmol/L}$) e B4 ($T_4 = 1,535\text{mmol/L}$), enquanto que hipocalcemia iônica ($\text{iCa} < 1,2\text{mmol/L}$) foi encontrada nos cães B2 ($T_3 = 1,173\text{mmol/L}$) e B4 ($T_4 = 0,805\text{mmol/L}$ e $T_5 = 1,097\text{mmol/L}$).

No Grupo B-CTM (Tabela 30), foi observada hipercalcemia ($\text{Catt} > 11,5\text{mg/dL}$) nos animais B7 durante todo o tempo de acompanhamento ($T_0 = 12,2$; $T_1 = 12,0$; $T_2 = 11,9$; $T_3 = 14,5$; $T_4 = 13,4$; $T_5 = 12,9$; $T_6 = 13,5$; $T_7 = 13,4$; $T_8 = 13,6$ e $T_9 = 12,1\text{mg/dL}$), B8 ($T_2 = 11,6$; $T_3 = 12,8$ e $T_4 = 11,6\text{mg/dL}$), B9 ($T_{10} = 15,0\text{mg/dL}$), B10 ($T_0 = 12,3\text{mg/dL}$), B11 ($T_0 = 11,5$; $T_1 = 11,9$; $T_2 = 12,1$; $T_3 = 12,1$ e $T_4 = 12,0\text{mg/dL}$), B12 ($T_0 = 14,0\text{mg/dL}$) e B13 ($T_1 = 11,7$ e $T_3 = 11,8\text{mg/dL}$); enquanto que hipocalcemia ($\text{Catt} < 9,0\text{mg/dL}$) foi observada apenas no cão B9 ($T_4 = 8,9$; $T_6 = 6,7$ e $T_{12} = 7,2\text{mg/dL}$). Ao se avaliar os resultados de cálcio iônico ainda no Grupo B-CTM

(Tabela 32), foi detectada hipercalcemia iônica nos animais B7 ($T_3 = 1,507 \text{ mmol/L}$), B9 ($T_1 = 1,520 \text{ mmol/L}$), B10 ($T_0 = 1,503 \text{ mmol/L}$), B11 ($T_0 = 1,509$ e $T_1 = 1,504 \text{ mmol/L}$) e B12 ($T_0 = 1,522$ e $T_1 = 1,559 \text{ mmol/L}$). Ainda no Grupo B-CTM, hipocalcemia iônica foi observada nos cães B7 ($T_9 = 1,175 \text{ mmol/L}$), B8 ($T_8 = 1,194 \text{ mmol/L}$), B9 ($T_5 = 1,198$; $T_6 = 1,047 \text{ mmol/L}$ e $T_{12} = 0,894 \text{ mmol/L}$) e B13 ($T_6 = 1,019 \text{ mmol/L}$).

No que se refere a composição da dieta dos cães DRC do Grupo B (Tabela 18), 11 cães receberam dieta hipofosfórica (dieta comercial prescrita para cães nefropatas), correspondendo a 84,6% dos casos, e apenas 15,4% foram alimentados com dieta caseira sem restrição de fósforo. Foi observado que os cães que comeram dieta sem restrição de fósforo apresentaram valores da uFEP mais elevados quando comparados com aqueles que receberam dieta hipofosfórica. As média $\pm$ EPM em T_0 , T_6 e T_{12} nos cães com dieta hipofosfórica foram de $T_0 = 21,12 \pm 2,54\%$, $T_6 = 27,98 \pm 5,71\%$ e $T_{12} = 26,32 \pm 5,37\%$, e nos cães do Grupo B que foram alimentados com dieta caseira (sem restrição de fósforo) a média $\pm$ EPM em T_0 , T_6 e T_{12} foram de $T_0 = 37,48 \pm 0,57\%$, $T_6 = 34,68 \pm 19,01$ e $T_{12} = 28,98 \pm 13,52\%$. Ao avaliar cada sub-grupo do Grupo B, alimentados com dieta hipofosfórica, observa-se que apenas dois cães do sub-grupo CTM (B9 e B11) foram alimentados com dieta não restrita em fósforo, e dentre os cães do Grupo B que apresentaram maiores valores da uFEP elevado ($>28,89\%$) incluíam os cães B4 e B6, pertencente ao sub-grupo B-SF, e os cães B8, B9, B11 e B12 do sub-grupo CTM.

Referente às complicações decorrente da disfunção renal (Tabela 19), oito dos nove cães que compuseram o Grupo A (correspondendo a 84,6% dos casos), desenvolveram alguma complicação decorrente da progressão da DRC em que quatro dos nove cães desenvolveram anemia normocítica normocrômica (38,4%), hiperfosfatemia (53,8%) e acidose metabólica (69,2%). Os animais que desenvolveram anemia foram tratados com reposição de eritropoietina recombinante humana por via subcutânea (50 a 150U/kg) quando o valor de hematócrito era inferior a 20%, associado a suplementação com glicinato férrico por via oral. Os cães que apresentaram acidose metabólica foram submetidos a terapia por via oral com bicarbonato de sódio (8 a 12mg/kg, SIB, BID ou TID, de acordo com a necessidade) quando o bicarbonato sanguíneo estivesse entre 12 a 18mEq/L, e por via parenteral

quando abaixo de 12mEq/L. Para o controle da hiperfosfatemia foi utilizado dieta hipofosfórica por cerca de 30 dias e, após, avaliada a concentração sérica de fósforo (sangue coletado após jejum alimentar de 12 horas), e caso ainda fosse necessário, era introduzido quelante intestinal de fósforo por via oral, inicialmente com hidróxido de alumínio (45mg/kg, BID, junto com as refeições) e se ainda não houvesse controle da hiperfosfatemia era associado o carbonato de cálcio (45mg/kg, BID, junto com as refeições, exceto em cães com hipercalcemia). Os cães que receberam quelante intestinal de fósforo apresentaram uFEP média $\pm$ EPM de $24,10 \pm 2,54\%$, e quando comparada com os cães do Grupo B que não receberam quelante, a média $\pm$ EPM foi de $28,16 \pm 2,22\%$, e não houve diferença estatística entre eles (Mann Whitney test; $P = 0,2506$).

5.4 EFEITOS ADVERSOS OBSERVADOS DURANTE A ADMINISTRAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAL

Durante a aplicação intravenosa das células-tronco mesenquimais foi observado alguns efeitos adversos, e estes foram constatados nos cães A7 e A8 do Grupo A.

No cão A7, foi observado convulsão tônico-clônica de rápida duração (cerca de cinco segundos) com defecação involuntária. O animal foi mantido em observação, e houve rápida recuperação do estado de consciência, apresentando parâmetros vitais normais. Posteriormente o animal não apresentou mais nenhum sintoma neurológico até o final do acompanhamento do estudo, não havendo a necessidade de intervenção terapêutica.

O cão A8 também apresentou um episódio de convulsão tônico-clônica durante a aplicação das CTM, com duração de aproximadamente 2 minutos, caracterizada por espasmos tônico-clônicos, sialorréia, micção e defecação involuntária. No momento da convulsão foi indicada terapia anti-convulsivante, diazepam (0,5mg/kg, por via intravenosa), com resolução do quadro. Foi mantido em observação para monitorização dos parâmetros vitais, os quais mantiveram-se estáveis e sem alterações.

6 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA DOS CÃES DO GRUPO B

Nos cães do Grupo B, desde o início do acompanhamento, as concentrações de FGF-23 sérico foram mais elevadas quando comparadas com os cães do Grupo A (diferença estatística significativa; Mann Whitney test; $P < 0,0001$), entretanto, diferentemente dos cães do Grupo A, os cães do Grupo B já apresentavam hiperfosfatemia em sua maioria ($< 5,0 \text{ mg/dL}$). Os níveis séricos de FGF-23 foram avaliados em quatro de seis cães do Grupo B-SF, nos quais foi observado aumento de FGF-23 durante todo o tempo de acompanhamento. No cão B4 foi observado aumento importante de FGF-23 em T6 ($16156,4 \text{ pg/mL}$) associado com o aumento da uFEP (31,5%), entretanto com posterior diminuição em T12 (FGF-23 = $843,9 \text{ pg/mL}$) mas com a uFEP menor em comparação com T6 (uFEP de 17,5%). Ainda, foi observado que concentrações aumentadas de FGF-23, associadas com hiperfosfatemia e diminuição de uFEP, foram constatadas nos cães que vieram a óbito, ou seja, nos três cães do Grupo B-CTM (B7, B10 e B13).

No Grupo B-SF, no cão B3, a concentração sérica de FGF-23 aumentou consideravelmente no momento em que o animal foi a óbito (T3) e estava associada a hiperfosfatemia intensa ($sP = 11,8 \text{ mg/dL}$) e sem aumento da uFEP (19,1%). Também foi observado aumento dos níveis de FGF-23, mas associado com normofosfatemia e aumento da uFEP nos cães B4 (T6), B9 (T0), B11 (T0 e óbito logo após T4), B12 (T1 e óbito logo após T1) e B13 (T0 e óbito após T6).

Em relação aos valores da uFEP, foi possível observar que os cães do Grupo B apresentaram valores mais elevados em comparação com os cães do Grupo A, porém alguns animais do Grupo B apresentaram redução gradual dos valores da uFEP ao longo da evolução da DRC que estava associada com aumento exacerbado da concentração sérica de FGF-23, bem como do fósforo sérico. A sobrevivência dos cães do Grupo B foi inferior quando comparada com os cães do Grupo A, não sendo observado nenhum óbito durante o estudo.

No Grupo B-SF ocorreram três óbitos (B2 logo após T5; B3 logo após T3; e B6 logo após T4), correspondendo a 50%. O animal B2 apresentava insuficiência valvar de mitral crônica e desenvolveu edema pulmonar refratário a terapia e evoluiu para óbito. O cão B3 e B6 desenvolveram descompensação da DRC com crise urêmica e vieram a óbito. Já no Grupo B-CTM, observou-se cinco óbitos (B7 logo

após T9; B10 logo após T2; B11 logo após T4; B12 logo após T1; B12 logo após T1 e B13 logo após T6). O cão B7 era um cão jovem, e a DRC evoluiu rapidamente ao longo de nove meses, com piora da acidose metabólica e óbito. No cão B11 houve descompensação da DRC e crise urêmica com agravamento da acidose metabólica e posterior óbito. Já o cão B12, o tutor optou pela eutanásia e que foi assistido em serviço particular/ externo em decorrência de crise de dor secundária a discopatia. Por fim, o cão B13 foi a óbito também em decorrência de descompensação da DRC. O número de óbitos no Grupo B correspondeu a 61,54% dos casos, sendo que 50% ocorreram no sub-grupo B-SF e de 71,43% no sub-grupo B-CTM.

A sobrevida foi menor nos animais do Grupo B que apresentaram valores mais elevados de FGF-23 sérico. A curva de Kaplan-Meier foi realizada a fim de demonstrar a sobrevida dos dois grupos de cães com doença renal crônica (Grupos A e B), os quais corresponderam aos estágios 2 e 3 da DRC, respectivamente, independente se receberam solução fisiológica ou célula-tronco mesenquimal, a fim de esclarecer o papel do FGF-23 como marcador prognóstico em T0 e demonstrar a diferença de sobrevida entre os dois grupos (Gráficos 23 e 24).

A curva de Kaplan-Meier foi realizada a fim de observar a sobrevida dos cães com doença renal crônica dos Grupos A e B, independente se receberam SF ou CTM, para avaliar o valor do FGF-23 sérico como marcador prognóstico no momento T0, ou seja, no início do acompanhamento, bem como verificar a existência de diferença de sobrevida entre os dois grupos.

Gráfico 23- Curva de Kaplan-Meier referente a sobrevida dos cães com doença renal crônica do **Grupo A (estágio 2) e do Grupo B (estágio 3)** associado ao aumento dos níveis séricos de FGF-23 (intervalo de quartis) no início do período de acompanhamento (**T0**)

Legenda: no **Grupo A (A-SF e A-CTM)**, definiu-se os quartis que foram obtidos a partir dos valores de FGF-23, nos diferentes tempos – T0, T6 e T12. Para o momento **T0**, foram definidos os seguintes valores de FGF-23: quartil 1 (até 242,1 pg/mL), quartil 2 (242,2 a 402,0 pg/mL), quartil 3 (402,1 a 778,6 pg/mL) e quartil 4 (maior que 778,7 pg/mL). Para o mesmo Grupo A em **T6**, os valores de quartis foram: quartil 1 (até 228,0 pg/mL), quartil 2 (228,1 a 389,7 pg/mL), quartil 3 (389,8 a 756,8 pg/mL) e quartil 4 (maior que 756,9 pg/mL). E para o tempo **T12** no Grupo A, os valores de quartis incluíram: quartil 1 (até 119,1 pg/mL), quartil 2 (119,2 a 500,9 pg/mL), quartil 3 (501,0 a 824,9 pg/mL) e quartil 4 (maior que 825,0 pg/mL). No **Grupo B (B-SF e B-CTM)**, os valores de quartis foram divididos da seguinte forma no momento **T0**: quartil 1 (até 1096,9 pg/mL), quartil 2 (1097,0 a 1866,0 pg/mL), quartil 3 (1866,1 a 14193,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 14193,1 pg/mL). No momento **T6**, os valores de quartis foram definidos como: quartil 1 (até 1700,9 pg/mL), quartil 2 (1701,0 a 4039,0 pg/mL), quartil 3 (4039,1 a 13902,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 13902,1 pg/mL). No momento **T12**, os valores de quartis de FGF-23 foram: quartil 1 (até 1419,0 pg/mL), quartil 2 (1420,0 a 4467,0 pg/mL), quartil 3 (4467,1 a 18696,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 18696,1 pg/mL).

Gráfico 24- Curva de Kaplan-Meier referente a sobrevida dos cães com doença renal crônica do **Grupo B** (estágio 3) associado ao aumento dos níveis séricos de FGF-23 (intervalo de quartis) no início do período de acompanhamento (**T0**)

Legenda: no **Grupo B (B-SF e B-CTM)**, os valores de quartis foram divididos da seguinte forma no momento **T0**: quartil 1 (até 1096,9 pg/mL), quartil 2 (1097,0 a 1866,0 pg/mL), quartil 3 (1866,1 a 14193,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 14193,1 pg/mL). No momento **T6**, os valores de quartis foram definidos como: quartil 1 (até 1700,9 pg/mL), quartil 2 (1701,0 a 4039,0 pg/mL), quartil 3 (4039,1 a 13902,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 13902,1 pg/mL). No momento **T12**, os valores de quartis de FGF-23 foram: quartil 1 (até 1419,0 pg/mL), quartil 2 (1420,0 a 4467,0 pg/mL), quartil 3 (4467,1 a 18696,0 pg/mL) e quartil 4 (maior que 18696,1 pg/mL).

A seguir estão configurados os gráficos de *box plot* referentes aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A e do Grupo B no momento T0 (Gráfico 25); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos A-SF e A-CTM em T0 (Gráfico 26); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos B-SF e B-CTM em T0 (Gráfico 27); FGF-23 sérico do grupo C, Grupo A e B em T6 (Gráfico 28); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos A-SF e A-CTM em T6 (Gráfico 29); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos B-SF e B-CTM em T6 (Gráfico 30); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos A e B em T12 (Gráfico 31); FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos A-SF e A-CTM em T12 (Gráfico 32) e FGF-23 sérico do Grupo C, Grupos B-SF e B-CTM em T12 (Gráfico 33).

Gráfico 25 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A e do Grupo B no momento T0 – São Paulo - 2016

Gráfico 26 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A-SF e do Grupo A-CTM no momento T0 – São Paulo - 2016

Gráfico 27 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo B-SF e do Grupo B-CTM no momento T0 – São Paulo - 2016

Gráfico 28 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A e do Grupo B no momento T6 – São Paulo - 2016

Gráfico 29- Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A-SF e do Grupo A-CTM no momento T6 – São Paulo - 2016

Gráfico 30 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo B-SF e do Grupo B-CTM no momento T6 – São Paulo - 2016

Gráfico 31- Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A e do Grupo B no momento T12 ou óbito – São Paulo - 2016

Gráfico 32 - Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo A-SF e do Grupo A-CTM no momento T12 ou óbito – São Paulo - 2016

Gráfico 33- Box plot referente aos valores séricos de FGF-23 do grupo de cães clinicamente normais (Grupo C), do Grupo B-SF e do Grupo B-CTM no momento T12 ou óbito – São Paulo - 2016

7 DISCUSSÃO

A doença renal crônica (DRC) é a doença renal mais frequente em cães, e é caracterizada pela presença de alterações estrutural e funcional de um ou ambos os rins e que acomete, principalmente, os cães idosos (POLZIN, 2011; BARTGES, 2012). No presente estudo a idade média dos cães com DRC nos estágios 2 (Grupo A) e 3 (Grupo B) foi de 107,1 e 117,1 meses, respectivamente, corroborando com os dados da literatura (POLZIN, 2011; BARTGES, 2012).

O comprometimento das funções renais na DRC decorre da perda gradual e progressiva do número de néfrons funcionais, e como os rins são responsáveis pela excreção urinária de fósforo, a hiperfosfatemia é uma alteração comumente observada nos cães e gatos com DRC (POLZIN, 2013; GEDDES et al., 2013). Dessa forma, a avaliação seriada da concentração sérica de fósforo é considerada uma etapa muito importante na monitoração de cães durante a evolução da DRC (CORTADELLAS et al., 2010; LIPPI et al., 2014).

Em um estudo foi observado que dentre os cães com DRC que apresentavam acidose metabólica, destes 92% desenvolveram hiperfosfatemia (KOGIKA et al., 2006). Ainda, em outro estudo foi demonstrado que a hiperfosfatemia havia sido agravada com a piora da função renal, e que havia correlação positiva entre as concentrações séricas de fósforo e de PTH (LAZARETTI et al., 2006). Em outro estudo em cães doentes renais crônicos com leishmaniose, a hiperfosfatemia foi constatada em 44,2% dos casos (CORTADELLAS et al., 2009). No presente estudo, a hiperfosfatemia foi observada em 84,61% dos cães nos estágios mais avançados da DRC (estágio 3 ou Grupo B), frequência semelhante ao que foi constatada por Cortadellas et al. (2010), o qual detectou hiperfosfatemia em 92% dos cães com DRC no estágio 3. Nesse mesmo referido estudo, nos estágios iniciais da DRC nos cães (estágio 2), a hiperfosfatemia havia sido detectada em 44,2%, diferentemente do que foi encontrado no presente estudo que foi menor (11,11%).

Considerando-se o número de cães com DRC que compuseram o Grupo A-SF e o Grupo A-CTM, o total do número de cães avaliados ainda não permite conclusões definitivas se o uso da terapia com CTM contribui no retardo do desenvolvimento de distúrbio mineral em cães com DRC pela avaliação da

concentração sérica de fósforo. No que tange aos cães do Grupo B, foi avaliado número maior de animais, e a hiperfosfatemia foi detectada em ambos os subgrupos, Grupo B-SF e Grupo B-CTM, e não foi detectada diferença entre os referidos subgrupos.

Assim, para a avaliação mais verticalizada, precoce e mais fidedigna da alteração do metabolismo de fósforo, foi mensurada, pela primeira vez, na espécie canina, o FGF-23 sérico em avaliação seriada durante a evolução da doença (YAMAZAKI et al., 2002; BACCHETTA et al., 2010; FINCH et al., 2013; GEDDES et al., 2013b). No presente estudo foi realizada, inicialmente, a validação do kit humano de FGF-23 para os cães, e na medicina veterinária a única validação havia sido publicada para a espécie felina (FINCH et al., 2013; GEDDES et al., 2013b). Os coeficientes de variação, intra e inter-ensaios, obtidos nas amostras de soro de cães foram adequados e, desta forma, foi possível ter confiabilidade nos valores mensurados nos cães clinicamente normais, como também nos cães com DRC do presente estudo.

As concentrações de fósforo sérico nos cães do Grupo A, ao longo do período de observação, foram adequadas e satisfatórias, uma vez que não foi constatada diferença estatística entre os cães do Grupo A e os cães clinicamente normais (Grupo C). O controle ou a manutenção das concentrações séricas de fósforo talvez possa ter sido favorecida pela ingestão de dieta hipofosfórica (comercial ou caseira balanceada restrita em fósforo), uma vez que a literatura veterinária recomenda a introdução de dieta hipofosfórica como parte importante no tratamento conservador dos cães e gatos com doença renal crônica a partir do estágio 2 ou que, ainda, o comprometimento da função renal não tenha atingido grande magnitude no relativo a excreção renal de fósforo (BROWN et al., 1991; JACOB et al., 2002; CHEW, 2011; GEDDES et al., 2013a; POLZIN, 2013; IRIS, 2013). Assim, a investigação do FGF-23 sérico nesses cães normofosfatêmicos do Grupo A pôde trazer informações adicionais acerca da existência de desbalanço no metabolismo de fósforo.

Nos gatos, foi constatado que o FGF-23 sérico estava aumentado desde o início do acompanhamento em 14 gatos, sendo que estes especificamente, evoluíram com azotemia, constatadas ao longo do período de acompanhamento.

Ainda, foi observada correlação positiva do FGF-23 com o PTH e correlação negativa entre os valores de FGF-23 e a taxa de filtração glomerular (FINCH et al., 2013), e os gatos com creatinina sérica até 1,8mg/dL apresentaram valores basais de FGF-23 plasmático de 150 a 580pg/mL e estes mesmos, após 12 meses, o FGF-23 variou de 150 a 900pg/mL (FINCH et al., 2013); e não houve alterações do FGF-23 nos gatos com creatinina sérica inferior a 1,6mg/dL. Assim, no presente estudo de cães com DRC, os cães com azotemia mais intensa, representados pelos animais do Grupo B ou estágio 3 da DRC, apresentaram desde o início do acompanhamento, aumento das concentrações séricas de FGF-23 e, concomitantemente, na maioria dos casos, a hiperfosfatemia intensa era detectada, como também a diminuição da uFEP. A análise conjunta dessas três variáveis, ou seja, do aumento das concentrações séricas de FGF-23 e fósforo e da diminuição da uFEP, pode ser justificada, possivelmente, em decorrência da menor ação do FGF-23, pois não foi observada fosfatúria intensa que poderia refletir no aumento da uFEP.

No atinente aos valores normais de FGF-23, um estudo em gatos em que foi utilizado também o mesmo kit comercial de FGF-23 intacto (Kainos Laboratories, Inc), observou-se que havia boa precisão, reprodutibilidade e especificidade, e o valor de normalidade adotado de FGF-23 para gatos normais foi 56 a 700pg/mL (GEDDES et al., 2013b). Em cães, no presente estudo, foi considerado como valores de normalidade a variação compreendida de 226,73 a 305,43pg/mL, correspondentes aos valores de percentis de 25% e 75%, respectivamente. Para informação em termos de comparação entre as espécies, o primeiro valor de referência de FGF-23 em humanos publicado foi de 8,2 a 54,3pg/mL (YAMAKAZI et al., 2002).

Assim, a partir dos valores de normalidade, discretos aumentos da concentração sérica de FGF-23 e que ocorressem de forma sustentada ao longo do período e na ausência de hiperfosfatemia, este achado poderia indicar, de forma precoce, a presença do distúrbio mineral (marcador precoce), como foi sugerido por Geddes et al. (2013b) em gatos com DRC, e que ocorreu de forma semelhante nos cães doentes renais crônicos do presente estudo, principalmente no **Grupo A** ou estágio 2 em que já era constatado o aumento discreto do FGF-23 sérico na ausência de hiperfosfatemia, sendo que estes níveis de FGF-23 perduraram em

patamares semelhantes ao longo de todo o período de acompanhamento, e não foi observado nenhum óbito nesse Grupo A.

No atinente a avaliação dos subgrupos, no Grupo A-SF, as concentrações de FGF-23 eram normais nos cães A2, A3 e A4, e apenas o cão A1 apresentou FGF-23 sérico elevado e que perdurou nos mesmos patamares durante todo o estudo, e como todos esses cães permaneceram normofosfatêmicos, não haveria razão aparente para estimular a síntese do FGF-23 (GALVÃO et al., 2013). Ainda, como confirmação de que no Grupo A-SF não havia ocorrido alteração significativa do metabolismo de fósforo, não foi constatado o aumento da uFEP e todos os cães mantiveram valores de uFEP < 28,89%, ou seja, sem a evidência da ativação do mecanismo fosfatúrico (DOMINGUÉZ et al., 2013). Para aquele único cão (A1) que apresentou aumento na concentração sérica de FGF-23, particularmente este fato poderia estar associado às características da velocidade de evolução da doença renal juvenil / hereditária, pois tratava-se de um cão jovem e que possivelmente a velocidade da perda de néfrons poderia ser maior (NASH, 1989; LEES, 1996; GRECO, 2001) e, desta forma, favorecendo o comprometimento mais precoce da excreção renal de fósforo e estímulo para a síntese de FGF-23, apesar do controle da quantidade de ingestão de fósforo ter sido controlada pela administração de dieta comercial hipofosfórica.

No relativo ao Grupo A-CTM, o FGF-23 estava aumentando em dois cães com DRC e estes eram normofosfatêmicos. Apesar do número pequeno de apenas dois cães que compuseram o subgrupo A-CTM em que o FGF-23 foi mensurado, o aumento do FGF-23 já poderia indicar a existência de estímulo para favorecer ação fosfatúrica devido a existência da retenção de fósforo, e que, assim, estaria refletindo no aumento da síntese do FGF-23, pois estes cães mantiveram as concentrações séricas de fósforo no intervalo de normalidade, e os valores da uFEP encontravam-se no limite superior da normalidade em T6 e T12 no cão A8, e aumentada em T0, T6 e T10 (sendo T10 o último momento de avaliação) nesse mesmo cão A8 (A8: T0 = 28,69%; T6 = 28,06%; T12 = 68,70%; A9: T0 = 50,88%; T6 = 51,02%; T10 = 76,70%). Assim, estudos futuros que contemplem maior número de cães submetidos a terapia celular devem ser conduzidos para que as conclusões possam ser melhor alicerçadas para a avaliação fidedigna da terapia empregada.

Independentemente do tipo de terapia empregada, pôde-se observar que o FGF-23 nos cães doentes renais crônicos no estágio inicial (estágio 2) e que eram normofosfatêmicos, o FGF-23 poderia ser considerado como um marcador precoce da presença de alteração mineral, como foram relatados em estudos prévios com humanos doentes renais crônicos (GUTIERREZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010; ISAKOVA et al., 2011; DOMINGUEZ et al., 2013; CRAVER et al., 2013). As concentrações séricas de fósforo no Grupo A encontravam-se inferior a 4,5mg/dL, valor este que é considerado como o ideal para o controle de fósforo em cães com DRC, de acordo com a *International Renal Interest Society* (ROUDEBUSH et al., 2010; POLZIN, 2013; IRIS, 2015).

No que se refere ao aumento das concentrações sérica de FGF-23 do **Grupo B**, todos os cães (100%) apresentaram valores aumentados e que eram superiores a 322,30pg/mL, ou seja, superiores a 957,5pg/mL no momento T0. Estes valores elevados também foram observados em cães com normofosfatemia tais como nos animais B4 (no tempo T6), B9 (em T0), B11 (em T0), B12 (no tempo T1) e B13 (em T0), corroborando conforme foi observado no Grupo A e, portanto, com os achados descritos por Gutierrez et al. (2005) que observaram que pacientes humanos normofosfatêmicos com DRC já apresentavam valores elevados de FGF-23 (GUTIERREZ et al., 2005).

As concentrações séricas de FGF-23 não foram diferentes entre os cães do Grupo B-SF e do Grupo B-CTM, entretanto não sendo possível, ainda, com o número de animais avaliados no presente estudo, de concluir caso a terapia celular tenha influenciado na ação mais efetiva do FGF-23. Cabe lembrar, ainda, que a ação do FGF-23 está na dependência da presença de seu cofator para que haja a ação no receptor específico no túbulo proximal, a proteína Klotho, e que não foi avaliada no presente estudo.

Assim, de modo geral, os cães do Grupo B apresentaram valores aumentados do FGF-23 desde o início do acompanhamento e que, portanto, poderia ser esperada uma ação mais efetiva de fosfatúria e controle da fosfatemia. Entretanto notou-se que a ação do FGF-23 não foi tão efetiva, pois a maioria dos cães desenvolveu posteriormente hiperfosfatemia, apesar da constatação de maior excreção urinária fracionada de fósforo (uFEP) quando comparada com os cães do Grupo A. Esse maior aumento da uFEP não foi o suficiente para atuar efetivamente

como um mecanismo compensatório de fosfatúria nos cães do Grupo B para, assim, ser evitada a hiperfosfatemia. Entretanto, há de se considerar que devido a progressão da DRC e com a perda de grande número de néfrons, há de se esperar que poderia ocorrer o comprometimento do mecanismo de excreção renal de fósforo, uma vez que haveria menor quantidade de sítios de ação para o FGF-23 (no túbulo contornado proximal) e, assim, a tendência para o agravamento da hiperfosfatemia e favorecer o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; CRAVER et al., 2013).

A excreção fracionada de um eletrólito na urina é definida como a fração do eletrólito filtrada que não foi reabsorvida e, conseqüentemente, excretada na urina (LAROUTE et al., 2005; LEFEBVRE et al., 2008; LEFEBVRE, 2011; BENNETT et al., 2006; VADEN, 2009; PRESSLER, 2013). No presente estudo, o valor de normalidade adotado para a uFEP foi obtido a partir dos percentis (25% e 75%) dos cães clinicamente normais, e considerada a uFEP até 28,89%. Em outros estudos em cães, o valor de uFEP preconizado como normal foi de até 40% (DIBARTOLA, 1980; LAROUTE et al., 2005; BENNETT et al., 2006; VADEN, 2009). O presente estudo foi o primeiro que investigou a uFEP em cães com doença renal crônica e de forma seriada, ou seja, de acompanhamento sequencial.

Em um estudo prévio, piloto, foi determinada a uFEP em amostras obtidas em um só momento de 49 cães com DRC que foram divididos por estágio da DRC (estágios 1 a 4), como também avaliado dez cães clinicamente normais. Observou-se que a uFEP estava aumentada nos cães com DRC no estágio 1 até o estágio 3, e no estágio 4, fase mais avançada de evolução, foi observada a diminuição da uFEP e que estava associada com hiperfosfatemia intensa (dados pessoais – ainda não publicados).

Já no presente estudo, no Grupo A-SF foi observado aumento de uFEP ao longo do acompanhamento em 33,3% dos casos (2 de 6) e no Grupo A-CTM, o aumento da uFEP foi observado em dois cães e que correspondeu a 66,7% dos casos ao longo do período de acompanhamento.

No Grupo A-SF houve momentos em que foi observado o aumento de uFEP, mas estes valores não foram mantidos ou sustentados e, também, foram observados apenas em algumas ocasiões ou pontualmente. Já no Grupo A-CTM, o aumento de uFEP ocorreu de forma gradual e progressiva, e que pode ser justificado pela ação

mais intensa do FGF-23, uma vez que foi constatado o aumento de FGF-23 nesses cães, o qual estimularia a fosfatúria com o objetivo de evitar o desenvolvimento de hiperfosfatemia nos estágios iniciais da DRC (GALVÃO et al., 2013; DOMINGUÉZ et al., 2013; FOSTER, 2016). Entretanto, há de se considerar, também, que os cães do Grupo A-CTM, na sua maioria (2 de 3), não eram alimentados com dieta controlada restrita em fósforo e, talvez, a devido à sobrecarga de fósforo na dieta, esta poderia promover o aumento da uFEP (CHEW, 2011).

Na avaliação individual do cão A1 do Grupo A-SF, que apresentou aumento do FGF-23 ao longo dos tempos de acompanhamento, foi observado que este desenvolveu hiperfosfatemia, e esse cão sempre teve baixos valores da uFEP, o que poderia justificar a deficiência no mecanismo para a fosfatúria e, conseqüentemente, o desenvolvimento de hiperfosfatemia. Estes achados foram semelhantes ao relatado por Dominguéz et al. (2013) em pacientes humanos com DRC que apresentavam baixos valores da uFEP associados ao aumento de FGF-23, sendo que estes pacientes tiveram mau prognóstico (DOMINGUÉZ et al., 2013; CRAVER et al., 2013). Em cães doentes renais crônicos, um outro estudo também relatou a diminuição da uFEP nos estágios mais avançados da DRC, entretanto não foi mencionada a composição das dietas (MARTINEZ; CARVALHO, 2010).

A constatação de diferença significativa da uFEP entre os cães clinicamente normais (Grupo C) e os cães do Grupo A pode sugerir a atuação de mecanismos renais para aumentar a uFEP na tentativa de controlar o desenvolvimento de hiperfosfatemia nos cães com DRC (DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016).

Nos cães do Grupo B-SF foi observado aumento da uFEP (> 28,89%) em 50% dos cães. Já no relativo a todos os cães do Grupo B, foi detectado o aumento da uFEP em 85,7% dos casos. Esse achado se deve, provavelmente, a ação do FGF-23, uma vez que a concentração sérica estava aumentada em todos os cães do Grupo B (GUTIERREZ et al., 2005; DOMINGUÉZ et al., 2013; GALVÃO et al., 2013; FOSTER, 2016) e, particularmente, nos cães do Grupo B-CTM, os quais apresentavam valores ainda mais elevados de FGF-23 em comparação com o Grupo B-SF, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística da uFEP entre os cães do Grupo B-SF e Grupo B-CTM.

Um fato interessante para ser observado, seria da constatação durante a evolução da doença, da diminuição da uFEP naqueles animais que vieram a óbito durante o acompanhamento. O óbito do cão B7 ocorreu logo após o tempo T9 e a uFEP era de 11,56%, e no cão B10 o óbito foi após T2 e a uFEP de 12,67%, e estes referidos animais apresentavam valores de FGF-23 elevados, principalmente o cão B7 (184581,0pg/mL), e no B10 foi de 2544,4pg/mL. Estes achados foram semelhantes aos relatados em pacientes humanos com DRC por Craver et al. (2013) em que se observou a associação do aumento do FGF-23 sérico acompanhado da diminuição da uFEP como avaliação para o mau prognóstico (ISAKOVA et al., 2011; CRAVER et al., 2013). No presente estudo, também foi observado que àqueles cães do Grupo B que no início do período de acompanhamento (momento T0) já apresentavam valores elevados na concentração sérica de FGF-23, estes tiveram menor tempo de sobrevivência, corroborando, novamente, com os estudos em pacientes humanos com DRC (GUTIERREZ et al., 2005; FLISER et al., 2007; JEAN et al., 2009; ISAKOVA et al., 2011; CRAVER et al., 2013).

Ao avaliar os valores da uFEP do Grupo A (média $\pm$ EPM de $13,27 \pm 2,61\%$) em comparação com o Grupo B ($21,89 \pm 1,84\%$), foi observada diferença significativa, o que pode ser justificada pela própria progressão da DRC em que nos estágios iniciais ainda existe número de néfrons viáveis e que este número ainda seria efetivo para evitar o desenvolvimento de hiperfosfatemia. No Grupo A, o fato da fosfatúria não ter sido evidente, coincide pela observação de que apenas 33,3% dos cães do Grupo A apresentavam aumento do FGF-23 e que, portanto, o mecanismo de fosfatúria não fora ativado, pois os demais cães desse grupo apresentaram valores normais de FGF-23.

Já no relativo ao Grupo B, como as concentrações séricas de FGF-23 já eram aumentadas desde o início do acompanhamento em todos os cães (100%), e supõe-se que haveria maior estímulo para fosfatúria. No entanto, esse mecanismo para o controle da fosfatemia foi efetivo até um certo momento, pois ao longo do período de acompanhamento, 84,6% dos cães desenvolveram hiperfosfatemia ($>5,0\text{mg/dL}$), o que pode ser justificada pela maior perda de néfrons, relacionada com a progressão e evolução da DRC nos cães no estágio 3 da DRC. Cabe lembrar que o aumento na concentração sérica de fósforo, devido a diminuição da excreção renal de fósforo, ocorre quando mais que 85% dos néfrons tornam-se não funcionais

(CHEW, 2011) e, assim, para o melhor entendimento da existência de diferença na progressão da DRC entre os cães do estágio 2 (Grupo A) e do estágio 3 (Grupo B), observou-se que a hiperfosfatemia já estava presente no momento T0 em 46,1% dos cães do Grupo B, enquanto que no Grupo A nenhum cão apresentou hiperfosfatemia em T0. Esse mecanismo compensatório do aumento da uFEP, promovido pelo FGF-23 nos estágios iniciais, e também em fases mais tardias da DRC, já foi demonstrado em pacientes humanos com DRC, como também que a persistência e aumento gradativo do FGF-23 estariam relacionados com a mortalidade (GUTIERREZ et al., 2005; FLISER et al., 2007; JEAN et al., 2009; CRAVER et al., 2013; DOMINGUÉZ et al., 2013).

Ainda, para justificar de forma indireta que os cães do Grupo B já apresentavam maior perda de néfrons, observou-se que 53,8% dos animais desenvolveram acidose metabólica e, ainda, anemia normocítica normocrômica em 53,8% durante o período de acompanhamento, uma vez que a anemia e acidose metabólica são indícios de perda da função renal devido a progressão da DRC, bem como estas alterações colaboram, adicionalmente, com a progressão da doença (FLISER et al., 2007; ROUDEBUSH et al., 2010; POLZIN, 2011; POLZIN, 2013). Enquanto que no Grupo A, nenhum cão desenvolveu anemia, e apenas um cão apresentou discreta acidose metabólica (A8) e que este, inclusive, já apresentava valores elevados de FGF-23, e justifica-se que esse aumento do FGF-23 já estaria relacionado ao maior comprometimento da função renal (FLISER et al., 2007; JEAN et al., 2009; ISAKOVA et al., 2011; CRAVER et al., 2013). Ainda, segundo Bunakarl et al. (2007) e Lefebvre (2011), a excreção fracionada de eletrólitos na urina pode ser utilizada como marcador de gravidade da disfunção renal em cães com DRC.

Em pacientes humanos normofosfatêmicos com DRC, foi observado aumento nos níveis séricos de FGF-23 nos estágios iniciais da doença, acompanhado pelo aumento da excreção fracionada de fósforo na urina (GUTIERREZ et al., 2005), e da mesma forma, a observação dessas variáveis foi semelhante aos que foram detectados nos cães A8 (em T0), B4 (em T6), B9 (em T0), B11 (em T0), B12 (em T1) e B13 (em T0) em que o aumento da uFEP, na presença de normofosfatemia e aumento do FGF-23, poderia justificar o seguinte processo: o FGF-23 tem sua síntese estimulada na medida em que é detectada retenção de fósforo (e que pode ocorrer ainda em condição de normofosfatemia, ou seja, a variação de concentrações de fósforo ocorrer no intervalo de normalidade), o

que ativaria a fosfatúria a fim de evitar o desenvolvimento de hiperfosfatemia (DOMINGUÉZ et al., 2013). Em um estudo de avaliação pontual em cães doentes renais crônicos, foi observado aumento de uFEP nos estágios 1 e 2, entretanto não havia menção sobre o tipo de dieta que os cães haviam recebido (MARTINÉZ; CARVALHO, 2010).

Ademais, em pacientes humanos com DRC que apresentaram valores séricos aumentados de FGF-23, como também diminuição da uFEP, este fato pôde ser atribuído a uma resposta tubular inadequada frente a ação do FGF-23, ou seja, a presença somente do FGF-23 não seria o suficiente, pois a ineficiência da resposta fosfatúrica poderia ser secundária a deficiência da proteína Klotho, uma vez que a mesma atuaria como co-receptor para que ocorresse a ação efetiva do FGF-23 (DOMINGUÉZ et al., 2013; CRAVER et al., 2013; KOMABA et al., 2010; HU, KURO-O; MOE, 2013). No presente estudo em cães com DRC, a proteína Klotho não foi investigada e, assim, sugere-se a necessidade de estudos futuros em cães para desta forma avaliar o papel do Klotho na doença renal crônica, tanto no seu desenvolvimento como na progressão da DRC.

No presente estudo não foi constatada correlação entre os valores de fósforo sérico e da uFEP, o que pode sugerir que o aumento de FGF-23 seja mais sensível do que o aumento da uFEP frente à hiperfosfatemia, já que para que ocorra a fosfatúria, seria necessária a ação do FGF-23 nos túbulos renais e também da presença de seu co-receptor, a proteína Klotho. Uma possível explicação poderia ser a resistência à ação do FGF-23 nos estágios mais avançados da DRC, principalmente, em virtude da deficiência de Klotho (menor expressão de Klotho nos rins e na glândula paratireóide), a qual é fundamental para que o FGF-23 atue adequadamente, como também que nos estágios mais avançados da DRC, a redução do número de néfrons, ou seja, a diminuição dos sítios de ação no túbulos seria esperada (KUROSU et al., 2006; KURO-O, 2009; KOMABA et al., 2010; HU, KURO-O; MOE, 2013).

Pela análise dos valores de FGF-23 segundo os quartis dos cães do Grupo A nos momentos T0, T6 e T12, foi possível observar que à medida que os valores séricos de ureia, principalmente, e de creatinina aumentaram, ocorria também o aumento das concentrações séricas de FGF-23, o que pode ser justificado, como já comentado anteriormente, em decorrência da progressão da DRC, ou seja, da perda

de néfrons (JEAN et al., 2009; BACCHETTA et al., 2011; ISAKOVA et al., 2011). No Grupo A, apenas no quartil 3, quando os valores de FGF-23 já eram aumentados em comparação aos cães clinicamente normais, surge que o aumento da uFEP possa demonstrar a ação fosfatúrica promovida pelo FGF-23 (GALVÃO et al., 2013; DOMINGUÉZ et al., 2013). De acordo com Chew (2011), como o fósforo é filtrado pelo glomérulo e reabsorvido pelos túbulos renais, a homeostase do fósforo é regulada por uma série de mecanismos tais como pelo FGF-23 e o PTH. No atinente ao hiperparatireoidismo secundário renal, a concentração sérica de fósforo pode ser ainda mantida dentro dos valores de referência, pois o PTH e o FGF-23 promoveriam maior excreção de fósforo, porém esse mecanismo não ocorre ou não é efetivo nos estágios avançados da DRC.

Na análise dos quartis das concentrações séricas do FGF-23 no Grupo B nos tempos T0, T6 e T12, ressaltando que os valores de FGF-23 já eram mais elevados desde o início em comparação com o Grupo A, foi possível observar que o aumento dos valores de FGF-23 ocorria na medida em que havia também o aumento das concentrações de ureia e creatinina, de forma semelhante ao observado durante a progressão da DRC em pacientes humanos (JEAN et al., 2009; BACCHETTA et al., 2011; ISAKOVA et al., 2011). Considerando-se que o FGF-23 estava aumentado no Grupo B, esperar-se-ia que a uFEP também estivesse aumentada. Entretanto, os valores observados eram inferior a 28,89%, mas apenas no quartil 3 em T0 e T6 havia aumento da uFEP, mas não sendo este em maior magnitude, e no quartil 4 em que o FGF-23 atingiu altos valores, também não se observou aumentos mais marcantes da uFEP e que poderia, portanto, ser justificada pela evolução mais avançada da DRC em que o número reduzido de néfrons ainda funcionais, não mais permitiria a prevenção da hiperfosfatemia, e seria quando os mecanismos compensatórios estariam esgotados e com consequente desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (GALVÃO et al., 2013; CRAVER et al., 2013; DOMINGUEZ et al., 2013). Apenas o cão B11 apresentou aumento de uFEP no quartil 4 em T6 (uFEP = 42,5%) e que talvez possa ser justificado pela ação mais efetiva do FGF-23, mas também deve-se considerar a possibilidade de estar relacionado com a ingestão de dieta caseira que poderia não estar adequadamente restrita em fósforo, o que corrobora com os relatos de Chew (2011) que descreve

que a dieta poderia ter influência na excreção ou na fração de fósforo excretada na urina.

Em relação aos valores séricos de fósforo dos cães do Grupo B, segundo a avaliação dos quartis de FGF-23 neste grupo, a hiperfosfatemia ($> 5,0\text{mg/dL}$) foi detectada a partir do quartil 2 nos momentos T0, T6 e T12, o que demonstra a progressão da DRC, uma vez que o rim é o órgão primário responsável pela excreção de fósforo e sem haver a atuação dos mecanismos compensatórios para a fosfatúria (CORTADELLAS et al., 2009; CORTADELLAS et al., 2010; CHEW, 2011; GEDDES et al., 2013a; LIPPI et al., 2014).

O controle da fosfatemia poderia ter também influência da dieta hipofosfórica (CHEW, 2011). A mudança para uma dieta hipofosfórica nos cães com DRC poderia diminuir a sobrecarga de fósforo, não exigindo que os rins tivessem que alterar a excreção de fósforo, além de prevenir o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (CHEW, 2011; GEDDES et al., 2013a).

No Grupo A, os cães alimentados com dieta comercial hipofosfórica correspondeu a 55,5% (5 de 9) e os demais quatro cães que compuseram esse grupo, estes receberam dieta caseira balanceada para composição hipofosfórica e/ou dieta comercial de manutenção e, portanto, possivelmente com teores de fósforo um pouco mais elevados. Os dois cães que receberam dieta comercial de manutenção foram os que apresentaram valores mais elevados da uFEP quando comparado com os demais cães deste mesmo grupo e que, portanto, esse aumento da uFEP não poderia ser atribuído, somente, a uma resposta terapêutica possível decorrente da terapia celular que fora empregada, pois segundo Chew (2011), espera-se que o aumento da uFEP nos cães alimentados com dieta não restrita em fósforo, da mesma forma que na dieta hipofosfórica haveria diminuição da uFEP (CHEW, 2011). Esse efeito da dieta hipofosfórica em reduzir a uFEP também foi observado em humanos com DRC (BLOCK et al., 2004). Entretanto, há ainda a necessidade de mais estudos clínicos, ou seja, em cães com DRC de curso natural para atestar ou confirmar esses mecanismos.

Em relação a dieta dos cães do Grupo B, 10 cães receberam dieta hipofosfórica comercial, correspondendo a 76,9% dos casos, e 23,1% foram alimentados com dieta caseira sem o controle rígido de restrição de fósforo. Foi

observado que os cães que comeram dieta sem restrição de fósforo foram os que apresentaram valores da uFEP mais elevados quando comparados com aqueles que receberam dieta hipofosfórica. Sendo assim, tais achados podem sugerir o possível efeito da dieta também na regulação da uFEP, conforme comentários de Chew (2011) e de Block et al.(2004).

O desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal é classicamente descrito como sendo o efeito da retenção de fósforo, sendo que valores séricos de fósforo podem influenciar na concentração do cálcio iônico e ainda, recentemente, tem sido demonstrado o importante papel do comprometimento da produção renal de calcitriol (vitamina D em sua forma ativa), associado à redução da excreção de fósforo decorrente da diminuição da taxa de filtração glomerular, resultando posteriormente em hiperfosfatemia (CORTADELLAS et al., 2010; CHEW, 2011; GEDDES et al., 2013a).

A hiperfosfatemia causa de modo recíproco a redução dos níveis de cálcio iônico (iCa) pela lei de efeito de massa ($iCa \times sP = \text{constante}$). Entretanto, atualmente, os conceitos em relação a contribuição da lei de efeito de massa parece ser pequena, pois seria necessária a presença de alteração marcante na concentração sérica de fósforo para que se possa alterar intervalos pequenos na concentração de cálcio iônico (CHEW, 2011). No presente estudo foi encontrado hiperfosfatemia associada a hipocalcemia iônica em apenas dois cães do Grupo B, correspondendo a 15,4%, e no Grupo A não foi detectado em nenhum caso.

Além disso, foi observada hipercalcemia pelos valores de cálcio total sérico em nove cães do Grupo B, sendo que sete desses cães também desenvolveram hipercalcemia iônica, correspondendo a 53,8% dos casos no Grupo B. Dentre os cães que apresentaram hipercalcemia (total e iônica), um dos cães (B7) apresentava a doença renal crônica juvenil e o aumento de cálcio sérico foi progressivo até o momento do óbito, da mesma forma que foi observado nos cães B11 e B12 em que no momento do óbito também apresentaram hipercalcemia (total e iônica), fato este que pode ter contribuído para piora da progressão da DRC (CHEW, 2011), uma vez que a hipercalcemia pode causar lesão renal adicional por meio de vasoconstrição e mineralização intersticial, bem como o comprometimento da membrana basal tubular (CARONE et al., 1960; ROSEN et al., 1990; CHEW, 2011). Possíveis mecanismos

para elucidar o desenvolvimento de hipercalcemia na DRC incluem: redução na excreção urinária de cálcio devido redução da TFG; distúrbio na síntese e na secreção do PTH; e diminuição de receptores sensíveis ao cálcio devido perda tubular (CHEW, 2011).

Nos cães do Grupo A, foi observado aumento de cálcio total e de cálcio iônico em apenas dois cães, correspondendo a 22,2% dos casos. Já a hipocalcemia foi observada em outros três cães, mas esses valores não foram mantidos ao longo do tempo e não foram acompanhados pela diminuição da concentração de cálcio iônico. De acordo com Kogika et al. (2006), Chew (2011) e Polzin (2013), a concentração de cálcio total nos pacientes com DRC pode estar aumentada, normal ou diminuída, da mesma forma que foi observado no presente estudo. A concentração de cálcio total, cálcio iônico, cálcio ligado a proteína e do cálcio complexado (por exemplo ao fosfato) pode variar consideravelmente em cães e gatos com DRC (CHEW, 2011). A diferença na concentração de cálcio entre os animais com DRC geralmente é atribuída à alteração no cálcio ligado a complexos, sendo que esta fração pode variar de 6 a 39% na concentração do cálcio total em cães com DRC (CHEW, 2011). Além disso, deve-se atentar para a interpretação fidedigna do valor de cálcio total, que deve ser sempre realizada em conjunto com o valor de cálcio iônico, pois esta referida fração seria a acurada para a avaliação do cálcio biologicamente ativo nos cães com DRC (CHEW, 2011; POLZIN, 2013).

Considerando que a doença renal crônica em cães é progressiva e irreversível, e o tratamento da DRC é embasado no tratamento sintomático e de suporte com intuito de retardar a progressão da DRC, na tentativa de controlar as disfunções renais tais como hiperfosfatemia, acidose metabólica, desidratação, desequilíbrio eletrolítico (a exemplo: hipocalemia), hipertensão arterial sistêmica, perda de peso, proteinúria e infecções do trato urinário (CHEW, 2011; POLZIN, 2011; BARTGES, 2012; POLZIN, 2013) e, recentemente, têm-se discutido sobre a terapia com as células-tronco na medicina veterinária para uma variedade de doenças, incluindo a doença renal crônica. O intuito da terapia com as células-tronco mesenquimal (CTM) pode ser promissora devido ao efeito anti-inflamatório e imunomodulador (ENGLISH; BARRY; MAHON, 2008; MCINTOSH et al., 2013). Até o momento foi realizado estudos de terapia celular em ratos e em gatos com doença renal crônica (MORIGI et al., 2004; KITAMURA et al., 2005; SEMEDO et al., 2007; ;

KIM et al., 2007; TOGEL et al., 2007; QUIMBY et al., 2011; QUIMBY et al., 2013; QUIMBY; DOW, 2015).

Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar os efeitos de proteção renal da CTM, conforme avaliado *in vitro* em modelos experimentais em roedores. A proteção renal inclui as ações anti-inflamatória, pró-angiogênico, anti-apoptose, anti-fibrótico, propriedades anti-oxidantes, bem como estimulação da produção de células progenitoras endógena (DE ALMEIDA et al., 2013). Além disso, diversos parâmetros da função renal e do exame clínico tem melhorado em trabalhos que utilizaram a CTM na presença de lesão renal, como peso corpóreo, ureia e creatinina sérica, proteinúria, pressão arterial sistêmica e hematócrito (CAVAGLIERI et al., 2009; SEMEDO et al., 2009; LEE et al., 2010; VILLANUEVA et al., 2013). Também já foi utilizada diferentes vias de administração da CTM, como intra-renal, subcapsular e intravenosa em ratos e todas elas têm se mostrado efetivas (QUIMBY; DOW, 2015).

No presente estudo não foi possível constatar de forma cabal os efeitos benéficos ou maléficos do uso de CTM, uma vez que o número de cães avaliados nos Grupos A e B poderia ser maior, como também os tempos ou momentos de avaliação dos cães do Grupo B não foram uniformes para todos os cães. Assim, propõe-se que futuros estudos sejam conduzidos, entretanto com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se suscitar discussões relevantes, pois os dados observados permitiram identificar importantes pontos para a condução de estudos de terapia celular em cães com DRC, tais como a possibilidade de ocorrer efeitos adversos, bem como o reconhecimento de qual momento da evolução da DRC seria o ideal para aplicação de CTM e, também de sugerir a necessidade de avaliar os marcadores específicos e precoces para a seleção apropriada dos cães com DRC que teriam maiores possibilidades de serem beneficiados com a terapia celular.

Observou-se no Grupo B (estágio 3 da DRC) em que o número de cães avaliados era similar entre os Grupos B-SF e B-CTM, a ausência de diferença estatística entre os valores de FGF-23 e fósforo sérico e da uFEP. A hipótese seria de que a terapia celular poderia fornecer a resposta esperada da ação inerente da CTM, entretanto, há de se considerar que uma vez a CTM no ambiente urêmico, condição esta já presente nos cães DRC no estágio 3, comprometeria as propriedades benéficas da CTM, segundo demonstrado por Klinkhammer et al.

(2014) em estudo experimental em ratos com DRC induzida. Um outro estudo também realizado em ratos com o uso de CTM na DRC induzida, observou-se que a CTM colaborou na redução da fibrose intersticial, mas não foi possível retardar a progressão da doença (IDZIAK et al., 2014).

Em gatos, até o momento, existem poucos estudos de terapia com CTM na DRC de ocorrência natural, e nenhuma investigação científica foi publicada referente a cães com DRC de curso espontâneo. Assim, o presente é um estudo pioneiro em cães com DRC de curso natural com o uso de CTM e, ainda, conduzido em duplo-cego e randomizado, e os cães foram avaliados sequencialmente ao longo de um período de evolução da doença. Nos cães há publicação de um estudo experimental de injúria renal aguda induzida por cisplatina, os quais os cães receberam células-tronco autóloga, e foi observada prevenção da fibrose renal, aumento da síntese de fator de crescimento endotelial, proliferação de células epiteliais dos túbulos renais, além de redução na expressão do fator de necrose tumoral α ; entretanto não foi detectada melhora na TFG, como também não foi constatada alteração nas concentrações séricas de ureia e creatinina e na proteinúria (LIM et al., 2016).

Em 2011 um estudo com apenas seis gatos doentes renais crônicos de ocorrência natural, a CTM foi injetada no parênquima renal, guiada pelo ultrassom, sendo a CTM autóloga derivada de medula óssea ou de tecido adiposo. A TFG foi avaliada antes da aplicação e sete e trinta dias depois. Não foi relatada a existência de efeitos adversos pela administração da CTM nesse estudo. Somente em dois gatos que receberam CTM houve moderada melhora na TFG e discreta diminuição na concentração sérica de creatinina (QUIMBY et al., 2011), sendo estes achados apenas relatados, mas sem a possibilidade de atribuir de forma contundente a ação benéfica da CTM. Semelhante ao presente estudo que foi conduzido em cães com DRC em que se observou melhora ou mesmo a manutenção dos valores de diversas variáveis laboratoriais que foram citadas nesta tese, os resultados observados ainda não são consistentes para uma conclusão positiva ou negativa do uso das CTM.

Há um outro estudo que foi realizado com gatos doentes renais crônicos de curso natural, o qual foi avaliada a segurança e a eficácia de repetidas administrações pela via intravenosa de CTM alogênica e criopreservada, e foi observado que pequenas e repetidas doses de CTM foram bem toleradas nesses gatos, e foi associada com a melhora da função renal com a redução dos níveis

séricos de creatinina (menor que 0,5mg/dL), mas sem associação com a melhora clínica (QUIMBY et al., 2011).

No presente estudo em cães com DRC do Grupo B, também não foi observada melhora clínica com o uso de CTM (Grupo B-CTM). Ainda no estudo de Quimby et al. (2013) em gatos com DRC de curso natural, observou-se a ocorrência de efeitos adversos. No presente estudo em cães com DRC, também foram observados efeitos adversos durante a única aplicação de CTM criopreservada em dois cães do Grupo A (A7 e A8) e que, possivelmente, poderiam ser atribuídos a aplicação da CTM e não houve nenhum óbito durante o período de acompanhamento. Ambos os cães (A7 e A8) apresentaram convulsão logo após o início da infusão lenta intravenosa de CTM, diferentemente dos efeitos adversos que foram relatados nos gatos no estudo realizado por Quimby et al. (2013) em que a maioria dos animais apresentou vômito e taquipnéia durante a infusão da CTM.

Portanto, ainda se faz necessária a condução de mais estudos que contemplem um número maior de animais, tanto em cães como em gatos, para assim melhor elucidar os efeitos adversos que realmente poderiam ser atribuídos as CTMs. Caso o episódio convulsivo estivesse relacionado com o efeito adverso da CTM nos cães com DRC do presente estudo, o mecanismo provável, poderia estar relacionado com a formação de êmbolos, uma vez que a CTM apresenta alta aderência e, portanto, possibilidade de conglomerar na circulação sanguínea (BIANCO; ROBEY; SIMMONS, 2008). Estudos prévios em humanos relataram a ocorrência de convulsão com a aplicação de CTM, que pode ter sido ocasionada por embolismo, entretanto o mecanismo exato não está elucidado (ZHANG et al., 2008; KARUSSIS et al., 2010; LALU et al., 2012).

Ainda existe a questão sobre a origem da CTM, ou seja, de serem alogênica (originária de células provenientes de um banco de células, ou seja, de um doador saudável da mesma espécie) ou autóloga (originária do próprio animal receptor). Dessa forma, a melhor escolha do tipo da origem celular ainda é controversa, pois as células alogênicas podem oferecer maior segurança pela menor probabilidade de causar reação imune, no entanto, as células autólogas têm maior durabilidade ou persistência no organismo e por esta característica podem apresentar maior risco para os efeitos adversos (TOGEL et al., 2009; QUIMBY et al., 2013). No presente estudo em cães, a origem da CTM foi de outra espécie e essa célula, talvez, possa ter sido fagocitada ou inativada ou lisada e, desta forma, atribuir em parte a

ineficiência da resposta ou de suas ações. Entretanto, já existem diversos estudos demonstrando a segurança de aplicação de células-tronco mesenquimais humana em diversas espécies animais, até mesmo em animais não-imunossuprimidos, pois a CTM provavelmente devido a potencial ação imunomoduladora (LIM et al., 2011; VIEIRA et al., 2011; ZUCCONI et al., 2011; CAO et al., 2010; LANGE et al., 2005). Estudo em cães com distrofia muscular realizado por Vieira et al. (2011) demonstraram que em cães não-imunossuprimidos as células-tronco mesenquimais humana foram seguras..

Em outro estudo de Quimby et al. (2013) em que gatos com DRC foram submetidos a terapia com CTM, observou-se melhora na concentração sérica de creatinina durante o estudo, mas o grau de melhora não foi o suficiente para afirmar que houve significado clínico para essa melhora (QUIMBY et al., 2013). Além disso, a dosagem de creatinina sérica não é o marcador mais sensível e específico, embora seja o mais rotineiramente utilizado e que tem influência do escore de massa muscular e grau de hidratação. Redução da massa muscular pode causar diminuição dos valores de creatinina sérica, enquanto que desidratação eleva a concentração sérica de creatinina. Além disso pode existir alteração da função renal sem necessariamente alterar os valores séricos de creatinina (BAXMANN et al., 2008).

Ainda neste estudo de Quimby et al. (2013), alguns gatos com DRC tiveram a TFG estimada, e foi aventado possíveis efeitos autócrinos e parácrinos promovidos pela aplicação de CTM, no entanto, o autor refere que ainda seria necessário mais estudos para melhor elucidação e entendimento do verdadeiro papel da CTM na progressão da DRC em gatos tais como número de células a ser aplicada, número de aplicações, como também o momento pertinente, relacionado ao estágio da DRC, para a aplicação da CTM. Ainda foi desaconselhado a aplicação de altas doses, como também a rápida infusão da CTM em virtude da possibilidade de ocorrer os efeitos colaterais (QUIMBY et al., 2013; QUIMBY; DOW, 2015). E, ainda, nos gatos, os resultados também são inconclusivos no referente as vias de administração, via intra-renal (QUIMBY et al., 2011), intravenosa (QUIMBY et al., 2013) e intra-arterial (BERENT, 2012). Assim, no presente estudo em cães com DRC, essas mesmas questões são ainda suscitadas, e os resultados obtidos até o presente momento trouxeram informações relevantes para o melhor entendimento e conhecimento,

para assim alicerçar estudos futuros a serem conduzidos nos cães com DRC em curso natural da doença.

Quanto ao óbito que ocorreu em 71,4% dos cães do Grupo B-CTM em comparação com 50,0% dos cães do Grupo B-SF, este fato pode ser justificado, mas não atribuído de forma cabal à terapia celular, mas sim ao fato desses cães no estágio 3 da DRC já se tratar de fase mais avançada, pois o próximo estágio, e o final seria, o estágio 4. Dessa forma, esperar-se-ia a maior possibilidade do desenvolvimento de complicações decorrente da perda das funções renais e, portanto, da uremia e, além disso, seria necessário aumentar o número de cães com DRC do estudo, pois possivelmente o óbito possa ser ainda atribuído a descompensação / crise urêmica que é esperada nesta fase mais avançada da DRC (FINCO et al., 1999; POLZIN, 2011; POLZIN, 2013). Ainda, o aparecimento de outras afecções concomitantes durante o curso da doença podem levar a piora clínica do quadro clínico geral e evoluir para o êxito letal (FINCO et al., 1999; POLZIN, 2011; POLZIN, 2013).

Portanto o presente estudo em cães com DRC de curso natural, trata-se de estudo preliminar sobre terapia com célula-tronco mesenquimal na espécie canina, e que foi administrada em única dose pela via intravenosa. Com os resultados obtidos até o momento não há, ainda, a possibilidade de afirmar sobre efeitos benéficos ou mesmo maléficos desta terapia celular, entretanto, os achados podem indicar que para a melhor ação dos efeitos desejáveis da CTM e que estariam, principalmente, relacionados com as ações anti-inflamatória e anti-fibróticas no parênquima renal, essas ações poderiam ser mais efetivas, ou mesmo benéfica, para os rins em que o número de néfrons não tivesse tão reduzido, a exemplo no estágio 2 da DRC ou em fase anterior, ou se caso fosse para o estágio 3 da DRC, que estes pacientes fossem avaliados com o uso de marcadores de lesão e de função renal mais específicos e precoces que possam identificar adequadamente e com mais precisão o grau de comprometimento dos rins ou da disfunção renal, pois as alterações renais podem diferir de paciente para paciente classificados no mesmo estágio, já que as concentrações de ureia e creatinina, comumente utilizadas para a definição dos estágios segundo a IRIS, não seriam o suficiente para identificar o grau e as outras disfunções dos rins já alteradas ou comprometidas. Ainda, é necessária investigações de estudos longitudinais que contemple um maior número de cães com DRC.

No presente estudo foi possível verificar que o FGF-23 poderia ser utilizado, também, como uma variável de fator prognóstico, pois a curva de Kaplan-Meier estimou que os cães com DRC que apresentavam as maiores concentrações de FGF-23 sérico no início do período de acompanhamento foram os que vieram a óbito. Esse achado também foi confirmado em pacientes humanos com DRC (ISAKOVA et al., 2011).

8 LIMITAÇÕES

Descreve-se as principais limitações do estudo identificadas na condução do estudo, tais como:

- O número de cães com doença renal crônica que receberam CTM e SF não foi homogêneo nos Grupos A e B, pois por se tratar de estudo randomizado em duplo cego houve diferença na distribuição, porém, as informações obtidas foram extremamente relevantes para a avaliação e a interpretação das variáveis FGF-23 e fósforo sérico e excreção fracionada de fósforo na urina e que irão servir de base para os estudos futuros;
- O kit comercial FGF-23 (ELISA) para fins de pesquisa necessita ser mantido refrigerado e houve problemas nos resultados, desde a confecção de curvas-padrão, com o uso de kits que foram importados para o Brasil e, dessa forma, foi necessária a realização das mensurações do FGF-23 nos Estados Unidos da América e que foi, então, realizada no Laboratório de Pesquisa do Dr. Ramiro Toribio da *The Ohio State University*;
- Houve grande dificuldade na seleção de cães com doença renal crônica sem a presença de outras doenças concomitantes, visto que a maioria dos cães doentes renais crônicos já apresenta meia-idade ou eram idosos, o que colaborou para a presença de doenças concomitantes tais como neoplasia, cardiopatias e endocrinopatias;
- Cães com doença renal juvenil também compuseram o grupo de estudo, e que pela característica da doença, esta evoluiu de forma mais rápida quando comparada com os cães idosos e essa característica pode afetar a interpretação dos resultados para fins de comparação intra e inter grupos;
- Ocorreram problemas e dificuldades na cultura de células-tronco mesenquimal, principalmente pela contaminação do meio de cultura;

- A aderência dos proprietários para participarem do estudo foi satisfatória, e apenas dois cães (A9 e B5) abandonaram o projeto durante o curso do acompanhamento;
- Houve dificuldade de coleta de material, principalmente urina por cistocentese em cães de pequeno porte, como também para a aferição da pressão arterial devido ao comportamento agitado e ao estresse, ou mesmo pelo temperamento indócil ou agressivo tais como foram observados nos cães A1, A7, A8 e A9.

9 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir:

- que na avaliação sequencial dos cães com doença renal crônica sugere que o FGF-23 sérico pode atuar como um marcador precoce de distúrbio mineral, pois o aumento da concentração de FGF-23 já pôde ser detectado nos cães normofosfatêmicos dos estágios 2 e 3 (Grupos A e B), além do FGF-23 atuar, também, como fator prognóstico pois os animais que apresentavam maiores concentrações de FGF-23 foram os que tiveram menor tempo de sobrevivência;
- a diminuição da excreção fracionada de fósforo na urina (uFEP), ou mesmo da ausência de resposta esperada do aumento da uFEP em associação com a presença de altas concentrações séricas de FGF-23, denota o comprometimento da ação esperada do FGF-23, como mecanismo de ativação da fosfatúria, e que pode estar relacionada com a diminuição de números de receptores para atuação, ou seja, diminuição de túbulos renais / néfrons, como também deficiência do seu co-fator, a proteína Klotho que não foi avaliada nesse estudo;
- ainda é necessário elucidar o quanto o fósforo proveniente da dieta possa alterar a uFEP nos cães com número reduzido de néfrons como ocorre na doença renal crônica;
- de acordo com o número de cães com doença renal crônica avaliados, Grupo A (A-SF e A-CTM) e Grupo B (B-SF e B-CTM), não se pode concluir, ainda, sobre o efeito da terapia com célula-tronco mesenquimal (CTM) no curso natural da doença renal crônica, entretanto, os resultados obtidos suscitam questões quanto ao momento ou estágio da DRC mais adequado para a administração da terapia celular para que os efeitos benéficos possam ser obtidos com segurança.

REFERÊNCIAS

- ALEXANDRE, C. S.; VOLPINI, R. A.; SHIMIZU, M. H.; SANCHES, T. R.; SEMEDO, P.; JURA, V. L.; CÂMARA, N. O.; SEGURO, A. C.; ANDRADE, L. Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal failure. *Stem Cells*, v. 27, n. 3, p. 682-692, 2009.
- ASANUMA, H.; MELDRUM, D. R.; MELDRUM, K. K. Therapeutic applications of mesenchymal stem cells to repair kidney injury. *The Journal of Urology*, v. 184, p. 26-33, 2010.
- BACCHETTA, J.; DUBOURG, L.; HARAMBAT, J.; RANCHIN, B.; ABOU-JAOUDE, P.; ARNAUD, S.; CARLIER, M. C.; RICHARD, M.; COCHAT, P. The influence of glomerular filtration rate and age on fibroblast growth factor 23 serum levels in pediatric chronic kidney disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 95, n. 4, p. 1741-1748, 2010.
- BARTGES, J. W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 42, p. 669-662, 2012.
- BASSI, E. J.; AITA, C. A.; CÂMARA, N. O. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World Journal Stem Cells*, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.
- BATTIWALLA, M.; HEMATTI, P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy*, v. 11, n. 5, p. 503-515, 2009.
- BAXMANN, A. C.; AHMED, M. S.; MARQUES, N. C.; MENON, V. B.; PEREIRA, A. B.; KIRSZTAJN, G. M.; HEILBERG, I. P. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 3, p. 348–354, 2008.
- BELLASI, A.; MANDREOLI, M.; BALDRATI, L.; CORRADINI, M.; NICOLO, P. D.; MALMUSI, G.; SANTORO, A. Chronic kidney disease progression and outcome according to serum phosphorus in mild-to-moderate kidney dysfunction. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, v. 6, p. 883-891, 2011.
- BENNETT, S. L.; ABRAHAM, L. A.; ANDERSON, G. A.; HOLLOWAY, S. A.; PARRY, B. W. Reference limits for urinary fractional excretion of electrolytes in adult non-racing Greyhound dogs. *Australian Veterinary Journal*, v. 84, p. 393-397, 2006.
- BERENT, A. Intra-arterial delivery of Mesenchymal Derived Stem Cells in Veterinary Patients. *Advanced Renal Therapies Symposium*, p. 48-51, 2012.
- BIANCO, P.; ROBEY, P.G.; SIMMONS, P.J. Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Press*, v.2, p. 313-319, 2008.

BLOCK, G. A.; MARTIN, K. J.; FRANCISCO, A. L. M.; TURNER, S. A.; AVRAM, M.M.; SURANYI, M. G.; HERCZ, G.; CUNNINGHAM, J.; ABU-ALFA, A. K.; MESSA, P.; COYNE, D. W.; LOCATELLI, F.; COHEN, R. M.; EVENEPOEL, P.; MOE, S. M.; FOURNIER, A.; BRAUN, J.; MCCARY, L. C.; ZANI, V. J.; OLSON, K. A.; DRÜEKE, T. B.; GOODMAN, W. G. Cinacalcet for Secondary Hyperparathyroidism in Patients Receiving Hemodialysis. *The New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 15, p. 1516-1525, 2004.

BOYD, L. M.; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K.; IMANISHI, M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000–2002). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, p. 1111–1117, 2008.

BRODIE, J. C.; HUMES, H. D. Stem cell approaches for the treatment of renal failure. *Pharmacological Reviews*, v. 57, n. 3, p. 299-313, 2005.

BROWN, S.; ATKINS, C.; CARR, A. R.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, p. 542-558, 2007.

BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; WHITE, J. V.; FINCO, D. R. Beneficial effects of dietary mineral restriction in dogs with marked reduction of functional renal mass. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 1, p. 1169-1179, 1991.

BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; ALLEN, T.; COWELL, C.; FINCO, D. R. Beneficial effects of chronic administration of dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 131, n. 5, p. 447-455, 1998.

BURANAKARL, C.; ANKANAPORN, K.; THAMMACHAROEN, S.; TRISIRIROJ, M.; MALEERATMONGKOL, T.; THONGCHAI, P.; PANASJAROEN, S. Relationships between degree of azotaemia and blood pressure, urinary protein: creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. *Veterinary Research Communications*, v. 31, p. 245-247, 2007.

BURKHOLDER, W. J. Dietary considerations for dogs and cats with renal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 216, n. 11, p. 1730-1734, 2000.

CAO, H.; QIAN, H.; XU, W. Mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord ameliorate ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Biotechnological Letter*, v. 32, n. 5, p. 725-732, 2010.

CARONE, F. A.; EPSTEIN, F. H.; BECK, D.; LEVITIN, H. The effects upon the kidney of transient hypercalcemia induced by parathyroid extract. *The American Journal of Pathology: cellular and molecular biology of disease*, v. 36, n. 1, p. 77-103, 1960.

CAVAGLIERI, R. C.; MARTINI, D.; SOGAYAR, M. C.; NORONHA, I. L. Mesenchymal stem cells delivered at the subcapsule of the kidney ameliorate renal disease in the rat remnant kidney model. *Transplantation Proceedings*, v. 41, p. 947–951, 2009.

CHEW, D.J. Chronic renal failure In: CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. O.; SCHENCK, P. *Canine and feline nephrology and urology*. Baltimore, MD: Saunders Elsevier, 2011, p. 145-196.

CHOI, S. J.; KIM, J. K.; HWANG, S. D. Mesenchymal stem cell therapy for chronic renal failure. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 10, p. 1217–1226, 2010.

CORTADELLAS, O.; PALACIO, M. J. F.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Veterinary Record*, v. 164, p. 487-490, 2009.

CORTADELLAS, O.; DEL PALACIO, M. J. F.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 24, p. 73-79, 2010.

CRAVER, L.; DUSSO, A.; ALONSO, M. M.; SARRO, F.; VALDICIELSO, J. M.; FERNANDEZ, E. A low fractional excretion of phosphate / FGF-23 ratio is associated with severe abdominal aortic calcification in stage 3 and 4 kidney disease patients. *BMC Nephrology*, v. 4, n. 221, p. 1-12, 2013.

DE ALMEIDA, D. V.; OLIVEIRA, C. D.; COSTA, P. B.; ORIGASSA, C. S.; CÂMARA, N. O. In Search of mechanisms associated with mesenchymal stem cell-based therapies for acute kidney injury. *The clinical Biochemistry Review*, v. 34, n. 3, p. 131-144, 2013.

DEAK, E.; RUSTER, B.; KELLER, L.; ECKERT, K.; FICHTNER, I.; SEIFRIED, E.; HENSCHLER, R. Suspension medium influences interaction of mesenchymal stromal cells with endothelium and pulmonary toxicity after transplantation in mice. *Cytotherapy*, v. 12, p. 260–264, 2010.

DIBARTOLA, S. P.; CHEW, D. J.; JACOBS, G. Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. *Journal of American Animal Hospital Association*, v. 16, p. 537-546, 1980.

DOMINGUÉZ, J. R.; SHLIPAK, M. G.; WHOOLEY, M. A.; JOACHIM, 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.

ELLIOTT, J. M.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELL, P. J.; BARBER, J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. *Journal of Small Animal Practice*, v. 41, p. 235–242, 2000.

ENGLISH, K.; BARRY, F. P.; MAHON, B. P. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters*, v. 115, p. 50–58, 2008.

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. 27, p. 227-233, 2013.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; DUNCAN, R. J.; BARSANTI, J. A.; BENNETT, S. E. Effects of dietary phosphorus and protein in dogs with chronic renal failure. *American Journal of Veterinary Research*, v. 53, p. 2264–2271, 1992.

FINCO, D. R. Evaluation of renal functions. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. *Canine and feline nephrology and urology*. Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1995. p. 216-229.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; COOPER, T. A.; BARSANTI, J. A. Progression of chronic renal disease in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 13, p. 516-528, 1999.

FLISER, D.; KOLLERITS, B.; NEYER, U.; ANKERST, D. P.; LHOTTA, K.; LINGENHEL, A.; RITZ, E.; KRONENBERG, F. Fibroblast growth factor 23 (fgf23) predicts progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease (MMKD) study. *Journal of American Society of Nephrology*, v. 18, p. 2601-2608, 2007.

FOSTER, D. J. Update on mineral and bone disorders in chronic kidney disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 46, p. 1131-1146, 2016.

FRITSCH, D. A.; JEWELL, D. E. Acceptance and effects of a therapeutic renal food in pet cats with chronic kidney disease. *Veterinary Record Open*, p.1-7, 2016.

FUCAGAWA, M.; KANAME, S.; IGARASHI, T.; OGATA, E.; KUOKAWA, K. Regulation of parathyroid hormone synthesis in chronic renal failure in rats. *Kidney International*, v. 39, p. 874-881, 1991.

GALVÃO, 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. 134-162, 2013.

GEDDES, R. F.; FINCH, N. C.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. Fibroblast growth factor 23 in feline chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 27, p.234-241, 2013a.

GEDDES, R. F.; FINCH, N. C.; SYME, H. M.; ELLIOT, J. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v. 23, n. 2, p. 122-133, 2013b.

GRECO, D. S. Congenital and inherited renal disease of small animals. *Clinical Theriogenology*, v. 31, n. 2, p. 393-399, 2001.

GUTIERREZ, O. M.; ISAKOWA, T.; RHEE, E.; SHAHAH, A.; HOLMES, J.; COLLERONE, G.; JUPPNER, 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.

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

HORI, M.; SHIMIZU, Y.; FUKUMOTO, S. Minireview: fibroblast growth factor 23 in phosphate homeostasis and bone metabolism. *Endocrinology*, v. 152, n. 1, p. 4-10, 2011.

HOUSTON, J.; SMITH, K.; ISAKOWA, T.; SOWDEN, N.; WOLF, M.; GUTIERREZ, O. M. Associations of dietary phosphorus intake, urinary phosphate excretion, and fibroblast growth factor 23 with vascular stiffness in chronic kidney disease. *Journal of Renal Nutrition*, v. 23, n. 1, p. 12-20, 2013.

HU, M. C.; KURO-O, M.; MOE, O. W. Klotho and chronic kidney disease. *Karger*, v. 180, p. 47-63, 2013.

IDZIAK, M.; PEDZISZ, P.; BURDZINSKA, A.; GALA, K.; PACKEK, L. Uremic toxins impair human bone marrow-derived mesenchymal stem cells functionality in vitro. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 66, n.4, p. 187–194, 2014.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). Treatment recommendations for CKD in dogs. [S.l.]: IRIS, 2015.

ISAKOVA, T.; XIE, H.; YANG, W.; XIE, D.; ANDERSON, A. H.; SCIALLA, J.; WAHL, P.; GUTIERREZ, O. M.; STEIGERWALT, S.; JIANG, H. E.; SCHWARTZ, S.; LO, J.; OJO, A.; SONDHEIMER, J.; YUAN, C.; LASH, J.; LEONARD, M.; KUSEK, J. W.; FELDMAN, H. I.; WOLF, M. Fibroblast Growth Factor 23 and Risks of Mortality and End-Stage Renal Disease in Patients With Chronic Kidney Disease. *Journal of American Medical Association*, v. 305, n. 23, p. 2432-2439, 2011.

IVANOVIC, Z.; BOIRON, J. M. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells: concept and clinical benefit. *Transfusion Clinical Biologic*, v. 16, n. 5-6, p. 489-500, 2009.

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 the American Veterinary Medical Association, v. 220, n. 8, p. 1163-1170, 2002.

JEAN, G.; TERRAT, J.; VANEL, T.; HROT, J.; LORRIAUX, C.; MAYOR, B.; CHAZOT, C. High levels of serum fibroblast growth factors (FGF)-23 are associated with increased mortality in long haemodialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 24, n. 9, p. 1–5, 2009.

KAPLAN, M. A.; CANTERBURY, J. M.; BOURGOIGNIE, J. J.; VELIZ; GAVELLAS, G.; REISS, E.; BRICKER, N. S. Reversal of hyperparathyroidism in response to dietary phosphorus restriction in the uremic dogs. *Kidney International*, v. 15, p. 43-48, 1979.

KARUSSIS, D.; KARAGEORGIOU, C.; VAKNIN-DEMBINSKY, A.; GOWDA-KURKALLI, B.; GOMORI, J.M.; KASSIS, I.; BULTE, J.W.M.; PETROU, A.; BEN-HUR, T.; ABRAMSKY, O.; SLAVIN, S. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of Neurology*, v. 67, p. 1187–1194, 2010.

KIM, S.S.; PARK, H. J.; HAN, J.; GWAK, S. J.; PARK, M. H.; SONG, K. W.; RHEE, Y. H.; MIN-CHUNG, H.; KIM, B. S. Improvement of kidney failure with fetal kidney precursor cell transplantation. *Transplantation*, v. 83, p. 1249-1258, 2007.

KITAMURA, S.; YAMASAKI, Y.; KINOMURA, M.; SUGAYA, T.; SUGIYAMA, H.; MAESHIMA, Y.; MAKINO, H. Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *The FASEB Journal*, v. 19, p. 1789–1797, 2005.

KLINKHAMMER, B. M.; KRAMANN, R.; MALLAU, M.; MAKOWSKA, A.; ROEYEN, C. R. V.; 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.

KOGIKA, M. M.; LUSTOZA, M. D.; NOTOMI, M. K.; WIRTHIL, V. A. B. F.; MIRANDOLA, R. M. S.; HAGIWARA, M. K. Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 35, n. 4, p. 441-445, 2006.

KOMABA, H.; GOTO, S.; FUJII, H.; HAMADA, Y.; KOBAYASHI, A.; SHIBUYA, K.; TOMINAGA, Y.; OTSUKI, N.; NIBU, K.; KAKAGAWA, K.; TSUGAWA, K.; OKANO, T.; KITAZAWA, R.; FUKAGAWA, M. Depressed expression of Klotho and FGF receptor 1 in hyperplastic parathyroid glands from uremic patients. *Kidney International*, v. 77, n. 3, p. 232-238, 2010.

KRAUSE, D. S.; THEISE, N. D.; COLLETOR, M. I. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, v. 105, n. 3, p. 369-377, 2001.

- KUROSU, H.; YAMAMOTO, M.; CLARK, J. D.; PASTOR, J. V.; NANDI, A.; GURNANI, P.; MCGUINNESS, O. P.; CHIKUDA, H.; YAMAGUCHI, M.; KAWAGUCHI, H.; SHIMOMURAS, L.; TAKAYAMA, Y.; HERZ, J.; KAHN, R.; ROSENBLATT, K. P.; KURO-O, M. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. *Science*, v. 309, n. 5742, p. 1829–1833, 2005.
- KURO-O, M. Klotho and aging. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1790, n. 10, p. 1049-1058, 2009.
- LALU, M.M.; MCINTYRE, L.; PUGLIESE, C.; FERGUSON, D.; WINSTON, B.W. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Plos One*, v. 7, n.10, p. 1-21, 2012.
- LAROUTE, V.; CHETBOUL, V.; ROCHE, L.; MAUREY, C.; COSTES, G.; POUCHELON, F.; FARGE, F. D. L.; BOUSSOUF, M.; LEFEBVRE, H. P. Quantitative evaluation of renal function in healthy beagle puppies and mature dogs. *Research in Veterinary Science*, v. 79, p. 161-167, 2005.
- LAZARETTI, P.; KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; LUSTOZA, M. D.; MIRANDOLA, R. M. S. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, n. 4, p. 489-494, 2006.
- LANGE, C.; TOGEL, F.; ITTRICH, H. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney International*, v. 68, n. 4, p. 1613-1617, 2005.
- LEE, S. R.; LEE, S. H.; MOON, J. Y.; PARK, J. Y.; LEE, D.; LIM, S. J.; JEONG, K. H.; PARK, J. K.; LEE, T. W.; IHM, C. G. Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. *Renal Failure*, v. 32, p. 840–848, 2010.
- LEES, G. E. Congenital renal disease. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 26, n. 6, p. 1379-1399, 1996.
- LEES, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 34, n. 4, p. 867-885, 2004.
- LEFEBVRE, H. P.; DOSSIN, O.; TRUMEL, C.; BRAUN, J. P. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 37, n. 1, p. 04-20, 2008.
- LEFEBVRE, H. P. Renal function testing In: BARTGES, L.; POLZIN, D. J. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Ed. Wiley-Blackwell: Iowa, USA, 2011, p. 91-96.
- LIM, J. Y.; JEONG, C. H.; JUN, J. A. Therapeutic effects of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells after intrathecal administration by lumbar puncture in a rat model of cerebral ischemia. *Stem Cell Residence Therapeutic*, v. 2, n. 5, p. 38, 2011.

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

LIPPI, I.; GUIDI, G.; MARCHETTI, V.; TOGNETTI, R.; MEUCCI, V. Prognostic role of the product of serum calcium and phosphorus concentrations in dogs with chronic kidney disease: 31 cases (2008–2010). *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 245, n. 10, p. 1135-1140, 2014.

LUND, E. M.; ARMSTRONG, P. J.; KIRK, C. A. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 214, n. 9, p. 1336-1341, 1999.

MARTINEZ, P. P.; CARVALHO, M. B. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e em cães com doença renal crônica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 30, n. 10, p. 868-876, 2010.

MOLLURA, D. J.; HARE, J. M.; RABB, H. Stem-cell therapy for renal diseases. *American Journal Kidney Disease*, v. 42, n. 5, p. 891-905, 2003.

MORIGI, M.; IMBERTI, B.; ZOJA, C.; CORNA, D.; TOMASONI, S.; ABBATE, M.; ROTTOLI, D.; ANGIOLETTI, S.; BENIGNI, A.; PERICO, N.; ALISON, M.; REMUZZI, G. Mesenchymal stem cells are renotropic, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *Journal of American Society of Nephrology*, v. 15, p. 1794–1804, 2004.

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 suppress toxic hyperparathyroidism. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 26, n. 6, p. 1293-1330, 1996.

NAGODE, L. A.; CHEW, D. J. Nephrocalcinosis caused by hyperparathyroidism in progression of renal failure: treatment with calcitriol. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, v. 7, p. 202–220, 1992.

NASH, S. A. Familial renal disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 30, p. 178- 183, 1989.

O'BRIEN, T.; BARRY, F. P. Stem cell therapy and regenerative medicine. *Mayo Clinic Proceedings*, v. 84, p. 859–861, 2009.

OLIVEIRA, R. B.; CANCELA, A. L. E.; GRACIOLLI, F. G.; REIS, L. M.; DRAIBE, S. A.; CUPPARI, L.; CARVALHO, A. B.; JORGETTI, V.; CANZIANI, M. E.; MOYSES, R. M. A. Early Control of PTH and FGF23 in Normophosphatemic CKD Patients: A New Target in CKD-MBD Therapy? *Clinical Journal of American Society of Nephrology*, v. 5, p. 286-291, 2010.

PARKER, V. K.; GILOR, C.; CHEW, D. J. Feline hyperparathyroidism: pathophysiology, diagnosis and treatment of primary and secondary disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 17, n. 5, p. 427-439, 2015.

POLZIN, D. J. Chronic kidney disease in small animals. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 41, p. 15-30, 2011.

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

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ADAMS, L. D.; O'BRIEN, T. D. Dietary management of canine and feline chronic renal failure. *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 19, n. 3, p. 539-560, 1989.

POLZIN, D. J.; ROSS, S.; OSBORNE, C. A. Calcitriol In: BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. *Kirk's current veterinary therapy XIV*. 14. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2009. p. 892-895.

PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal*, v. 43, p. 1193-1208, 2013.

QUARLES, L. D. Role of FGF23 in vitamin D and phosphate metabolism: implications in chronic kidney disease. *Experimental Cell Research*, v. 318, p. 1040-1048, 2012.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; GIBBONS, D. S.; DOW, S. W. Evaluation of intrarenal mesenchymal stem cell injection for treatment of chronic kidney disease in cats: a pilot study. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 13, p. 418-426, 2011.

QUIMBY, J. M.; WEBB, T. L.; HABENICHT, L. M.; DOW, S. W. Safety and efficacy of intravenous infusion of allogeneic cryopreserved mesenchymal stem cells for treatment of chronic kidney disease in cats: results of three sequential pilot studies. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 4, p. F31-F42, 2013.

QUIMBY, J. M.; DOW, S. W. Novel treatment strategies for feline chronic kidney disease: A critical look at the potential of mesenchymal stem cell therapy. *The Veterinary Journal*, v. 204, p. 241-246, 2015.

ROSEN, S.; GREENFELD, Z.; BERNHELM, J.; RATHAUS, M.; PODJARNY, E.; BREZIS, M. Hypercalcemic nephropathy: Chronic disease with predominant medullary inner stripe injury. *Kidney International*, v. 37, p. 1067-1075, 1990.

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 Medical Association*, v. 229, p. 949-957, 2006.

ROUDEBUSH, D. J.; POLZIN, D. J.; ADAMS, L. G.; TOWELL, T. L.; FORRESTER, S. D. An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease. *Journal of Small Animal Practice*, v. 51, p. 244-252, 2010.

RYAN, J. M.; BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation*, v. 2, p. 8, 2005.

SEGEV, G.; MELTZER, H.; SHIPOV, A. Does secondary renal osteopathy exist in companion animals? *Veterinary Clinics of North America: small animal practice*, v. 46, n. 6, p. 1151-1162, 2016.

SEMEDO, P.; WANG, P. M.; ANDREUCCI, T. H.; CENEDEZE, M. A.; TEIXEIRA, V. P. A.; REIS, M. A.; PACHECO-SILVA, A.; CÂMARA, N. O. S. Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Tissue Damages Triggered by Renal Ischemia and Reperfusion Injury. *Transplantation Proceedings*, v. 39, p. 421-423, 2007.

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

SEMEDO, P.; OLIVEIRA, C. D.; SILVA, M. B.; CENEDEZE, M. A.; MALHEIROS, D. M. A. C.; SILVA, A. P.; CÂMARA, N. O. S. Bone marrow mononuclear cells attenuate fibrosis development after severe acute kidney injury. *Laboratory Investigation*, v. 90, p. 685-695, 2010.

SHIMADA, T.; KAKITANI, M.; YAMAZAKI, Y.; HASEGAWA, H.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; FUKUMOTO, S.; TOMIZUKA, K.; YAMASHITA, T. Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, v. 113, n. 4, p. 561-568, 2004.

SLATOPOLSKY, E.; CAGLAR, S. L.; PENNELL, J. P.; TAGGART, D. D.; CANREWURY, J.; REISS, E.; BRICKER, N. S. On the pathogenesis of hyperparathyroidism in chronic renal insufficiency in the dog. *Journal of Clinical Investigation*, v. 50, p. 492-499, 1971.

SLATOPOLSKY, E.; CAGLAR, S.; GRADOWSKA, L.; CANTERBURY, J.; REISS, E.; BRICKER, N. S. On the prevention of secondary hyperparathyroidism in experimental chronic renal disease using "proportional reduction" of dietary phosphorus intake. *Kidney International*, v. 2, p. 147-151, 1972.

STAGG, J.; GALIPEAU, J. Immune plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Handbook Experience Pharmacological*, v. 180, p. 45-66, 2007.

STEPIEN, R. L. Pathophysiology of systemic hypertension and blood pressure assessment. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Textbook of veterinary internal medicine*. v. 7th ed. California: Saunders Elsevier, 2010. p. 577-581.

TAN, A. O.; LEVINE, B. S.; MAZESS, R. B.; KYLLO, D. M.; BISHOP, C. W.; KNUTSON, J. C.; KLEINMAN, K. S.; COBURN, J. W. Effect suppression of parathyroid hormone by 1- α -hydroxy vitamin D₂ in hemodialysis with moderate to severe secondary hyperparathyroidism. *Kidney International*, v. 51, p. 317–323, 1997.

TOGEL, F.; HU, Z.; WEISS, K.; ISAAC, J.; LANGE, C.; WESTENFELDER, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, v. 289, p. F31–42, 2005.

TOGEL, F.; ZHANG, P.; HU, Z.; WESTENFELDER, C. VEGF is a mediator of the renoprotective effects of multipotent marrow stromal cells in acute kidney injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 13, p. 2109–2114, 2009.

VADEN, S. L. Urine fractional excretion of electrolytes. In: VADEN, S. L.; KNOLL, J. S.; SMITH JR., F. W. K.; TILLEY, L. B. (Ed.). *Blackwell's five minute veterinary consult: laboratory tests and diagnostic procedures – canine & feline*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell: 2009. p. 674-675.

VIEIRA, N. M.; VALADARES, M.; ZUCCONI, E.; SECCO JR., M.; BRANDALISE, V.; ASSONIA, A.; LANDINI, V.; ANDRADE, T.; CAETANO, H. V.; VAINZOF, M.; ZATZ, M. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stromal cells injected systemically into GRMD dogs without immunosuppression are able to reach the host muscle and express human dystrophin. *Cell Transplant*, v. 21, n. 7, p. 1407-1417, 2011.

VILLANUEVA, S.; EWERTZ, E.; CARRIO, F.; TAPIA, A.; VERGARA, C.; CESPEDES, C.; SAEZ, P. J.; LUZ, P.; IRARRAZABAL, C.; CARREÑO, 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.

YAMAZAKI, Y.; OKAZAKI, R.; SHIBATA, M.; HASEGAWA, Y.; SATOH, K.; TAJIMA, T.; TAKEUCHI, Y.; FUJITA, T.; NAKAHARA, K.; YAMASHITA, T.; FUKUMOTO, S. Increased circulatory level of biologically active full-length FGF-23 in patients with hypophosphatemic rickets/osteomalacia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 87, p. 4957–4960, 2002.

YOKOO, T.; FUKUI, A.; OHASHI, T.; MIYAZAKI, Y.; UTSUNOMIYA, Y.; KAWAMURA, T.; HOSOYA, T.; OKABE, M.; KOBAYASHI, E. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *Journal American Society of Nephrology*, v. 17, p. 1026-1034, 2006.

WAN, M.; SMITH, C.; SHAH, V.; GULLET, A.; WELLS, D.; REES, L.; SHROFF, R. Fibroblast growth factor 23 and soluble klotho in children with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v. 28, p. 153-161, 2013.

WATSON, A. Indicators of renal insufficiency in dogs and cats presented at a veterinary teaching hospital. *Australian Veterinary Practices*, v. 31, p. 54-58, 2001.

WILLIAMS, M. E. Chronic kidney disease/bone and mineral metabolism: the imperfect storm. *Seminars in Nephrology*, v. 29, n. 2, p. 97–104, 2009.

ZERBINI, G.; PIEMONTE, L.; MAESTRONI, A.; DELL'ANTONIO, G.; BIANCHI, G. Stem cells and the kidney: a new therapeutic tool? *Journal of American Society of Nephrology*, v. 17, p. S123–126, 2006.

ZHANG, Z.X.; GUAN, L.X.; ZHANG, K.; ZHANG, Q.; DAI, L.J. A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy* v. 10, p. 134–139, 2008.

ZUBKO, R.; FRISHMAN, W. Stem cell therapy for the kidney? *American Journal of Therapeutics*, v. 16, p. 247-256, 2009.

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