

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Nathália das Graças Dorneles Coelho

**ESTABELECIMENTO DE INTERVALO DE REFERÊNCIA
PARA HOMOCISTEÍNA EM CÃES E GATOS E ESTUDO
DA INFLUÊNCIA DA OBESIDADE, DOENÇA RENAL E
PERIODONTITE CRÔNICA EM CÃES**

Belo Horizonte

2024

Nathália das Graças Dorneles Coelho

**ESTABELECIMENTO DE INTERVALO DE REFERÊNCIA PARA
HOMOCISTEÍNA EM CÃES E GATOS E ESTUDO DA
INFLUÊNCIA DA OBESIDADE, DOENÇA RENAL E
PERIODONTITE CRÔNICA EM CÃES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Ciência Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiola Oliveira Paes
Leme

Belo Horizonte

2024

C672e Coelho, Nathália das Graças Dorneles, 1989-
Estabelecimento de intervalo de referência para homocisteína em cães e gatos e estudo da influência da obesidade, doença renal e periodontite crônica em cães/ Nathália das Graças Dorneles Coelho.-2024.
80f: il.

Orientadora: Fabiola Oliveira Paes Leme
Tese (Doutorado) apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina e Cirurgia Veterinária.
Inclui bibliografia.

1. Cão - Teses - 2. Doença periodontal - Teses - 3. Rins – Doenças - Teses
I. Paes Leme, Fabiola Oliveira - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD – 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

NATHALIA DAS GRAÇAS DORNELES COELHO

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração **Medicina e Cirurgia Veterinárias**.

Aprovado(a) em 28 de junho de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fabíola de Oliveira Paes Leme - Orientador(a)

Dr.(a). Rubens Antônio Carneiro

Dr.(a). Breno Curty Barbosa

Dr.(a). Paula Costa de Oliveira Pinto

Dr.(a). Patrícia Maria Coletto Freitas



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 08/07/2024, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 09/07/2024, às 09:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Costa de Oliveira Pinto, Usuário Externo**, em 09/07/2024, às 21:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Breno Curty Barbosa, Usuário Externo**, em 10/07/2024, às 07:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Maria Coletto Freitas, Professora do Magistério Superior**, em 30/07/2024, às 22:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3356014** e o código CRC **54303C90**.

À Deus e a minha família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por me sustentar nesta etapa, concedendo-me saúde física e mental, bem como perseverança para construir meus sonhos diante de todos os desafios enfrentados.

A São Judas Tadeu, padroeiro das causas impossíveis, agradeço por sua intercessão em minha jornada.

Aos melhores pais do mundo, Geraldo Mauro Coelho e Maria das Graças Dorneles Coelho, por sonharem comigo o desejo de me tornar Médica Veterinária, e pelo apoio e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida. Sem vocês, nada disso seria possível. Amo muito vocês!

Ao meu amado esposo e companheiro de vida, Ilano Oliveira e Silva. Sem seu companheirismo, paciência, compreensão, apoio e amor, este trabalho não seria concretizado.

Aos meus irmãos, Ana Carolina das Graças Dorneles Coelho e Mauro Dorneles Coelho, agradeço, pois, acreditaram nos meus sonhos e me ouviram em momentos difíceis.

À melhor orientadora e amiga que Deus poderia colocar em minha vida, Profa. Fabiola de Oliveira Paes, minha imensa admiração pelo ser humano, orientadora, amiga, mãe e professora incrível que você é. Você é um dos maiores presentes que a UFMG me concedeu. Conte comigo por toda a vida.

À amiga e Profa. Patrícia Maria Coletto de Freitas e ao GEMIV-UFMG que sempre me acolheram com muito amor. Obrigada por acreditarem em mim e por me fazerem tão bem.

A todos os outros mestres que contribuíram para a minha educação desde a infância até aqui, com destaque ao Prof. Daniel Moreira de Faria, grande amigo que o Pré-UFMG me presenteou, e aos Professores Rubens Antônio Carneiro, Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Renato César Sacchetto Torres, Anelise Carvalho Nepomuceno, Suzane Lilian Beier e Júlio César Cambraia Veado da Medicina Veterinária. Todos vocês mudaram a minha vida e a da minha família por meio da educação.

Aos anjos chamados amigos o Breno Curty Barbosa, Paula Costa de Oliveira Pinto, Natália Rocha Mattos de Castro, Luíza Andrade Côrrea, Rafaela da Silveira Prestes, Izabela Patrício de Souza, Thais de Paula, Grazielle Amaro Siqueira de Sousa, Tayanne de Carvalho Gouveia, Daniela Bastos de Souza Karam Rosa, Fernanda dos Santos Alves e a tantos outros amigos não citados aqui, expresse minha sincera gratidão por compartilharem meu sonho. Realizar ciência com o apoio de todos vocês torna essa tarefa prazerosa. Além disso, juntos superamos todas as nossas dificuldades e construímos uma jornada de vida cada vez mais leve e enriquecedora.

À psicóloga Jeanyce Gabriela Araújo, seu profissionalismo associado à sua humanidade, empatia e paciência foram peças fundamentais na restauração da minha saúde mental. Sem ela, este doutorado não seria possível.

Aos funcionários, residentes e pós graduandos de toda Escola de Veterinária e Laboratório de Patologia Clínica da UFMG, em especial o Guilherme Augusto Borges Duarte, Lucas Braga Costa dos Santos, Marco Túlio Gomes Campos e Flaviani Emilia dos Santos. O acolhimento e carinho de todos vocês foi essencial nessa etapa.

A meus amados filhos de quatro patas, por me receberem todos os dias com tanto amor, refletido em latidos, lambidas e ronronados, mesmo quando me mostrei ausente.

Aos pacientes que contribuíram de maneira ingênua e doce para a realização desse trabalho. Cada hora de estudo e todos os projetos profissionais ao longo da minha vida serão sempre dedicados a vocês. Aos tutores que aceitaram o convite, disponibilizaram parte do seu tempo e confiaram na pesquisa.

A todos os meus alunos da PUC-MINAS e UNIVERSO-BH, que me motivam a ser cada vez melhor como ser humano e profissional. Vocês permitem que eu realize o meu maior propósito de vida: a docência.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos recursos financeiros disponibilizados com a bolsa de doutorado.

“A educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo” Nelson Mandela.

RESUMO

A homocisteína (HC) é um potencial marcador de saúde em cães e gatos, mas sua análise clínica ainda é limitada. Para avançar nesse campo, são necessários métodos de mensuração acessíveis e o estabelecimento de intervalos de referência (IR) para animais saudáveis, além da compreensão dos fatores na saúde e na doença, que afetam sua concentração em amostras biológicas. Diante disso, o objetivo principal desta pesquisa foi investigar como raça, sexo, faixa etária e escore de condição corporal afetam valores de HC total sérica (HCts) em cães e gatos, bem como avaliar a influência da obesidade, da periodontite crônica (PC) e da lesão renal aguda (LRA) nos valores de homocisteinemia de cães. Para isso, foram avaliados em um único momento: 62 cães saudáveis, divididos por faixa etária, escore de condição corporal (ECC), sexo e presença/ausência de PC (G1); 23 gatos saudáveis, subdivididos por faixa etária e sexo (G2); 24 cães com LRA isolada ou associada à doença renal crônica (G3); e, por fim, 24 cães obesos, sem doença endócrina de base (G4). Foram avaliados os efeitos de determinantes como obesidade, PC e LRA sobre valores de HCts, assim como a correlação entre HC e as concentrações séricas de creatinina, uréia, fósforo e amilase. O IR, valores médios e desvios padrão para HCts em cães e gatos saudáveis, sem doença periodontal, foram: 6,08 à 20,91 $\mu\text{mol/L}$ ($13,25 \pm 3,78 \mu\text{mol/L}$) para cães saudáveis; e 15,89 à 45,58 $\mu\text{mol/L}$ ($26,22 \pm 7,69 \mu\text{mol/L}$) para gatos saudáveis. Constatou-se que cães com obesidade, PC e LRA apresentam concentrações maiores de HCts do que cães considerados saudáveis, enquanto variáveis fisiológicas, como sexo e faixa etária, não apresentaram influência significativa sobre a HCts. A correlação entre HCts e creatinina, amilase e fósforo reforçam sua importância no diagnóstico precoce de LRA. Cães com HCts acima de 15 $\mu\text{mol/L}$ apresentam 5 (cinco) x mais chance de óbito. Esses resultados indicam que a HCts é um biomarcador promissor para o diagnóstico, estadiamento, monitoramento e prognóstico de animais com obesidade, LRA e PC.

Palavras-chave: cão; doença periodontal; rins.

ABSTRACT

Homocysteine (HC) is a potential health marker in dogs and cats, but its clinical analysis is still limited. To advance in this field, accessible measurement methods and the establishment of reference intervals (RI) for healthy animals are necessary, in addition to understanding the factors in health and disease that affect their concentration in biological samples. Therefore, the main objective of this research was to investigate how breed, sex, age group and body condition score affect serum total (HCts) values in dogs and cats, as well as evaluate the influence of obesity, chronic periodontitis (CP) and acute kidney injury (AKI) can influence homocysteinemia in dogs. For this, the following were evaluated at a single time: 62 healthy dogs, divided by age group, body condition score (BCS), sex and presence/absence of CP (G1); 23 healthy cats, subdivided by age group and sex (G2); 24 dogs with AKI alone or associated with chronic kidney disease (G3); and, finally, 24 obese dogs, without underlying endocrine disease (G4). The effects of determinants such as obesity, BW and AKI on HC values were evaluated, as well as the correlation between HC and serum concentrations of creatinine, urea, phosphorus and amylase. The RI, mean values and standard deviations for HCts in healthy dogs and cats, without periodontal disease, were: 6.08 to 20.91 $\mu\text{mol/L}$ ($13.25 \pm 3.78 \mu\text{mol/L}$) for healthy dogs; and 15.89 to 45.58 $\mu\text{mol/L}$ ($26.22 \pm 7.69 \mu\text{mol/L}$) for healthy cats. It was found that dogs with obesity, CP and AKI have higher concentrations of HCts than dogs considered healthy, while physiological variables, such as sex and age group, did not have a significant influence on HCts. The correlation between HCts and creatinine, amylase and phosphorus reinforces its importance in the early diagnosis of AKI. Dogs with HCts above 15 $\mu\text{mol/L}$ have a 5x greater chance of death. These results indicate that HCts is a promising biomarker for the diagnosis, staging, monitoring and prognosis of animals with obesity, AKI and CP.

Keywords: canine; periodontal disease; kidney injury.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1. Processo de desmetilação da metionina até a conversão a homocisteína | 20 |
| Figura 2. Esquema da via da remetilação que converte a homocisteína em metionina, destacando o papel das vitaminas B12 e B9. As reações ocorrem na ordem de 1 a 3, com setas verdes indicando a reciclagem das vitaminas B9 e B12 | 21 |
| Figura 3. Via da transulfatação da homocisteína, destacando o papel da vitamina B6 como cofator das reações envolvidas..... | 22 |
| Figura 4. Principais estudos que investigaram os valores de homocisteína total sérica (HCts) ou homocisteína total plásmatica (HCtp) em cães..... | 24 |
| Figura 5. Principais estudos que investigaram os valores de homocisteína total sérica (HCts) ou plásmatica (HCtp) em gatos..... | 29 |
| Figura 6. Sistema de escore de condição corporal desenvolvido na Nestlé Purina Pet Care Center e validado por Mawby et al. (2004)..... | 43 |
| Figura 7. Classificação dos estágios de vida de cães, conforme recomendado pela <i>AAHA Canine Life Stage Guidelines</i> . Fonte: Creevy e colaboradores (2019)..... | 43 |
| Figura 8. Estágios de vida de gatos conforme recomendado pelas <i>AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines</i> (Quimby et al., 2021)..... | 43 |
| Figura 9. Frequência relativa das raças de cães amostrados no experimento, composto por 62 cães saudáveis, para estabelecimento do intervalo de referência (IR) para homocisteína..... | 49 |
| Figura 10. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de cães clinicamente saudáveis de raças, sexo e idades variadas(n=62) | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 11. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 62 cães saudáveis, divididos em quatro faixas etárias (estágios de vida) | 52 |
| Figura 12. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 62 cães saudáveis divididos entre fêmeas (n=45) e machos (n=17)..... | 53 |
| Figura 13. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 58 cães saudáveis subdivididos dentre ECC diferentes. ECC4-5 normal; ECC 6- sobrepeso..... | 54 |
| Figura 14. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 57 cães com ausência de periodontite crônica (PC) (n=31), presença PC discreta (n=17) e PC moderada (n=9) | 55 |
| Figura 15. Valores de homocisteína total sérica (HCt) de 34 cães de raças, sexos e idades variadas, clinicamente saudáveis e sem periodontite crônica..... | 56 |
| Figura 16. Distribuição da doença periodontal em 26 cães divididos por diferentes faixas etárias. | 56 |
| Figura 17. Distribuição da doença periodontal em 26 cães divididos por escore de condição corporal (ECC) em uma escala de 1 à 9..... | 57 |
| Figura 18. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos sem raça definida (SRD) saudáveis..... | 58 |
| Figura 19. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos SDR saudáveis, divididos em quatro faixas etárias (estágios de vida) | 59 |
| Figura 20. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos saudáveis, sem raça definida (SRD) s divididos em fêmeas (n=14) e machos (n=9)..... | 60 |
| Figura 21. Comparação entre os valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos e 31 cães saudáveis, sem doença periodontal..... | 61 |
| Figura 22. Valores de homocisteína total sérica (HCts) em 24 cães com lesão renal aguda (LRA), com ou sem doença renal crônica (DRC), comparados aos valores de cães saudáveis sem periodontite crônica (PC)..... | 62 |

| | |
|--|----|
| Figura 23. Alterações apontadas como causas de lesão renal aguda (LRA) dos 24 cães do estudo e o desfecho..... | 62 |
| Figura 24. Distribuição por raça, sexo e faixa etária de 24 cães obesos não portadores de doença endócrina de base. A. Frequência relativa por raça. B. Frequência relativa por sexo. C. Frequência relativa por faixa etária..... | 66 |
| Figura 25. Comparação dos valores de homocisteína total sérica (HCt) entre 24 cães obesos e 31 cães saudáveis, sem doença periodontal..... | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus centígrados
µL – microlitro
µmol/l- micromol por litro
µmol – micromolar
5-MTHFR - 5- metilenotetra-hidrofolato redutase
ALB - albumina
ALT- alanina aminotransferase
AMYL – amilase
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CE - colorimétrico enzimático
CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média
CBS - cistationina B-sintetase
CM - cardiomiopatia hipertrófica
CRTI -cromatografia de troca iônica
dL - decilitro(s)
DCb - dieta comercial balanceada
DCSb - dieta caseira balanceada
DRC - doença renal crônica
ECC - escore de condição corporal
EDTA - ácido etilenodiamino tetra acético
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EM – Espectrometria de massa
FA - fosfatase Alcalina
FE- fluorimétrico
fig - figura
GGT - gama-glutamyltransferase
GLOB - globulina
GLU – glicose
Hb - hemoglobina
HC - homocisteína
HCt- homocisteína total
HCs- homocisteína sérica
HCts - homocisteína total sérica
HCtp - homocisteína total plasmática
HDL- lipoproteína de alta densidade
He – eritrócitos
HHC - hiperhomocisteinemia
Ht - hematócrito
Kg - quilograma(s)
IR- intervalo de referência
IVMC - insuficiência valvar mitral crônica
LRA - lesão renal aguda
mL – mililitro(s)
mmol – milimol
metil-tetrahidrofolato- metil-THF
MULTILAB - Unidade multiusuária de experimentação animal
PAS - pressão arterial sistólica
PC - periodontite crônica
PHOS – fósforo

QL – quimioluminescência
SRD - sem raça definida
SRIS - síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TEA - tromboembolismo arterial
THF- tetraidrofolato
HV-UFMG – Hospital Veterinário da Universidade
Federal de Minas Gerais
VCM - volume corpuscular médio
vB9 – vitamina B9
vB12 – vitamina B12

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1. Objetivo geral | 19 |
| 2.2. Objetivos específicos | 19 |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 3.1. Definição, origem e principais causas de alterações da homocisteína | 20 |
| 3.2. Influência da Obesidade sobre os valores de homocisteína | 33 |
| 3.3. Influência da doença renal sobre a concentração da homocisteína | 33 |
| 3.4. Influência da periodontite crônica sobre os valores de homocisteína | 35 |
| 3.5. Métodos analíticos para determinação de HCts..... | 36 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 39 |
| 4.1. Comitê de ética em experimentação animal e anuência do HV-UFGM | 39 |
| 4.2. Animais..... | 39 |
| 4.3. Grupos experimentais | 39 |
| 4.4. Critérios para inclusão e exclusão..... | 40 |
| 4.5. Tempos do estudo e locais de realização | 41 |
| 4.6. Avaliação clínica..... | 41 |
| 4.7. Coletas de amostras para análises laboratoriais..... | 43 |
| 4.7.1. Hemograma | 44 |
| 4.7.2. Perfil Bioquímico | 45 |
| 4.7.3. Dosagem de homocisteína | 45 |
| 4.8. Delineamento experimental e análise estatística | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 49 |
| 5.1. Caracterização dos grupos experimentais e estabelecimento de Intervalo de referência (IR) para HCts de cães | 49 |
| 5.2. Caracterização dos grupos experimentais e estabelecimento de Intervalo de referência (IR) para HCts de gatos saudáveis | 58 |
| 5.3. Valores de homocisteína total sérica de cães com lesão renal aguda (LRA)..... | 61 |
| 5.4. Valores de homocisteína total sérica de cães obesos | 65 |
| 6. CONCLUSÕES | 67 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 69 |

| | |
|--|----|
| ANEXO 1 – Comissão de ética no uso de animais – CEUA | 75 |
| ANEXO 2 – Anuência do HV-UFGM | 76 |
| ANEXO 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 77 |
| ANEXO 4 – Declaração de Consentimento | 79 |

1. INTRODUÇÃO

A homocisteína (HC) é um aminoácido sulfurado produzido principalmente pelo metabolismo da metionina dietética (House et al., 1998). Esse analito é pouco explorado na rotina clínica de cães e gatos, mas apresenta potencial como biomarcador em diversas condições, especialmente renais e cardiovasculares. Quadros de hiperhomocisteinemia (HHC) podem aumentar o risco de desenvolvimento e/ou agravar essas condições (Bydlowski et al., 1998). Portanto, avaliar a concentração de HC e manter seus valores dentro do intervalo de referência (IR) para a espécie é fundamental na prática clínica.

Na medicina o emprego da dosagem da HC já vem sendo utilizada para o diagnóstico e monitoramento de doenças renais (Shih et al., 2022), cardiovasculares (Venâncio et al., 2010), neurológicas (Zhuo et al., 2011), obesidade (Wang et al., 2022) e periodontite crônica (Langote et al., 2023). Poucos artigos científicos que avaliam a importância da análise da HC em cães e gatos estão disponíveis na medicina veterinária. Dentre, os estudos destacados, estão aqueles realizados por McMichael e colaboradores (2020) e Lee e Hyun (2012), que investigaram a HC na cardiopatia em cães e gatos, respectivamente. Além disso, Rossi e colaboradores (2013) e Girdali e colaboradores (2019) conduziram pesquisas sobre a HC na doença renal crônica (DRC) em cães e gatos, respectivamente.

Até o presente momento não foram estabelecidas as interferências da faixa etária, obesidade ou de alterações dentárias sobre as concentrações de HC, em cães e gatos. Diante desse contexto, é essencial estabelecer o IR de HC para a espécie, seguindo as diretrizes de Scott (2008). Para isso, é necessário obter amostras representativas que abranjam diferentes sexos, raças e faixas etárias. A seleção criteriosa com base em critérios de inclusão e exclusão, a qualidade das amostras, a precisão da análise e o controle de qualidade laboratorial são fatores determinantes para a qualidade dos resultados.

Além disso, é importante avançar no conhecimento sobre os determinantes fisiológicos e patológicos das concentrações de HC e, estabelecer IR específicos para cães e gatos. Isso requer a mensuração da HC utilizando métodos práticos, econômicos e de fácil execução, que permitam sua análise na rotina laboratorial para uso clínico, um exemplo é o método enzimático, utilizado pioneiramente em amostras de cães por Rossi e colaboradores (2008).

A partir da determinação de IR específicos para cães e gatos, será possível desenvolver estratégias para controlar os valores de HC, mitigando os danos biológicos associados à HHC, especialmente em relação ao sistema renal e cardiovascular.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar a provável influência de determinantes fisiológicos, como raça, sexo e faixa etária, sobre os valores de homocisteína total sérica (HCts) em cães e gatos clinicamente saudáveis bem como a influência da obesidade, periodontite crônica (PC) e lesão renal aguda (LRA) nos valores de HCts em cães.

1.2. Objetivos específicos

- 1.2.1. Estabelecer o intervalo de referência (IR) para HCts de cães e gatos em estado de saúde;
- 1.2.2. Avaliar a influência da idade sobre os valores de HCts em cães e gatos;
- 1.2.3. Avaliar a influência do sexo sobre os valores de HCts em cães e gatos;
- 1.2.4. Avaliar a influência do escore de condição corporal (ECC) sobre os valores da HCts em cães e gatos;
- 1.2.5. Avaliar a influência da PC discreta e moderada nos valores de HCts em cães saudáveis;
- 1.2.6. Avaliar a influência do diagnóstico de LRA sobre valores de HCts em cães;
- 1.2.7. Correlacionar a HCts aos valores de fósforo, amilase, creatinina e uréia séricos em cães e gatos saudáveis e em cães com LRA;
- 1.2.8. Estudar a possibilidade da HCts ser um analito preditor de prognóstico em cães com LRA;

3. Revisão de Literatura

3.1. Definição, origem e principais causas de alterações da homocisteína

A HC é um aminoácido sulfurado, não formador de proteínas, produzido principalmente no fígado a partir da via da desmetilação da metionina oriunda da dieta ou do catabolismo (fig. 1), sendo a metionina a única fonte de produção de HC endógena (Selhub, 1999; Neves et al., 2004).

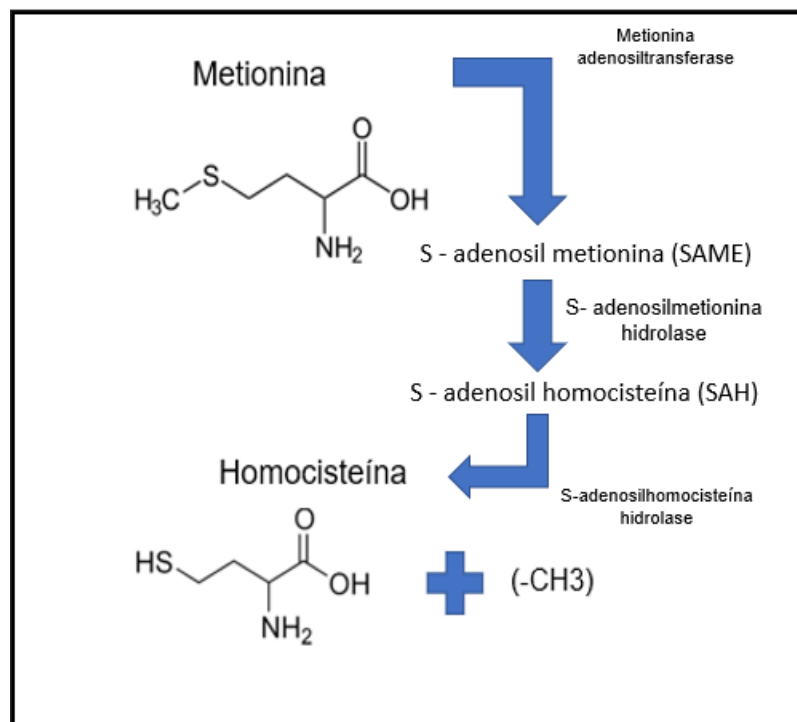


Figura 1. Processo de desmetilação da metionina até a conversão a homocisteína. Fonte: adaptado de Neves e colaboradores (1999).

A manutenção dos valores de homocisteína total (Hct) sérica ou plasmática dentro do IR depende de três fatores: a dieta, a excreção renal e, principalmente, sua metabolização. Essa última, ocorre por duas grandes vias: a remetilação e a transulfatação, que acontecem simultaneamente no organismo. No entanto, há predomínio da remetilação em jejum e da transulfatação no período pós-prandial, após sobrecarga de metionina (Neves et al., 2004).

Na via da remetilação, que ocorre em todas as células corporais, especialmente nos hepatócitos, inicialmente há a adição de um grupo metila (-CH₃) ao tetrahydrofolato (THF), a forma ativa da vitamina B₉ (vB₉) proveniente da dieta, formando o metil-tetrahydrofolato (metil-THF) pela ação da enzima 5- metilenotetra-hidrofolato redutase (5-MTHFR). Em seguida, o metil-THF transfere o grupo metila para a HC, formando metionina por meio da enzima metionina sintetase, que é dependente de vitamina B₁₂ (vB₁₂).

Durante este processo, o metil-THF é convertido em di-hidrofolato, que é convertido de volta em THF pela enzima di-hidrofolato redutase, reciclando a vB9. A vB12, após atuar como cofator da enzima metionina sintetase, é liberada e pode continuar participando do ciclo da HC (Selhub, 1999; Neves et al., 2004; Venâncio et al., 2010), conforme demonstrado na figura- 2.

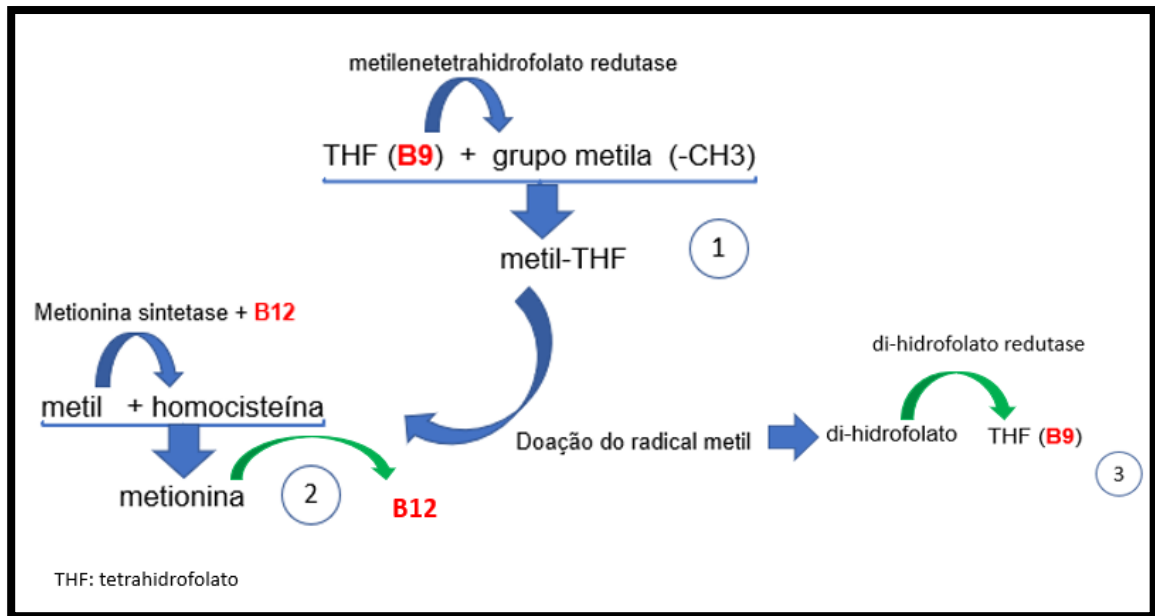


Figura 2. Esquema da via da remetilação que converte a homocisteína em metionina, destacando o papel das vitaminas B12 e B9. As reações ocorrem na ordem de 1 a 3, com setas verdes indicando a reciclagem das vitaminas B9 e B12. Fonte: adaptado de Neves e colaboradores (1999).

A transulfatação, em condições de normohomocisteinemia, ocorre predominantemente no fígado. No entanto, em condições de HHC apesar do protagonismo hepático, há um grande incremento na via de transulfatação renal na tentativa de manter a HC dentro da faixa de normalidade (House et al., 1997; House et al., 1998). A via da remetilação não é importante na metabolização renal de HC, mesmo em casos de HHC, sendo observado menos de 2% de recuperação de metionina (House et al., 1998).

Esta via tem como objetivo sintetizar cisteína e/ou catabolizar o excesso de HC presente no organismo (Selhub, 1999; Neves et al., 2004; Venâncio et al., 2010). Inicialmente, a HC se condensa com a serina para formar a cistationina, por meio da ação da enzima cistationina B-sintetase (CBS), que tem como cofator a vB6. Essa conversão envolve uma reação de transulfatação, na qual um grupo sulfeto (-SH) da HC é transferido para a serina,

transformando-o em piruvato, ou transferido para outra molécula de HC, formando, pela ligação dissulfeto (-S-S) a cistationina (Selhub, 1999; Neves et al., 2004; Venâncio et al., 2010), conforme demonstrado na fig.3.

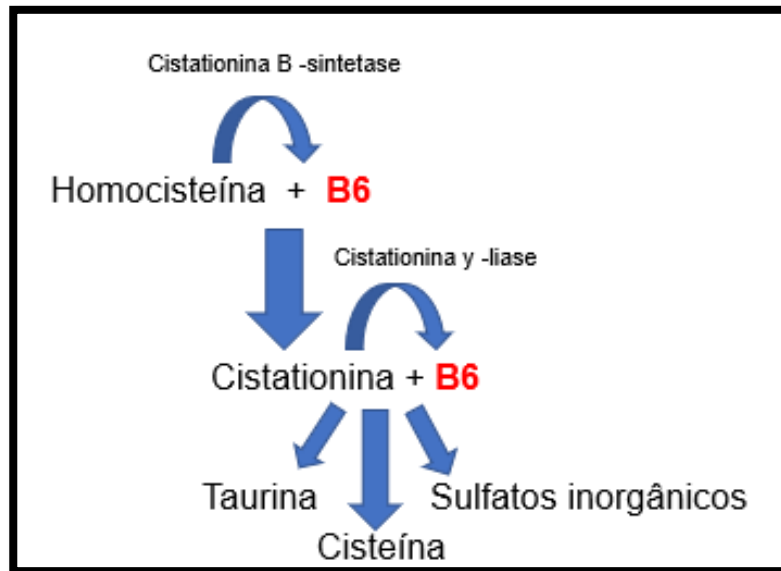


Figura 3. Via da transulfatação da homocisteína, destacando o papel da vitamina B6 como cofator das reações envolvidas. Fonte: adaptado de Neves e colaboradores (1999).

Apesar dos mecanismos compensatórios, os quadros de HHC são comuns em humanos e podem ser causados por uma dieta rica em proteínas oriundas de carnes vermelhas, baixa ingestão e/ou absorção de vitaminas do complexo B, e pela doença renal crônica (DRC). Suas consequências incluem aumento de doenças coronarianas, infarto do miocárdio, trombose, acidentes vasculares cerebrais (AVC), além de contribuir para o desenvolvimento e evolução do Alzheimer, associado ou não a estas doenças mencionadas anteriormente.

Portanto, reduzir a HC requer uma abordagem multidisciplinar entre clínicos e nutricionistas para definir a melhor estratégia terapêutica. Isso pode incluir aumento da ingestão de alimentos ricos em vitaminas B6 (vB6) e vB12, redução na ingestão de carnes vermelhas e, se necessário, suplementação com ácido fólico, vB12, taurina ou betaína. No entanto, em casos de DRC, essas medidas podem ser insuficientes e pouco eficazes, devido ao comprometimento renal na transulfatação (Neves et al., 2004; Gabriel et al., 2005; Venâncio et al., 2010; Zhuo et al., 2011).

A hipohomocisteinemia é menos frequente e pode ser causada por redução da sua produção pelo fígado, falta de substrato e/ou suplementação excessiva com vitamínicos do complexo B. As suas consequências incluem falhas no sistema imunológico, maior predisposição ao Alzheimer e menor combate ao estresse oxidativo.

Ao detectar a HC sérica baixa, deve-se alterar ou interromper a suplementação das vitaminas do complexo B ou ácido fólico. Em outras situações é recomendada ajustes dietéticos, de maneira a consumir em menor quantidade alimentos ricos em vB6 e vB12 (Neves et al., 2004; Bae et al., 2021).

Dentro deste contexto, em pesquisa conduzida por Rossi e colaboradores (2008), a homocisteína total (HCt) foi avaliada em cães de maneira inédita pelo método colorimétrico enzimático (CE), devido à sua simplicidade de execução e menor custo em comparação ao padrão-ouro, a cromatografia líquida e alta eficiência (CLAE). O desempenho analítico deste método foi avaliado em 56 amostras de cães, sendo oito provenientes de pacientes saudáveis e 48 com diferentes condições clínicas.

Os resultados destacaram a maior precisão do método CE em amostras com níveis de HCt próximos ou acima do limite de referência, enquanto observaram maior imprecisão em amostras com níveis baixos, encontrados apenas em cães saudáveis. Os autores consideraram que esta imprecisão em níveis baixos não deve ter impacto significativo nas decisões clínicas. O estudo também enfatizou a preferência por amostras de soro em relação ao plasma e recomendou evitar o uso de amostras intensamente ictericas (Rossi et al., 2008).

Após a pesquisa de Rossi e colaboradores (2008), novos trabalhos em cães e gatos foram impulsionados, conforme detalhado nas figuras 5 e 6, respectivamente.

Figura 4. Principais estudos que investigaram os valores de homocisteína total sérica (HCts) ou plásmatica (HCtp) em cães.

| Autores | n° amostral e condição de saúde | Raça, sexo e idade | MA e amostra utilizada | M ± DP | Avaliação da influência da faixa etária, sexo e ECC nos valores de HCts ou HCtp |
|---------------------|---|---|------------------------------------|--|---|
| Rossi et al. (2008) | 8 hígidos 48 doentes: doenças cardíacas (n=10), inflamações (n=6), distúrbios gastrointestinais (n=7), neoplasias (n=8), insuficiência renal (n=4), traumas (n=7) e outras (n=6) | Hígidos SRD (n=19); Labrador (n=3); Golden Retriever (n=2); outras raças (n=11) Fêmeas (n=5) e Machos (n=3) Idade média: 2,5 anos (variando de 1 a 6 anos), | AMOSTRA Plasma e soro MA CE | Hígidos: 5,82 ± 3,26 µmol/l (variando de 1,43 a 11,23 µmol/l). Insuficiência renal: 18,86 ± 10,15 µmol/L (variando de 9,38 a 32,07 µmol/l) Doenças cardíacas: 10,21 ± 6,09 µmol/l. (variando de 4,47 a 24,50 µmol/l) | Não foram avaliadas |
| Lutz et al. (2012) | 35 hígidos não Border Collies 109 hígidos Border Collies | Não Border Collies SRD (n=19); Labrador (n=3); Golden Retriever (n=2); outras raças (n=11) Fêmeas (n=18) e Machos (n=17) Idade média: 5 anos (variando de 1 a 15 anos), Peso corporal médio: 12,6 kg (variando de 5,1 a 43 kg). | AMOSTRA plasma MA CLAE/FL | Hígidos não Border Collies: 10,4 ± 4,5 µmol/l (variando de 4,3 a 18,4 µmol/l) Hígidos Border Collies: 9,5 ± 4,0 µmol/l (variando de 2,8 a 22,4 µmol/l) Não notou-se diferença estatística entre os grupos Comparação foi conduzida devido a descobertas | Não foram avaliadas |

| | | | | | |
|-------------------------|--|--|---------------------------------|--|--|
| | | Border Collies Fêmeas (n=58) e Machos (n=51) Idade média: 4 anos (variando de 0,2 a 14 anos) Peso corporal médio: 17,3 kg (variando de 2,7 a 29 kg). | | anteriores que indicaram a presença de uma deficiência hereditária de vB12 em cães da raça Border Collie. Cinco animais apresentaram a vB1 abaixo do IR, porém com valores de HC dentro do IR. | |
| Cayir; Kozat (2016) | 40 hípidos | Pastor Alemão, Golden Retriever, Labrador e Terrier, distribuídos igualmente | AMOST RA plasma MA ELISA | 10,6 ± 4,55 µmol/l, Pastor Alemão 11,43 ± 6,10 µmol/l, Golden Retriever 8,88 ± 2,34 µmol/l, Terriers 9,40 ± 3,83 µmol/l, Labrador Retriever Não notou-se diferença estatística entre raças | Foram avaliadas a influência do sexo e idade. Sexo: não notou-se diferença estatística Idade: três grupos, sendo: menos de 1 ano, entre 1 e 2 anos e entre 3 e 6 anos. Não notou-se diferença estatística |
| Benvenuti et al. (2020) | 29 enteropatia responsiva à imunossupressão (ERI) associada a má absorção. 24 hípidos | ERI SRD (n=7), Pastor Alemão (n=6), Maltês (n=4), Dachshund (n=2), Pinscher (n=2), Basenji | AMOST RA Soro MA CLAE | Hípidos: 5,26 ± 2,78 µmol/l Enteropatia: 30,22 ± 8,67 µmol/l Notou-se no grupo portador de enteropatia | Não foram avaliadas |

| | | | | | |
|-----------------------|--|--|--|--|---|
| | | <p>(n=1), Setter Irlandês (n=1), Weimaraner (n=1), Cocker Inglês Spaniel (n=1), Jack Russel Terrier (n=1), Dobermann (n=1), Pug (n=1) e Beagle (n=1).</p> <p>Fêmeas (n=7) e Machos (n=22)</p> <p>Idade média: 4,79 anos (variando de 1 a 11 anos)</p> <p>ECC: 2 a 6 (escala de 1 à 9) Mediana: 3,5</p> <p>Hígidos</p> <p>Fêmeas (n=8) e Machos (n=16)</p> <p>Idade média: 4,5 anos (variando de 1 a 8 anos)</p> <p>ECC: 4 a 6 (escala de 1 à 9) Mediana: 4,5</p> <p>SRD (n=11), Jack Russel Terrier (4), Setter Inglês (3), Bulldog Inglês (2), Dachshund (2), Beagle (1) e Cocker Spaniel (1).</p> | | <p>foi identificada uma correlação negativa entre os níveis de HCts e da vB12.</p> | |
| Johnson et al. (2023) | <p>15 hígidos não galgos</p> <p>31 hígidos Greyhound</p> | <p>Hígidos não galgos</p> <p>Fêmeas (n=6) e Machos (n=9)</p> | <p>AMOSTRA Soro</p> <p>MA CLAE/E M</p> | <p>Hígidos não galgos</p> <p>Mediana: 13,9 µmol/l (variando de 8,7 a 21,2 µmol/l)</p> | <p>Não foram avaliadas para sexo e ECC.</p> <p>Apenas no grupo Greyhound a HCts foi</p> |

| | | | | | |
|-------------------------|--|---|--|--|--|
| | | <p>Idade média: 3,5 anos (variando de 1,5 a 7,5 anos)</p> <p>SRD (n=5); Golden Retriever (n=3); Border Coliie (n=1); American Pit Bull Terrier (n=1), Pointer Alemão de Pelo Curto (n=1) e Treeing Walker Coonhound (n=1).</p> <p>Hígidos galgos</p> <p>Fêmeas (n=12) e Machos (n=19)</p> <p>Idade média: 3,5 anos (variando de 1,5 a 12,5 anos)</p> | | <p>Hígidos galgos Mediana: 25,0 µmol/l (variando de 6 a 94,9) µmol/l</p> <p>Notou-se diferença estatística entre raças Foi evidenciada uma correlação inversa entre a vB12, vitamina B9 (vB9) e metionina e os valores de HCts nos Greygounds</p> | positivamente correlacionada com a idade (p = 0,02) |
| Patterson et al. (2013) | 51 hígidos 22 síndrome da resposta inflamatória sistêmica não infecciosa (n=11) e infecciosa/sepsis (n=11). | Hígidos Fêmeas (n=24) e Machos (n=27) Idade: variando de 6,0 a 13,0 anos | AMOST RA Soro MA CG/EM | Hígidos Mediana: 11,1 µmol/l (variando de 8,89 a 17,20 µmol/l) SIRS Mediana: 7,3 µmol/l Notou-se diferença estatística entre os grupos. | Não foram avaliadas |
| Golynski et al. (2017) | 10 hígidos 19 hipotireoideos | Hígidos Fêmeas (n=5) e Machos (n=5) Idade: média de 7,3 anos (variando de 5 a 10 anos) Raça: SRD | AMOST RA Soro MA IQ | Hígidos Média: 11,52 µmol/l (variando de 10,00 a 16,65 µmol/l) Hipotiroidismo 22,2 µmol/l | Não foram avaliadas |

| | | | | | |
|-------------------------|--|--|---------------------------------|--|---------------------------------|
| | | Hipotiroidismos Fêmeas (n=11) e Machos (n=8) Idade: média 7,7 anos (variando de 4 a 12 anos). | | (variando de 16,5 a 37,75 µmol/l) Correlação inversa em HCts e tiroxina total e livre | |
| Lee e Hyun (2012) | 9 Hígidos Yorkshire (n=1) Terrier; Shit-zu (n=2); Poodle (n=1); Maltês (n=4); Crossbreed (n=4); 82 Doença valvar mitral crônica | Fêmeas (n=4) e Machos (n=5) Idade média: 10,1 ± 2,4 anos | AMOST RA Plasma MA | Não demonstrado Sem diferença entre os grupos | Não foram analisad os. |

M: média; MA: método de análise; CE: colorimétrico enzimático; CG: cromatografia gasosa; Nes: não especificadas; CLAE/FL: cromatografia de alta eficiência acoplada a detecção fluorométrica; n.: número amostral; SRD: sem raça definida. EM: espectrometria de massa; DP: desvio padrão. IR: intervalo de referência; IQ: imunensaio quimioluminescente.

Figura 5. Principais estudos que investigaram os valores de homocisteína total sérica (HCts) ou plásmatica (HCtp) em gatos.

| Autores | n° amostra | Raça, sexo e idade | Método e amostra utilizada | M ± DP | Avaliação da influência da faixa etária, sexo e ECC nos valores de HCts ou HCtp |
|------------------------|---------------------------|--|----------------------------|-------------------------|--|
| Kabakci; Bulbul (2021) | 32 hípidos | Fêmeas (n=16) e Machos (n=16) Raça:Angora | AMOSTRA Plasma MA CLAE | 29,94 ± 3,2 μmol/l | <p>Foram avaliados o efeito da idade e sexo, apenas.</p> <p>Dois grupos distintos: Jovens, 5,8 ± 2,6 meses, Adulto: 76,6 ± 52,6 meses.</p> <p>Foi observado um aumento significativo nas concentrações de HCtp com a idade.</p> <p>Não apresentaram diferenças estatisticamente significativas de acordo com o sexo.</p> |
| Özkan et al. (2017) | 60 hípidos Fêmeas (n=30); | Van Turcos | AMOSTRA Soro MA | Média: 7,1 ± 2,2 μmol/l | Não foram observadas diferenças estatísticas |

| | | | | | |
|----------------------------|--|---|-----------------------------|--|---|
| | Machos (n=30) | | ELISA | | entre sexo e idade. |
| | | | | | Faixas etárias: 6 a 12 meses; 12 a 24 meses, mais de 24 meses. |
| Drut et al. (2020) | 84 hígidos | SRD pelo curto e longo (n=87); Birmaneses (n=2); Persa (n=1); Exótico pelo curto (n=1) | AMOSTR A Plasma MA CLAE/E M | Mediana: 13,9 $\mu\text{mol/l}$ (variando de 10,5 a 20,5 $\mu\text{mol/l}$) IR: 6,2 a 52,3 $\mu\text{mol/l}$ | Não foi avaliado o efeito ECC, apenas pacientes ECC 5 (escala de 1 à 5) foram excluídos. ECC médio 4,5 (variando de 4, 1 a 5,2). Foram avaliadas a idade e sexo, não sendo observado diferenças estatísticas. Faixas etárias: filhote (1 a 2 anos); adulto jovem (3 a 6 anos); adulto maduro (7 a 10 anos) e sênior (> 11 anos). |
| McMichael et al. (2020) | 29 hígidos 27 CM 28 CM e TEA | Hígidos Fêmeas (n=17) e Machos (n=12) Idade: 3,9 \pm 2,4 anos Peso: 5,1 \pm | AMOSTR A Plasma MA CLAE | Hígidos: Média: 7,6 $\mu\text{mol/l}$ (variando de 6,0 a 8,2 | Foi avaliada a variável idade, não sendo observada diferenças estatísticas em diferentes idades. O sexo e ECC não foram avaliados |

| | | | | | | |
|--------------------------|--|------------------------------------|-----------------------------------|--|--|--|
| | | 0,8 kg | | | $\mu\text{mol/l}$ | |
| | | Raça: SRD pelo curto e longo | | | Não foram observadas diferenças nos valores HCtp entre os gatos do grupo controle em comparação com aqueles com CM isolada e os que apresentava m tanto CM quanto TEA | |
| Üren et al. (2009) | 8 hígidos 13 DRC | Nes | AMOSTR A Soro MA CLAE | Hígidos: Média: 13,03 \pm 2,81 $\mu\text{mol/l}$ DRC Média: 41,68 \pm 9,97 $\mu\text{mol/l}$ Observou- se aumento da HCts na DRC, não foi observada correlação entre HCts e creatinina | Não foram avaliados | |
| Giraldi et al. (2019) | 17 hígidos em risco de DRC | Raça: SRD pelo curto | AMOSTR A Soro MA CE | Hígidos: Mediana: 8,46 $\mu\text{mol/l}$ (variando de 3,37 a 40,24 $\mu\text{mol/l}$) | Não foram avaliados. | |

DRC
2,12 $\mu\text{mol/l}$
(variando
de 4,94 a
23,42
 $\mu\text{mol/l}$).

Diferença
estatística
apartir do
estágio II da
DRC

M: média; MA: método de análise; Nes: não especificadas; CM: cardiomiopatia hipertrófica; CLAE: cromatografia de alta eficiência; n°: número amostral; EM: espectometria de massa; DP: desvio padrão; CE: colorimérico enzimático; IR: intervalo de referência; ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; TEA: tromboembolismo arterial; DRC: doente renal crônico.

3.2. Influência da obesidade sobre os valores de homocisteína

Na medicina, os valores de HC em pacientes obesos são significativamente mais elevados em comparação com pacientes ‘magros’ (Wang et al., 2021). Em estudo conduzido por Fu e colaboradores (2018) foi inferida uma correlação da HHC com a síndrome metabólica (SM), diagnosticada em 14,5% da população, tendo a HCts sido correlacionada diretamente com a circunferência de cintura e níveis de triglicerídeos aumentados.

O impacto da obesidade sobre a HC também foi avaliado em pesquisa pioneira conduzida por Lee e colaboradores (2012) na medicina veterinária, utilizando o inumensaio quimioluminescente direto para avaliar os valores de HCts, perfil lipídico e glicemia de 100 cães de pequeno porte. Desses, 53 apresentavam ECC adequado, 19 tiveram ECC reduzido e 28 exibiram ECC aumentado (obesos), sem a presença de outras doenças sistêmicas.

Os resultados indicaram que os cães obesos apresentavam uma concentração significativamente elevada de HCts. Além disso, houve uma associação positiva entre os níveis de HCts e os valores de lipoproteína de alta densidade (HDL), triglicerídeos, glucagon e frutossamina. Frente a isto, os autores sugeriram que níveis elevados de HCts desempenham papel biológico na relação entre obesidade e doenças cardiovasculares em cães obesos.

Tvarijonaviciute e colaboradores (2013) também avaliaram os valores de HCtp, cistatina C e clusterina, em 37 cães obesos e após a perda de peso. Os três marcadores apresentaram redução após a perda de peso, sugerindo possíveis alterações subclínicas na função renal em cães obesos. Os valores de HCtp observados foram de 10,8 $\mu\text{mol/l}$ (5,7-23,2 $\mu\text{mol/l}$) antes da perda de peso e 7,8 $\mu\text{mol/l}$ (1,1-18,1 $\mu\text{mol/l}$) após a perda de peso ($p < 0,001$).

3.3. Influência da doença renal sobre a concentração da homocisteína

A metabolização da HC acontece em todas células corporais, mas em maior quantidade pelas células hepáticas e renais, sendo realizada pelos rins, principalmente a via de transulfatação. Acredita-se que as vias metabólicas renais sejam reguladas pela quantidade de HC filtrada pelos glomérulos, objetivando-se manter uma concentração constante de HC plasmática (House et al., 1998).

Em casos de HHC, como os rins apresentam uma capacidade de reserva substancial, sua

remoção plasmática arterial pode chegar a 60%, ou seja, a HCs pode aumentar até quatro vezes, sem que haja um incremento na excreção urinária (House et al., 1998). Essa baixa excreção urinária de HC, mesmo em casos de HHC, torna evidente que a HC reabsorvida pelos rins é metabolizada. Dessa forma, a insuficiência renal aguda ou crônica pode levar a quadros de HHC graves. Isso faz da HC um analito promissor para o diagnóstico precoce e o estabelecimento de prognóstico nos quadros de insuficiência renal (Shih et al., 2022; Zhang et al., 2022).

Rossi e colaboradores (2013) também avaliaram a HCts e a endotelina em 92 cães portadores de DRC, com e sem hipertensão, proteinúria e inflamação e em 12 cães saudáveis, utilizando o kit comercial baseado no método CE (Demed intec Diagnostics). A HCts foi significativamente maior nos cães DRC estágios II, III, IV comparado ao controle (Rossi et al., 2013).

Em pesquisa realizada por Cohen e colaboradores (2019), a correlação entre o aumento HCtp e a DRC foi novamente constatada, porém em humanos. No referido trabalho a HCtp se mostrou elevada em todos os estágios da DRC, com uma progressão dos seus valores do estágio I ao IV, apesar de haver maior discrepância entre os estágios IIIa e IIIb. Além disso, foi observado em pessoas com HCtp > 15 $\mu\text{mol/L}$ uma maior propensão a proteinúria e a redução da TFG.

Shih e colaboradores (2022) demonstraram que a HCts alta em humanos se comporta também como um biomarcador independente para o risco de DRC, tendo sido definido um ponto de corte de 15,15 $\mu\text{mol/l}$, com 80% de especificidade e 47% de sensibilidade. Além disso, eles observaram uma correlação direta entre os valores de creatinina e HCts.

Diante disso, nas últimas décadas, a atenção dos pesquisadores também se voltou para a associação da LRA com a elevação da HC. Em um estudo piloto, Sun e colaboradores (2012) delineararam o perfil metabolômico sérico de 17 pacientes humanos com LRA inicial, comparando-o com indivíduo da mesma idade e com a função renal normal, com o intuito de encontrar novos marcadores clínicos que pudessem contribuir para a detecção precoce da LRA e também na definição do prognóstico. Entre as diferenças dos perfis metabolômicos de indivíduos em LRA e saudáveis, destacaram-se os compostos relacionados à via do estresse oxidativo, como a dimetilarginina, o piroglutamato e a própria HCts, os quais apresentaram aumento de 3,5x, 91x e 8,5x, respectivamente.

Na medicina veterinária, o primeiro estudo a explorar a HCts como biomarcador de

hipertensão arterial sistêmica, proteinúria e inflamação associadas à DRC em cães foi realizado por Rossi e colaboradores (2013). Neste estudo, observou-se uma correlação entre a HCts e a creatinina sérica, bem como um aumento progressivo da HCts com o aumento da gravidade da DRC. É importante ressaltar que HCts foi significativamente maior apenas nos cães DRC estágios II, III, IV em comparado ao controle (Rossi et al., 2013).

Além disso, assim como em humanos, a HCts também diferiu entre animais proteinúricos e não proteinúricos (Cohen et al., 2019). Entretanto, ao contrário do que ocorre em humanos, não se observou aumento da HCts em pacientes com hipertensão (Stehouwer e van Guldener, 2003).

Adicionalmente, Giraldi e colaboradores (2019) avaliaram a HCts em gatos saudáveis em risco de DRC e em pacientes portadores de DRC em diferentes estágios. A HCts foi avaliada pelo método CE (Diazyme Europe). Os valores médios e medianos obtidos de HCts para gatos saudáveis foram de 8,46 $\mu\text{mol/l}$ (3,37 a 40,24 $\mu\text{mol/l}$), sendo estatisticamente inferiores aos do grupo com DRC, que apresentou valores médios de 12,12 $\mu\text{mol/l}$ (4,94 a 23,42 $\mu\text{mol/L}$). Houve uma concentração de HCts significativamente maior nos estágio de II ao IV da DRC.

Além disso, a elevação da HCts não foi correlacionada a proteinúria ou hipertensão. Portanto, até que novos estudos sejam realizados, a creatinina sérica continua sendo o analito mais confiável para o estadiamento da DRC nesta espécie (Giraldi et al., 2019)

3.4. Influência da periodontite crônica nos valores de homocisteína

Tem sido demonstrada uma correlação entre a periodontite crônica (PC) e a elevação da HCt sérica/plasmática em seres humanos. No entanto, até o momento desta revisão, não foram identificados estudos semelhantes na medicina veterinária. Penmetsa e colaboradores (2020) avaliaram a HCtp em três grupos: o Grupo 1, composto por 30 pacientes saudáveis, sem PC e os Grupos 2 e 3 compostos, respectivamente, por 30 pacientes com PC generalizada inicial e 30 pacientes que apresentaram a mesma alteração, porém três meses após o tratamento não cirurgico.

Os valores de HCtp foram menores no Grupo 1, em comparado ao 2 e 3. Apesar da redução dos valores de HCtp após o tratamento, os valores encontrados no Grupo 3, não foram semelhantes estatisticamente ao Grupo 1. Os valores de média e desvio padrão para HCtp

dos grupos 1, 2 e 3 foram: $14,04 \pm 1,98 \mu\text{mol/l}$, $26,67 \pm 8,77 \mu\text{mol/l}$, $19,87 \pm 6,44 \mu\text{mol/l}$, respectivamente.

De maneira semelhante, Langote e colaboradores (2023) investigaram os valores de HC_{tp} com o mesmo delineamento experimental de Penmetsa e colaboradores (2020), porém com 18 pacientes por grupo e avaliando o Grupo 3 seis meses após o tratamento. Os valores de HC_{tp} nos Grupos 1, 2 e 3 foram: $6,72 \pm 1,27 \mu\text{mol/l}$, $17,0 \pm 1,41 \mu\text{mol/l}$, $11,28 \pm 2,22 \mu\text{mol/l}$, respectivamente.

Botelho e colaboradores (2021) também avaliaram a associação entre os valores de HC_{ts} e PAS em 4.021 pacientes, sendo 3287 sem PC e 734 com PC. Eles correlacionaram a área da superfície inflamada (ASI) e a área de exposição peridontal (AEP) a esses parâmetros, observando correlações significativas entre os valores de HC_{ts} e PAS. Os valores de HC_{ts} para os pacientes saudáveis e portadores de PC, foram: $8,2 \pm 3,9 \mu\text{mol/l}$ e $9,8 \pm 4,0 \mu\text{mol/l}$, respectivamente. Esses achados sugerem que a PC generalizada inicial possa estar correlacionada com a presença de doença renal e cardiovascular, em humanos, também pelo HHC.

Apesar do papel promissor da homocisteína (HC) na correlação entre periodontite crônica (PC) e doenças renais e cardiovasculares, é importante ressaltar que os principais mecanismos fisiopatológicos estão bem elucidados. Estes incluem inflamação sistêmica, disfunção endotelial e aumento do estresse oxidativo, fatores que podem levar à doença renal crônica (DRC) através da PC e/ou predispor à PC na DRC, influenciando a microbiota oral. Além disso, outras alterações induzidas pela DRC, como acidose, ambiente urêmico e fluxo salivar alterado, também podem ser relevantes para a ocorrência da PC (Baciu et al., 2023).

No que diz respeito às doenças cardiovasculares, Leng e colaboradores (2023) observaram uma prevalência de 7,2% em humanos com PC, com correlação significativa entre essas condições. Os principais fatores envolvidos na gênese da cardiopatia incluem o aumento de mediadores inflamatórios.

3.5 Métodos analíticos para determinação de HC_{ts}

No caminho a percorrer para que a HC seja consagrada como um marcador confiável de parâmetros de saúde, o primeiro passo envolve encontrar metodologias adequadas para a sua medição. Apesar da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ser a técnica padrão

ouro para a análise da HC, a sua pesquisa na rotina pode ser comprometida, pois é pouco prática, cara e requer longo tempo de execução e pessoal especializado (Alam et al., 2019; Barbosa et al., 2014). Sendo assim, torna-se necessário o estudo e a compreensão de outras técnicas para ampliar a análise da HC sérica na rotina laboratorial e clínica (Alam et al., 2019; Gascón et al., 2010; Rossi et al., 2008).

Dentre elas, a quimioluminescência (QL) é uma técnica analítica que permite a detecção e a quantificação de substâncias em uma amostra. Neste método, ocorre uma reação química específica, no qual a energia é liberada na forma de luz visível ou ultravioleta, por meio de um fenômeno denominado quimioluminescência (Ciarlini et al., 2002).

Todas etapas do processo acontecem de maneira automática no aparelho, após a inserção da unidade teste e dos reagentes quimioluminescentes específicos, ambos presentes no kit comercial, e posteriormente da amostra. O primeiro resultado quimioluminescente é obtido aproximadamente 40 minutos após o início do teste. A intensidade da luz é diretamente proporcional à concentração da substância analisada (Ciarlini et al., 2002). Apesar da facilidade dessa técnica uma pesquisa realizada por Paprotny e colaboradores (2020) em 101 amostras de plasma/soro de humanos relatou que a CLAE fornece valores mais baixos da HC devido à sua maior seletividade, o que inviabiliza a substituição dessa técnica pela QL.

Além disso, há a cromatografia de troca iônica (CRTI) caracterizada por ser uma técnica cromatográfica que separa moléculas de acordo com suas cargas elétricas e interações com íons em uma resina de troca iônica (fase estacionária) (Andersson et al., 1989; Miranda, 2022). Esta técnica é menos utilizada para a análise da HC, por ser menos sensível que a CLAE para detecção de concentrações muito baixas de HC, além disso a preparação da amostra pode ser mais complexa (Andersson et al., 1989).

Entretanto, este método pode ser empregado no diagnóstico e acompanhamento de indivíduos com homocistinúria clássica, onde a HC não ligada a proteínas está presente na urina. Uma das desvantagens dessa abordagem é que a concentração da HC no sangue precisa ser consideravelmente elevada, muito além da faixa de referência para que seja detectável na urina (Alam et al., 2019).

Outro método é a espectrometria de massa (EM), sendo uma técnica analítica versátil que

permite identificar e quantificar íons, que podem ser átomos ou moléculas, de acordo com sua massa (m) e carga elétrica (z), possibilitando a determinação da composição química de amostras (Paiva et al., 2008; Alam et al., 2019). A EM pode ser aplicada de forma autônoma ou em acoplamento com a CLAE. Quando utilizada em conjunto com a CLAE, a amostra é introduzida no EM por meio da coleta de substâncias eluídas da coluna de cromatografia.

Isso permite a separação de uma mistura complexa de componentes pelo cromatógrafo, e, em seguida, a análise individual do espectro de massa de cada componente (Paiva et al., 2008). O analisador de espectrômetro de massa quadruplo é comumente utilizado e em estudos com a HC (Alam et al., 2019). Assim como a CLAE, a EM também apresenta desafios, incluindo a necessidade de preparação cuidadosa da amostra, a complexidade dos equipamentos e a exigência de conhecimento especializado para a interpretação dos espectros (Paiva et al., 2008). Esta técnica permite a detecção da HC mesmo em concentrações muito baixas de maneira altamente seletiva, portanto pode se tornar o método de referência para a análise da HC (Paiva et al., 2008; Alam et al., 2019).

Por fim, há o método enzimático, uma técnica bioquímica que se baseia na utilização de enzimas específicas como catalisadores para promover a quebra controlada de moléculas complexas em unidades menores. No contexto da análise da HC, a principal enzima catalítica empregada é a cistationina β -sintetase (Young., 2000).

A validação do método enzimático na dosagem da HC sérica em cães foi realizada por Rossi e colaboradores em 2008. Neste estudo, a HC foi avaliada em uma variedade de condições clínicas, incluindo cães saudáveis, aqueles com doenças cardíacas, inflamações, distúrbios gastrointestinais, neoplasias, insuficiência renal, traumas e outras doenças diversas.

Os resultados indicaram que o método apresentou maior precisão em amostras com níveis de HC próximos ou acima do limite de referência. No entanto, em amostras com níveis baixos, que foram observados apenas em cães saudáveis, o método demonstrou maior imprecisão. É importante notar que essa imprecisão em níveis baixos de HC não deve impactar significativamente as decisões clínicas.

Além disso, o estudo destacou a preferência por amostras de soro em vez de plasma e

recomendou evitar o uso de amostras intensamente ictéricas. Devido à sua simplicidade em comparação com a CLAE e à disponibilidade de kits comerciais no Brasil, o laboratório de análises clínicas da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) utiliza a técnica do método enzimático associado à espectrofotometria para determinar a concentração de HC.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Comitê de ética em experimentação animal e anuência do HV/UFMG

O estudo experimental foi conduzido no período de junho de 2023 a janeiro de 2024 no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (HV-UFMG) em clínica veterinária particular BH-VET (BH-MG). Todos os procedimentos foram previamente aprovados pela Comissão de ética no Uso de animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo de 208/2023 (anexo 1). Os procedimentos só foram iniciados após a anuência do Hospital Veterinário (anexo 2)

4.2 Animais

Foram selecionados cães (*Canis lupus familiares*) e felinos domésticos (*Felis catus*), entre machos e fêmeas, castrados e não castrados, de diferentes idades e raças para o estudo. Os cães saudáveis foram provenientes de uma clínica veterinária particular de propriedade de um dos colaboradores do projeto (BH-VET). Os cães obesos e em LRA, foram provenientes do atendimento endócrino e da internação do HV-UFMG, respectivamente. Todos os tutores residiam no município de Belo Horizonte e região, e concordaram com as condições do estudo, tendo assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexos 3 e 4).

4.3 Grupos experimentais

Os animais selecionados foram divididos em quatro grupos de acordo com as seguintes classificações:

Grupo 1 (G1)- composto por 62 cães saudáveis, subdivididos da seguinte forma:

- a. Faixa etária: jovem; adulto jovem; adulto maduro; sênior.
- b. Escore de condição corporal (ECC): 4, 5 ou 6 (escala de 1 à 9).

- c. Sexo: macho ou fêmea.
- d. Periodontite crônica: ausente ou presente (discreta ou moderada).

A periodontite crônica foi classificada de acordo com os graus de acometimento do periodonto, em, sendo recomendado por Gioso (1993) e Gioso (2003).

- Ausente: ausência de alterações em cavidade oral
- Discreta: acúmulo de placa bacteriana, discreta gengivite e edema gengival.
- Moderada: gengivite, edema gengival e início de formação de bolsa periodontal
- Grave: perda óssea, mobilidade dentária e perda dentária, sendo a última um dos critérios de exclusão da pesquisa.

Grupo 2 (G2) - 23 gatos saudáveis, subdividido da seguinte forma:

- a. Faixa etária: jovem; adulto jovem; adulto maduro
- b. Sexo: macho ou fêmea

Grupo 3 (G3) - 24 cães com LRA, subdivididos pelo desfecho clínico

- a. Óbito
- b. Alta médica

Grupo 4 (G4)- 24 Cães obesos (ECC 7, 8 ou 9, escala de 1 à 9), sem doença endócrina de base.

4.4 Critérios para inclusão e exclusão

Os cães do G1 foram escolhidos com base em seu histórico, exames físicos e laboratoriais, todos com ausência de qualquer indicação de doença aparente. Todos os cães selecionados para o G1 apresentaram resultados negativos para exames de leishmaniose visceral canina, nos últimos 12 meses, e um ECC de 4, 5 ou 6 numa escala de 1 à 9 após exame físico. Os animais não testados para leishmaniose, os positivos ou aqueles que apresentavam quaisquer anormalidades nos exames físicos, hematológicos e bioquímicos foram excluídos do estudo.

Os gatos do G2 também foram escolhidos com base em seu histórico, exames físicos e

laboratoriais, todos com ausência de qualquer sinal de doença aparente. Todos os gatos selecionados foram testados negativos para o vírus da imunodeficiência felina (FIV) e para o vírus da leucemia felina (FELV) no dia da consulta. Além disso, foram submetidos a exames ecoDopplercardiográficos e eletrocardiográficos. Qualquer anormalidade nos exames físicos, cardiológicos, hematológicos, bioquímicos e/ou de imagem foi motivo de exclusão do estudo.

Os cães do G3 foram selecionados durante a internação no HV-UFMG com critérios de inclusão baseados em concentrações elevadas de creatinina e ureia devido à LRA isolada ou em combinação a DRC. Pacientes apenas com DRC não foram incluídos no Grupo G3.

Os cães do Grupo G4 foram selecionados durante consultas de endocrinologia no HV-UFMG, requerendo um ECC de 7, 8 ou 9 numa escala de 1 à 9. A seleção baseou-se em seus históricos médicos, exames físicos e laboratoriais, além de ultrassonografias abdominais, todos demonstrando a ausência de quaisquer indicações de doença, além da obesidade. A identificação de sinais de endocrinopatias ou outras condições patológicas se caracterizou como critério de exclusão do animal deste grupo.

4.5 Tempos do estudo e locais de realização

Todos os animais foram avaliados em um único momento, passando por avaliação clínica e laboratorial. Os gatos, além deste exames também foram submetidos a avaliação cardiológica. Todas as etapas da avaliação clínica e coleta de amostras dos animais dos grupos G2, G3 e G4 foram realizadas nas instalações do HV-UFMG. Apenas as etapas da avaliação clínica e coleta de sangue dos cães do Grupo G1 foram conduzidas nas instalações de uma clínica particular parceira (BH-VET).

4.6 Avaliação clínica

Todos os cães do estudo foram submetidos a anamnese e exame físico completo, incluindo inspeção das colorações das mucosas orais e oculares, avaliação da hidratação através do turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar (s), medição da frequência cardíaca (bpm) pela auscultação, da frequência respiratória (mov/min) pela auscultação pulmonar e movimentação do gradil costal, além de palpação abdominal, inspeção de linfonodos, aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e da temperatura retal por termômetro digital.

A PAS foi aferida pelo método não invasivo Doppler ultrassonográfico (Doppler Parks 811B) com seleção dos manguitos do tipo neonatal correspondentes de 30 a 40% da circunferência do membro torácico esquerdo. Os pacientes foram mantidos em decúbito lateral ou esternal, sentados ou em estação, conforme posição de conforto para o animal. O pulso foi localizado com o transdutor posicionado sobre a artéria palmar com auxílio de gel condutor e auscultado através de fone de ouvido conectado ao Doppler vascular

Além disso, foi realizada a classificação de cada cão pelo ECC utilizando um sistema desenvolvido na Néstle Purina Care Center, conforme demonstrado na figura 6.

CÃES

ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

O cão está no peso ideal?



MUITO MAGRO



1

- Costelas, coluna lombar, ossos pélvicos e todas as proeminências ósseas facilmente visíveis à distância.
- Não se nota gordura corporal.
- Perda evidente de massa muscular.



2

- Costelas, coluna lombar e ossos pélvicos facilmente visíveis.
- Sem gordura palpável.
- Algumas proeminências ósseas visíveis à distância.
- Perda mínima de massa muscular.



3

- Costelas facilmente palpáveis e podem ser visíveis sem gordura palpável.
- Apófise da coluna lombar visível, ossos pélvicos se tornam proeminentes.
- Cintura e reentrância abdominal evidentes.

IDEAL



4

- Costelas facilmente palpáveis com mínimo camada de gordura.
- Cintura facilmente notada quando vista por cima.
- Reentrância abdominal evidente.



5

- Costelas palpáveis sem camada de gordura em excesso.
- Quando vista por cima, a cintura pode ser observada atrás das costelas.
- Abdômen recolhido quando visto de lado.



6

- Costelas palpáveis com leve excesso de camada de gordura.
- Cintura evidente quando vista de cima mas não é proeminente.
- Reentrância abdominal aparente.

SOBREPESO

OBESO



7

- Costelas palpáveis mas com dificuldades, camada de gordura espessa.
- Depósitos de gordura na região lombar e base da cauda.
- Cintura ausente ou quase imperceptível.
- Reentrância abdominal pode estar ausente.



8

- Costelas não palpáveis sob espessa camada de gordura ou palpáveis apenas se uma pressão significativa é feita.
- Depósitos espessos de gordura na região lombar e base da cauda.
- Ausência de cintura e reentrância abdominal.
- Distensão abdominal evidente pode estar presente.



9

- Grandes depósitos de gordura no tórax, coluna vertebral e base da cauda.
- Ausência de cintura e reentrância abdominal.
- Depósitos de gordura no pescoço e membros.
- Distensão abdominal evidente.

Todos os gatos do estudo foram submetidos a anamnese e exame físico completo, incluindo inspeção das colorações das mucosas orais e oculares, avaliação da hidratação através do tempo turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar, medição da frequência cardíaca (bat/min) pela auscultação, da frequência respiratória (mov/min) pela auscultação pulmonar e movimentação do gradil costal, além de palpação abdominal,

inspeção de linfonodos, aferição da PAS por sistema ultra-sônico (Doppler Parks 811B) e esfigmomanômetro (Gamma G5) e da temperatura retal por termômetro digital.

Além disso, foram realizados exame eletrocardiográfico e ecoDopplercardiográfico, bem como testes rápidos para FIV e FELV. Os traçados eletrocardiográficos foram obtidos pelo método computadorizado a partir do aparelho InCardio® com o tempo de monitoramento de três minutos. As imagens ecocardiográficas foram obtidas por meio do equipamento Esaote® Mylab 40, com transdutor de varredura setorial eletrônica de 4,0 a 7,5 mHz e acompanhamento eletrocardiográfico simultâneo no monitor.

Os gatos analisados no estudo não foram classificados quanto ao ECC a semelhança dos cães, já que todos os gatos analisados, sem raça definida (SRD), foram considerados com ECC normal, machos com peso até 5,0 e -fêmeas com 4,5 kg (Hendri et al., 1996). Todos os cães de G1 e G4 e gatos de G2 foram divididos em faixas etárias conforme recomendado por Quimby et al. (2021) e demonstrado nas fig 7 e 8.

Figura 7. Classificação dos estágios de vida de cães, conforme recomendado pela *AAHA Canine Life Stage Guidelines*. Fonte: Creevy e colaboradores (2019).

| | |
|------------------|--|
| Estágios de Vida | |
| Filhote | Nascimento até cessar o crescimento (6-9 meses) |
| Adulto Jovem | Termina na maturação das atividades sociais, físicas e fisiológicas (3-4 anos) |
| Adulto Maduro | Até 75% da expectativa de vida. |
| Idosos | Últimos 25% da expectativa de vida (depende das patologias específicas) |

Figura 8. Estágios de vida de gatos conforme recomendado pelas *AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines* (Quimby et al., 2021).

| | |
|------------------|---|
| Estágios de Vida | |
| Filhote | Nascimento até 1 ano (12 meses) |
| Adulto Jovem | 1 a 6 anos |
| Adulto Maduro | 7 a 10 anos |
| Idosos | Maior que 10 anos, fim de vida variável |

4.7 Coletas de amostras para análises laboratoriais

As amostras de sangue foram obtidas de cada animal sob condições de jejum alimentar de 12 horas, estando todos os animais normohidratados. Todos os animais foram submetidos a um único tempo de coleta.

A coleta de sangue foi realizada por venopunção com seringas de 10 mL e agulha 25x7mm,

na jugular externa ou cefálica, após a devida antissepsia. A escolha do local de coleta ocorreu de acordo com o porte e grau de incômodo de cada animal. O sangue obtido foi distribuído e acondicionado da seguinte forma:

- 1,0 mL em microtubo com EDTA (10%) para realização do hemograma
- 9,0 e 1,0 ml em tubo contendo ativador de coágulo protegido da luz para separação do coágulo e obtenção de soro em cães e gatos, respectivamente.

As amostras sangue contendo EDTA e o soro aliquotado foram processadas no prazo máximo de 12 horas após a coleta, sendo todos os exames executados no Laboratório de Patologia Clínica e na estrutura do MULTILAB, ambos na Escola de Veterinária da UFMG. Apenas para a análise de HCTs, amostras de soro foram armazenadas por um período máximo de 6 (seis) meses, em temperatura de -20° C, afim de otimizar o uso dos kits.

As análises seguiram os protocolos adotados pelo Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG, que se encontram em conformidade com a diretrizes da ANVISA tanto para as análises quanto para os descartes dos produtos biológicos originados.

4.7.1 Hemograma

Para a realização do hemograma as contagens celulares foram realizadas em analisador hematológico automático de impedância - Incounter 3D (Diagno), segundo técnica de rotina do laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG. Para o eritrograma avaliou-se o número total de eritrócitos (He), hematócrito (Ht) e a hemoglobina (Hb), além do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a amplitude de distribuição eritrocitária (RDW).

Também avaliaram-se o número total de leucócitos e plaquetas por impedância. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de todas as amostras, fixando-se a lâmina com metanol, por 5 minutos, seguido da coloração tipo Romanowsky (Panotico-Newprov), para realização de hematoscopia e contagem diferencial de leucócitos, de acordo com o protocolo operacional padrão do laboratório. Todos os achados foram documentados em ficha própria de resultados e utilizados neste estudo para classificar os animais dos grupos experimentais.

4.7.2 Perfil Bioquímico

As amostras de sangue em tubo com ativador de coágulo foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga de bancada (Coleman[®]), para a obtenção do soro. Para realização das análises bioquímicas do soro foi utilizado o analisador bioquímico Catalyst One (IDEXX[®]) por meio de bioquímica seca (IDEXX Laboratories, 2016). A análise bioquímica de cada amostra de soro foi feita individualmente.

Utilizou-se o painel CHEM 17 para os parâmetros bioquímicos séricos e suas frações, sendo eles: glicose (GLU), creatinina sérica (CREA), nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), frações nitrogênio ureico/creatinina sanguínea (BUN/CREA), fósforo (PHOS), cálcio total (CA), proteínas totais (TP), albumina (ALB), globulina (GLOB), razão albumina/ globulina (ALB/GLOB), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamiltransferase (GGT), bilirrubinas totais (TBIL), colesterol (CHOL), amilase (AMYL) e lipase (LIPA). Os resultados interpretados e utilizados, em conjunto com os dados clínicos para classificar os animais nos grupos experimentais.

4.7.3 Dosagem de Homocisteína

A mensuração da HC foi realizada por meio do método enzimático (ME) validado para dosagem da HcT em cães por Rossi e colaboradores em 2008. A escolha desse método de mensuração se deu devido à sua simplicidade em comparação com a CLAE e à disponibilidade de kits comerciais no Brasil.

O kit empregado foi fornecido pela empresa Biotécnica (Biotecnologia Avançada) e é especificamente designado para HC, tendo o nome "Homocisteína-HCY/2021" (Ref.: 10.042.00). Este kit é destinado à realização de análises da homocisteína in vitro em amostras de soro e plasma.

O kit é composto por um frasco de 45 mL contendo uma solução denominada R1 (35 kU/L de lactato desidrogenase, 0,76 mmol/L de serina e 0,47 mmol/L); um frasco de 7 mL contendo uma solução denominada R2 (20 kU/L de cistationina b-sintetase e 10 kU/L cistationina b-liase; um calibrador, rastreável ao material de referência do National Institute of Standards and Technology, em volume de 1 mL contendo 28,9 mmol/L de HC, 100

mmol/L de cloreto de sódio, 20 g/L de albumina bovina sérica (BSA), 10% de sacarose e 0,03% de conservantes; e duas soluções controles apresentadas em diferentes frascos contendo 1 mL em cada, sendo a solução 1 (denominada controle 1) composta por aproximadamente 15 mmol/L de HC, 100 mmol/L de cloreto de sódio, 20 g/L de BSA, 10% de sacarose e 0,03% de conservantes, e a solução 2 (denominada controle 2) composta por aproximadamente 37 mmol/L de HC, 100 mmol/L de cloreto de sódio, 20 g/L de BSA, 10% de sacarose e 0,03% de conservantes.

Os reagentes são destinados ao diagnóstico in vitro de HC em amostras de soro e plasma (obtido em sangue anticoagulado em EDTA ou heparina) de seres humanos. O ensaio é espectrofotométrico enzimático, podendo ser realizado em metodologia manual ou automatizada, em comprimento de onda igual a 340 nanômetros. A concentração sérica ou plasmática da homocisteína é determinada pela reação bioquímica descrita a seguir.

Após transformação da homocisteína oxidada em homocisteína reduzida por reação de óxido-redução, a qual é intermediada com serina sob ação catalítica da cistationina β -sintase (CBS), forma-se L-cistationina. Esta, na presença da cistationina β -liase (CBL) é novamente convertida em homocisteína, havendo liberação de amônia e piruvato. O piruvato é convertido em lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH) e o NADH é oxidado a NAD⁺. A concentração de homocisteína na amostra é determinada pela velocidade de desaparecimento do NADH, que é espectrofotometricamente determinada.

A calibração e a validação do ensaio são realizados por meio dos reagentes fornecidos no kit. A corrida é considerada válida quando as leituras dos controles 1 e 2 apresentam resultados no intervalo de 11,8 - 17,6 mmol/L e 28,8 - 43,2 mmol/L, respectivamente.

Para assegurar a qualidade e a eficácia desse kit da Biotécnica, é crucial armazená-lo ao abrigo da luz e em temperaturas situadas na faixa de 2 a 8 °C, devendo ser mantido fora dessas condições apenas durante a execução dos testes. As amostras de plasma e soro que serão submetidas à análise, podem ser armazenadas por um período que varia de 4 semanas a 4 anos. Para atender a esses requisitos, as amostras devem ser conservadas a 8°C e -20°C, respectivamente.

4.8 Delineamento experimental e análise estatística

O cálculo do número amostral foi realizado por uma abordagem baseada na simulação de

Monte Carlo. A partir de dados de estudo anterior (Giraldi et al., 2019), foi possível verificar que os valores de concentração de HC apresentaram uma distribuição de probabilidade similar à distribuição gama. A distribuição gama apresenta uma relação positiva entre a média da variável e o seu desvio padrão, ou seja, quanto maior o valor da média, maior será o desvio-padrão. Esta relação entre média e desvio-padrão foi modelada a partir de dados de dois estudos, um para cães (Çayir & Kozat, 2016) e outro para gatos (McMichael et al., 2000).

Tendo essas informações como base, vários cenários foram simulados, obtendo-se amostras aleatórias de distribuições gama para dois grupos teóricos com uma diferença pré-especificada entre suas médias. Para cada diferença, foi mensurado o poder estatístico com diferentes tamanhos amostrais. O poder foi estimado a partir da proporção do número de vezes que o teste detectou uma diferença significativa dividido pelo número total de simulações ($n = 100$). Em cada simulação, aplicou-se um teste-t com o valor da concentração de Homocisteína. A probabilidade de se cometer o erro tipo I foi fixada em 5% ($\alpha = 0,05$), correspondendo a uma confiança de 95% e fixou-se um valor mínimo de 80% para o poder estatístico ser considerado aceitável.

Ao seguir apresentamos os tamanhos amostrais mínimos (número de animais) para se identificar uma diferença entre dois grupos com médias pré-especificadas e com um poder de 80% e uma significância de 5%. Sendo de 24 animais para cães com uma diferença entre médias de 3 $\mu\text{mol/l}$ e de 30 para gatos com uma diferença de 5 $\mu\text{mol/l}$.

A variável HC apresentou distribuição de probabilidade similar à normal, portanto, foi possível utilizar o teste ANOVA, seguido do teste de comparações múltiplas de Sidak, calculando-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo. Para avaliar a associação entre duas variáveis quantitativas foi calculada a correlação paramétrica de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

Para a estimativa dos valores de referência, três medidas foram calculadas: a tendência central e os limites inferior e superior. Inicialmente, calculou-se a média e o desvio padrão e multiplicou-se o desvio padrão por 1,96 (quantil de 97,5% da distribuição normal padrão) encontrando a margem de confiança. Os limites inferior e superior do intervalo de 95% de confiança foram calculados subtraindo-se e somando-se, respectivamente, a margem de

confiança à média.

O IR foi construído, conforme sugerido por Scott (2008), geralmente segue-se um processo estatístico que inclui a coleta de dados de uma população saudável e a definição dos limites inferior e superior com base na distribuição estatística desses dados. Recomenda-se que sejam coletadas amostras de 60 a 120 indivíduos, sendo que um mínimo de 40 indivíduos pode ser suficiente para alguns métodos de estabelecimento de IR. É crucial que essas amostras sejam representativas, abrangendo diferentes sexos, raças e faixas etárias, o que é fundamental para a precisão do IR

Scott (2008) enfatiza que, além do número mínimo de indivíduos, os critérios de inclusão e exclusão, a qualidade das amostras, a precisão da análise e o controle de qualidade laboratorial são determinantes críticos para a qualidade dos resultados. Portanto, a seleção cuidadosa da população de referência e a execução rigorosa dos procedimentos laboratoriais são essenciais para garantir a confiabilidade e a validade do intervalo de referência estabelecido.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos grupos experimentais e estabelecimento de Intervalo de referência (IR) para HCTs de cães

Para compor o Grupo G1, foram inicialmente selecionados 75 cães. No entanto, somente 62 tiveram sua saúde confirmada. As razões para a exclusão dos 13 cães foram: testes positivo para leishmaniose visceral canina (n=2), diagnóstico de neoplasias mamárias (n=2), periodontite crônica intensa (n=2), hipertensão arterial sistêmica (n=1), trombocitopenia sem causa definida (n=2), aumento da atividade da fosfatase alcalina (FA) (n=1), hiperfosfatemia (n=2) e hiperglicemia, possivelmente de causa diabética (n=1). Além disso, três cães foram excluídos devido a um escore de condição corporal (ECC) maior que 6 dentro da escala de 1 à 9 (Mawby et al., 2004).

Dos 62 cães estudados no G1, 45 eram machos e 17 eram fêmeas, com uma média de idade de $5,64 \pm 4,05$ anos (mínimo de 0,66 anos e máximo de 15 anos), peso médio de $13,73 \pm 10,193$ kg (mínimo de 2 kg e máximo de 39,8 kg) e média do ECC de $4,552 \pm 0,680$ (mínimo de 4 e máximo de 6). A frequência relativa das raças de cães no G1 e os valores gerais de HCTs estão representados nas figuras 9 e 10, respectivamente.

Figura 9. Frequência relativa das raças de cães amostrados no experimento, composto por 62 cães saudáveis, para estabelecimento do intervalo de referência (IR) para homocisteína.

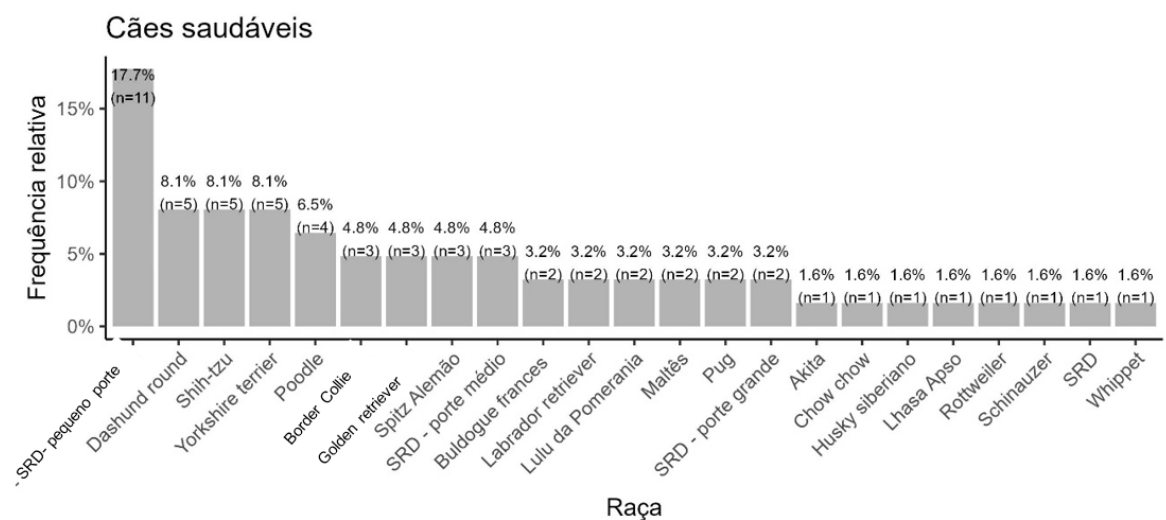


Figura 10. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de cães clinicamente saudáveis de raças, sexo e idades variadas (n=62).

| | Mé- di- a | DP | mín- e- má- x | Intervalo de referência |
|--|--------------------------|-----------|----------------------------------|--|
| HCts ($\mu\text{mol/l}$) | 15,72 2 | 5,27 5 | 6,66 31,9 4 | L.inf. 5,38 L.sup. 26, 06 |

DP: desvio padrão; mínimo; máx: máximo; L. Inf.: limite inferior; L. sup.: limite superior.

Todos os pacientes do G1 apresentaram valores dos analitos do hemograma e do perfil bioquímico dentro do IR para a espécie. Para a análise da homocisteína total sérica (HCts) em todos os grupos, foram selecionadas amostras de soro. A amostra de soro foi preferida em detrimento ao plasma, conforme recomendado por Rossi e colaboradores (2008), devido à maior estabilidade da HCt, menor interferência de anticoagulantes e procedimentos mais simplificados de coleta e processamento das amostras.

Para a análise laboratorial da homocisteína total (HCt), escolheu-se o CE devido à sua simplicidade de execução e menor custo em comparação com a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como pelo seu bom desempenho analítico em diferentes valores de HCt. Segundo Rossi e colaboradores (2008), o CE apresentou maior precisão em amostras com níveis de HC próximos ou acima do limite de referência. No entanto, em amostras com níveis baixos, que foram observados apenas em cães saudáveis, o método demonstrou maior imprecisão. É importante notar que essa imprecisão em níveis baixos de HC não deve impactar significativamente as decisões clínicas.

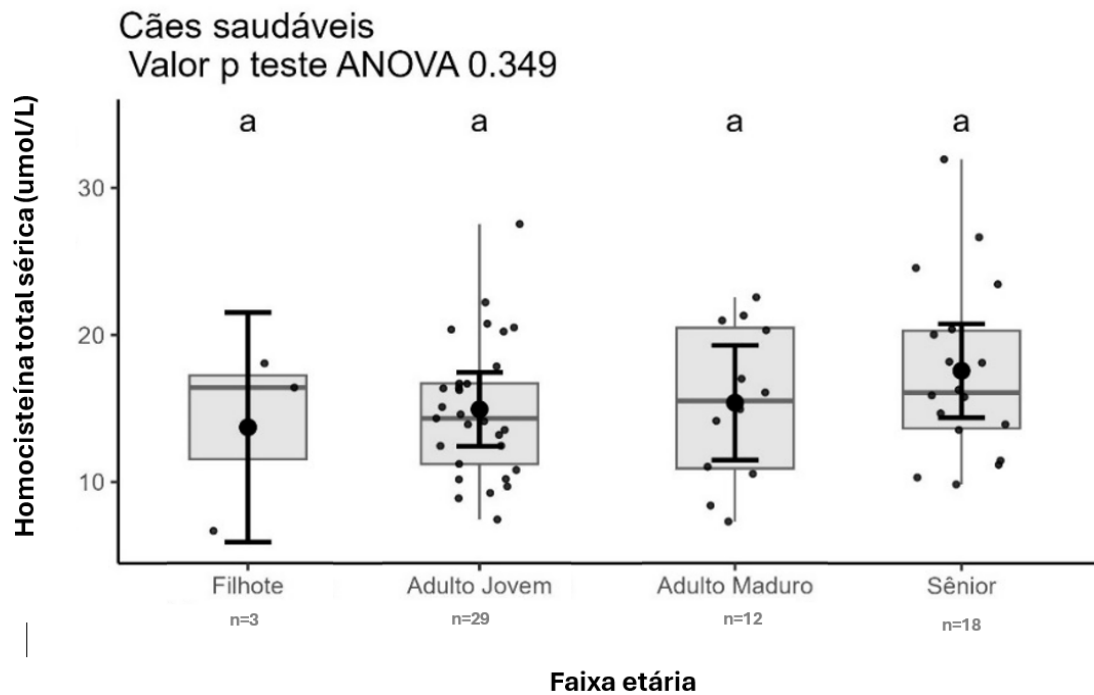
Diversas raças foram estudadas no presente trabalho, incluindo 1 (um) cão Galgo (Whipped) e 3 (três) Border Collies. A literatura sugere que cães Galgos tenham um defeito primário na conversão de HC à metionina, com geração prejudicada de vB9, esgotamento secundário de vB12 e, como consequência, HHC (Johnson et al., 2023). No entanto, o referido paciente apresentou o valor de HCts dentro do intervalo de referência estabelecido no presente estudo, sendo o seu valor de HCts de 20,75 $\mu\text{mol/l}$ (IR: 5,38-26,06 $\mu\text{mol/l}$)

Apesar da literatura demonstrar uma possível deficiência hereditária de vB12 e mecanismo para HHC em Border Collies (Lutz et al., 2012), os valores de HCts observados em dois, dos três animais amostrados (16,23; 20,97 μ mol/L) não ultrapassaram o limite superior de normalidade da população pesquisada (fig. 10). Um dos cães da raça Border Collie apresentou HCts de 27,52 μ mol/l, mas que esteve abaixo do maior valor observado, que foi de 31,94 μ mol/L, em uma cadela da raça Chow-Chow de 7,5 anos de idade e ECC 4. Os mecanismos pelos quais a HCts desta cadela esteve acima dos valores dos demais animais avaliados, não puderam ser identificados, já que não se trata de uma raça predisposta à HHC, tampouco estava acima do peso.

Ainda em relação ao G1, avaliou-se a influência da faixa etária, condição corporal (ECC), sexo e presença de periodontite crônica (PC). Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de homocisteína total (HCt) entre as diferentes faixas etárias de cães saudáveis, similar aos resultados encontrados por Çayir e Kozat (2016) (figura 4).

No entanto, apesar de Çayir e Kozat (2016) terem avaliado pioneiramente a influência da idade nos valores de HCt, seu delineamento de pesquisa diferiu do presente estudo ao dividir os 40 cães hípidos estudados em apenas três grupos: menos de 1 ano (n=16), entre 1 e 2 anos(n=10), e entre 3 e 6 anos (n=14). A figura 11 demonstra a distribuição dos valores de HCts entre as faixas etárias de G1.

Figura 11. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 62 cães saudáveis, divididos em quatro faixas etárias (estágios de vida). Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.

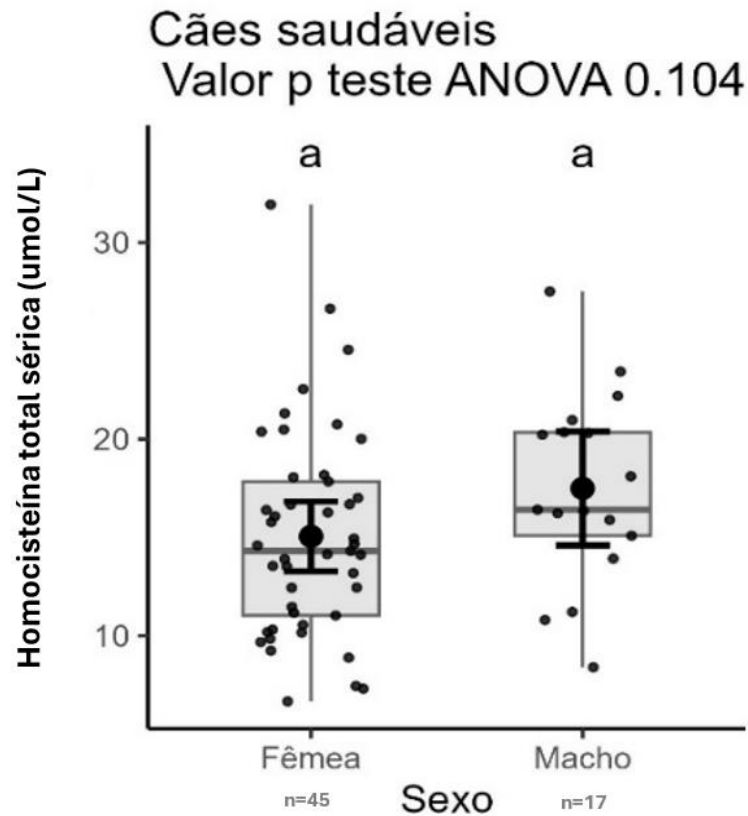


É importante ressaltar que a presente pesquisa avaliou, de maneira pioneira a influência da idade sobre os valores de HCts dividindo a população em faixas que correspondem aos estágios de vida dos cães, conforme recomendado pelo *AAHA Canine Life Stage Guidelines* (Creevy et al., 2019). Este cuidado no delineamento da pesquisa é importante, pois pode melhorar a percepção das alterações oriundas da idade, bem como contribuir para a adoção de cuidados específicos para cada estágio de vida, tornando os resultados mais confiáveis. Desta forma é possível afirmar que a idade não é um determinante fisiológico que caracteriza oscilações nos valores de HCts em cães.

Quanto ao sexo o G1 foi dividido entre machos (n=17) e fêmeas (n=45) e não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de HCts, apesar de ter sido observada uma tendência estatística de aumento da HCts em machos. Conforme demonstrado na figura 12.

Os resultados da presente pesquisa corroboram com as informações obtidas por Çayir e Kozat (2016) que, ao analisarem a HCtp em 40 cães (20 machos e 20 fêmeas), observaram valores de HCtp maiores em cães machos, embora sem diferença estatística.

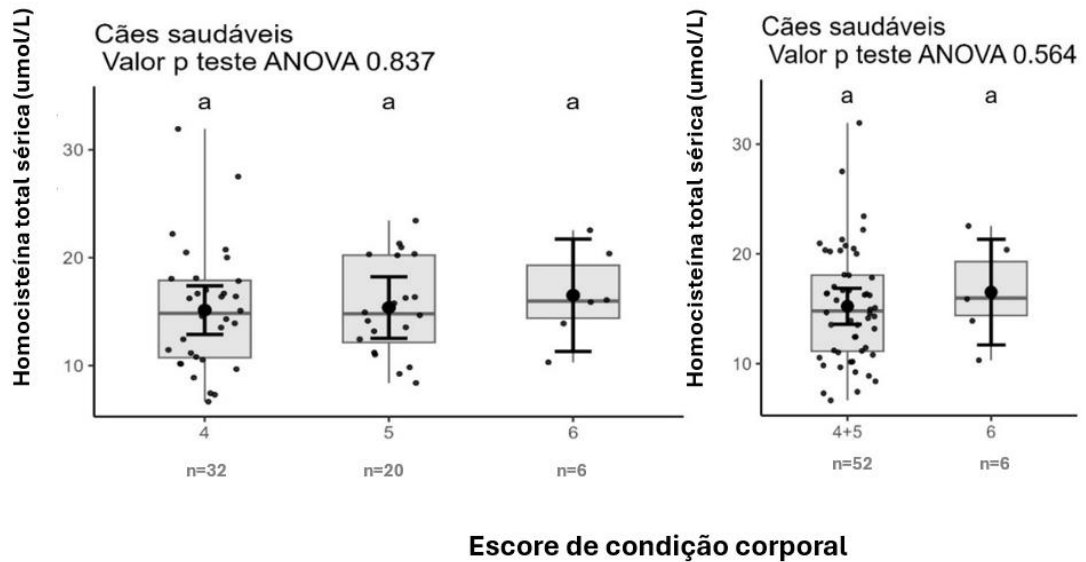
Figura 12. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 62 cães saudáveis divididos entre fêmeas (n=45) e machos (n=17). Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



Quanto ao ECC, 58 cães foram classificados quanto ao ECC, sendo 32 cães com ECC-4 (normal), 20 cães em ECC-5 (normal), 6 ECC-6 (sobrepeso). Não foram observadas diferenças estatísticas para a HCts entre os cães com diferentes ECC, conforme demonstrado na figura 13.

Como animais com ECC-6 são considerados metabolicamente normais (Lee et al., 2012), esta diferença não era mesmo esperada. No entanto, a tendência de aumento corrobora para a suspeita de que a HHC possa ser causada pela obesidade primária, não associada a doença endócrina, conforme demonstrado por Lee e colaboradores (2012) e Tvarijonaviciute e colaboradores (2013).

Figura 13. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 58 cães saudáveis subdivididos dentre ECC diferentes. ECC4-5 normal; ECC 6- sobrepeso. Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.

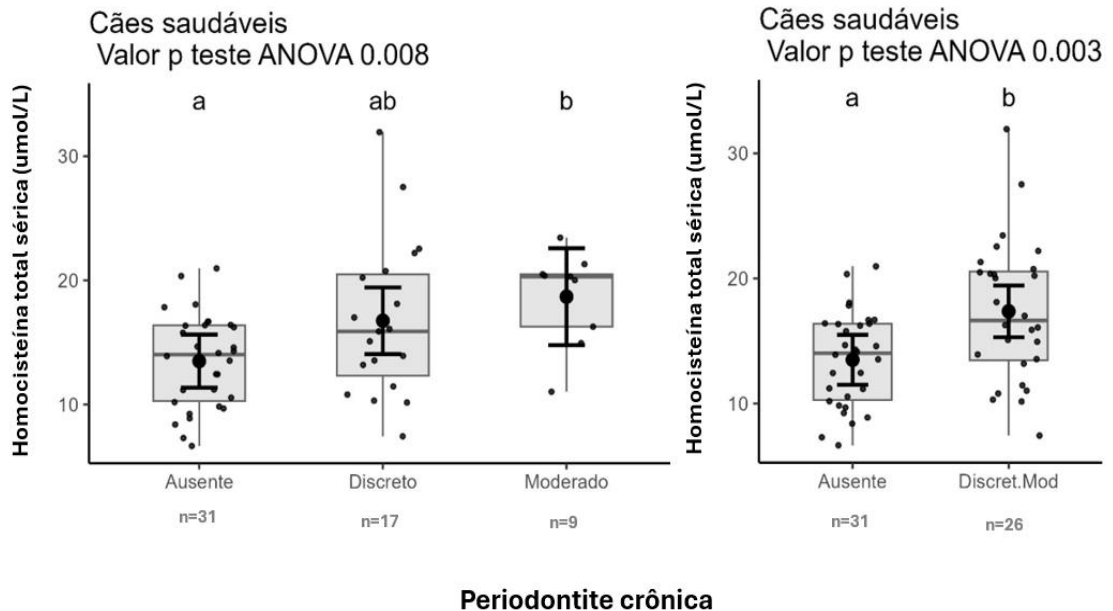


Até o momento, todos os 62 cães foram considerados saudáveis, independentemente da presença de PC discreta a moderada, à semelhança do que ocorre na prática clínica. Na rotina a PC discreta a moderada ainda é frequentemente negligenciada e/ou subestimada, apesar das complicações sistêmicas divulgadas, como inflamação e aumento do estresse oxidativo (Baciu et al., 2023).

Diante disso, decidiu-se avaliar a possível influência da PC, mesmo que discreta e moderada, nos valores HCts na população estudada, a fim de obter um IR mais confiável. Para isso, foram isolados os 26 cães portadores de PC da população inicial.

Dessa forma, notou-se diferença estatística na concentração de HCts, com valores significativamente maiores em animais que apresentaram PC moderada em relação aos que não tinham PC (figura 14). Até o presente momento, este é o primeiro estudo a correlacionar a HCts a PC em cães.

Figura 14. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 57 cães com ausência de periodontite crônica (PC) (n=31), presença PC discreta (n=17) e PC moderada (n=9). Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



O grupo sem PC foi composto por 22 fêmeas e 9 machos, com média e desvio padrão para idade de $3,76 \pm 4,33$ anos e peso de $12,44 \pm 8,42$ kg. Os valores de média \pm desvio padrão, valores mínimo e máximo para o HCts dos cães desse grupo, foram: $13,25 \mu\text{mol/l} \pm 3,78$; $6,08 \mu\text{mol/L}$ e $20,91 \mu\text{mol/l}$, respectivamente.

Embora os cães com PC discreta à moderada possam ser considerados saudáveis na prática clínica, os valores atribuídos ao grupo de animais sem PC são significativamente menores do que os obtidos ao agrupamento de cães geral, incluindo os portadores de PC, cuja média observada foi de $15,72 \pm 5,27 \mu\text{mol/l}$ (figura 15).

Por sua vez, o grupo com PC discreta ou moderada foi composto por 17 fêmeas e 9 machos, com média e desvio padrão para idade e peso de $6,80 \pm 3,75$ anos e $12,81 \pm 10,93$ kg. Os valores de média \pm desvio; mínimo e máximo para o HCts desse grupo, foram de: $17,98 \mu\text{mol/l} \pm 5,59$; mínimo $7,37 \mu\text{mol/l}$ e máximo $34,56 \mu\text{mol/l}$, respectivamente.

Figura 15. Valores de homocisteína total sérica (HCt) de 31 cães de raças, sexos e idades variadas, clinicamente saudáveis e sem periodontite crônica.

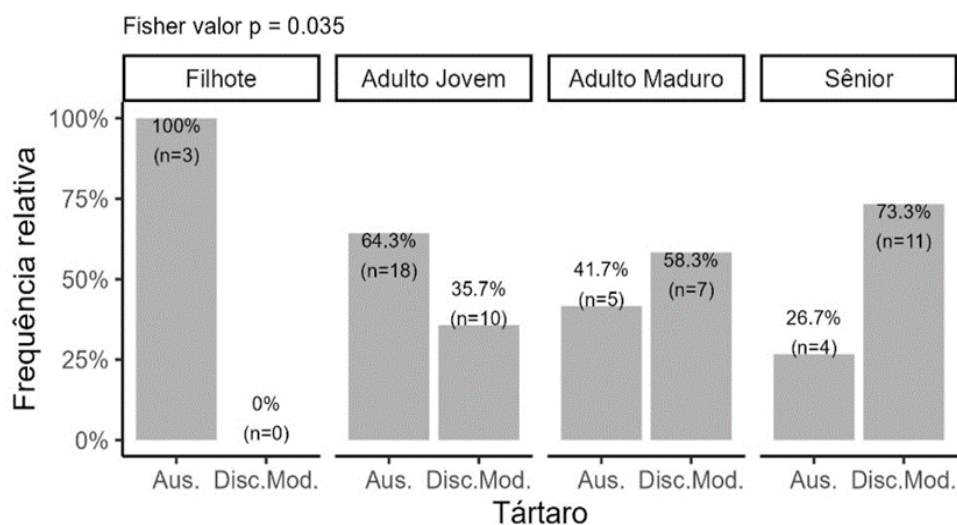
| | Grupo geral (n=62) | Grupo sem PC (n=31) |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| HCt ($\mu\text{mol/l}$) | 15,72\pm5,28a | 13,25\pm 3,78b |

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($p < 0,005$) ao teste de Fisher.

Este estudo de maneira inédita demonstra a correlação entre a PC e a elevação da HCts em cães, e corrobora com dados obtidos por Penmetsa e colaboradores (2020), em humanos. A diferença observada, alerta para que cães portadores de PC não sejam considerados saudáveis e sugere maiores investigações acerca da sua correlação com as doenças renais e cardiovasculares, essas que foram bem demonstradas por Baciú e colaboradores (2023) e Leng e colaboradores (2023), respectivamente.

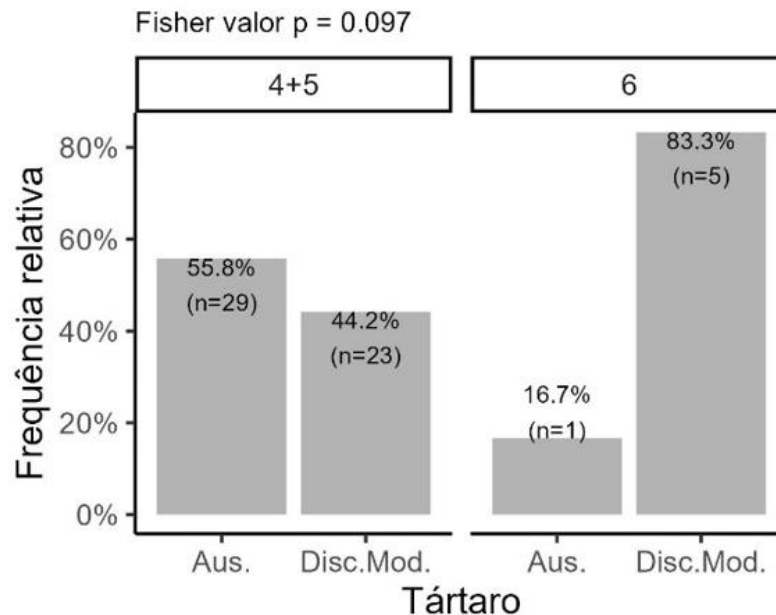
A avaliação da PC distribuída entre as diferentes faixas etárias demonstrou diferença entre os grupos (figura 16), aumentando a incidência proporcional à idade. Diferença também observada entre os diferentes ECC (figura 17), sendo mais frequente em cães mais velhos e em sobrepeso (ECC-6).

Figura 16. Distribuição da doença periodontal em 26 cães divididos por diferentes faixas etárias.



Observação: Aus = Ausente | Disc = Discreto | Mod = Moderado

Figura 17. Distribuição da doença periodontal em 26 cães divididos por escore de condição corporal (ECC) em uma escala de 1 à 9.



Observação: Aus = Ausente | Disc = Discreto | Mod = Moderado

A correlação positiva entre a prevalência de PC e o envelhecimento também foi relatada por Parreira e colaboradores (2018), onde observaram que 91% dos pacientes idosos apresentavam PC, sendo 36% discreta, 37% moderada e 18% grave. Por sua vez, a maior prevalência de PC em animais com ECC 6 (sobrepeso) pode ser explicada pelas alterações imunológicas desencadeadas pelo acúmulo de gordura nos tecidos, modificando o curso e a prevalência da PC (Machado et al., 2011).

Após a retirada dos cães portadores de PC do grupo de animais saudáveis o efeito faixa etária e sexo foram novamente avaliados, sendo agora observada uma tendência estatística de aumento dos valores de HCTs em cães machos. A tendência de aumento da HCTs no presente estudo, pode ser justificada parcialmente pelas alterações hormonais existentes entre machos e fêmeas, à semelhança do que foi discutido por Cohen et al. (2018) para vários analitos.

5.2 Caracterização dos grupos experimentais e estabelecimento de Intervalo de referência (IR) para HCts de gatos saudáveis

O G2 foi constituído por 23 gatos, 9 machos e 14 fêmeas, com média de idade $4,28 \pm 3,11$ anos (mín. de 0,58 anos e máx. de 10,2 anos), apresentando peso médio de $3,87 \pm 0,74$ (mín. de 2,4 kg e máx. de 5,0 kg). Todos os gatos selecionados apresentavam os analitos do hemograma e perfil bioquímico dentro do IR para a espécie. Todos os gatos participantes do estudo eram SRD, estavam dentro do peso recomendado para a espécie e não apresentavam PC. Os valores de HCts estão representados na fig. 18.

Figura 18. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos sem raça definida (SRD) saudáveis.

| n=23 | Média | DP | Mín e Máx | Intervalo de normalidade |
|--|--------------|-----------|--------------------------|-------------------------------------|
| HCts ($\mu\text{mol/L}$) | 26,22 | 7,69 | 15,89 45,58 | L.inf. 11,15 L.sup.41,30 |

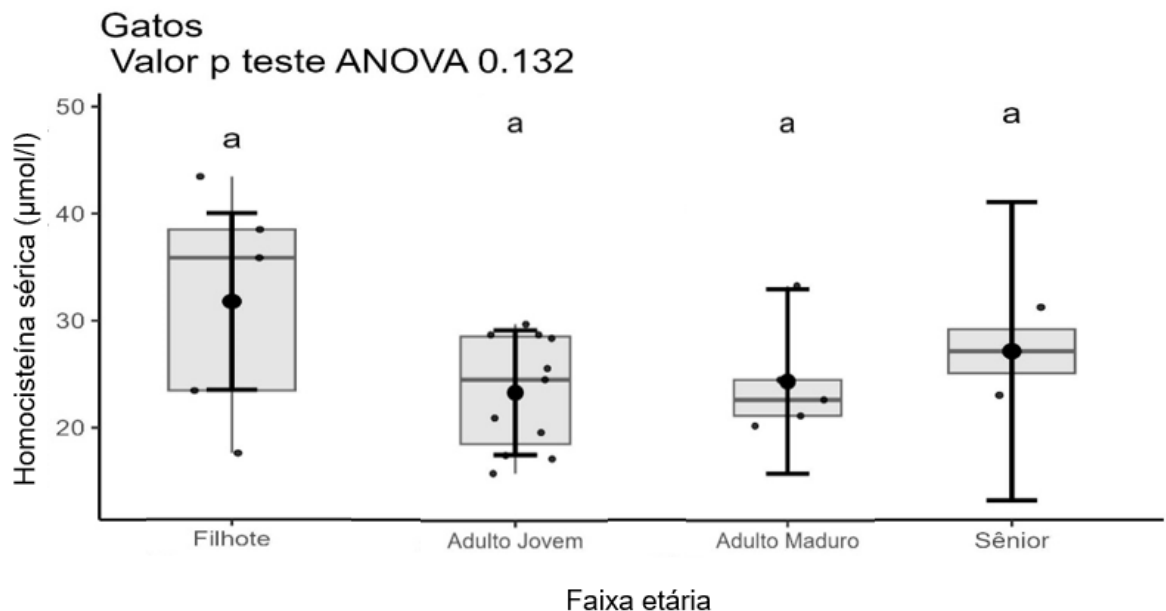
DP: desvio padrão; Mín: mínimo; Máx: máximo; L. Inf: limite inferior; L. sup: limite superior.

Avaliou-se a influência da faixa etária dentro da população de gatos estudados. Não foram encontradas diferenças significativas na concentração de HCts entre as faixas etárias, à semelhança das pesquisas realizadas por Özkan e colaboradores (2017), Drut et al. (2020) e McMichael et al. (2020) em felinos (figura 5).

Porém, refutam as informações obtidas por Kabakci e Bulbul (2021) que, ao dividirem 32 gatos em dois grupos de acordo com a faixa etária (jovens- $5,8 \pm 2,6$ meses; adultos- $76,6 \pm 52,6$ meses), observaram um aumento significativo nas concentrações de HCts com o envelhecimento. É importante reforçar que os pesquisadores Kabakci e Bulbul (2021) não avaliaram as faixas etárias, conforme recomendado por Quimby e colaboradores (2021), conforme realizado, de maneira pioneira por Drut e colaboradores (2020) e na presente pesquisa.

Este cuidado no delineamento da pesquisa é importante, pois pode melhorar a percepção das alterações fisiológicas e comportamentais, bem como contribuir para a adoção de cuidados específicos para cada estágio de vida. A determinação da HCTs em diferentes faixas etárias traz uma maior confiabilidade dos resultados apresentados, sendo possível afirmar que a idade não é um determinante fisiológico em gatos. As informações referentes a HCTs nas diferentes faixas etárias em gatos está demonstrado na figura 19.

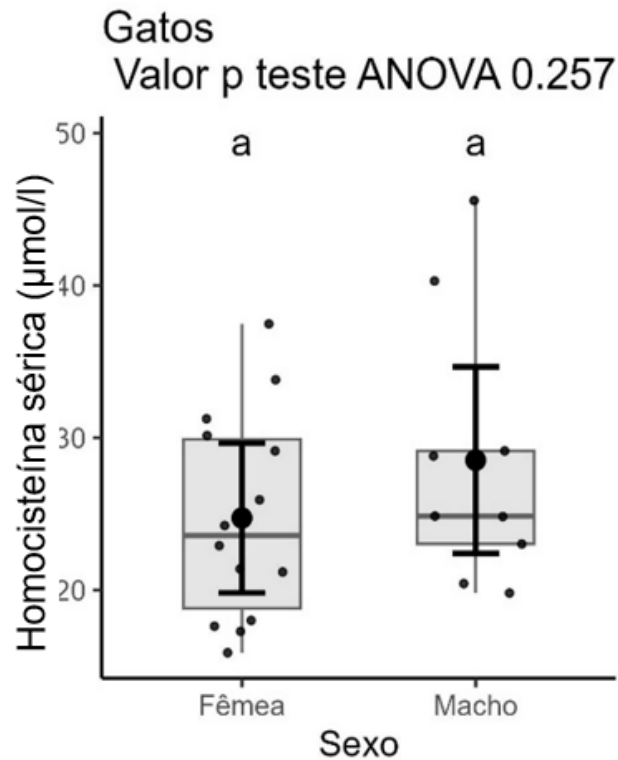
Figura 19. Valores de homocisteína total sérica (HCTs) de 23 gatos SDR saudáveis, divididos em quatro faixas etárias (estágios de vida). Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



Não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de HCTs para fêmeas e machos, apesar de ser observada uma tendência estatística de aumento da HCTs em machos, à semelhança do que ocorreu em cães, conforme demonstrado na figura 20.

Os resultados da presente pesquisa corroboram com informações obtidas por Özkan e colaboradores (2017) e Kabakci e Bulbul (2021) nos trabalhos demonstrados na figura 5. A tendência numérica de aumento da HCTs no presente estudo, pode ser justificada parcialmente pelas alterações hormonais existentes entre machos e fêmeas, à semelhança do que foi discutido por Cohen et al. (2018) para vários analitos

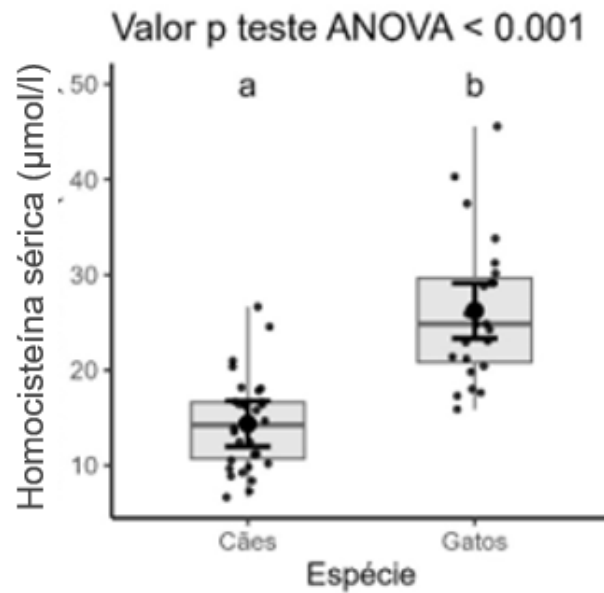
Figura 20. Valores de homocisteína total sérica (HCts) de 23 gatos saudáveis, sem raça definida (SRD) s divididos em fêmeas (n=14) e machos (n=9). Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



Após as análises de HCts de cães e gatos, foram observados valores em felinos estatisticamente maiores (figura 21) Esta diferenciação pode estar relacionada às peculiaridades nutricionais, sendo os gatos carnívoros estritos, ingerindo um maior teor de proteína em comparação aos cães.

A relação entre o teor de proteína da dieta e os valores de HCt já foi bem documentada e discutida por Drut et al. (2020). Dessa forma, intervalos de referência de cães não podem ser utilizados para gatos em nenhuma das faixas etárias ou sexo.

Figura 21. Comparação entre os valores de homocisteína total sérica (HCTs) de 23 gatos e 31 cães saudáveis, sem doença periodontal. Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



5.3 Valores de homocisteína total sérica de cães com lesão renal aguda (LRA)

O grupo de cães portadores de lesão renal aguda (LRA) (G3), foi composto por 24 cães internados no Hospital Veterinário da UFMG, sendo 7 (sete) também doentes renais crônicos (DRC). Os cães também considerados DRC apresentam discreta a moderada perda de definição cortico-medular e/ou a presença de cistos renais.

Foram observados valores de média e desvio padrão para idade e peso de $10,44 \pm 4,33$ anos e $16,56 \pm 15,09$ kg. Os valores de média e desvio padrão para HCTs dos 24 animais portadores de LRA, bem como a sua comparação com os valores de cães saudáveis sem doença periodontal, estão apresentados na figura 22. As causas de LRA nos cães que compuseram o G3 e os valores de HCTs estão listadas na figura 23.

Figura 22. Valores de homocisteína total sérica (HCts) em 24 cães com lesão renal aguda (LRA), com ou sem doença renal crônica (DRC), comparados aos valores de cães saudáveis sem periodontite crônica (PC).

| | Média ($\mu\text{mol/l}$) e DP | Mín ($\mu\text{mol/l}$) | Máx ($\mu\text{mol/l}$) |
|--|--|---|---|
| HCts saudáveis sem doença periodontal (n=24) | 13,25 \pm 3,78a | 6,08 | 20,91 |
| HCts LRA (n=17) | 12,44 \pm 15,078a | 3,38 | 45,51 |
| HCts LRA e DRC (n=7) | 14,874 \pm 12,361a | 2,5 | 42,0 |

DP: desvio padrão; Mín: mínimo; Máx: máxima.

Figura 23. Alterações apontadas como causas de lesão renal aguda (LRA) dos 24 cães do estudo e o desfecho.

| Causa da LRA | HCts ($\mu\text{mol/l}$) | Desfecho |
|---|----------------------------|----------|
| Cirurgia de hérnia de disco | 3,89 | Alta |
| Diabetes <i>Mellitus</i> complicada | 17,34 | Óbito |
| Quadro hemolítico: suspeita de leptospirose | 9,46 | Alta |
| DRC+ Leishmaniose | 31,11 | Alta |
| Leishmaniose Visceral Canina | 16,7 | Alta |
| Obstrução uretral | 7,89 | Alta |
| Peritonite urêmica/ Sepsis | 43,2 | Óbito |
| Hidronefrose grave bilateral | 7,43 | Óbito |
| Leishmaniose Visceral Canina | 7,67 | Alta |

| | | |
|---|----------------------------|----------|
| Síndrome cardiorenal | 10,92 | Óbito |
| Piometra | 6,18 | Alta |
| Cistite e cálculos vesicais | 45,51 | Alta |
| Piometra | 10,03 | Alta |
| Sepse abdominal | 15,61 | Óbito |
| Diabetes <i>Mellitus</i> Complicada | 3,95 | Alta |
| Hemoparasitose | 7,01 | Óbito |
| Leishmaniose | 12,03 | Alta |
| DRC + cistite | 20,98 | Alta |
| Causa da LRA | HCts ($\mu\text{mol/l}$) | Desfecho |
| DRC + Leishmaniose Visceral Canina | 12,01 | Óbito |
| DRC + cistite | 10,01 | Alta |
| DRC + Leishmaniose Visceral Canina | 4,75 | Alta |
| DRC + Diabetes <i>Mellitus</i> Complicada | 2,5 | Alta |
| DRC + Neoplasia vesical | 11,87 | Óbito |
| DRC + Melanoma oral | 42,0 | Óbito |

Os resultados dos cães portadores de LRA foram comparados aos de cães saudáveis sem doença periodontal. Não foi observada diferença estatística entre os grupos, o que difere do observado por Sun e colaboradores (2012), que ao delinearem o perfil metabólico de 17 pacientes recém-nascidos humanos com LRA, observaram um aumento da HCt de 8,5 vezes em relação ao grupo controle.

Além disso, observaram uma correlação positiva da HC com os valores de creatinina. É importante ressaltar que o trabalho de Sun e colaboradores (2012) avaliou pacientes recém-nascidos, que apresentavam uma função renal marcadamente imatura com redução do fluxo sanguíneo renal, da filtração glomerular e da secreção tubular ativa, que trazem grandes impactos ao metabolismo e secreção de substâncias (Ligi et al., 2013). Essa imaturidade renal do recém-nascido pode comprometer a capacidade de reserva substancial dos rins.

Rossi e colaboradores (2013) avaliaram a HCts na DRC em cães e observaram que cães com DRC em estágios II, III, IV apresentavam valores significativamente maiores de HCts do que os cães do grupo controle. Apesar de parte dos pacientes deste estudo terem recebido o diagnóstico de DRC, esta intercorrência não gerou diferença estatística detectável, possivelmente pelos cães do presente estudo serem classificados como DRC estágio I, uma vez que os tutores não relataram queixas anteriores à internação.

Além disso, acredita-se que a LRA, na presente pesquisa, não tenha cursado com aumentos importantes da HCts, já que as vias metabólicas renais são reguladas pela quantidade de HC filtrada pelos glomérulos, objetivando-se manter uma concentração constante de HC sérica. Em casos de LRA o compartimento de reserva renal pode aumentar até 4 vezes a metabolização tubular da HC, principalmente pela via da transulfatação (House et al., 1998), que pode não estar comprometida, uma vez que as principais causas de LRA são: pré-renais (ex. hipovolemia), pós renais (ex. obstruções uretrais) e renais, principalmente causadas por doenças consagradas por glomerulonefrite imunomediada, tais como a leishmaniose. Apesar de haver indicativos de que a LRA, nessas situações, possa causar lesões tubulares, o que poderia comprometer o metabolismo da HC, o consenso é de que a lesão causada pela leishmaniose seja, predominantemente, de origem glomerular (Valle et al., 2021).

Frente a estes achados, avaliou-se a possível correlação entre a HCts e ureia, creatinina, amilase e fósforo em cães. Os resultados comparando cães com LRA não demonstraram correlação significativa entre HCts e ureia ($p = 0,82$), fósforo ($p = 0,96$), amilase ($p =$

0,69) e creatinina ($p = 0,64$), a semelhança do que foi observado por Üren e colaboradores (2009), em gatas com DRC. Neste trabalho, embora tenha sido observada uma elevação nos níveis de HCt na DRC, não foi identificada uma correlação significativa entre HCts e creatinina.

Além disso, entre os animais em LRA, avaliaram-se os valores de HCts entre aqueles que tiveram óbito e alta, como preditor de desfecho. Não foi observada diferença estatística entre os grupos alta ou óbito.

Embora esta diferença não tenha ocorrido, pode-se perceber que os animais em LRA com HCts maiores que $15 \mu\text{mol/l}$ apresentaram 5 (cinco) vezes mais chances de óbito e que animais com HCts menor que $7,0 \mu\text{mol/l}$ apresentaram um bom prognóstico, com alta médica. Dessa forma, concentrações de HCts devem ser incluídas na rotina clínica para monitoramento de cães em LRA. Esses achados se assemelham aos observados por Cohen e colaboradores (2019), em pacientes DRC humanos, no qual observaram que pessoas com $\text{HCtp} > 15 \mu\text{mol/l}$ apresentam uma maior propensão a proteinúria e a redução da taxa de filtração glomerular (TFG).

5.4 Valores de homocisteína total sérica de cães obesos

O grupo de cães obesos (G4) foi composto por 24 cães com ECC-7 ($n=1$), ECC-8 ($n=4$) ou ECC-9 ($n=19$), classificados através de 1 à 9 (Mawby et al., 2004). Foram observados valores de média e desvio padrão para idade, peso, ECC e HCts de: $6,75 \pm 2,29$ anos, $17,48 \pm 8,80$ kg, $8,75 \pm 0,53$ ECC e $17,983 \pm 5,593 \mu\text{mol/l}$, respectivamente. Os dados do grupo encontram-se na figura 24. Foram observados valores estatisticamente superiores para cães obesos, conforme demonstrado na figura 25.

Figura 24. Distribuição por raça, sexo e faixa etária de 24 cães obesos não portadores de doença endócrina de base. A. Frequência relativa por raça. B. Frequência relativa por sexo. C. Frequência relativa por faixa etária.

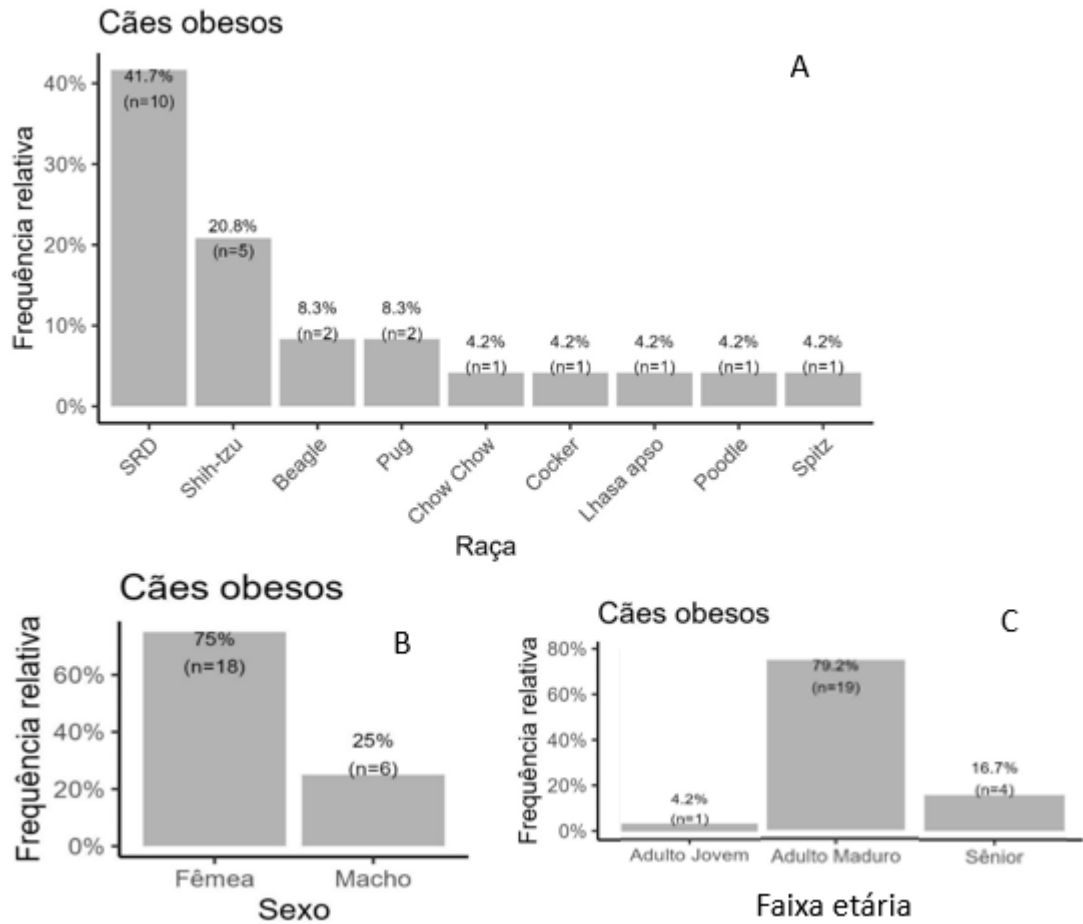
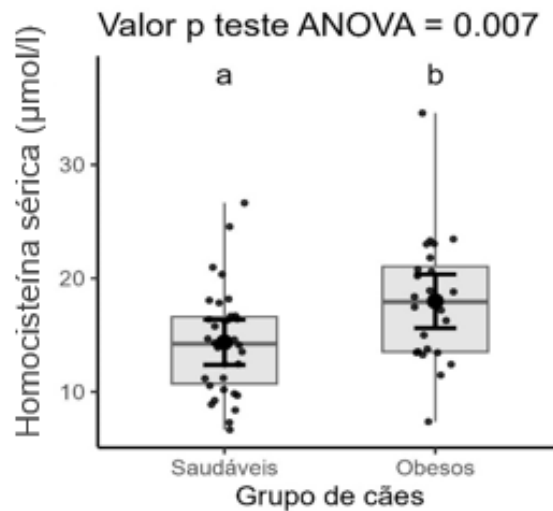


Figura 25. Comparação dos valores de homocisteína total sérica (HCt) entre 24 cães obesos e 31 cães saudáveis, sem doença periodontal. Os grupos que compartilham a mesma letra não são significativamente diferentes entre si.



Ao comparar os valores de HCts de cães obesos com os valores dos 31 cães sem doença periodontal, presentes em G1, observou-se diferença estatística ($p < 0,005$). Alguns autores sugerem que níveis elevados de HCts possam desempenhar um papel biológico na relação entre obesidade e doenças cardiovasculares, à semelhança do que foi demonstrado por Lee e colaboradores (2012) em cães de pequeno porte.

Dessa forma, os achados do presente estudo reforçam a importância da mensuração da HCts em cães obesos e seu monitoramento durante o processo de emagrecimento, para garantir que esses cães não apresentem HHC. Diante do exposto, torna-se evidente a correlação entre obesidade e elevação dos níveis de HC, uma relação que precisa ser analisada e melhor compreendida na medicina veterinária.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que este estudo foi realizado, pode-se concluir que:

A idade não é um determinante fisiológico que causa oscilações nos valores de homocisteína total sérica (HCt) em cães e gatos.

Não há diferença significativa nos valores de HCt entre cães e gatos machos e fêmeas, embora haja uma tendência estatística de aumento nos machos.

Os valores médios \pm desvio padrão, mínimo e máximo de HCt em cães saudáveis foram de $13,25 \mu\text{mol/l} \pm 3,78$. O intervalo de normalidade para HCt em cães é de $6,08 \mu\text{mol/l}$ e $20,91 \mu\text{mol/l}$, respectivamente.

Os valores médios \pm desvio padrão, mínimo e máximo de HCt em gatos saudáveis foram de $26,22 \mu\text{mol/l} \pm 7,69$. O intervalo de normalidade para HCt em gatos é de $11,15$ a $41,30 \mu\text{mol/l}$.

Intervalos de referência estabelecidos para cães não podem ser aplicados a gatos, independentemente da faixa etária ou sexo.

A presença de PC discreta a moderada interfere significativamente nos valores de HCt, indicando que a HCt pode ter um papel biológico na relação entre PC e doenças cardiovasculares em cães.

A presença de LRA não interfere significativamente nos valores de HCts em cães.

A HCt pode prever prognósticos em casos de LRA. Pacientes com HCt superior a $15 \mu\text{mol/l}$ têm cinco vezes mais chances de óbito, enquanto animais com HCt inferior a $7,0 \mu\text{mol/l}$ apresentam um bom prognóstico.

Quanto maior o escore de condição corporal (ECC), maior o valor de HCt sérica. Há uma diferença significativa entre os animais com ECC ideal e os animais obesos, na ausência de outras comorbidades.

As concentrações de HCts devem ser incluídas na rotina clínica para monitoramento de cães obesos, com lesão renal aguda (LRA) e com periodontite crônica (PC)

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, S.F.; KUMAR, S.; GANGULY, P. Measurement of homocysteine: a historical perspective. *Journal of Clinical Nutrition*. 2019, v. 65, n.3, p. 171-177.

ANDERSSON, A.; BRATTSTROM, L.; ISAKSSON, A.; ISRAELSSON, B.; HULTBERG, B. Determination of homocysteine in plasma by ion-exchange chromatography. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 1989, v 49, p. 445-449

BACIU, Sorana Florica; MESAROS, Anca-Ştefania; KACSO, Ina Maria. Chronic Kidney Disease and Periodontitis Interplay—A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v. 20, p. 1298 -1316, 2023.

BARBOSA, T.M.C.C.; CARVALHO, M.G.; SILVEIRA, J.N.; RIOS, J.G. Homocysteine: validation and comparison of two methods using samples from patients with pulmonary hypertension. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2014, v. 50, n.6, p. 402 – 409.

BAE, J.B.; HAN, J.W.; SONG, J. Hypohomocysteinemia may increase the risk of dementia and Alzheimer's disease: A nationwide population-based prospective. *Clinical Nutrition*. June. 2021. p. 1-6.

BENVETUNI, E.; PIERINI, A.; GORI, E.; BOTTERO, E.; PIETRA, M.; LIPPI, I.; VALENTINA, M.; MARCHETTI, V. Serum homocysteine concentration in dogs with immunosuppressant-responsive enteropathy. *Journal of Veterinary Science*. 2020, v. 21, n. 04, p. 1-12.

BOTELHO, João; MACHADO, Vanessa; LEIRA, Yago; PROENÇA, Luís; MENDES, José João. Periodontal Inflamed Surface Area Mediates the Link between Homocysteine and Blood Pressure. *Biomolecules*. v. 11, n. 875, p. 1-11, 2021.

BYDŁOWSKI, S.P.; MAGNANNELLI, A.C.; CHAMONE, D. A. F. HiperHomocisteinemia e Doenças Vaso-Oclusivas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 1998, v.71, n. 1, p. 69-76.

ÇAYIR, C.; KOZAT, S. Investigation of Homocysteine Levels in Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry*, v. 4, n. 3, p. 305, 2016.

CHANDLER, M.L.; PAYNE-JAMES. J. J: Prospective evaluation of a peripherally administered three-in-one parenteral nutrition product in dogs. *J Small Anim Pract.* 2006, v. 47, p. 518–523.

CIARLINI, L.D.R.P.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, L.F.F. Quimiluminescência: Princípio e Aplicações. *Revista de Educação Continuada.* 2002, v.5, n.2, p. 181- 187.

COHEN, E.; MARGALIT, I.; SHOCHAT, T.; GOLDBERG, E.; KRAUSE, I. Gender differences in homocysteine concentrations, a population-based cross-sectional study. *Nutrition, Metabolism e Cardiovascular Diseases*, p. 1-6, 2018.

CREEVI, K. E., GRADY, J., LITTLE, S. E., MOORE, G. E., WEEB, J. A.. 2019 AAHA Canine Life Stage Guidelines. *Veterinary practice guidelines.* 2019. n. 55, p. 267 -290.

DRUT, A., SOETART, N., BERTIN, C., CORFFL, E., BERDER, C., NGUYEN, P., SIMARD.G., MALLEM, Y. Plasma homocysteine concentration in privately owned healthy adult cats: assessment of biological determinants and establishment of a reference interval. 2019. p. 1-8.

FU, S.; YAO, Y.; ZHAO, Y.; LUAN, F. Relationships of hyperhomocysteinemia and hyperuricemia with metabolic Síndrome and renal Function in Chinese Centenarians. *Journal Frontiers in Endocrinology.* 2018, v.09, p. 01-07. Doi: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00502>.

GABRIEL, S.A.; IZAR.L.C.; TRISTÃO. C.K., et al. Homocisteína como Fator de Risco para Doenças Cardiovasculares. *Rev. Fac. de Ciênc. Méd. Sorocaba.* 2005. n.1, v.7, p. 11-14.

GASCÓN, T. M.; SCHINDLER, F.; OLIVEIRA, C.G.B.; SOUZA, F.I.S.; HIX, S. SARNI; BACAN, A.P.A.; ALMEIDA, V.D.; GIGLIO, A.D. FONSECA. F.L.A. Avaliação do método de quimiluminescência na análise de homocisteína plasmática e sua comparação com o método de HPLC em amostras de crianças. *Einstein.* 2010, v.8, n.2, p. 187-191.

GIOSO MA. 1993. Odontologia Veterinária: Periodontia. *Revista Cães & Gatos.* 45(8):16-22.

GIOSO MA. 2003. Odontologia para o Clínico de Pequenos Animais. 5ª ed. São Paulo, iEditora, p. 202.

GOŁYŃSKI, M.; LUTNICKI, K.; KRUMRYCH, W.; SZCZEPANIK, M.; GOŁYŃSKA, M.; WILKOŁEK, P.; ADAMEK, Ł.; SITKOWSKI, Ł.; KUREK, Ł. Relationship between Total Homocysteine, Folic Acid, and Thyroid Hormones in Hypothyroid Dogs. *J Vet Intern Med.* n. 31, p. 1403-1405.

GIRALDI, M.; PALTRINIERI, S.; CURCIO, C.; SCARPA, P. Serum concentration of homocysteine in spontaneous feline chronic kidney disease. *The Veterinary Journal.* 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.105358>.

GRÜTZNER, N.; HEILMANN, R.M.; STUPKA, K.C.; RANGACHARI, V.R.; WEBER, K.; HOLZENBURG, A.; SUCHODOLSKI, J.S.; STEINER, J.M. Serum Homocysteine and Methylmalonic Acid Concentrations in Chinese Shar-Pei Dogs with Cobalamin Deficiency. *Vet. J.* 2013, 197, 420–426.

HENDRIKS, W. H., MOUGHAN, P.J., TARTTELIN, M.F. Body composition of the adult domestic cat (*Felis catus*). *J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr.* 1997. n. 77, p. 16-23.

HOUSE, J. D.; BROSNAN, M.E.; BROSNAN, J.T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Journal Biochem.* 1997, v. 328, p. 287-292

HOUSE, J. D.; BROSNAN, M.E.; BROSNAN, J.T. Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney International.* 1998, v. 54, p. 1601-1607.

HOUSE, J. D.; BROSNAN, M.E.; BROSNAN, J.T. Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Journal Biochem.* 1997, v. 328, p. 287-292.

JOHNSON, K.; TIEDEMAN, T.; PETERSON, H.; STEINER, J. M.; TREPANIER, L. A. Potential mechanism for hyperhomocysteinemia in Greyhound dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 2023, v. 37, p. 960-967.

KABAKCI, R., BULBUL, S. F. Effects of Age and Gender on The Concentrations of Plasma Homocysteine, Vitamin B12 and Folic Acid in Angora Cats. *International Journal of Veterinary and Animal Research.* 2021. n. 4, v. 1, p. 22-26.

LANGOTE, S., KALBURGI, V., DUBEY, A., GUPTA, A., MALIK, N., KHAN, R.Z. Nexus between Plasma Homocysteine Levels in Chronic Periodontitis Patients and Non-surgical Periodontal Therapy. *Journal of Young Pharmacists*. 2023. n.15, v.3, p. 535-539.

LEE, S., NAM, H, HYUN, C. The Relationship between Homocysteine, Obesity, Glucose and Lipid Profiles in Small-Breed Dogs. *Journal of Veterinary Clinics*. 2012. n 29, v. 4, p. 277-282.

LENG, Yurong et al. Periodontal disease is associated with the risk of cardiovascular disease independent of sex: A meta-analysis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, v. 10, article 1114927, 27 fev. 2023. DOI: 10.3389/fcvm.2023.1114927

LUTZ, Sabina; SEWELL, Adrian C.; BIGLER, Beat; RIOND, Barbara; REUSCH, Claudia E.; KOOK, Peter H. Serum cobalamin, urine methylmalonic acid, and plasma total homocysteine concentrations in Border Collies and dogs of other breeds. *AJVR*, n.8, v.73, p1194-1199, 2012.

MAWBY, D. I. et al. Comparison of various methods for estimating body fat in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 40, n. 2, p. 109–114, Mar-Apr 2004.

McMICHAEL, M.A., FREMAN, J. SELHUB, E.A., ROZANSKI, D.J., NADEAU, M.R., RUSH, J.E. Plasma Homocysteine, B Vitamins, and Amino Acid Concentrations in Cats with Cardiomyopathy and Arterial Thromboembolism. *Vet Intern Med*. n.14, p.507-512.

NEVES, L.B.; MACEDO. D.M.; LOPES. A.C. Homocisteína. *J Bras Patol Med Lab*. Outubro.2004. n.5, v.40, p.311-320.

OSKAN, C., KOZAT, S., KAYA, A., AKGUL, Y. A periodical of the Network for the Veterinarians of Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. n. 1, v. 4, p. 58-64.

PAIVA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, JAMES.R. Introdução à Espectroscopia: Tradução da 4 edição norte-americana. CENGAGE Learning. 2008.

PAPROTNY, L.; WIANOWSKA, D.; IZDEBSKA, M.; CELEJEWSKA, A.; SKEWCZAK, D.; SOLSKI, J. Analysis of sérum homocysteine in the laboratory practice – comparison of the direct chemiluminescence immunoassay and high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. *Biochemia Medica*. 2020, v.30, n.3, p. 1-7.

PARREIRA, F.S.; GARCIA, D.O.; JORGE, A. T.; BARROS, J. C., MAIA, S.R.; CARVALHO, L. L.; PEREIRA, L. F.; DIAS, F. G.G. Periodontite e os fatores predisponentes em cães idosos. 2018, v. 17, n. 5, p.1-7.

PATTERSON, B.E.; BARR, J.W.; FOSGATE, G.T.; BERGHOFF, N.; STEINER, J.M.; SUCHODOLSKI, J.S.; BLACK, D.M. Homocysteine in Dogs with Systemic Inflammatory Response Syndrome. *J. Small Anim. Pract.* 2013, 54, 620–624.

PENMETSA, Gautami S.; BHASKAR, Rayapudi Uday; MOPIDEVI, Anudeep. Analysis of Plasma Homocysteine Levels in Patients with Chronic Periodontitis Before and After Nonsurgical Periodontal Therapy Using High-Performance Liquid Chromatography. *Contemporary Clinical Dentistry*, v. 11, n. 3, p. 266, jul. 2020. DOI: 10.4103/ccd.ccd_650_18. License: CC BY-NC-SA 4.0.

QUIMBY, J., GOWLAND, S., CARNEY, H. C., DePORTER, T., PLUMMER, P. 2021 AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2021. n. 23, p. 211-233.

R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

ROSSI, G., GIORDANO, A., BREDA, S., LISI, C., ROURA, X., ZATELLI A. Big-endothelin 1 (big ET-1) and homocysteine in the serum of dogs with chronic kidney disease. *The Veterinary Journal*. 2013. v. 198, p.109-115. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.022>.

ROSSI, S.; ROSSI, G.; GIORDANO, A.; PALTRINIERI, S. Homocysteine measurement by an enzymatic method and potential role of homocysteine as a biomarker in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2008, v. 20, p. 644-649.

SELHUB, J. Homocysteine Metabolism. *Annual Review of Nutrition*. 1999, n. 19, p. 217-246.

SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L.; JAIN, N. C. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008.

SUN, J.; SHANNON, M.; ANDO, Y.; SCHNACKENBERG, L.K.; KHAN, N.A.; PORTILLA, D.; BERGER, R.D. Serum metabolomic profiles from patients with acute kidney injury: A pilot study. *Journal of Chromatography B*. 2012, v. 893-894, p. 107 -113. Doi:

<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.02.042>.

SHIH, Y-L.; SHIH, C-C.; CHEN, J-Y. Elevated homocysteine level as indicator for chronic kidney disease in Community -dwelling Middle -age and elderly populations in Taiwan: A Community -based-cross-sectional study. *Journal Frontiers in Medicine*. 2022, p, 01-09. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.967104>.

TVARIJONAVICIUTE, A.; CERON, J.J.; HOLDEN, S.L.; BIOURGE, V.; MORRIS, P.J.; GERMAN, A.J. Effect of Weight Loss in Obese Dogs on Indicators of Renal Function or Disease. *Vet Intern Med*, v. 27, p. 31-38, 2013.

UREN, N., FIDANCI, V., FIDANCI, U.U., PEKCAN, M., KIRMIZIGUL, A. H. Kronik Böbrek Yetmezlikli Kedilerde Homosistein Düzeyleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2009. n.15, v. 4, p .543-546.

VALLE, P.G., VEADO, J.C.C., RIBEIRO, V. M., TELES, P.P.A., COSTA VAL, A.P., DORNELAS, L.R.S.M., FONSECA, L.A., PAES LEME, F.O. 2021. Characterization of proteinuria in treated and untreated dogs naturally infected with *Leishmania* sp. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2021

VENÂNCIO, L.S.; BURINI,R.C.; YOSHIDA. W.B. Tratamento dietético da hiperhomocisteinemia na doença arterial periférica Dietary treatment of 12 hyperhomocysteinemia in peripheral arterial disease. *J Vasc Bras*. 2010. n.1. v.9. p. 28-41.

WANG, T; MA, J; HOGAN. H. N. et al. Quantitative Translation of Dog-to-Human Aging by Conserved Remodeling of the DNA Methylome. *Cell Syst*. August. 2020. n.11, v. 2, p. 176-185.

YOUNG, D.S. *Effects of drugs on clinical laboratory tests - vol. 2, 5 ed.* Washington DC: AACC Press, 2000.

ZHANG, M.; DONG, R.; DA, J.; YUAN, J.; ZHA, J.; LONG, Y. Hyperhomocysteinemia exacerbates acute kidney injury via increased mitochondrial damage. *Journal Frontiers in Physiology*. 2022, p. 01-12. Doi: <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.967104>.

ZHUO, J.M., WANG. H. PRATICÒ. Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends Pharmacol Sci*. 2011. n. 32, v. 9, p. 562-571.

ANEXO 1 – Comissão de ética no uso de animais - CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 208/2023**Título do projeto:** Homocisteína: validação, definição dos intervalos de referência e ensaio clínico em cães e gatos**Finalidade:** Pesquisa**Pesquisador responsável:** Fabiola de Oliveira Paes Leme**Unidade:** Escola de Veterinária**Departamento:** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 06/11/2023. Validade: 06/11/2023 à 05/11/2028.

Belo Horizonte, 07/11/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2 – Anuência do HV-UFMG



DECLARAÇÃO

Belo Horizonte, 12 de julho de 2023.

A Direção do Hospital Veterinário-UFMG declara estar ciente da realização de projeto de pesquisa **“Homocisteína: validação, definição dos intervalos de referência e ensaio clínico em cães e gatos”**, sob a responsabilidade da Professora Fabíola de Oliveira Paes Leme.

No referido projeto, a aluna de doutorado fará o acompanhamento das consultas de rotina do setor de Oncologia. As amostras de sangue coletadas dos pacientes durante as consultas serão encaminhadas para laboratório para exames de rotina. O excedente das amostras sanguíneas será utilizado para as análises do referido projeto. Dessa forma, o pesquisador responsável informa que não haverá custos adicionais ao tutor nem ao Hospital Veterinário.

Ressaltamos que essa autorização se faz verdadeira desde que, a execução do referido projeto não determine qualquer alteração e/ou prejuízo da rotina hospitalar, que seja obedecido o cronograma de execução previamente estabelecido, que esteja em consonância com as exigências e certificado pelo CEUA e que tenha registro prévio de 45 a 60 dias antes do início do experimento.

O Hospital Veterinário dá ciência de que não se responsabilizará por qualquer eventualidade ocorrida com projeto em tela, não arcará com custos de materiais de consumo ou de qualquer natureza tais como provenientes de danos de equipamentos, bem como não fornecerá recursos humanos para a realização do projeto. Outrossim, as publicações científicas resultantes do projeto de pesquisa deverão obrigatoriamente conter a informação de que o desenvolvimento da pesquisa ocorreu nas dependências do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da UFMG.

Membros da Equipe:

| Nome | | Categoria |
|--|------------|--------------------------|
| Professora Fabíola de Oliveira Paes Leme | | Orientadora/Coordenadora |
| Nathália das Graças Dorneles Coelho | | Aluna de doutorado |
| | Data | |
| Recebimento do Projeto pela Direção do HV | 16/06/2023 | |
| Ciência da Direção do Hospital Veterinário | 12/07/2023 | |

Profa. Christina Malm

Diretora do Hospital Veterinário-UFMG



ANEXO 3 - termo de consentimento livre esclarecido

Título do projeto: intervalo de referência e determinantes fisiológicos e patológicos em cães e gatos

Nome do pesquisador principal: Prof. Dra. Fabíola Paes Leme.

Objetivos do estudo:

Validar a técnica enzimática associada à espectrometria de massa para a avaliação laboratorial da homocisteína em cães e gatos, a fim de que a homocisteína possa ser utilizada como um marcador de saúde na prática clínica no futuro. Além disso, será avaliada a variável idade como um fator que pode alterar os níveis séricos de homocisteína em cães e gatos, com a definição dos valores de referência para faixas etárias.

Potenciais riscos para os animais:

O risco ao qual o paciente será submetido é mínimo, podendo apresentar um pequeno hematoma (bolsa de sangue) no local da coleta de sangue, que será realizada preferencialmente na veia jugular em cães e gatos.

Cronograma:

O tempo de permanência do cão ou gato para a realização do projeto será de, no máximo, 1 hora para cada paciente, levando em consideração a necessidade dos exames complementares e a realização do exame físico geral detalhado.

Benefícios:

A homocisteína se mostra promissora como indicadora da condição de saúde em cães e gatos. Estudos que visam à validação de métodos de avaliação são essenciais para que esse analito possa ser empregado no futuro na clínica de cães e gatos, contribuindo para o diagnóstico, estadiamento e prognósticos de alterações renais.

Esclarecimentos ao proprietário sobre a participação do animal neste projeto:

Sua autorização para a inclusão do seu animal neste estudo é voluntária. Seu(s) animal (is) poderá (ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer

prejuízo a ele(s).

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada.

Garantimos o sigilo/anonimato de seus dados. Os resultados da pesquisa poderão ser utilizados em trabalhos científicos publicados ou apresentados em congressos, palestras e outros eventos sem revelar sua identidade. Os dados obtidos durante a pesquisa são confidenciais e não serão usados para outros fins.

Os membros da Ceua ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

O Sr. não terá nenhuma despesa e não há compensação financeira relacionada à sua participação na pesquisa.

O Médico Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal (is) será a médica veterinária Nathália das Graças Dorneles Coelho, inscrito (a) no CRMV-MG sob o nº 15146. Além dele, a equipe do Pesquisador Principal, Prof. Dra. Fabíola Paes Leme, também se responsabilizará pelo bem-estar do(s) seu(s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos

Tel. de emergência: (31) 9 92848663 (Nathália das Graças Dorneles Coelho).

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627- Campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte- MG-
Telefone: (31) 3409 22 76 -3409 20 00.

ANEXO 4- Declaração de Consentimento

Validar a técnica enzimática associada à espectrometria de massa para a avaliação laboratorial da homocisteína em cães e gatos, a fim de que a homocisteína possa ser utilizada como um marcador de saúde na prática clínica no futuro. Além disso, será avaliada a variável idade como um fator que pode alterar os níveis séricos de homocisteína em cães e gatos, com a definição dos valores de referência para faixas etárias.

Este termo será assinado em duas vias, pelo senhor e pelo responsável pela pesquisa, ficando uma via em seu poder.

Eu,, residente na _____, N° _____, Bairro _____, Cidade _____, RG: _____, Idade _____, Telefone (____) _____ - _____, concordo voluntariamente em submeter meu animal de nome _____, espécie _____, raça _____, coloração da pelagem _____, sexo _____, idade _____ à pesquisa intitulada **“Homocisteína: validação, definição dos intervalos de referência e ensaio clínico em cães e gatos”**

Estou ciente que serão realizados exame físico completo, mensuração da pressão arterial e coleta de exames de sangue no animal acima descrito que se encontra sob minha tutela e responsabilidade. Está claro que o animal não será submetido a nenhum tipo de intervenção que possa causar dano à sua saúde.

Sou sabedor ainda que não receberei nenhum tipo de remuneração, vantagem econômica ou material por participar desse estudo, além de poder abandonar a pesquisa em qualquer etapa de seu desenvolvimento, sem qualquer prejuízo ou justificativa. Estou de acordo de que os resultados obtidos sejam divulgados no meio científico, sempre resguardando minha individualidade.

Estou ciente também de que se houver descumprimento de qualquer norma ética poderei recorrer ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG).

De posse de todas as informações necessária, e tendo me sido esclarecidas todas as dúvidas, concordo em deixar meu animal participar da referida pesquisa.

Assinatura do responsável pelo animal.

Assinatura do responsável pelo estudo

Belo Horizonte, __/__/____

