

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Colegiado de Pós Graduação em Ciência Animal

PILLAR GOMIDE DO VALLE

Estadiamento e caracterização da proteinúria em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2021

PILLAR GOMIDE DO VALLE

Estadiamento e caracterização da proteinúria em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*

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

Área de concentração: Ciência Animal
Orientadora: Dra. Fabiola Paes Leme

Belo Horizonte

2021

V181e Valle, Pillar Gomide do, 1985-
Estadiamento e caracterização da proteinúria em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*/ Pillar Gomide do Valle, -2021.

105 f.:il.

Orientador: Fabiola de Oliveira Paes Leme.
Tese (Doutorado) Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de Concentração: Ciência Animal.

Bibliografia: f.: 92 - 103.

Anexo: f.: 104 e 105.

1. Cão - Teses - 2. Leishmaniose visceral - Doença - Teses - 3. Ciência Animal - Teses - I. Leme, Fabiola de Oliveira Paes - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - III. Título.

CDD - 636.089

Bibliotecária responsável Cristiane Patricia Gomes - CRB2569



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

PILLAR GOMIDE DO VALLE

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

Aprovada em 09 de abril de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme
Presidente – Orientador(a)
Dr.(a). Julio Cesar Cambraia Veado
Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Dr.(a). Leandro Abreu da Fonseca
Dr.(a). Carolina Maria Vianna de Freitas
Dr.(a). Ana Paula Lucas Mota
Dr.(a). Vitor Márcio Ribeiro



Documento assinado eletronicamente por **Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 12/04/2021, às 10:52, 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 **Leandro Abreu da Fonseca, Usuário Externo**, em 12/04/2021, às 13:53, 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 **Ana Paula Lucas Mota, Membro**, em 12/04/2021, às 17:08, 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 **Vitor Marcio Ribeiro, Usuário Externo**, em 13/04/2021, às 15:56, 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 **Carolina Maria Vianna de Freitas, Usuário Externo**, em 13/04/2021, às 18:07, 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 **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 14/04/2021, às 14:16, 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 **Julio Cesar Cambraia Veado, Professor do Magistério Superior**, em 14/04/2021, às 15:53, 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 **0662523** e o código CRC **4BB41AD2**.

“Desistir... Eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chã nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça...”

Letícia Lanz (Geraldo Eustáquio de Souza), 1989.

DEDICATÓRIA a minha família, amigos e a minha orientadora. Dedico também aos cães que são a razão dos meus trabalhos. E aos meus alunos que me estimulam a buscar sempre o meu melhor. Espero que este estudo sirva para abrir um novo caminho na qualidade de vida dos pacientes com lesão renal.

AGRADECIMENTOS

À amiga, confidente e orientadora Fabiola Oliveira Paes Leme por tornar essa etapa de aprendizado muito mais prazerosa e produtiva.

Ao meu pai Pedro Maurício do Valle e minha mãe Patrícia Maria Gomide do Valle que sempre participaram ativamente de todos meus projetos, tornando tudo mais leve. A meus irmãos André e Arthur pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu marido Breno Costa Lima, pelo apoio, incentivo e participação ativa em todos os projetos que me destino. E a Bella, nossa filha, que resolveu nascer com 35 semanas, enquanto eu terminava os ajustes das referências bibliográficas desta tese. E agora um mês depois assiste minhas correções em meu colo.

A toda minha família, mas principalmente a Glória Gomide, pelo exemplo e fonte inspiradora para minha jornada na docência.

Ao amigo Júlio César Cambraia Veado pela confiança, oportunidade e que torna possível a realização dos meus maiores sonhos. A professora Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho pelo carinho e cuidado nas correções que sempre faz com maestria.

A CAPES pela bolsa concedida por um período tão necessário.

Aos amigos e colegas de trabalho Professores da Faculdade de Veterinária do Arnaldo e da Faculdade de Veterinária da Newton Paiva, e a todos os meus alunos que tornaram parceiros e amigos. E claro, a essas duas grandes faculdades que me permitem a realização do sonho da docência e que me deram condições de concluir esta etapa.

A todos os médicos veterinários, residentes e funcionários do Hospital Veterinário Santo Agostinho, pela ajuda na coleta das amostras. Em especial ao amigo e médico veterinário Pedro Paulo de Abreu Teles pela colaboração na busca de animais e realização dos exames laboratoriais.

A todos os professores de Medicina Veterinária da PUC-Betim e da Escola de Veterinária da UFMG que contribuíram e contribuem para minha formação. Em especial, à Professora Maria Isabel Vaz de Melo, pela imensa colaboração para o ingresso no doutorado e ao Professor Vitor Márcio Ribeiro sempre comigo na caminhada em busca aos diamantes.

À Duda, Zelda e Branca (*in memoriam*) pela total influência na minha escolha profissional e Allegra, Marrie e Yoshi por fazerem parte da minha vida. E minha pequena Stella Artois, pela companhia e amor.

Aos animais, por existirem.

Aos membros da banca pelo aprendizado e colaboração. E a todos que, de alguma forma, contribuíram para esta construção.

A Deus, Nossa Senhora e todos os amigos espirituais que me inspiram e me guiam.

SUMÁRIO

Pág.

RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVO GERAL	18
2.1 Objetivos Específicos.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1. Definição e Classificação de Injúria Renal Aguda.....	19
3.1.1 Injúria Renal Aguda.....	21
3.1.2 Insuficiência Renal Aguda.....	22
3.2. Comparação entre insuficiência renal aguda e doença renal crônica.....	24
3.3 Relação entre fisiologia glomerular e proteinúria.....	25
3.4 Avaliação renal através de biomarcadores além da proteinúria.....	29
3.5 Patofisiologia das Proteínas urinárias em Cães Portadores de IRA e DRC.....	33
3.5.1 Proteinúria fisiológica.....	34
3.5.2 Proteinúria não fisiológica.....	34
3.5.3 Proteinúria pré-renal.....	35
3.5.4 Proteinúria renal.....	36
3.5.5 Proteinúria pós-renal.....	37
3.5.6 Testes laboratoriais de rotina.....	37
3.6 Principais proteínas de interesse na insuficiência renal aguda.....	39
3.6.1 Proteinúria glomerular.....	39
3.7.2 Albumina e Transferrina.....	39
3.7.3 Imunoglobulina G.....	41
3.7.4 Proteinúria tubular.....	42
3.7.5 Alfa 1 microglobulina.....	42
3.7.6 Proteína ligadora de retinol.....	43
3.8 Leishmaniose Visceral Canina (LVC) e os Rins.....	44
3.8.1 Patogenia e sinais clínicos da LVC.....	44
3.8.2 Nefropatias determinadas pela leishmaniose.....	46
3.8.3 Diagnóstico e achados laboratoriais.....	48
3.8.4 Estadiamento e manejo da LVC.....	50
4. MATERIAL E MÉTODOS	54

4.1.	Aprovação do Projeto.....	54
4.2.	Animais e Local de Estudo.....	54
4.3.	Grupos Experimentais.....	55
4.4.	Coleta de Amostras.....	56
4.5	Exame ultrassonográfico.....	57
4.6.	Processamento das Amostras.....	57
4.6.1	Avaliação hematológica.....	57
4.6.2	Bioquímica sérica e urinária.....	57
4.6.3	Urinálise.....	58
4.6.4	Exames sorológicos.....	59
4.6.4.1	SNAP Leishmania e 4Dx Plus IDEEX®	59
4.6.4.2	ELISA.....	59
4.6.4.3	RIFI.....	60
4.6.5	Exames parasitológicos.....	61
4.6.5.1	PCR.....	61
4.6.5.	SDS-PAGE.....	61
4.7	Análise estatística.....	64
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	66
5.1	Comparação dos Grupos.....	66
5.1.1	Alterações hematológicas.....	67
5.1.2	Marcadores e estadiamento da função renal.....	74
5.1.2.1	Avaliação urinária.....	77
5.1.2.2	Urinálise.....	77
5.1.2.3	RPC.....	80
5.1.2.4	Análise eletroforética da urina.....	82
5.1.3	Análise de componente principal	86
6.	CONCLUSÕES	90
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
8.	PERSPECTIVAS FUTURAS	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
	ANEXOS	104

LISTA DE ABREVIÇÕES

Å – Ângstrons
AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais
ALB – Albumina sérica
ALB/GLOB - Relação albumina e globulinas séricas
ALKP – Fosfatase alcalina sérica
ALT - Alanina aminotransferase sérica
 α 1M - β 2-microglobulina
BUN - Nitrogênio ureico sérico
BUN/CREA - Fração nitrogênio ureico/creatinina sanguínea
 β 2M- β 2-microglobulina
CA – Cálcio sérico
CK – Creatina quinase
CREA – Creatinina
dL - Decilitro
DRC - Doença Renal Crônica
ECA - Enzima conversora de angiotensina
ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay*
ERI - Eritrócitos
FG – Filtração glomerular
g - Grama
GC – Grupo controle
GGT - Gama-Glutamiltransferase
GL – Grupo leishmaniose tratados
GLNT – Grupo leishmaniose não tratados
GLOB - Globulinas sérica
GLU - Glicose sérica
h – Hora
HGB – Hemoglobina
HCT - Hematócrito
IgA - Imunoglobulina A
IgG - Imunoglobulina G
IgM - Imunoglobulina M
IL -2- Interleucina-2
IL-18 - Interleucina-18
IFN- γ - Interferon- γ
IRA- Insuficiência Renal Aguda
IRC- Insuficiência Renal Crônica
IRIS - Sociedade Internacional de Interesse Renal
kDa – Quilodáton
Kg - Quilograma
KIM-1 - Molécula-1 de Lesão Renal

L – *Leishmania*
LV – Leishmaniose Visceral
LVC - Leishmaniose Visceral Canina
MA – Microalbuminúria
MBG - Membrana Basal Glomerular
Mg – Miligrama
 μL – Microlitro
NAG - N-acetil-b-D-glucosaminidase
NGAL - Gelatinase de Neutrófilos
OIE – Organização Internacional de Epizootias
PCR - Reação da Cadeia em Polimerase
PCT - Plaquetócrito
PDW - Amplitude de variação do tamanho das plaquetas
PHOS – Fósforo sérico
PLQ – Plaquetas
PM – Peso molecular
PT – Proteínas totais
RBP - Proteína Ligadora de Retinol
RPC - Relação proteína/creatinina urinária
RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta
RNAm – Ácido Ribonucleico mensageiro
SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio
SFM – Sistema Fagocítico Mononuclear
TFG - Taxa de Filtração Glomerular
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral- α
UCRE – Creatinina urinária
UPRO - Proteína urinária
VPM - Volume plaquetário médio

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Sistema de pontuação em escores de gravidade obtidos a partir da interpretação das bandas proteicas obtidas em gel de poliacrilamida pela técnica de SDS-Page para classificação de lesões tubulares em cães, segundo Hokamp <i>et al.</i> (2018).	63
Tabela 2	Sistema de pontuação em escores de gravidade obtidos a partir da interpretação das bandas proteicas obtidas em gel de poliacrilamida pela técnica de SDS-Page para classificação de lesões tubulares em cães, segundo Hokamp <i>et al.</i> (2018).	63
Tabela 3	Estadiamento da injúria renal aguda (IRA) segundo a sociedade internacional de interesse renal (IRIS) de cães infectados por <i>Leishmania infantum</i> tratados (GLT) e não tratados (GLNT).	74
Tabela 4	Valores de pH e de densidade urinária em cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT).	77
Tabela 5	Distribuição % de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT) apresentando proteinúria e bilirrubinúria, segundo tira reagente.	79
Tabela 6	Distribuição % de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT) apresentando alterações sedimentoscópicas.	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados saudáveis e/ou doentes no Brasil, segundo recomendação do BRASILEISH (2018).	52
Quadro 2	Lista de grupos experimentais, segundo diagnóstico e tratamento (GLT) ou não para leishmaniose visceral canina (GLNT), a serem comparados com um grupo de animais hígidos (GC).	55

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Janela de perfil de peso molecular em gel de leitura por SDS-PAGE obtidos de amostras de urina de cães.	62
Figura 2	Amostras de urina representativas de cães com amplo espectro de níveis de proteinúria apresentadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para demonstrar a aplicação do sistema de pontuação em gel.	64
Figura 3	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média do hematócrito (HCT), contagem de eritrócitos e determinação de hemoglobina (HGB) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	68
Figura 4	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da contagem total de leucócitos de cães	69

	hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	
Figura 5	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da contagem de plaquetas de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	71
Figura 6	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica de proteínas totais (PT), albumina (ALB) e globulinas (GLOB) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	72
Figura 7	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica das atividades de fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	73
Figura 8	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média das concentrações sérica de nitrogênio ureico sanguíneo (BUN) e creatinina (CREA) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	75
Figura 9	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	76
Figura 10	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média das concentrações séricas de cálcio (CA) e fósforo (PHOS) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	77
Figura 11	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da relação proteína creatinina urinárias (RPC) de cães hígidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	81
Figura 12	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média do número de bandas de eletroforese urinária	82

	de cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	
Figura 13	Gráficos demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da estratificação de peso molecular proteico de bandas de eletroforese urinária de cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	84
Figura 14	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média dos escores de severidade glomerular de bandas de eletroforese de cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	85
Figura 15	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média dos escores de severidade tubular de bandas de eletroforese urinária de cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	86
Figura 16	Gráfico dos primeiros dois eixos obtidos através da Análise de Componentes Principais.	87
Figura 17	Médias dos volumes calculados para cada peso molecular das proteínas urinárias de cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT).	88
Figura 18	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da presença de proteínas com peso molecular entre 9-18kDa e 24-30kDa em cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	89
Figura 19	Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da presença de proteínas com peso molecular 47-53kDa em cães hípidos (GC), infectados por <i>Leishmania infantum</i> e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.	89

RESUMO

A leishmaniose visceral canina (LVC), doença com alta prevalência no Brasil, tem como uma de suas principais consequências a injúria renal devido a lesões tubulares e glomerulares decorrentes principalmente da deposição de imunocomplexos. A presença de animais infectados assintomáticos dificulta o diagnóstico que deve ser realizado através da combinação de exames físico, parasitológico, sorológicos e moleculares. Após diagnóstico da infecção é primordial seu estadiamento para melhor composição do manejo terapêutico. Para tanto, são necessários marcadores que possam indicar a evolução e prognóstico da doença renal, uma das mais importantes ocorrências na LVC, que causa morte em muitos animais infectados. Na busca por um biomarcador precoce de injúria renal, este trabalho teve como objetivo determinar o perfil proteico urinário de cães infectados com leishmaniose tratados e sem tratamento. Para tanto, foram avaliados 30 cães oriundos do atendimento clínico ambulatorial de um Hospital Veterinário em Belo Horizonte. Todos os animais passaram por exames clínico, ultrassonográfico e laboratorial que incluíram biomarcadores renais como urinálise, relação proteína e creatinina urinárias (RPC), arginina dimetilada simétrica (SDMA), nitrogênio ureico sanguíneo (BUN) e creatinina sérica. Além disso, as proteínas urinárias foram caracterizadas através da técnica de eletroforese por SDS-PAGE, e assim, foi elaborado um perfil proteico urinário comparando pacientes hígidos não infectados, com cães infectados com *Leishmania infantum* com e sem tratamento. Os resultados demonstraram que os parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentaram comportamento semelhante entre os grupos de cães não infectados e de cães infectados tratados, entretanto um padrão muito heterogêneo de proteínas urinárias pode ser observado e diferiu entre animais hígidos não infectados e animais infectados com *L. infantum* com ou sem tratamento. Os resultados sugerem que a classificação da proteinúria pode ser uma ferramenta que auxilia no estadiamento de animais infectados por *L. infantum* podendo diferenciá-los quanto à gravidade de lesões renais existentes.

Palavras – Chave: rim, proteinúria, eletroforese, *Leishmania infantum*.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL), a disease with high prevalence in Brazil, has as one of its main consequences renal injury due to tubular and glomerular lesions resulting mainly from the deposition of immune complexes. The presence of asymptomatic infected animals hinders the diagnosis that must be made through the combination of physical, parasitological, serological and molecular tests. After diagnosis of the infection, its staging is essential for a better composition of the therapeutic management. For that, markers are needed that can indicate the evolution and prognosis of kidney disease, one of the most important occurrences in CVL, which causes death in many infected animals. Thus, in the search for an early biomarker of renal injury, this study aimed to determine the urinary protein profile of dogs infected with leishmaniasis treated and without treatment. For this, 30 dogs from an outpatient clinic at a Veterinary Hospital in Belo Horizonte were evaluated. All animals underwent clinical, ultrasound and laboratory tests that included renal biomarkers such as urinalysis, urinary protein and creatinine ratio (UPC), symmetrical dimethylated arginine (SDMA), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine. In addition, urinary proteins were characterized using the SDS-PAGE electrophoresis technique, and thus, a urinary protein profile was developed comparing healthy, uninfected patients with dogs infected with *Leishmania infantum* with and without treatment. The results showed that the hematological and biochemical parameters showed similar behavior between the groups of uninfected dogs and treated infected dogs, however a very heterogeneous pattern of urinary proteins can be observed and differed between healthy non-infected animals and animals infected with *L. infantum* with or without treatment. The results suggest that the classification of proteinuria can be a tool that helps in the staging of animals infected with *L. infantum* and can differentiate them in terms of the severity of existing kidney injuries

Keywords: kidney, proteinuria, electrophoresis, *Leishmania infantum*.

1. INTRODUÇÃO

O progresso na compreensão de mecanismos celulares e moleculares envolvendo a lesão renal aguda esclareceu mecanismos fisiopatológicos antes desconhecidos. Entretanto, esse conhecimento ainda não resultou na aplicação de tratamentos específicos ou efetivos para prevenir a ação dos agentes etiológicos ou mesmo excluí-los, o que dificulta o controle da progressão da injúria renal aguda e justifica os esforços para o reconhecimento e utilização de ferramentas diagnósticas e de estadiamento nas últimas décadas, especialmente na busca por novos marcadores de lesão e disfunção renal (MAGRO e VATTIMO, 2007).

Considerando que alterações glomerulares possam ser classificadas como injúria renal glomerular e que as principais glomerulonefrites apresentam uma origem imunomediada (VEADO *et al.*, 2014), os achados mais frequentemente relatados em pacientes com doença periodontal, piometra, hepatite infecciosa canina, erliquiose e leishmaniose visceral canina (LVC) são de origem renal. Tal fato se deve a produção de anticorpos, resultando em formação e deposição de imunocomplexos nos glomérulos favorecendo a lesão glomerular e podendo levar a insuficiência renal aguda (IRA), comprometendo a qualidade e a sobrevivência destes pacientes (GRAUER, 2010; CHEW *et al.*, 2011). Considerada enzoótica na mesorregião de Belo Horizonte, a LVC causa um quadro clínico polimórfico no qual as patologias renais estão entre as principais causas de morte (ZATELLI *et al.*, 2003).

Na busca por biomarcadores proteicos renais precoces, diversas técnicas, incluindo a eletroforese e a proteômica têm sido empregadas na expectativa de definir o segmento do néfron envolvido (THONGBOONKERD, 2004), entretanto, nenhum estudo foi encontrado utilizando estas técnicas como ferramenta discriminatória para cães infectados por *Leishmania (L.) infantum*, sendo este um estudo pioneiro.

O consenso em relação à taxa de excreção de proteína na urina ser um marcador da progressão da doença renal aponta que algumas proteínas urinárias têm um importante papel como biomarcadores de doença ou toxicidade renais (POLZIN *et al.*, 2005; LEFEBVRE, 2011). Sabe-se que a albuminúria é um importante indicador de perda da permeabilidade dos capilares glomerulares e, que na prática, pode indicar precocemente danos glomerulares e tubulares (DIBARTOLA, 2004; POLZIN, *et al.*, 2005).

Entretanto, o diagnóstico de uma injúria renal só pode ser realizado pela associação do quadro clínico laboratorial junto a composição e quantidade de proteínas presentes. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi traçar o perfil proteico urinário através da técnica de SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio) de cães saudáveis e infectados com *L.infantum* tratados e não tratados, em associação a biomarcadores do perfil renal destes pacientes.

2. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a proteinúria de cães infectados com *L.infantum* sem tratamento ou quando submetidos a protocolos terapêuticos preconizados pelo BRASILEISH.

2.1 Objetivos específicos

- Comparar resultados do hemograma, perfil bioquímico e urinário de cães saudáveis não infectados e aqueles infectados por *L.infantum*;
- Realizar a eletroforese em gel de agarose e SDS-PAGE de amostras de urina de cães saudáveis não infectados e aqueles infectados por *L.infantum* para determinar o perfil proteico urinário de cães saudáveis não infectados e aqueles infectados por *L.infantum* pela técnica de SDS-PAGE;
- Comparar características do hemograma, perfil bioquímico com resultados da eletroforese urinária em cães com o diagnóstico clínico e laboratorial de cães infectados com *L.infantum*, submetidos ou não a tratamento;
- Correlacionar o traçado eletroforético da urina ao tratamento de cães infectados com *L.infantum*;
- Definir as bandas eletroforéticas de interesse discriminatório entre cães saudáveis e doentes para posterior análise proteômica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definição e classificação de injúria renal aguda

Alterações renais são cada vez mais frequentes na clínica médica de pequenos animais, possivelmente decorrente do aumento da longevidade desses animais, com conseqüente desenvolvimento de doenças relacionadas à senilidade, que provocam direta ou indiretamente danos renais, como cardiopatias e neoplasias. A necessidade do uso de fármacos com potencial nefrotóxico, comumente necessária na terapêutica dessas alterações também colabora com o aumento da prevalência. Associado a esta casuística o reconhecimento dos médicos veterinários a partir de métodos mais eficazes, também favorece o aumento da identificação de alterações renais em cães e gatos (DIBARTOLA, 2004; POLZIN *et al.*, 2005; COWGILL *et al.*, 2016).

Os rins são responsáveis pela manutenção da homeostase através de funções como regulação da osmolaridade e do volume dos fluidos corporais, manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e ácido base, excreção de metabólitos e substâncias exógenas como medicamentos, além da produção de hormônios como eritropoietina e calcitriol (POLZIN *et al.*, 2005; GRAUER, 2010). Assim, quando a função renal está normal, os rins mantêm sua capacidade funcional de filtração, reabsorção, secreção e excreção, não permitindo, sobretudo, o acúmulo de compostos, que são normalmente excretados. Dessa forma, o desempenho renal interfere diretamente na homeostase do organismo, uma vez que se ocorrer injúria, uma ou mais funções podem ser alteradas (POLZIN *et al.*, 2005; VEADO *et al.*, 2014).

Durante o 8º Congresso Anual da Sociedade Europeia de Medicina Veterinária Interna em Viena (1998), um grupo de médicos veterinários independentes, especialistas em Nefrologia, formou a Sociedade Internacional de Interesse Renal, denominada IRIS, que em 2013 publicou os critérios para o estadiamento da injúria renal aguda e vem apresentando diretrizes para diferentes alterações renais em cães e gatos (IRIS, 2019). A IRIS esclarece que, os danos ou injúrias renais antecedem a disfunção e, apesar da presença de um dano renal, a capacidade de concentrar urina pode permanecer intacta, não havendo azotemia, mas gerando uma doença renal discreta em alguns casos (COWGILL *et al.*, 2016).

Quando um dano renal é suficiente para provocar perda da reserva funcional ocorre uma redução na capacidade de concentrar urina e, dessa forma, há uma insuficiência renal, mas

ainda pode não haver azotemia. Se os danos persistirem até o ponto em que, além da capacidade de concentração ou diluição da urina, houver acúmulo de resíduos nitrogenados não proteicos no sangue, caracteriza-se uma insuficiência renal. Quando esta insuficiência progride e quantidades crescentes de produtos são observados em associação a alterações metabólicas, provocando efeitos adversos, clinicamente evidentes, tem-se uma insuficiência renal clínica, que pode evoluir até uma síndrome urêmica levando ao óbito (BERGSTRÖM, 2004; SQUIRES, 2014).

As insuficiências renais são diagnosticadas com facilidade pelos veterinários, entretanto nem sempre o tipo de insuficiência é identificado, comprometendo o tratamento e o prognóstico dos pacientes. Quando o termo insuficiência é empregado, implica na necessidade de identificar quais funções estão alteradas, assim como se esta insuficiência é aguda ou crônica (VEADO *et al.*, 2014).

Embora os dados do histórico e achados clínico-patológicos associados à IRA e insuficiência renal crônica (IRC) possam ser semelhantes, o tratamento subsequente e o prognóstico são muito diferentes (DIBARTOLA, 2004; POLZIN *et al.*, 2005; COWGILL *et al.*, 2016).

O início e a gravidade das alterações clínicas em pacientes com doença renal podem variar de acordo com a natureza, duração, presença de comorbidade, idade do paciente e administração de agentes terapêuticos (DIBARTOLA, 2004; POLZIN *et al.*, 2005).

Os sinais clínicos do paciente com IRA são inespecíficos e envolvem; desidratação, apatia, inapetência, quadros de vômitos e/ou diarreias, não havendo, portanto, nenhum sinal patognomônico (DIBARTOLA, 2004; VEADO *et al.*, 2014). O aparecimento dessas manifestações clínicas é decorrente da redução nas funções renais, acompanhada do acúmulo de metabólitos e a síndrome urêmica (BERGSTRÖM, 2004; SQUIRES, 2014).

Um rim pode estar doente, mas ainda assim não apresentar insuficiência, já que consegue exercer suas funções mantendo o volume e a composição equilibrada do fluido extracelular. Ou seja, um rim com alterações morfológicas pode ser suficiente, entretanto, mesmo que não apresente lesões perceptíveis pode estar com sua função comprometida (DIBARTOLA, 2004; VEADO *et al.*, 2014). Um bom exemplo disso são as alterações congênitas como as displasias renais, citadas por Polzin *et al.* (2005).

A IRIS esclarece que a IRA se refere desde a uma lesão renal contínua leve, assintomática, até uma insuficiência grave, causadas comumente por agressões obstrutivas, infecciosas, isquêmicas ou tóxicas aos rins. Assim, a forma de classificação da IRA proposta visa o reconhecimento da gravidade da doença e permite melhor acompanhamento e manejo clínico dos pacientes (COWGILL *et al.*, 2016).

A IRIS classifica a IRA em 5 graus fundamentados em critérios clínico-laboratoriais. A seguir são apresentadas as classificações clínicas com o objetivo de definir termos, causas e consequências.

3.1.1 Injúria Renal Aguda

O termo injúria renal mostra que existe uma lesão inicial que começou antes da perda da função renal excretora (DIBARTOLA, 2004; VEADO *et al.*, 2014). Qualquer condição que cause lesão ao glomérulo, túbulo ou interstício renal é considerada uma injúria. As injúrias podem ser discretas e não causarem nenhum dano significativo ao parênquima, mas podem ser a causa de insuficiência funcional renal. Essas injúrias, geralmente de ocorrência súbita, podem causar IRA ou gerar, de forma lenta e gradual, lesões irreversíveis, desencadeando doença renal crônica (DRC) (DIBARTOLA, 2004; COWGILL *et al.*, 2016).

A susceptibilidade às injúrias como a isquemia e substâncias tóxicas se deve às particularidades fisiológicas e anatômicas renais. O grande fluxo de sangue renal, de aproximadamente 20% do débito cardíaco, resulta em um maior contato com substâncias tóxicas comparação com outros órgãos. O córtex renal é especialmente suscetível à isquemia e à exposição de substâncias tóxicas porque recebe 90% do fluxo de sangue renal. Na região medular, o túbulo proximal e as células epiteliais da alça espessa de Henle são mais frequentemente afetados por isquemia e lesão tóxicas devido a altas taxas metabólicas e sua função de transporte (SQUIRES, 2014).

A lesão das células renais pode ser letal ou subletal. A lesão subletal representa um componente importante na IRA, pois pode influenciar profundamente na TFG e no fluxo sanguíneo renal. A natureza da resposta de recuperação é mediada pelo grau em que as células podem restaurar a função normal e promover a regeneração (GRAUER, 2010; BASILE *et al.*, 2014). A recuperação bem-sucedida da IRA depende, portanto do grau em que esses

processos de reparo sobrevêm, e estes reparos podem estar mais comprometidos em pacientes idosos ou com DRC (BASILE *et al.*, 2014).

O diagnóstico de injúria não é possível através da mensuração da creatinina sérica, uma vez que o aumento superior ao limite de referência só ocorre quando há perda de pelo menos 65% da massa renal funcional (LEFEBVRE, 2011), sendo assim, em pacientes com risco de injúria outros métodos como as quantificações de enzimas urinárias têm sido utilizados para o reconhecimento da nefrotoxicidade precoce em cães. As enzimas gama-glutamyltransferase (GGT) e N-acetil-b-D-glucosaminidase (NAG) podem ser dosadas na urina, sendo indicadores precoces de lesão tubular (GRAUER, 2010; TASSINI *et al.*, 2016).

3.1.2 Insuficiência Renal Aguda

O termo insuficiência indica situações em que há perda de função, mas ainda há mecanismos de compensação do rim através da hipertrofia ou hiperplasia de néfrons (POLZIN *et al.*, 2005). A IRA pode ser definida então, como uma manifestação súbita de sinais que sugerem a diminuição do número de néfrons e, assim a perda da capacidade dos rins em manter o exercício de uma ou mais funções, devido a um fator primário. É caracterizada pela diminuição da função renal e pela incapacidade de regular o equilíbrio acidobásico e hidroeletrólítico (GRAUER, 2010; VEADO *et al.*, 2014). Uma característica subjacente é um rápido declínio na TFG, geralmente associado a reduções no fluxo sanguíneo renal (BASILE *et al.*, 2014).

A IRA tem quatro fases distintas que são classificados como: iniciação, extensão, manutenção e recuperação. A iniciação refere-se à exposição à nefrotoxinas ou à isquemia, antes do início da azotemia. Está associada ao aumento crescente do número e da gravidade das lesões glomerulares ou tubulares no decorrer do tempo se a agressão renal não for descontinuada. Caso haja remoção da causa incitante, logo no início, haverá restabelecimento da normalidade. Assim, durante a fase de iniciação, medidas terapêuticas que reduzem o insulto renal têm o potencial de prevenir o desenvolvimento da IRA estabelecida. Nesta fase o paciente ainda não apresenta sinais clínicos nem alterações laboratoriais detectáveis pelos métodos tradicionais (CHEW *et al.*, 2011; BASILE *et al.*, 2014).

A identificação de pacientes em risco de desenvolver IRA permite ao clínico aumentar o monitoramento durante procedimentos e terapias que podem ser considerados nefrotóxicos.

Este monitoramento auxilia na detecção de dano tubular na fase de iniciação (GRAUER, 2014). Neste contexto, o diagnóstico precoce é de fundamental importância, uma vez que a maior parte das doenças renais só se manifesta clinicamente quando mais de 50% a 75% da função renal já está comprometida (LEFEBVRE, 2011; DUSSE *et al.*, 2017).

Na fase de extensão o insulto inicial amplifica-se, visto que a causa base continua a causar lesões e, conseqüentemente induz a resposta inflamatória. A fase de extensão pode variar entre um a dois dias, tempo suficiente para que ocorra redução da TFG (BASILE *et al.*, 2014).

Estabelecidas às lesões tubulares, resultando em disfunção nos néfron caracteriza-se a fase de manutenção. A entrada nessa fase significa que uma quantidade significativa de injúrias ocorreu nos túbulos renais, que levaram a uma redução no fluxo sanguíneo renal e na TFG. Mesmo que a causa desencadeante da injúria seja identificada e removida, não há retorno imediato da função renal normal (CHEW *et al.*, 2011; BASILE *et al.*, 2014). A intervenção terapêutica durante esta fase, embora potencialmente importante para preservar a vida, geralmente é incapaz de diminuir as lesões renais já existentes (GRAUER, 2014). Ou seja, esta fase é caracterizada pelo aumento persistente da concentração sérica de creatinina, mesmo após correção dos fatores pré-renais como restauração do volume extracelular e do débito cardíaco. Nesta fase a fluidoterapia é a fundamental para o tratamento de suporte (CHEW *et al.*, 2011; GRAUER, 2014).

A fase de recuperação é o período em que as lesões renais são reparadas e os néfrons viáveis sofrem hipertrofia resultando em melhora da função renal. Os danos tubulares associados à IRA podem ser reversíveis, se a membrana basal tubular estiver intacta e células epiteliais viáveis estiverem presentes, caso contrário, haverá lesão renal irreversível com perda de néfrons e subsequente fibrose renal, resultando em DRC (GRAUER, 2010; CHEW *et al.*, 2011; BASILE *et al.*, 2014).

Devido a grande importância na identificação da causa na IRA, essa condição é classificada de acordo com a injúria que a provocou, ou seja, pré-renal, renal ou pós-renal (GRAUER, 2010; VEADO *et al.*, 2014). Essa classificação sugere também o prognóstico do paciente (CHEW *et al.*, 2011).

3.2 Comparação entre insuficiência renal aguda e doença renal crônica

IRA e DRC representam dois processos distintos de dano renal. Enquanto a IRA representa um dano ativo que progride rapidamente, a DRC representa um dano lento, mas também progressivo. Ultimamente, tem sido sugerido que IRA e DRC possam não ser entidades independentes, pois são influenciadas por várias condições similares, compartilham fatores de risco comuns e, em última análise uma interfere no prognóstico da outra, uma vez que a IRA é um fator de risco para DRC e vice-versa. O reconhecimento de dano renal ativo em curso em pacientes com DRC pode sugerir que a fisiopatologia da IRA e da DRC compartilham mais características do que as atualmente reconhecidas, e a principal diferença entre elas é a taxa de progressão da doença (COWGILL *et al.*, 2016).

As principais sequelas da IRA se devem a presença de áreas parenquimatosas perdidas, como lesões cicatriciais, fibroses e perda de néfrons que caracterizam um problema de caráter crônico (POLZIN *et al.*, 2005; VEADO *et al.*, 2014).

As observações através de exames ultrassonográficos nos rins de cães e gatos com IRA são geralmente inespecíficas, o rim pode estar aumentado ou apresentar sua região cortical normal ou espessada e também ligeiramente hiperecoica. Uma linha hiperecogênica, denominada linha ou sinal medular é observada na junção corticomedular (GRAUER, 2010; PENNICK e D'ANJOU, 2015). Também é difícil diferenciar um paciente IRA de um DRC apenas pelos níveis séricos de ureia e creatinina ou mesmo propor a origem, se pré, renal ou pós-renal. Dessa forma a associação clínica aos achados clínico-laboratoriais e, mais especificamente a definição da causa, são mandatórios para o tratamento e definem o prognóstico dos pacientes (VEADO *et al.*, 2014).

Na urinálise é importante verificar a densidade, que comumente se encontra normal ou aumentada, diferente do observado em cães portadores de DRC, que são geralmente isostenúricos. Alterações como proteinúria, cilindrúria, hematúria e alterações do pH podem ser observadas em ambas as doenças (VEADO *et al.*, 2014). O débito urinário pode ou não apresentar diminuição, entretanto, a oligúria é um forte indicativo de que os rins estão começando a apresentar falhas de função (GRAUER, 2010; COWGILL *et al.*, 2016).

Na classificação proposta pela IRIS, diferente da IRA, os subestágios na DRC estão relacionados à proteinúria renal e à hipertensão arterial sistêmica, considerados como fatores

independentes de progressão da DRC e que interferem no prognóstico e requerem intervenção terapêutica específica (COWGILL *et al.*, 2016).

3.3 Relação entre fisiologia glomerular e proteinúria

O glomérulo consiste em um arranjo em paralelo de alças capilares sustentado por células e por uma matriz mesangial. O sangue é seletivamente filtrado pelo glomérulo, à medida que se move da arteríola aferente através dos capilares glomerulares em direção à arteríola eferente. Os componentes estruturais da parede do capilar glomerular isolam o sangue do espaço urinário e formam uma barreira à filtração, com seletividade para carga e tamanho. Esta barreira de filtração glomerular permite a passagem imediata de líquido e de pequenas moléculas do sangue para o interior do espaço urinário, mas previne que as células sanguíneas e as proteínas plasmáticas sejam filtradas (BONEGIO e SALANT, 2011).

É essencial que os glomérulos funcionem como filtros para retenção de proteínas, sendo essa conservação necessária para a regulação da pressão oncótica, coagulação sanguínea e outros processos vitais. Em indivíduos saudáveis, essa pequena quantidade de proteínas que chega ao filtrado glomerular é quase totalmente reabsorvida pelos túbulos proximais (SANTOS *et al.*, 2001; HARLEY e LANGSTON, 2012).

Portanto, os glomérulos desempenham a função de gerar um ultrafiltrado de plasma, a etapa inicial do processo de formação de urina. Em humanos, aproximadamente 180 litros de ultrafiltrado glomerular são formados a cada 24 horas. Antes de atravessar o capilar glomerular, este fluido contém aproximadamente 11.000 a 14.000g de proteínas, enquanto que, em condições normais, a excreção urinária de proteínas em 24 horas é inferior a 0,2-0,3g (KASISKE e KEANE, 2000). Em cães a quantidade de ultrafiltrado varia em torno de 3 a 6 litros por quilo em 24 horas (FINCO, 1995; GRAUER, 2010), já o valor normal de excreção proteica urinária de 24 horas em cães e gatos deve ser inferior a 20mg/kg por dia (até 50mg/dl) (DIBARTOLA, 2004). Devido à barreira representada pelos poros capilares, proteínas com peso molecular maior que 60.000 a 65.000 dáltons não devem estar presentes em grandes quantidades no filtrado glomerular normal (DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010).

A urina final em humanos é composta por aproximadamente 40% de albumina, 40% de proteína de Tamm-Horsfall e 20% de IgA (Imunoglobulina A), IgG (Imunoglobulina G) e

cadeias leves κ e λ (MORALES, 2002). Já o filtrado glomerular inicial de cães e gatos saudáveis contém apenas 2-3mg/dl de albumina em comparação com cerca dos 4g/dl encontrados no plasma. As proteínas de menor peso molecular, bem como as proteínas maiores carregadas positivamente que passam pela parede capilar glomerular, são quase completamente reabsorvidas pelas células epiteliais tubulares. Tais proteínas reabsorvidas podem ser decompostas e usadas pelas células epiteliais ou devolvidas ao plasma como aminoácidos constituintes. Essa reabsorção ocorre principalmente nos túbulos contorcidos proximais e reduz a concentração de albumina na urina normal para concentrações inferiores a 1mg/dl (LAFAYETTE *et al.*, 1997; KASISKE e KEANE, 2000; GRAUER, 2016).

A barreira de filtração é composta por três camadas: a camada de células endoteliais fenestradas, que reveste as alças capilares, a membrana basal glomerular (MBG) e a camada de células epiteliais glomerulares viscerais, frequentemente denominadas podócitos, por apresentarem processos podais interdigitantes (BONEGIO e SALANT, 2011). A primeira barreira à passagem das proteínas é a camada de células endoteliais que, ao contrário de outros capilares do organismo, apresenta grandes fenestras cujo diâmetro pode chegar a centenas de angstroms (Å), sendo incapaz de discriminar as macromoléculas pelo tamanho (BONEGIO e SALANT, 2011; HARLEY e LANGSTON, 2012).

A membrana basal glomerular é a segunda camada a oferecer resistência à filtração das macromoléculas. Esta camada não contém elementos celulares, sendo um arranjo complexo de colágeno, proteoglicanos e outras moléculas. O colágeno tipo IV dentro da membrana basal da parede capilar glomerular restringe a filtração da maioria das proteínas plasmáticas, principalmente com base no peso e tamanho moleculares (KASISKE e KEANE, 2000; BONEGIO e SALANT, 2011). A albumina (69.000 Da) e proteínas maiores normalmente não estão presentes em grandes quantidades no filtrado glomerular devido a essa permeabilidade seletiva (GRAUER, 2016).

Finalmente, a camada de células epiteliais, com os podócitos e seus prolongamentos denominados pedicelas, não representa obstáculo importante à passagem das macromoléculas (KASISKE e KEANE, 2000; BONEGIO e SALANT, 2011). As funções do podócito incluem manutenção da integridade da barreira de filtração, síntese e manutenção da MBG, produção e secreção dos fatores de crescimento, neutralização da pressão no capilar glomerular, e

regulação dinâmica de sua arquitetura (HARLEY e LANGSTON, 2012; RODRIGUES, 2012).

Qualquer natureza de lesão quer seja, imunológica, tóxica, infecciosa ou isquêmica, determina uma capacidade limitada de proliferação de podócitos *in situ*, geralmente ocorrendo necrose, apoptose ou perda de adesão à MBG. Em modelos experimentais a reposição da célula podocitária pode ocorrer por migração sanguínea de células tronco ou parietais da cápsula de Bowman ao tufo glomerular (PRODROMIDI *et al.*, 2006).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a injúria ao podócito causada por fusão podocitária, deposição de anticorpos e imunocomplexos com inflamação induz a diminuição da expressão de suas proteínas no tecido renal. Especula-se que o descolamento dos podócitos da MBG e consequente excreção urinária de células viáveis ou em apoptose possam ser identificados através de testes de PCR (Reação da Cadeia em Polimerase) em tempo real com amostras do sedimento urinário, pelo aumento da expressão do RNAm de proteínas como a nefrina, podocina, podocalixina, sinaptopodina e alfa actinina-4 (PRODROMIDI *et al.*, 2006).

Os espaços vazios entre as pedicelas são cobertos por uma membrana muito delicada denominada de *slit membrane* ou fenda diafragmática, que consiste em uma junção intercelular especializada situada entre os podócitos. Essa fenda forma a barreira tamanho-seletiva final contra a passagem das proteínas plasmáticas, ou seja, é a última e mais eficiente barreira à filtração de macromoléculas (KASISKE e KEANE, 2000; BONEGIO e SALANT, 2011).

Diversas substâncias existentes nessas camadas, como o ácido siálico, sulfato de heparan e sialoglicoproteínas, que são responsáveis pela eletronegatividade do glomérulo (LAFAYETTE *et al.*, 1997), que presentes na superfície das células endoteliais e podócitos, bem como na MBG, repelem a passagem de moléculas aniônicas como, por exemplo, a albumina (LAFAYETTE *et al.*, 1997; KASISKE e KEANE, 2000; BONEGIO e SALANT, 2011).

Apesar da participação de carga negativa na seletividade glomerular ser discutida, um estudo com rim perfundido *in vivo* utilizando desidrogenase (molécula 2 vezes maior que albumina) carregada negativa e positivamente mostrou a ocorrência de depuração fracionada catiônica

maior do que a aniônica. Esses dados sugerem seletividade de carga, inclusive para proteínas maiores que a albumina (LINDSTRÖM *et al.*, 1998).

A seletividade por tamanho molecular também foi discutida e demonstrada por vários autores, dentre eles, Oliver *et al.* (1992) que utilizaram *ficoll*, uma molécula esférica semelhante à albumina e obtiveram resultados que sugeriram que os poros medem em torno de 30Å. Entretanto, ainda não há um consenso acerca dos tamanhos desses poros e sua distribuição ao longo da MBG. Duas teorias explicam a permeabilidade da parede do capilar glomerular. A primeira é a teoria dos isoporos, que sugere que a barreira seria uma membrana perfurada por poros cilíndricos do mesmo tamanho com alguns raros poros maiores. A segunda é a teoria dos heteroporos que sugere a existência de uma distribuição log-normal de populações de poros pequenos e outra de poros maiores (DEEN, 1985; SANTOS, 2001). Entretanto, nos estados proteinúricos, acredita-se que haja existência de maior quantidade de poros grandes, permitindo maiores perdas proteicas urinárias. Um estudo realizado em pacientes diabéticos humanos albuminúricos, demonstrou haver, além das alterações no número de poros grandes, menor seletividade por carga (RIPPE *et al.*, 2007).

Como visto, a barreira de ultrafiltração glomerular seleciona, a passagem de proteínas de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica. Assim, as proteínas consideradas de alto peso molecular, ou seja, maior ou igual a 60 quilodáltons (kDa), como por exemplo a IgG (150kDa), são retidas pela barreira de ultrafiltração glomerular que, por outro lado, permite a passagem de pequenas quantidades de proteínas de peso molecular considerado intermediário, como é o caso da albumina (67 kDa), e de proteínas de baixo peso molecular (<60kDa), como a NGAL e a β 2 microglobulina (SANTOS *et al.*, 2001; GRAUER, 2016).

Uma vez que proteínas com peso molecular intermediário ou baixo tenham ultrapassado a barreira de filtração glomerular, são reabsorvidas no túbulo contorcido proximal, por meio do complexo de receptores megalina-cubilina. Estes receptores estão expressos na borda em escova do túbulo proximal e realizam a endocitose das referidas proteínas, que são transportadas por meio da formação de vesículas até os lisossomos, para que sejam degradadas em aminoácidos, ao passo que o complexo de receptores megalina-cubilina é reencaminhado para a membrana apical celular (SANTOS *et al.*, 2001). A reabsorção de proteínas pelas células epiteliais tubulares, no entanto, tem um transporte máximo. A proteinúria tubular pode ocorrer se esse valor for excedido, por exemplo, com a produção

excessiva de proteínas de baixo peso molecular como as proteínas de Bence Jones, ou se o dano às células epiteliais tubulares, devido ao dano nefrotóxico ou doença túbulo intersticial crônica, diminuir sua capacidade reabsortiva (GRAUER, 2016).

Os resultados de exames que identificam a presença de proteína na urina não devem nunca ser analisados de forma isolada, mas em conjunto com histórico, anamnese e exame clínico, associado ao menos com um exame de urina completo. Assim, o clínico poderá ter informações importantes sobre a saúde e até mesmo prognósticos de seus pacientes.

A proteinúria é uma ferramenta valiosa para o clínico, entretanto o conhecimento de suas variáveis é de extrema importância para a tomada de decisões em relação ao manejo e conduta dos pacientes que a apresentam.

Vale ressaltar a importância de pesquisas para a obtenção de informações mais precisas a respeito da identificação e circunstâncias em que essas proteínas são excretadas. A proteômica acrescenta novos enfoques ao diagnóstico e à compreensão da patogênese de muitas doenças, seu estudo promete fornecer informações sobre o curso clínico e valor preditivo, que por anteciparem o curso de doenças favorecem muito o prognóstico das mais variadas enfermidades em diferentes espécies.

3.4 Avaliação renal através de biomarcadores além da proteinúria

Um biomarcador renal ideal deve atender a vários requisitos como: ser detectável na urina e/ou no sangue, ser preditivo de lesão renal com alta sensibilidade e especificidade, fornecer informações sobre a etiologia e sobre a localização da lesão, além de refletir a gravidade da lesão, os processos de reparo, e finalmente prever a probabilidade de recuperação. Entretanto devem estar disponíveis ao clínico a um custo acessível (SEGEV, 2018).

A avaliação renal através dos biomarcadores ureia e creatinina séricas ainda são utilizadas na rotina clínica, apesar das suas deficiências (COCA *et al.*, 2008; DUSSE *et al.*, 2017, SEGEV, 2018). A ureia, comumente referida como a concentração de nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), é eliminada principalmente pelos rins, sendo filtrada livremente pelos glomérulos e, grande parte reabsorvida pelos túbulos. É importante lembrar que a ureia não é reabsorvida de forma constante, ou seja, a taxa de reabsorção depende do fluxo de urina tubular e aumenta à medida que o fluxo urinário diminui como, por exemplo, na desidratação. Suas limitações

também envolvem interferências por fatores extrarrenais, que podem elevar sua concentração sérica, tais como: hemorragia gastrointestinal, terapia com corticosteroide, dietas com alto teor proteico, obstrução uretral e ruptura de bexiga (GRAUER, 2010; LEFEBVRE, 2011; STOCKHAM e SCOTT, 2011).

A creatinina também tem importantes limitações, como sua alta variabilidade entre as raças caninas, resultando em um amplo intervalo de referência para essa espécie. Esse biomarcador também é influenciado por fatores extrarrenais, como idade, sexo, massa muscular e a ingestão proteica, portanto, possui baixa especificidade (GRAUER, 2010, SEGEV, 2018). Entretanto, é importante reforçar que apesar de ser considerado um biomarcador tardio, pequenos aumentos da creatinina sérica são monitorados e considerados como fator preponderante para estadiamento e definição do prognóstico dos pacientes renais (LEVI *et al.*, 2013; COWGILL *et al.*, 2016).

Assim, ureia e creatinina séricas são marcadores funcionais e só serão detectados aumentos em suas concentrações após o comprometimento de mais de 65% dos néfrons, e como visto, ainda pode haver situações de elevações sem lesão renal (COCA *et al.*, 2008; DUSSE *et al.*, 2017). Essa característica compromete intervenções terapêuticas antes do quadro de insuficiência ter sido instalado.

A redução da TFG ocorre muito antes dos aumentos de ureia e creatinina séricas, por isso sua mensuração pode ser indicada para avaliação e acompanhamento da função renal, pois afere com alta sensibilidade a capacidade de filtração e habilidade de excreção urinária (BROWN *et al.*, 1997, DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010). Por meio da seguinte fórmula matemática obtém-se o valor da TFG:

$$TFG = \frac{Cr_u \text{ (mg/dl)} \times Vol_u \text{ (ml)}}{Cr_{ser} \text{ (mg/ml)} \times T \text{ (min)} \times PV \text{ (kg)}}$$

Onde:

TFG= Taxa de filtração glomerular

Cr_u= concentração urinária de creatinina

Vol_u= volume de urina

Cr_{ser}= concentração sérica de creatinina

T= tempo em minutos (1.440 minutos)

Entretanto, a necessidade do conhecimento exato da produção urinária por pelo menos 2 horas e a influência de fatores extrarrenais, como ingestão proteica e hidratação, além da grande instabilidade da função excretora que ocorrem nos pacientes com IRA diminuem a utilização desta avaliação na rotina clínica (KIRSZTAJN, 2007; LEFEBVRE, 2011).

Na veterinária, análises que indicam injúrias renais, como a dosagem de atividade urinária de enzimas como a GGT e a NAG, que permitem detecção precoce de lesão tubular já vêm sendo realizadas (GRAUER, 2010; TASSINI *et al.*, 2016). As relações GGT:creatinina e NAG:creatinina urinária refletem a excreção urinária de 24 horas da GGT e da NAG em cães, quando determinadas antes do surgimento da azotemia. Os valores individuais basais de GGT:creatinina e NAG:creatinina urinários, portanto, devem ser determinados em todos os cães que receberão fármacos potencialmente nefrotóxicos (VEADO *et al.*, 2010; GRAUER, 2010). Aumentos de 2 a 3 vezes na relação GGT:creatinina e NAG:creatinina em relação ao valor basal são sugestivos de lesão tubular clinicamente relevante (GRAUER, 2010). Entretanto, alguns fatores extrarrenais podem influenciar nesta enzimúria, como por exemplo: febre, septicemia, hepatopatias e diabetes (FREITAS *et al.*, 2014).

A cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular sintetizada em ritmo constante, assim, a sua concentração sérica depende fundamentalmente da TFG e não tem interferência de massa muscular, estado nutricional, sexo ou febre. Entretanto, métodos específicos para medida da cistatina C, em veterinária, não estão disponíveis para utilização na rotina (BROWN, 2015; SOUZA, 2017).

A arginina dimetilada simétrica (SDMA) é uma forma metilada do aminoácido arginina e trata-se de um biomarcador específico da função renal. Assim como a creatinina, o SDMA é um marcador de filtração, mas não é influenciado pela massa muscular e, portanto, seu intervalo de referência é mais uniforme. Estudos em cães e gatos relataram detecção precoce de progressão da DRC usando SDMA, e por isso esse exame vem sendo recomendado nas diretrizes da IRIS para estadiamento dos pacientes com DRC (BROWN, 2015). A dosagem de SDMA já tem sido utilizada, portanto na rotina de atendimentos de cães e gatos como biomarcador precoce de disfunção renal e no monitoramento de pacientes nefropatas, principalmente naqueles em que os valores de creatinina e a ureia séricas apresentam-se ainda dentro do intervalo de referência (DRC estágio 1) (NASCIMENTO *et al.*, 2017). Assim como com a ureia e a creatinina, a SDMA deve sempre ser interpretada à luz dos achados do exame

clínico para descartar as causas responsivas ao aumento de azotemia. Nos casos de aumentos sutis de SDMA sérica, o IRIS recomenda estudar outros fatores para corroborar ou refutar o diagnóstico de DRC. O grupo IRIS sugere que as relações séricas de SDMA/creatinina possam ter valor prognóstico em cães e gatos com DRC, desde que o valor de SDMA seja maior que 14 μ g/dl (IRIS, 2016).

Por todos os motivos expostos acima, estas ferramentas laboratoriais têm sido apontadas como biomarcadores renais. Biomarcadores são parâmetros biológicos que podem ser quantificados para determinar processos fisiológicos normais, alterações patológicas ou respostas à intervenção terapêutica (AMORIM, 2003).

Ainda não foi determinado quando e se os biomarcadores podem atender a todos esses requisitos, mas é improvável que um deles sozinho forneça todas essas informações. Um painel completo de biomarcadores provavelmente terá um custo elevado, assim um painel mais direcionado de biomarcadores poderá ser indicado, cada um fornecendo informações complementares únicas e específicas (SEGEV, 2018).

Na busca por biomarcadores proteicos precoces, diversas técnicas para análise da proteômica são empregadas. A eletroforese tem sido utilizada para identificar as proteínas na urina de acordo com o peso molecular. A presença de algumas já estão bem definidas em relação ao segmento do néfron envolvido (THONGBOONKERD, 2004). Por exemplo, proteínas com massa molecular maior ou igual 100.000 dáltons aparecem na urina somente quando há avançado comprometimento da membrana glomerular, envolvendo a perda da função. Neste caso, a proteinúria não é seletiva e a principal representante é a IgG. Já a presença das proteínas, com massa entre 50.000 e 80.000 dáltons, representa um possível dano reversível no glomérulo, sendo uma proteinúria glomerular seletiva. Proteínas típicas deste grupo envolvem a albumina e a transferrina. Entretanto, proteínas com massa menor que 50.000 dáltons, ou seja, de baixo peso molecular estão normalmente presentes em danos renais intersticiais. Assim, a função de reabsorção fica diminuída resultando em proteinúria tubular. As proteínas marcadoras deste grupo são: α 1-microglobulina (α 1M), β 2-microglobulina (β 2M) e proteína ligadora de retinol (RBP) (MOTTA, 2000).

Em 2001, através da técnica de espectrometria de massa com cromatografia, 124 diferentes proteínas foram identificadas na urina humana. Em 2004 esse número aumentou para 150 e em 2006 para 1543, com a utilização de técnicas mais sensíveis. Atualmente, mais de 2.000

proteínas foram identificadas na urina humana normal por meio de abordagem baseada em afinidade e não afinidade à lectina, seguida por separação por SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio-duodecil sulfato) (BEASLEY-GREEN, 2016). Assim, muitos biomarcadores urinários são candidatos ao diagnóstico precoce de IRA entre eles destacam-se: Interleucina-18 (IL-18), molécula 1 de dano renal-1 (KIM-1), N-acetil- β -D-glucosaminidase (NAG), lipocalina neutrofílica associada à gelatinase (NGAL), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), cistatina C (Cys), aprotinina, albumina, α -1-antitripsina, α 1 e β -2-microglobulina, fibrinogênio α e colágenos 1α (I) e 1α (III), zinco-alfa-2-glicoproteína e um fragmento de proteína de ligação a adrenomedulina, entre outros (VAIDYA *et al.*, 2008; KALANTARI *et al.*, 2015).

Logo, algumas proteínas urinárias podem ter um importante papel como biomarcadores de doenças ou toxicidade renais (THONGBOONKERD, 2004; COCA *et al.*, 2008). Em medicina veterinária, muitos estudos já foram realizados abordando a proteinúria em doenças comuns em cães, como leptospirose, leishmaniose e piometra. Entretanto, esses estudos não citam as proteínas encontradas, apesar de indicarem o segmento do néfron envolvido, de acordo com o peso molecular dessas proteínas (SCHULTZE e JENSEN, 1998; ZARAGOZA *et al.*, 2003; ZARAGOZA *et al.*, 2004).

Muito mais que a identificação de proteínas, a proteômica abrange a caracterização quantitativa, funcional, estrutural e pós-traducional de proteínas, bem como possibilita determinar relações entre elas e delas com o sistema biológico (BENSIMON *et al.*, 2012). Assim, a análise proteômica urinária permitirá essa caracterização proteica, gerando novas hipóteses, melhor entendimento da fisiologia do organismo, bem como dos mecanismos de doenças, podendo representar diagnóstico precoce, além de propor novas terapias e conduzir a utilização de fármacos (THONGBOONKERD, 2004).

3.5 Patofisiologia das proteínas urinárias em cães portadores de IRA e DRC

Os principais autores da nefrologia veterinária definem a proteinúria como principal marcador da progressão da doença renal (POLZIN *et al.*, 2005; LEFEBVRE, 2011). O termo proteinúria é definido pela presença de proteínas na urina (HARLEY e LANGSTON, 2012) e, muito mais do que apenas a presença de proteína na urina, a proteinúria representa um sinal de alerta. Em humanos, doenças como hipertensão e *diabetes mellitus* frequentemente manifestam acometimentos renais com a presença de proteinúria, dessa forma este achado

também tem sido considerado um marcador de doenças sistêmicas. Para a sua interpretação, no entanto, na medicina, a proteinúria tem sido dividida em dois grandes grupos: proteinúria isolada, não associada à doença renal ou sistêmica, e proteinúria associada a alguma dessas alterações (GÓMEZ *et al.*, 2007).

Embora a proteinúria tenha sido classificada há bastante tempo por Barsanti e Finco (1979) permanece atual e, tem sido interpretada de acordo com os mecanismos e suas origens se pré-renal, renal ou pós-renal. Além disso, existem outras causas, tidas como fisiológicas (COWGILL *et al.*, 2016) e que serão descritas a seguir.

3.5.1 Proteinúria fisiológica

Alimentação com alto teor proteico, exercícios intensos, convulsão, febre, exposição a temperaturas extremas quentes ou frias e estresse são exemplos de condições que causam proteinúria classificadas como fisiológicas. Nessas condições a proteinúria tende a ser transitória, corrigindo-se com a eliminação ou correção da causa (GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010).

Proteinúria funcional, transitória ou intermitente idiopática e ortostática são exemplos de proteinúrias pré-renal fisiológicas descritas em humanos (GÓMEZ *et al.*, 2007). Em cães, a diminuição da atividade física também pode afetar a excreção de proteína na urina e já foi relatada como sendo maior em animais confinados em gaiolas que naqueles com atividade física normal, semelhante à proteinúria ortostática que ocorre no homem (GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010).

Conhecida como benigna e funcional, porque não existem danos renais intrínsecos estruturais ou funcionais, a proteinúria fisiológica é causada por alterações hemodinâmicas, ainda não completamente elucidadas, mas que favorecem o aumento da filtração glomerular das proteínas plasmáticas. No caso da proteinúria que ocorre após-exercício em humanos, foram identificados aumentos na permeabilidade glomerular, assim como reduções na reabsorção tubular (GÓMEZ *et al.*, 2007).

3.5.2 Proteinúria não fisiológica

Quando há uma alteração na barreira da membrana capilar, permitindo a passagem de proteínas de alto peso molecular, a baixa capacidade de reabsorção destas proteínas pelos

túbulos, ocasiona a proteinúria. Um segundo mecanismo muito frequente é a insuficiência tubular que inibe a capacidade absorptiva do túbulo contorcido proximal, levando a presença daquelas proteínas com baixo peso molecular na urina. No terceiro mecanismo o aumento da concentração de proteínas no plasma faz com que a quantidade filtrada ultrapasse a capacidade de reabsorção do túbulo proximal. Desta maneira, a proteinúria é didaticamente qualificada em: glomerular, tubular ou por aumento de produção de proteínas locais (RAMOS *et al.*, 2000; DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010), podendo se relacionar ou não a doenças sistêmicas ou das vias urinárias (GRAUER, 2010; ALMEIDA, 2014).

3.5.3 Proteinúria pré-renal

Os distúrbios não urinários associados à proteinúria normalmente envolvem a produção de proteínas de baixo peso molecular que são filtradas pelos glomérulos e subsequentemente ultrapassam a capacidade de reabsorção dos túbulos proximais. Exemplo disso inclui a produção de proteínas de Bence Jones (mioglobina e imunoglobulinas de cadeias leves *kappa* e *lambda*) por plasmócitos neoplásicos ou linfócitos (GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010) e a liberação de hemoglobina por hemácias lisadas, que excede a capacidade de ligação a haptoglobina (GRAUER, 2010). A hemoglobina não ligada à haptoglobina, filtrada pelos glomérulos se precipita nos túbulos, causando enfermidade renal severa. Isto normalmente não ocorre com o complexo haptoglobina-hemoglobina que é grande para ser filtrado, prevenindo, assim, lesões renais e a perda de ferro, em casos de anemia hemolítica. O complexo é degradado no fígado ou no sistema retículo endotelial o que justifica a concentração reduzida de haptoglobina após episódios hemolíticos (MOTTA, 2000).

Congestão renal secundária a insuficiência cardíaca congestiva também pode resultar em proteinúria patológica não urinária, assim como inflamações do trato genital como prostatite e metrite (DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010). Doenças sistêmicas que aumentam a permeabilidade capilar glomerular e podem levar a perdas urinárias de proteínas envolvem, além da insuficiência cardíaca, infecções virais e processos que apresentem a febre como um dos sinais clínicos (RAMOS *et al.*, 2000).

As causas de proteinúria descritas acima não são de origem renal, mas podem progredir para causas renais se não forem corrigidas (BARSANTI e FINCO, 1979; LEES *et al.*, 2005; GRAUER, 2010).

3.5.4 Proteinúria renal

A proteinúria renal patológica geralmente é persistente e classificada em glomerular, tubular ou intersticial. A proteinúria de origem glomerular ocorre em consequência às lesões na barreira de filtração glomerular que permitem a passagem de proteínas de alto peso molecular, além da albumina. Em contrapartida, a proteinúria tubular é caracterizada pela presença de proteínas de baixo peso molecular, que ocorre devido a falha na reabsorção pelas células tubulares do segmento proximal. Já a proteinúria renal intersticial é decorrente de processos inflamatórios que promovem a liberação de proteínas para o espaço urinário (LEES *et al.*, 2005).

A proteinúria renal é causada com maior frequência por lesões glomerulares, além dos distúrbios inflamatórios ou infiltrativos dos rins, como em casos de pielonefrite, neoplasias e ou anormalidades tubulares, que resultam em diminuição da reabsorção de proteína filtrada, como na síndrome de Fanconi congênita ou adquirida e na DRC (GRAUER, 2010).

Embora lesões glomerulares resultem em proteinúria mais intensa quando comparada as lesões tubulares, a proteinúria associada a ambos os tipos de lesão tende a ser persistente e serve como um importante sinal de doença renal (LEES *et al.*, 2005; GRAUER, 2010)

Fator de progressão da DRC, a proteinúria, nesse caso, ocorre em decorrência da diminuição do número de néfrons funcionais que leva a hipertrofia dos glomérulos remanescentes devido à hiperperfusão provocada pela redução do leito capilar glomerular total e à vasodilatação de suas arteríolas aferentes. Todas essas alterações diminuem a permeabilidade e seletividade glomerulares, provocando o surgimento da proteinúria. Essas proteínas são lesivas às estruturas tubulares, estimulam a proliferação mesangial, e são reabsorvidas em grande quantidade pelo túbulo contorcido proximal (BRENNER, 1982).

A proteinúria persistente, de moderada a intensa, na ausência de anormalidades no sedimento urinário ou acompanhada por formação de cilindros hialinos é sugestiva de doença glomerular, como glomerulonefrite ou amiloidose glomerular (DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010). Essas doenças alteram a permeabilidade seletiva dos capilares e costumam resultar em proteinúrias acima de 50mg/kg/24hs ou relação proteína/ creatinina (RPC) urinária maior que 2,0 (GRAUER, 2010; HARLEY e LANGSTON, 2012). O exame

histopatológico permanece como o único exame confiável para diferenciar essas duas etiologias, mas requer biópsia renal (DIBARTOLA, 2004).

Se a proteinúria for discreta ou moderada e houver indicações do processo ativo no sedimento urinário, como a presença de descamação celular, devem ser incluídas no diagnóstico diferencial doenças do trato urinário inferior, do trato genital e a doença renal inflamatória (DIBARTOLA, 2004).

Alguns autores mencionam que a proteinúria, em cães com leishmaniose, pode ser tão grave que determina alterações nos valores das proteínas séricas (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; BONFANTI e ZATELLI, 2004; COSTA-VAL, 2004), uma proteinúria tão significativa ocorreria em pacientes em estágios mais avançados da DRC (LESS *et al.*, 2005; GRAUER, 2010).

3.5.5 Proteinúria pós - renal

A proteinúria pós-renal ocorre pela adição de proteínas linfáticas ou plasmáticas à urina durante sua permanência na bexiga ou nos ureteres. A alta densidade dessas proteínas não as permite atravessar a membrana do glomérulo. Ou seja, sua passagem para a urina é consequência de uma sobrecarga plasmática pós-renal (GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010).

Essas proteínas se somam a urina por exsudação ou transudação do epitélio do ureter, portanto, ocorrem mais frequentemente associadas à infecção do trato urinário inferior ou em casos de hemorragia. As alterações vistas no sedimento urinário comumente refletem a causa subjacente, como a presença de cristais, células neoplásicas, e células epiteliais compatíveis com trauma e cistite bacteriana (MOTTA, 2000; GRAUER, 2010).

3.5.6 Testes laboratoriais de rotina

Uma das maneiras mais simples para a identificação de proteinúria é a utilização dos testes com fitas reagentes de imersão (DIBARTOLA, 2004; LEES *et al.*, 2005). Este teste semiquantitativo é geralmente realizado em amostra isolada de urina e detecta a concentração total de proteína e não necessariamente o aumento de sua excreção. Portanto, resultados falsos positivos podem ocorrer em pacientes com baixo volume urinário, mesmo com uma excreção normal de proteína, além disso, reações falsas positivas podem ser obtidas também se a urina

for alcalina, estiver contaminada com componentes de amônio quaternário ou se a fita for deixada na urina por tempo suficiente para remover o tampão de citrato incorporado no papel filtro da fita (RAMOS *et al.*, 2000; GRAUER, 2010), erro usualmente cometido quando não se segue as recomendações de uso.

Por outro lado, resultados falsos negativos podem ocorrer em amostras de pacientes com alto volume urinário ou com urina ácida, ainda que a excreção de proteínas esteja aumentada (RAMOS *et al.*, 2000; GRAUER, 2010). Dessa forma, pode se dizer que as tiras reagentes são pouco precisas e específicas (LEES *et al.*, 2005; GRAUER, 2010), além de serem mais sensíveis para a detecção de albumina do que globulinas na urina (DIBARTOLA, 2004; GRAUER, 2010).

Como já reportado anteriormente a diferenciação entre as proteínas é de suma importância sendo a albuminúria um importante indicador de perda da permeabilidade dos capilares glomerulares, podendo indicar, na prática danos precoces (DIBARTOLA, 2004; POLZIN *et al.*, 2005).

A importância da proteinúria persistente na urinálise deve ser avaliada, portanto através da mensuração da excreção urinária de proteína em 24 horas. Pela dificuldade em se obter amostras urinárias por 24 horas a relação proteína/ creatinina urinária (RPC) tem sido mais utilizada para quantificar a proteinúria em diversas espécies animais (DIBARTOLA, 2004; LEES *et al.*, 2005; GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010). O uso da RPC em uma única amostra é possível já que a depuração proteica renal e a excreção de creatinina urinária são constantes e estáveis ao longo do dia (FINCO, 1995; LEES *et al.*, 2005).

Quando há resultados imprecisos na fita reagente, é recomendada a realização da determinação da microalbuminúria (MA), especialmente quando há suspeita de perda de pequenas quantidades de albumina, entretanto a metodologia para a realização deste exame é o imunoensaio espécie-específica, o que o torna oneroso e por isso, pouco utilizado na rotina veterinária (KISZTAJN *et al.*, 2007; GRAUER, 2010).

Os valores normais de RPC em cães e gatos são menores do que 0,2. Nos cães os valores não são influenciados pela diferença de sexo, pelo método de coleta da urina, pelo estado de jejum nem pelo momento do dia em que é feita a coleta (DIBARTOLA, 2004).

A piúria e a contaminação sanguínea marcante das amostras de urina podem resultar em RPC anormais na ausência de doença glomerular, conseqüentemente tanto a concentração de proteína urinária quanto o índice de RPC devem ser avaliados em conjunto com os achados do sedimento urinário. Alguns autores relataram que tanto a alimentação com dieta altamente proteica, assim como, a administração de prednisolona também aumentaram a RPC em cães (DIBARTOLA, 2004).

Portanto, a classificação do paciente como proteinúrico deve ser realizada somente após a identificação e exclusão de fatores pré e pós-renais e, ainda, a confirmação de sua persistência pela determinação da RPC em diferentes momentos, geralmente duas a três ocasiões com intervalo mínimo de 15 dias, segundo POLZIN *et al.* (2005).

A desnaturação mediada por SDS e a carga negativa das proteínas urinárias permitem a migração dependente da massa durante a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), diferenciando grandes proteínas presentes na urina devido ao dano glomerular, de pequenas proteínas de origem tubular. Os resultados de SDS-PAGE se correlacionam bem com a histopatologia das biópsias renais, especialmente para a diferenciação entre dano glomerular e dano tubulointersticial grave (PALTRINIERI *et al.*, 2016).

3.6 Principais proteínas de interesse na insuficiência renal aguda

3.6.1 Proteinúria glomerular

O aumento da permeabilidade glomerular é a causa mais comum de proteinúria, podendo ocorrer por disfunção do sistema de poros da parede capilar, por perda de cargas eletronegativas do glomérulo ou pela combinação destes dois fatores. Neste mecanismo, a proteína predominante é a albumina (MORALES, 2002).

3.6.2 Albumina e transferrina

A determinação de proteínas derivadas de biofluidos (soro e urina) como albumina sérica humana e transferrina, tem despertado considerável interesse, devido ao seu conteúdo incomum estar diretamente relacionado a doenças renais (RASOULI e GHAVAMI, 2020).

A albumina é a proteína mais abundante no plasma e corresponde a cerca de 60% da concentração total de proteínas. É sintetizada exclusivamente no fígado e possui funções

importantes no organismo, como o transporte de uma ampla gama de ligantes exógenos, por exemplo, ácidos graxos, heme, hormônios e íons metálicos, mantendo a pressão oncótica (MCPHERSON, 1999; RASOULI e GHAVAMI, 2020). Trata-se de uma molécula proteica com peso molecular em torno de 66kDa e, em consequência disso, tende a se perder na urina sempre que ocorre dano aos glomérulos renais (SILVA, 2008; GRAUER, 2016).

Apesar de ser a proteína mais abundante do plasma, normalmente apenas uma pequena porção é filtrada no glomérulo, sendo esta fração reabsorvida quase completamente nos túbulos renais. Sua elevação na excreção urinária é considerada um marcador estabelecido de dano glomerular (COMPER e GLOSCOW, 1995; GRAUER, 2016). No entanto a disfunção tubular por si só pode causar albuminúria por diminuição da reabsorção da albumina filtrada (BIRN e CHRISTENSEN, 2006). Acredita-se que a albumina é retida na membrana basal glomerular devido à seletividade de cargas e tamanho molecular (COMPER e GLOSCOW, 1995).

O mecanismo fisiopatológico que explicaria a albuminúria está embasado em um processo inflamatório sistêmico que levaria a uma disfunção endotelial e um consequente aumento da permeabilidade capilar. A utilização clínica da albuminúria como marcador inicial de lesão renal começou na década de 80, após o desenvolvimento de metodologias com melhor sensibilidade analítica para a dosagem de albumina (DUSSE *et al.*, 2017).

Em geral a presença de proteinúria, em pacientes com glomerulopatia, é identificada em exame de urina simples através da fita reagente (DIBARTOLA, 2004; LEES *et al.*, 2005). A detecção de albuminúria indica então a necessidade de quantificação. O padrão ouro para a quantificação de proteinúria é a pesquisa em urina de 24 horas, ou avaliando a relação proteína creatinina urinária. Sabe-se que quanto maior a perda proteica urinária maior é o risco de progressão da doença renal (DIBARTOLA, 2004; LEES *et al.*, 2005; GÓMEZ *et al.*, 2007; GRAUER, 2010). A identificação qualitativa tem sido realizada através de eletroforese de proteínas urinárias ou quantificação direta de albumina (ALVES, 2011).

A presença de albumina na urina em quantidade maior que o normal, mas abaixo do limite de detecção das medidas padrão de medição da urina, é definida como microalbuminúria (MA). Além de ser um sinal de alerta para doença glomerular, a MA está associada ao extravasamento de proteína endotelial e inflamação sistêmica (WHITTEMORE *et al.*, 2007).

Em pequenos animais define-se como MA a presença de albumina na urina entre 1 e 30mg/dL. Essas concentrações não são detectadas pelos testes de triagem padrão com as fitas reagentes, por isso recomenda-se o teste ELISA quando há necessidade de aumentar a sensibilidade na triagem de animais com DRC, por exemplo (GRAUER, 2010). A presença de MA tem se mostrado um preditor preciso de subsequente doença renal em humanos com hipertensão sistêmica e diabetes, e outras doenças sistêmicas acompanhadas de glomerulopatias (WHITTEMORE *et al.*, 2007; GRAUER, 2010).

Já a transferrina é uma glicoproteína que desempenha um papel regulador no metabolismo do ferro. Essa proteína se liga ao ferro e o transporta para as células via endocitose mediada por receptor de transferrina (RASOULI e GHAVAMI, 2020). Trata-se de uma proteína plasmática com um peso molecular semelhante à albumina, com 76,5kDa. Apresenta um menor caráter aniônico que a albumina, fazendo supor que seria mais facilmente filtrada. Um aumento significativo da excreção urinária da transferrina em humanos diabéticos tipo 2 foi associado com lesões glomerulares difusas, fibrose e inflamação intersticial (CHEUNG *et al.*, 1989). Estudos demonstraram que os diabéticos exibem mais precocemente transferrinúria que albuminúria, entretanto a transferrinúria não está correlacionada com o controle glicêmico sugerindo que este marcador está ligado intrinsecamente com o dano renal (KANAUCHI *et al.*, 2002).

Há evidência de que a transferrina urinária seja um marcador mais precoce para o dano renal que a MA, tendo mesmo valor preditivo. Este fato tem particular importância em outros contextos podendo ser útil para prever quais doentes têm maior risco de progressão na nefropatia diabética, por exemplo. O teste deste marcador é o ELISA, um método comprovado, confiável, barato e facilmente disponível e manuseável (COELHO, 2015).

3.6.3 Imunoglobulina G

Como visto nos pacientes proteinúricos com glomerulopatias a albumina é a proteína presente em maior quantidade e essa característica define a proteinúria como glomerular. Na medida em que além da albumina, proteínas de maior tamanho, como a IgG, são identificadas na urina desses indivíduos o prognóstico renal a longo prazo é ainda pior (ALVES, 2011).

A IgG é uma imunoglobulina monomérica simples de 150.000 dáltons que perfaz 80% das imunoglobulinas do organismo (MCPHERSON, 1999). Pesquisadores sugeriram que a IgG

pode ser a porção tóxica da proteinúria; mas falta uma demonstração direta da tubulotoxicidade da IgG em doenças glomerulares humanas. Bazzi *et al.* (2003) observaram que a excreção de IgG, estava no limite da associação estatisticamente significativa com a esclerose segmentar, diferente do que observaram com a albumina e a transferrina. Além disso, mostraram que a excreção de $\alpha 1M$ depende da excreção de IgG, mas não de albumina ou transferrina. Juntos, esses dados apoiam a hipótese de que a IgG, ou alguma outra proteína excretada em associação à IgG com peso molecular semelhante, possa ser a porção tubulotóxica da proteinúria (BAZZI *et al.*, 2003; GEBRIN, 2006; ALVES, 2011).

3.6.4 Proteinúria tubular

Os túbulos são capazes de reabsorver a maior parte das proteínas normalmente filtradas pelo glomérulo. Quando ocorre um defeito no sistema de reabsorção, tem-se uma proteinúria de origem tubular. Nesse tipo de proteinúria, predomina a excreção de proteínas de baixo peso molecular, como a $\alpha 1$ e $\beta 2$ -microglobulina ($\alpha 1M$ e $\beta 2M$), as quais migram na região α e β da eletroforese (MORALES, 2002). No entanto, $\beta 2M$ perde sua antigenicidade em pH <6,0, o que na prática clínica de rotina pode levar a uma subestimação da intensidade da proteinúria de baixo peso molecular (YU *et al.*, 1983).

A pesquisa de proteinúria tubular pode ser realizada através de solicitação direta de proteínas como $\alpha 1M$ urinária, RBP, cadeias leves de imunoglobulina urinária e $\beta 2M$ (ALVES, 2011).

3.6.5 Alfa 1 microglobulina

A $\alpha 1M$ é uma glicoproteína de peso molecular entre 26.000 e 33.000 dáltons. O fígado é provavelmente o principal local de sua síntese. Sua quantidade não se altera nos processos inflamatórios e está presente no plasma sob três formas: livre, ligada à albumina e ligada à IgA (YU *et al.*, 1983).

Sobre a forma livre a $\alpha 1M$ passa dos glomérulos para os túbulos onde é reabsorvida e posteriormente catabolizada. Acredita-se que sua função é se ligar a agentes oxidantes e radicais livres protegendo as células dos danos ocasionados por estas moléculas nocivas (YU *et al.*, 1983).

A alta sensibilidade do aumento da excreção urinária de α 1M livre como marcador de todos os tipos de alterações de túbulos proximais, aliada à alta estabilidade na urina, independência dos níveis séricos e sua ausência em urinas normais, tornam a dosagem desta proteína o instrumento ideal para diagnóstico e monitoramento das disfunções tubulares proximais (GRUBB, 1992, WALLER *et al.*, 1989).

Gebrin (2006) relatou a correlação significativa entre a excreção urinária de IgG e α 1M. Em pacientes com nefropatias foram evidenciadas correlações positiva com a albuminúria e negativa com a TFG. Para este marcador também pode ser usado um teste ELISA (COELHO, 2015).

3.6.6 Proteína ligadora de retinol

A RBP pertence à superfamília das lipocalinas, esta proteína tem como função o transporte do retinol para os tecidos periféricos e é expressa, principalmente no fígado e no tecido adiposo. No plasma forma um complexo com a transtirretina que a impede de ser filtrada através do glomérulo. Na sua forma livre de retinol tem um peso molecular de 21kDa, sendo filtrada, reabsorvida e catabolizada nas células do túbulo proximal (FREY *et al.*, 2008).

A RBP transporta a vitamina A, na forma de retinol, dos hepatócitos para todos os tecidos do organismo. A própria RBP é transportada pela transtirretina (pré-albumina). Em condições normais uma fração de RBP não ligada à transtirretina é filtrada nos glomérulos, sendo quase totalmente reabsorvida pelas células tubulares proximais (FREY *et al.*, 2008).

Os níveis séricos e urinários deste marcador demonstraram elevados índices em humanos diabéticos correlacionado de modo positivo e significativo com a albuminúria. Esta correlação com a excreção urinária de albumina também ficou evidente pelo aumento gradual deste marcador com a progressão nos estágios de albuminúria. A transição de normoalbuminúria para microalbuminúria esteve associada a um aumento na RBP urinária (COELHO, 2015).

Bottini e Garlipp (1990), em estudo comparando a utilização da α 1M com a RBP como marcador de disfunção tubular, observaram que, apesar de altamente específica e do alto valor preditivo positivo, a RBP apresenta baixos índices de sensibilidade e eficiência diagnóstica. Além disso, a RBP apresenta dificuldades metodológicas relacionadas à padronização para

seu uso rotineiro, uma vez que concentrações são muito baixas (inferior a 1mg/L) na urina de indivíduos normais, refletindo um menor poder discriminatório (COELHO, 2015).

3.7 Leishmaniose visceral canina (LVC) e os rins

Os agentes etiológicos da leishmaniose visceral (LV) são protozoários tripanossomatídeos do gênero *Leishmania*, um parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), que possui duas formas, uma flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota, encontrada nos tecidos dos vertebrados. No continente americano, a *Leishmania (Leishmania) chagasi* é a espécie comumente isolada em pacientes com LV. Com base nos perfis isoenzimáticos, a *Leishmania chagasi* se comporta da mesma forma que a *Leishmania infantum* e, por isso, *chagasi* e *infantum* podem ser considerados sinônimos, apesar de existirem diferenças bioquímicas entre ambas. O uso do nome *Leishmania donovani chagasi* é incorreto, pois a *L. donovani* pertence a um grupo geneticamente diferente, que causa LV no subcontinente indiano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; BRASILEISH, 2018).

Considerado o principal reservatório em áreas urbanas e periurbanas, o cão é responsável pela manutenção deste parasito nos focos endêmicos, devido à alta prevalência da doença nestes animais e à grande quantidade de formas amastigota em sua pele. Somado a isso, encontra-se a sua proximidade ao homem e a ocorrência de inúmeros casos em que a sorologia é reagente, mas os animais não apresentam sinais clínicos (MORENO e ALVAR, 2002). Assim, os cães são considerados um dos alvos estratégicos de controle da doença (COSTA-VAL, 2004; FRANÇA-SILVA *et al.*, 2005; ALVES, 2006). Belo Horizonte é considerada mesorregião endêmica e a leishmaniose causa, tanto em cães quanto em humanos um quadro clínico polimórfico, sendo as patologias renais a principal causa de morte (COSTA-VAL, 2004; ZATELLI *et al.*, 2003)

3.7.1 Patogenia e sinais clínicos da LVC

A variação do quadro clínico causada pela LVC é influenciada por fatores intrínsecos como idade, nutrição, genética e comorbidades do hospedeiro, e aqueles relacionados ao parasito, como virulência da cepa e carga parasitária inoculada (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). O cão tem sido considerado um modelo para a compreensão da patogenia da doença em humanos (QUINNELL *et al.*, 2001).

Dentre os sinais clínicos mais comuns se destacam: lesões de pele como a dermatite esfoliativa não pruriginosa, com ou sem alopecia; onicogribose; linfadenomegalia local ou generalizada; esplenomegalia; abatimento com perda ou diminuição do apetite; síndrome febril; emagrecimento; vasculopatias e síndromes hemorrágicas como epistaxe, diarreia sanguinolenta, hematúria; neuropatias centrais e periféricas; claudicação devido a poliartrite erosiva ou não, osteomielite e polimiosite; manifestações oculares como blefarite, conjuntivite, quemose, ceratoconjuntivite, uveíte, hifema, glaucoma e descolamento retinal (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2020).

É necessário um período de 2 a 12 meses para o cão desenvolver sinais clínicos relacionados à LVC, mas o período de incubação observado em condições experimentais pode alcançar até 25 meses (OLIVEIRA *et al.*, 1993). A infecção em cães é semelhante à humana, entretanto no cão, além do acometimento visceral, são frequentemente encontradas lesões de pele (KRAUSPENHAR *et al.*, 2007).

A manifestação dos sinais clínicos é variável e depende da resposta imune do cão e da cepa do parasito inoculado pela picada do inseto vetor. Alguns cães podem se curar espontaneamente, mas há também a possibilidade de morte em poucas semanas (KILLICK-KENDRICK *et al.*, 1994; BARBIÉRI, 2006; CONTRERAS, 2019).

Geralmente o cão infectado e susceptível apresenta ausência de linfoproliferação, enquanto os resistentes apresentam hipersensibilidade tardia (MARTÍNEZ-MORENO, 1995). Segundo Barbiéri (2006), a infecção sintomática esta associada com a crescente produção de anticorpos e imunorregulação negativa da resposta celular com decrescente produção de interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

Desta forma, animais sensíveis a LVC tendem a desenvolver resposta imune predominantemente humoral caracterizada por hipergamaglobulinemia policlonal, ineficiente para a eliminação do parasito. A resposta humoral específica que se manifesta na LVC é caracterizada pela produção de níveis elevados de IgG anti-Leishmania. Acredita-se que aqueles cães capazes de desenvolver uma resposta imune predominantemente celular ante a infecção tendem a controlar a progressão da doença, minimizando ou não apresentando sinais clínicos (BARBIÉRI, 2006).

A inoculação dos parasitos na pele do cão provoca uma resposta inflamatória local, com a adesão e internalização do parasito basicamente por células de Langerhans e outras dendríticas (FERRER, 2002). Nos animais susceptíveis, nas primeiras horas após a inoculação ocorre a disseminação do parasito, por via hematogena ou linfática, inicialmente para a pele, linfonodos, baço e medula óssea, seguida do parasitismo no fígado e rins e, mais tarde, em órgãos reprodutivos (ALVAR *et al.*, 2004). Nos órgãos observa-se reação inflamatória, estimulação policlonal de linfócitos B, com produção de imunoglobulinas específicas e não específicas, e formação de imunocomplexos, que se depositam em diferentes órgãos (BARBIÉRI, 2006; TAFURI *et al.*, 1989).

Cerca de 50 a 60% dos cães portadores de formas amastigotas não exibem nenhum sinal clínico, e 20% destes animais apresentam parasitos na pele. Em torno de 15% dos animais infectados são capazes de se recuperar dos sinais clínicos e eliminar os parasitos espontaneamente (ALVAR *et al.*, 2004). As manifestações clínicas geralmente são classificadas como sendo do tipo cutânea ou visceral, mas em alguns casos há sobreposição das duas (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; BANETH, 2006).

Resultantes de um desequilíbrio proteico, em virtude da proteinúria associada ao quadro de deficiência imunológica crônica, a perda de peso e a atrofia da musculatura das fossas temporais estão presentes em boa parte dos casos de LVC, porém em frequência variável (ALVAR *et al.*, 2004). Apesar de ser rara a presença do parasito nos rins dos indivíduos portadores de LV, as lesões renais são frequentes, tanto no homem, quanto no cão, podendo resultar em grave comprometimento da função renal (FILHO *et al.*, 2003). Ainda hoje uma das principais causas que torna o tratamento mais complexo em cães é a insuficiência renal (SILVA, 2007; PINEDA *et al.*, 2017).

3.7.2 Nefropatias determinadas pela leishmaniose

A inespecificidade de sinais clínicos da leishmaniose, associada ao alto índice de animais assintomáticos, dificulta a identificação da doença nos cães (CONTRERAS *et al.*, 2019). Alterações na função renal podem ser a única causa de manifestação, podendo ser observada desde uma leve proteinúria, até a síndrome nefrótica, principal causa de morte entre os cães com LV. Assim, a avaliação da função renal é fundamental, não apenas para o diagnóstico precoce de nefropatia, mas

também para a adoção de medidas terapêuticas importantes que podem melhorar a qualidade e a sobrevida desses cães (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

As alterações renais mais comuns na LVC são as glomerulonefrites, em consequência de lesões tubulares e glomerulares resultantes da deposição de imunocomplexos (ZATELLI *et al.*, 2003; ALVAR *et al.*, 2004; BONFANTI e ZATELLI, 2004; TAFURI *et al.*, 1989). Estas alterações provocam um quadro de proteinúria que pode progredir para condições graves como a DRC ou a síndrome nefrótica (BONFANTI e ZATELLI, 2004; VEADO, 2014).

Lesões renais intersticiais e tubulares de 55 cães infectados naturalmente por *L.chagasi* foram identificadas por Gomes *et al.* (2008), que utilizaram a análise histopatológica, morfométrica e ultraestrutural. Onze cães foram submetidos a dosagens de creatinina sérica e proteína e creatinina urinárias, seis cães revelaram proteinúria e destes, três apresentaram níveis elevados de creatinina no soro. A nefrite intersticial foi observada em 45 e lesões tubulares em 51 cães. O infiltrado inflamatório intersticial ocupava maior área nas regiões cortical e medular nos animais infectados e naqueles com glomerulonefrite membranoproliferativa e glomerulonefrite de alterações mínimas. Os resultados obtidos revelaram que a LVC provoca lesões renais intersticiais e tubulares graves, específicas da doença, estreitamente relacionadas com a alteração da função renal, independente da presença de alterações glomerulares.

Brito e Hoshino (1975) citados por Filho e colaboradores (2003), evidenciaram, à microscopia ótica proliferação celular, espessamento fibrilar e uma leve expansão mesangial, não encontrando alterações de membrana basal ao estudarem aspectos histopatológicos de rins humanos com LV. A imunofluorescência revelou IgG, C3 e IgM sob a forma de depósitos localizados principalmente em área mesangial. A atividade policlonal de células B é um achado comum em infecções crônicas, associadas à produção de anticorpos e imunocomplexos potencialmente nefrogênicos (FILHO *et al.*, 2003).

Diversos estudos relatam que até 100% dos cães com LV apresentam glomerulonefrites proliferativas e quase 80% nefrite intersticial (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008). Os primeiros relatos sobre os mecanismos patogênicos responsáveis pelo envolvimento renal na LVC sugeriram que a deposição de imunocomplexos causava essas glomerulopatias. Mancianti, Poli e Bionda (1989) detectaram depósitos de IgG no tecido renal de cães naturalmente infectados

por *L. infantum*, sendo que essa imunoglobulina era policlonal e reconhecia antígenos de membrana de *Leishmania*. Costa *et al.* (2010) relataram que não havia nenhuma diferença na intensidade do depósito de uma proteína do sistema complemento, aC3b, particularmente no glomérulo, em rins de cães com LVC em relação aos cães saudáveis. Também foi demonstrado que a deposição de C3b, IgG e antígenos de *Leishmania* se encontravam em diferentes compartimentos, não formando imunocomplexos. Por outro lado, vêm sendo constatada a participação de linfócitos T, citocinas e moléculas de adesão na lesão renal na LV humana (COSTA *et al.*, 2010).

Em humanos com LV, métodos sensíveis têm sido usados para detectar a presença de proteinúria tubular, sendo capazes de identificar a existência de disfunção do túbulo proximal. Entre esses métodos destaca-se a proteína ligadora de retinol (RBP), responsável pelo transporte de retinol do fígado para os tecidos epiteliais. Na prática clínica, as alterações da função renal são geralmente detectadas pela estimativa da filtração glomerular, através da depuração da creatinina endógena, das dosagens séricas de ureia e creatinina, da análise do sedimento urinário e da quantificação da proteinúria. Com relação à avaliação da função tubular, progressos foram obtidos com a utilização de métodos capazes de detectar lesões precoces do túbulo proximal, através da pesquisa de proteinúria tubular e da secreção de microproteínas urinárias. A determinação tanto da microalbuminúria como da RBP nos pacientes estudados mostraram importantes alterações, sendo, portanto, úteis na demonstração do envolvimento da função renal na LV em sua fase aguda, indicando disfunções renais glomerulares e tubulares mesmo em pacientes humanos com nenhuma ou pouca expressão clínica de nefropatia (FILHO *et al.*, 2003).

3.7.3 Diagnóstico e achados laboratoriais da LVC

Devido à presença de animais sintomáticos e assintomáticos, o diagnóstico preciso da LVC deve ser realizado através da combinação de exame físico, parasitológicos, sorológicos e/ou moleculares associados (ALVAR *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2020).

Os testes rápidos, como o SNAP *Leishmania*® IDEXX, são de execução rápida e simples e servem como triagem, pois possuem alta especificidade. Sua sensibilidade é menor do que a da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e do ensaio imunoenzimático ligado à enzima (ELISA) e aumenta à medida que os títulos de anticorpos das amostras são mais elevados. Dessa forma, esses

testes rápidos podem exibir resultados falso-negativos em amostras com baixos títulos de anticorpos (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2020).

A RIFI, também amplamente utilizada na rotina clínica, é considerada o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da LVC, sendo o teste mais utilizado por pesquisadores europeus nos últimos anos, é também a técnica recomendada pela Organização Internacional de Epizootias (OIE). A RIFI em diferentes estudos demonstra sensibilidade variando de 83% a 100%, e especificidade, dependendo da região geográfica em que o teste é aplicado, entre 74% e 100% (GRADONI, 2002; SILVA *et al.*, 2016). Já no ELISA a sensibilidade oscila entre 97% a 100% e especificidade de 88% a 100%, quando são usados antígenos brutos (SILVA *et al.*, 2016). Testes sorológicos quantitativos, como RIFI e ELISA, podem fornecer mais informações ao médico veterinário, quando comparados aos testes rápidos. Níveis altos de anticorpos ou elevada densidade óptica (OD — aumento de três a quatro vezes acima do ponto de corte [cut-off] estabelecido pelo laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* (BRASILEISH, 2018; RIBEIRO, 2020).

Em muitos casos os exames parasitológicos através de esfregaços de aspirados de medula óssea e linfonodos são os mais utilizados nas clínicas veterinárias. A sensibilidade desde exame varia em torno de 68% nos aspirados de medula óssea e 45% nos aspirados de linfonodos. Entretanto, diante de uma forma amastigota da *Leishmania* encontrada na lâmina, o diagnóstico é confirmado (ALVAR *et al.*, 2004). Apesar dos exames histopatológicos de fragmentos da pele e linfonodos poderem ser usados, deve-se ressaltar que o infiltrado inflamatório encontrado não é específico e que apenas a observação das formas amastigotas fornece o diagnóstico de positividade (COSTA-VAL, 2004). As técnicas de imuno-histoquímica podem melhorar os problemas relacionados à evidênciação do parasito, pois anticorpos específicos marcados detectam com maior sensibilidade e especificidade as formas amastigotas nos cortes de tecidos (TAFURI *et al.*, 2004).

Técnicas moleculares, como a Reação da Cadeia em Polimerase – PCR, também podem ser empregadas como método para confirmação da infecção (FARIA e ANDRADE, 2012; FIGUEIREDO *et al.*, 2012). O diagnóstico molecular realizado pela PCR se baseia na amplificação de uma sequência conhecida de oligonucleotídeos específicos do patógeno. Este teste é altamente sensível e específico para *Leishmania*, e apresenta como vantagem sua realização em grande variedade de materiais clínicos, como sangue, aspirados de medula óssea ou linfonodos, além de biópsias de pele, urina e outros (ALVAR *et al.*, 2002; FIGUEIREDO *et al.*, 2012). É importante

ressaltar que resultados falsos negativos podem ocorrer devido à baixa carga parasitária circulante no momento da coleta (SILVA *et al.*, 2016).

Os testes parasitológicos e moleculares são confirmatórios da infecção por *Leishmania*. Os testes citológicos, histológicos e de cultura, bem como o teste molecular (PCR convencional) são capazes de definir se o animal está ou não infectado a partir da amostra examinada, mas não são capazes de mensurar a carga parasitária da amostra, o que será possível por meio da PCR quantitativa (qPCR) (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; RIBEIRO, 2020).

Dados de hematologia, bioquímica sérica e urinálise possuem limitado valor para o diagnóstico da LVC, entretanto estes parâmetros fornecem importantes contribuições para avaliação do estado clínico do animal e para o prognóstico da evolução da doença (COSTA-VAL, 2004; COSTA, 2009; FIGUEIREDO *et al.*, 2012). As alterações na atividade funcional dos rins, representadas pela azotemia é um achado relativamente comum em cães portadores de LV (AMUSATEGUI *et al.*, 2003). Na urinálise, a proteinúria é a alteração mais frequentemente descrita em graus variados. Em alguns animais, a proteinúria chega a determinar alterações nos valores de proteínas séricas (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; BONFANTI e ZATELLI, 2004; COSTA-VAL, 2004).

Uma característica marcante da LVC é a disproteinemia sérica, caracterizada por hipergamaglobulinemia que ocorre na maioria dos cães com LV, podendo alcançar 100% dos animais infectados (ALVAR *et al.*, 2004; AMUSATEGUI *et al.*, 2003; BONFANTI e ZATELLI, 2004). A composição do perfil eletroforético das proteínas plasmáticas dos cães doentes sofre alterações, principalmente quanto à relação albumina e globulina sérica (A/G). O aumento da concentração no plasma das frações β e γ seria responsável pelo aumento geral das gamaglobulinas, enquanto a diminuição da albumina seria devido a perdas por nefropatias, doenças hepáticas, subnutrição crônica ou até mesmo a combinação entre estes fatores (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; BONFANTI e ZATELLI, 2004).

3.7.4 Estadiamento e manejo clínico da LVC

No dia 17 de junho de 2011, na sede do Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais (CRMV-MG), inspirada no LEISHVET, uma associação científica europeia focada em pesquisa da LVC, foi criada uma associação científica que reuniu médicos veterinários para o

estudo da Leishmaniose em animais no Brasil: a BRASILEISH, tomando por princípio a defesa e respeito à vida humana e animal, pautados em valores éticos e científicos. Os objetivos da BRASILEISH eram orientar os clínicos e discutir junto às autoridades sanitárias os melhores métodos diagnósticos, tratamentos e medidas de prevenção da Leishmaniose nos animais. Além disso, objetivou também debater com os órgãos de classe sobre as evidências científicas da doença, assim como orientar a população sobre a prevenção, tratamento e realidade da doença no país. Dessa forma, estabelecendo recomendações internacionalmente reconhecidas e executar trabalhos de pesquisa destinados ao manejo da leishmaniose em animais (CRMV- MG, 2011).

Em 2018 o grupo BRASILEISH publicou as diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da LVC, os autores orientam que o tratamento da LVC deva ser realizado com protocolos que produzam melhora clínica e redução da carga parasitária. É ressaltado que a única droga aprovada para o tratamento da LVC no Brasil é a miltefosina (SBMT, 2016). Miró *et al.* (2011) sugeriram que quanto mais cedo os animais infectados forem diagnosticados e tratados, além de melhor prognóstico, menor é o risco da dispersão da doença no ambiente urbano.

A ausência de cura parasitológica torna necessário o acompanhamento dos animais com estadiamentos sucessivos. É importante ressaltar que o BRASILEISH, em consonância com o LEISHVET apresenta já no estadiamento III a atenção para a proteinúria como diferencial no manejo do cão (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2020). Segue abaixo (quadro 1) o esquema de estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados sadios ou doentes no Brasil, segundo recomendação da BRASILEISH (BRASILEISH, 2018).

Quadro 1: Estadiamento clínico, manejo e tratamento de cães infectados considerados saudáveis e/ou doentes no Brasil, segundo recomendação da BRASILEISH (2018).

Estádios clínicos	Sorologia ¹	Sinais clínicos	Resultados laboratoriais	Terapia ²	Prognóstico
ESTÁDIO I Sem doença	Positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo	Ausentes	Sem alterações	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴	Bom
ESTÁDIO II Sem Doença / Doença leve	Negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo	Sinais clínicos ausentes a leves, como linfadenopatia periférica, dermatite papular.	Geralmente sem alterações. Perfil renal normal	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina	Bom
ESTÁDIO III Doença moderada	Positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio II, além de outros como lesões dérmicas difusas ou simétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, onicogribose/ulcerações, anorexia, epistaxis, febre, emagrecimento	Anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais >12 g/dl) oriundos da formação de imunocomplexos, tais como uveíte e glomerulonefrite. Subestádios: a) Perfil renal normal (Creatinina <1,4 mg/dl; RPC <0,5) b) Creatinina <1,4 mg/dl; RPC = 0,5-1.	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da nefropatia e controle PSS	Bom a reservado
ESTÁDIO IV Doença grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio III sinais originários de lesões por imunocomplexos: esclerite, artrite, uveíte glomerulonefrite.	Alterações do Estádio III, além de DRC no Estádio I (RPC >1) ou 2 (creatinina 1,4-2 mg/dl) da IRIS	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Reservado a pobre
ESTÁDIO V Doença muito grave	Positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo	Sinais do Estádio IV, além de tromboembolismo pulmonar a síndrome nefrótica e doença renal em estágio final.	Alterações do Estádio IV, além de DRC no estágio III (creatinina 2,1-5mg/dl) e IV (creatinina > 5 mg/dl) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria com RPC >5).	Imunoterapia ³ + imunomodulação ⁴ + alopurinol + miltefosina Seguir as diretrizes da IRIS para o manejo da DRC e controle PSS	Pobre

Abreviações: RIFI (reação de imunofluorescência indireta); DRC (doença renal crônica); IRIS (International Renal Interest Society); PSS (pressão sistêmica sanguínea); RPC (razão proteína-creatinina urinárias).

1: Em cães soronegativos ou com níveis de anticorpos baixos ou médios, a infecção deve ser confirmada por meio de citologia, histologia, imuno-histoquímica e/ou PCR. Níveis altos de anticorpos (aumento de 3-4 vezes acima do ponto de corte ou cut-off pré-estabelecido de um laboratório de referência) são conclusivos para o diagnóstico da LCan (SOLANO-GALLEGO et al., 2009; Ribeiro et al., 2013).

2: Monitorar a cada 4 a 6 meses com exames sorológicos, parasitológicos e/ou moleculares, exames gerais para estadiamento e revisão de tratamento (Ribeiro, 2016; Leishvet, 2018).

3: Imunoterapia com a vacina LeishTec: um frasco aos 0, 14 e 28 dias em animais infectados (Toepp et al., 2018) ou dois frascos nos dias 0, 21 e 42, em monoterapia ou associada ao alopurinol, com reforços semestrais (Ribeiro et al., 2013, 2017).

4: Imunomodulação com domperidona: 0,5-1 mg/kg duas vezes ao dia por 30 dias (Gómez-Ochoa et al., 2009).

Considerando que a prática quimioterápica convencional na LVC é ainda ineficaz e efeitos colaterais graves estão associados ao tratamento (BANETH e SHAW, 2002; NOLI e AUXILIA, 2005; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009) a imunoterapia tem ganhado grande atenção na busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, menos tóxicos e mais acessíveis para o tratamento da doença. Vacinas contra LVC sejam profiláticas ou terapêuticas, podem ser um importante instrumento a ser considerado para controlar a doença canina, levando a OMS a estimular os estudos que busquem potenciais vacinas contra a LVC (WHO, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2013; CARDOSO, 2018).

Diversos trabalhos demonstraram a redução gradativa dos sinais clínicos apresentados pelos animais, bem como ausência de morte no grupo de cães submetidos à imunoterapia. São relatados resultados como normalização dos parâmetros bioquímicos e hematológicos, aumento de linfócitos T CD4+ e CD8+ circulantes, produtores IFN- γ , redução na produção de IL-4 por esses linfócitos e aumento dos níveis de TNF- α , com diminuição acentuada na produção de IL-10. Também é relatada a redução do número e intensidade dos sinais clínicos, aumento de peso, redução de esplenomegalia e da carga parasitária na medula óssea, pele e baço, além de redução da infectividade de flebotomíneos após o tratamento (BORJA-CABRERA *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2013; ROATT *et al.*, 2017; CARDOSO, 2018).

Gómez-Ochoa e colaboradores (2009) relataram a eficácia da domperidona no controle e redução dos sinais clínicos e títulos de anticorpos. Diminuições significativas nos anticorpos séricos foram observadas em 74,3% dos cães com sinais clínicos leves e 40% dos cães tornaram-se soronegativos. Em cães com vários sinais clínicos e altos títulos de anticorpos, a melhora clínica ocorreu em 86% dos animais e os títulos recíprocos de anticorpos séricos diminuíram em 38% desses cães. Um aumento no estado imunológico celular foi medido pelo teste cutâneo de *Leishmania* e pelo ensaio de proliferação de linfócitos. Portanto, o tratamento com a domperidona contribui para a modulação da resposta imune inata, melhorando os mecanismos de defesa do animal com ativação de células fagocíticas e potencialização da destruição intracelular dos parasitos (MANNA *et al.*, 2015). De acordo com Viana (2019), os efeitos adversos da domperidona envolvem a galactorreia, ginecomastia, arritmias e sonolência.

O alopurinol é uma droga da classe das hipoxantinas, que metabolizado pela *Leishmania* produz um análogo inativo da inosina, este análogo é incorporado no RNA do parasito, causando síntese proteica errônea. O alopurinol é amplamente usado na terapia de LVC, isolado ou associado a

outras drogas, devido a sua baixa toxicidade, eficiência em proporcionar significativa remissão dos sinais clínicos, e seu baixo custo associados à conveniência de ser administrado por via oral (BANETH e SHAW, 2002). Os efeitos adversos são incomuns em animais, sendo o prurido a ocorrência mais frequente, com vômitos e tremores musculares quando utilizado em doses altas (VIANA, 2019). Os cristais de xantina e urólitos também podem ser provocados pelo uso de alopurinol para tratamento de leishmaniose (PALTRINIERI *et al.*, 2016).

A miltefosina atua no metabolismo de lipídeos, com atividade sobre a membrana de *Leishmania*, e acumula-se em macrófagos, sendo diretamente tóxica para o parasito. Este composto induz *in vitro* a ativação de macrófagos e células T, que produzem IFN- γ , citocina associada ao controle da infecção (BANETH e SHAW, 2002; NIETO *et al.*, 2005). Os principais efeitos colaterais relacionados com o uso da miltefosina são distúrbios gastrointestinais transitórios, como inapetência, vômito e diarreia (MIRÓ *et al.*, 2005; NIETO *et al.*, 2005; VIANA, 2019). Entretanto, há possibilidade de hepatotoxicidade e nefrotoxicidade (NOGUEIRA e RIBEIRO, 2015; VIANA, 2019).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aprovação do projeto

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo de número 88/2018.

4.2 Animais e local de estudo

Para o desenvolvimento deste trabalho foram selecionados ao acaso 30 cães atendidos em um Hospital Veterinário de Belo Horizonte, considerado como referência no atendimento de animais infectados com *L. infantum*. A escolha deste estabelecimento baseou-se na demanda de atendimento, disponibilidade dos dados e principalmente por apresentar uma amostragem diversificada, com ampla distribuição espacial.

Foram coletadas amostras de cães de diferentes idades (entre 2 e 14 anos), raças (Poodle, Maltês, Pinsher, Sem Raça Definida, Spitz Alemão, Basset, Dasch Hund, Cocker spaniel, Bull Dog, Golden Retriever, Border Collie, Lhasa Apso, Chihuahua, Fox Paulistinha, York Shire e Schnauzer) e pesos

(entre 2,200 a 31,300kg), castrados e inteiros, machos e fêmeas, provenientes de tutores residentes da região metropolitana de Belo Horizonte.

O critério de inclusão foi de animais demonstrados infectados hígidos ou doentes a partir de testes sorológicos e moleculares e estadiamento clínico conforme BRASILEISH (2018) e animais considerados clínica-laboratorialmente hígidos e que foram atendidos no período de setembro de 2019 até fevereiro de 2020.

Pacientes que apresentaram alterações clínicas e laboratoriais que testaram positivo para alguma hemoparasitose foram excluídos do grupo controle. Além disso, cães portadores de DRC, diagnosticados por ultrassonografia e pacientes com diagnóstico de infecção urinária também foram excluídos do experimento. Foram rejeitadas as amostras com características de hemólise, lipemia e icterícia.

4.3 Grupos experimentais

Visando comparar os grupos, 30 cães incluídos foram distribuídos em três grupos de estudo com 10 animais cada, sendo eles: grupo controle (GC) composto por cães negativos para leishmaniose, grupo de animais infectados por *L. infantum* submetidos ao tratamento (GLT) seguindo protocolo apresentado pela BRASILEISH e, grupo de animais infectados por *L. infantum* e que não foram tratados (GLNT), conforme quadro 2.

Quadro 2: Lista de grupos experimentais, segundo diagnóstico e tratamento (GLT) ou não para leishmaniose visceral canina (GLNT), comparados com um grupo de animais considerados clínica-laboratorialmente hígidos (GC).

Grupo	Nº de cães	Característica
GC	10	Animais hígidos (grupo controle)
GLT	10	Animais infectados por <i>L. infantum</i> submetidos ao tratamento
GLNT	10	Animais infectados por <i>L. infantum</i> não tratados

4.4 Coleta de amostras

Após o exame clínico, os animais foram encaminhados para coleta de materiais biológicos para realização de exames hematológicos, sorológicos e parasitológico com a finalidade de confirmar a infecção por *L. infantum*.

As amostras foram coletadas uma vez de cada animal. Amostras de sangue das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas, foram colhidas após antissepsia e acondicionadas em frascos contendo ácido etilenodiaminotetracético- EDTA (10%), para realização de hemograma, e em frascos com gel ativador da coagulação, para obtenção de soro e determinações bioquímicas, conforme os procedimentos adotados na rotina de atendimento do Hospital Veterinário.

Para biópsia de pele foi feita tricotomia e antissepsia da orelha após administração de cloridrato lidocaína 1%, sem vasoconstritor, na dosagem de 4mg/kg, por via subcutânea na face interna de uma das orelhas. Procedeu-se então a retirada de um fragmento da pele com o auxílio de um “punch” de 5mm de diâmetro (Punch para Biópsia®, Kolplast ci LTDA, Brasil). O fragmento retirado foi depositado em papel filtro estéril para remoção do excesso de sangue. Logo após, o material foi acondicionado em tubos eppendorf DNase e RNase free para realização da técnica de qPCR no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Para coleta de medula também foi realizada tricotomia e antissepsia na extremidade anterior do manúbrio do esterno, a medula óssea foi coletada através de punção aspirativa utilizando-se agulha de 1,25mm x 38mm, acoplada a uma seringa de 10mL. O conteúdo do aspirado foi armazenado em tubo DNase e RNase free e mantido a -20°C e enviado para a realização da qPCR no Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG.

Amostras de urina foram colhidas, por meio de cistocentese guiada por ultrassonografia, de forma asséptica, e processadas em até 30 minutos ou mantidas sob-refrigeração por, no máximo, 2 horas até o processamento. Após centrifugação (1000rpm por 10 minutos), o sobrenadante das amostras de urina foi armazenado em microtubos do tipo *ependorf* (alíquotas de 1 ml) e estocadas em ultrafreezer a -80°C, para posterior realização de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) no laboratório de patologia clínica da Faculdade de Medicina Veterinária de Viçosa

4.5 Exame ultrassonográfico

Os exames ultrassonográficos foram realizados pelo mesmo examinador, utilizando-se o aparelho (SAEVO FT422). A técnica adotada para avaliação ultrassonográfica renal foi descrita por Nyland *et al.* (2005). Nos rins foram avaliados tamanho (normal, aumentado, diminuído), contorno renal (regular, irregular), ecogenicidade cortical (aumentada, normal) e definição corticomedular (normal, diminuída, ausente).

4.6 Processamento das amostras

4.6.1 Avaliação hematológica

A hematologia foi realizada com o auxílio do analisador hematológico ProcyteDx (IDEXX[®]) por meio de impedância, citometria de fluxo à laser e fluorescência óptica (IDEXX Laboratories, 2016). As amostras de sangue em tubo com EDTA foram submetidas a temperatura ambiente, após refrigeração, uma vez que o processamento hematológico de amostras refrigeradas pode conduzir a erros pré-analíticos, como hemólise, aglutinação celular e agregação plaquetária. Após atingirem a temperatura ambiente (aprox. 21°C) foram homogeneizadas (IDEXX[®]) durante um minuto, para reconstituição dos componentes sanguíneos. Para o eritrograma avaliou-se o número total de eritrócitos, hematócrito (HCT) e a hemoglobina (HGB). No leucograma e no plaquetograma avaliou-se o número total de leucócitos e plaquetas. Ainda, de cada amostra, foi confeccionado o esfregaço e corado através da técnica de coloração segundo Romanowsky. Os esfregaços foram utilizados para realização de hematoscopia complementar às análises realizadas pelo ProcyteDx, além da contagem diferencial de leucócitos, seguindo protocolo operacional padrão do hospital em questão.

4.5.2 Bioquímica sérica e urinária

As amostras de sangue em tubo com ativador de coágulo foram centrifugadas a 3.000rpm por 10 minutos, conforme procedimento operacional padrão do laboratório, em centrífuga de bancada (Coleman[®]), para a obtenção do soro. De cada amostra foram pipetados 4ml de soro, com o auxílio de micropipeta monocal volume fixo 1000µl (Peguepet[®]) e ponteiros universais de polipropileno (Corning[®]), para posteriormente separação em dois microtubos de 2,0ml (Eppendorf[®]), identificados com os nomes do animal e do tutor e data de coleta. Após a identificação, alíquotas foram armazenadas em duas caixas organizadoras para microtubos (Kasvi[®]), sendo uma delas separada para as análises bioquímicas séricas e a outra para dosagem de SDMA.

Para as análises bioquímicas séricas e urinárias foi utilizado analisador bioquímico Catalyst One (IDEXX[®]) por meio de bioquímica seca (IDEXX Laboratories, 2016). Nesse analisador, a análise bioquímica de cada amostra de soro ou urina é feita individualmente, podendo-se realizar painéis bioquímicos pré-formatados pela fabricante.

No presente estudo optou-se por utilizar o painel Chem 10 CLIP que contempla oito *slides* para os parâmetros bioquímicos e suas frações, sendo eles: glicose sérica (GLU), creatinina sérica (CREA), nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), frações nitrogênio ureico/creatinina sanguínea (BUN/CREA), proteínas totais séricas (PT), albumina sérica (ALB), globulinas sérica (GLOB), fração albumina/globulinas séricas (ALB/GLOB), alanina aminotransferase sérica (ALT) e fosfatase alcalina sérica (ALP). Além do Chem 10 CLIP, adicionou-se o slide para o parâmetro bioquímico de dimetilarginina sérica (SDMA). Para todas as mensurações foram seguidas as instruções do fabricante.

Para a bioquímica urinária foi realizada a transferência de, idealmente 10ml de urina, para tubo cônico graduado (CRAAL[®]) para posterior centrifugação (Centrífuga Coleman[®]) à 3.000rpm durante 10 minutos, conforme procedimento operacional padrão do laboratório. Utilizando-se o mesmo analisador anteriormente descrito os *slides* selecionados para urina foram: proteína urinária (UPRO), creatinina urinária (UCRE) e fração proteína/creatinina urinária (RPC).

4.6.3 Urinálise

As amostras de urina foram retiradas da refrigeração e aguardou-se até que chegassem a temperatura ambiente para seu processamento a partir da análise física, química e da sedimentoscopia. A análise física constou dos seguintes parâmetros: volume, cor, odor, turbidez e densidade (refratometria). Na análise química, utilizou-se fita reagente (Urofitá Alere[®]), mergulhando-a no frasco contendo a amostra de urina seguido de leitura após o tempo recomendado pelo fabricante (10-30 seg.) através da comparação com a escala de cor fornecida. Para a realização da sedimentoscopia urinária, após centrifugação os tubos cônicos foram submetidos a versão total para alíquotamento do sobrenadante urinário. Após retomada a posição inicial do tubo cônico, realizou-se homogeneização do sedimento urinário com o restante do sobrenadante, durante dez segundos. Com o auxílio de micropipeta monocal volume fixo (Peguepet[®]) foram pipetados 20µl do sedimento que foram posteriormente transferidos para o centro de uma lâmina de vidro (Invicta[®], Brasil), seguida de sobreposição do volume transferido por uma lamínula (Invicta[®], Brasil), ambas previamente limpas e desengorduradas. Em seguida, o material em lâmina foi

analisado à microscopia óptica nas objetivas de 20 e 40 vezes, para avaliação de elementos *macro* como cilindros e *micro* como células, bactérias e cristais.

4.6.4 Exames sorológicos

4.6.4.1 SNAP Leishmania e 4Dx Plus IDEXX®

Trinta minutos antes da realização do teste foram retirados da geladeira a amostra, o conjugado e o teste SNAP® para estabilização do exame de detecção de anticorpos anti *Leishmania* realizado através do teste rápido ELISA (SNAP *Leishmania* IDEXX®). Também foram realizados testes para dirofilariose, anaplasmosose, erliquiose e doença de Lyme utilizando-se o SNAP IDEXX 4Dx Plus®. Com o dispositivo SNAP posicionado em uma superfície plana, colocou-se o conteúdo do microtubo na canaleta da amostra. Em seguida o dispositivo foi ativado e a leitura realizada após oito minutos. Para determinar o resultado dos testes leu-se os pontos de reação na janela dos resultados. Foram consideradas reagentes as amostras onde houve aparecimento de cor no local definido para o controle positivo do teste e no local definido para resultado da amostra teste. Nas amostras consideradas não reagentes não houve aparecimento de cor no local definido para o controle positivo do teste. Todos os animais foram submetidos a RIFI e ELISA independente do resultado do SNAP.

4.6.4.2 ELISA

A técnica de ELISA foi realizada de acordo protocolo pré estabelecido pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Departamento de Parasitologia/ICB/UFMG. No primeiro dia foi realizada a diluição dos soros e a sensibilização das placas. Inicialmente foi montado o mapa de trabalho seguido da diluição de 100ng do antígeno em 100µl do tampão carbonato de acordo com sua concentração. Foram pipetados 100µl do antígeno diluído em cada well. Os soros dos animais foram diluídos em PBS-Tween-20 a 0,05% na proporção 1:100. As placas foram guardadas com os soros diluídos a 4°C até o momento do uso. A placa foi incubada a 4°C *overnight*. No segundo dia foi preparada a solução bloqueio (PBS-BSA 2%) e em seguida, foi descartado o conteúdo por versão das placas e retirado o excesso por movimentos de batimento em bancada plana. Foram posteriormente adicionados 200µl de PBS-BSA 2% em cada well seguido de incubação em temperatura ambiente durante duas horas. Após o bloqueio, foi retirada toda a solução por versão das placas e retirado o excesso por movimentos de batimento em bancada plana. Nos poços foram adicionados 100µl dos soros diluídos seguido de incubação a temperatura ambiente por uma hora e trinta minutos a 37°C. As placas foram posteriormente lavadas cinco vezes

com solução PBS-Tween-20 a 0,05%. Foi feita diluição dos anticorpos secundários em PBS-Tween-20 a 0,05% nas proporções de 1:2500 para cão. Em seguida foram adicionados 100µl do anticorpo secundário diluído nos wells. Foi feita incubação da placa a 37°C por uma hora de trinta minutos. Durante a incubação foi preparada a solução reveladora (0,02g OPD em tubo falcon envolto em papel alumínio adicionado de 30ml de tampão citrato mais 12µl de H₂O₂ (ácido cítrico 0,1M, Na₂PO₄ 0,2 M, OPD 0,05% e H₂O₂ 0,1%). As placas foram posteriormente lavadas cinco vezes com solução PBS-Tween-20 a 0,05%. Foram adicionados 100µl da solução reveladora em cada poço. A placa foi incubada a 37°C ao abrigo de luz, durante dez minutos. A reação foi posteriormente interrompida adicionando-se 50µl de H₂SO₄ (Ácido sulfúrico) 4M. A leitura foi realizada no leitor Elisa a 492nm.

4.6.4.3 Imunodifusão radial (RIFI)

A técnica de imunodifusão radial (RIFI) foi realizada de acordo com Camargo (1966) em que foram utilizadas microplacas para a diluição dos soros, pipetando-se 190µL de PBS 0,01M, pH 7,2 e 10 µL do soro a ser testado no primeiro orifício, homogeneizando-se, perfazendo a diluição 1:20. Foram distribuídos 100µL de PBS 0,01M, pH 7,2 em outras cinco cavidades e a partir da primeira diluição, transferindo-se 100µL para o orifício seguinte, homogeneizando-se, repetindo até a quinta cavidade, desprezando-se os últimos. Com isso, as amostras foram diluídas a 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 e 1:640. Da mesma maneira, foram diluídas amostras de soros controles positivo e negativo. Em lâminas fixadas com o antígeno de *L. major*, foram distribuídos 10µL de cada diluição nos orifícios, incubando-se a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. A seguir, foram lavadas em coplin com PBS 7,2 por 10 minutos, por duas vezes consecutivas e, a seguir, secas em estufa.

O conjugado espécie-específico foi diluído, segundo seu título pré-estabelecido, em solução de Azul de Evans a 20% a qual foi previamente diluída em PBS 0,01M, pH 7,2 na proporção de 1:5. Foram distribuídos 10µL de conjugado para cada diluição, incubando-se novamente a 37°C por 30 minutos em câmara úmida. Realizou-se uma nova lavagem em jarra de coplin com PBS 0,01M, pH 7,2 por 10 minutos, duas vezes consecutivas, secando-se em estufa. As lâminas foram montadas com glicerina tamponada pH 8,5, cobrindo-se com lamínula 24x60mm, e examinadas em microscópio de imunofluorescência, no aumento 40 vezes. Após a leitura dos controles, foi procedido o exame das amostras em teste, considerando-se como título final a maior diluição do soro em que ainda ocorresse fluorescência completa na borda de pelo menos 50% das promastigotas.

4.6.5 Exames Parasitológicos

4.6.5.1 PCR

PCR específico realizado em amostras de pele da ponta da orelha e medula foi utilizado para confirmar a positividade dos animais para *L. infantum*. Após a extração do DNA de cada amostra, foi realizada PCR em tempo real. Foi utilizada a plataforma ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo o protocolo descrito por Nicolas *et al.* (2002), com algumas modificações nos ciclos: 50° por 2min, 95° por 2min para a desnaturação do DNA, seguidos pela amplificação utilizando 40 ciclos de 10s a 95°C, 10s a 56°C e 30s a 72°C e para finalizar o ciclo de “melting” dado pela máquina, de 15s a 95°C, 30s a 60°C e 15s a 95°C.

4.6.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) de proteínas urinárias

Os processamentos das amostras ocorreram no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Para a avaliação qualitativa das proteínas urinárias, pelo peso molecular, foi empregado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), conforme modificação da técnica descrita por Laemmli (1970). Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (MINI PROTEAN TETRA CELL® BIO-RAD), confeccionando-se o gel de separação a 14% e o gel de empilhamento a 5%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, adicionou-se 15µL de sobrenadante urinário e 3µL de água ultrapura, em 6µL de tampão-fosfato (PBS). Uma alíquota de 24µL de cada amostra preparada foi depositada em uma determinada cavidade do gel, além da amostra do marcador padrão de peso molecular como referência, que sempre foi colocado em cavidades pré-estabelecidas. Após colocadas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica de 80 volts, fornecida por fonte de energia apropriada (BIO-RAD®).

Terminada a corrida, desligou-se imediatamente a fonte elétrica e o gel foi retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Posteriormente, o gel foi submerso em solução descorante a base de metanol para retirar o excesso de corante até que todo o gel se apresentasse nítido.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Software LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular utilizou-se marcadores de pesos moleculares de 200,

116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 e 6kDa, além de proteínas purificadas. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

Definida a área de leitura, de acordo com gráfico (o pico determina a banda verdadeira - área mais próxima dos marcadores de peso molecular, ausência de pico determina sombra), foram separadas as janelas de perfil que correspondem aos pesos moleculares e que definiu os escores de medida, conforme figura 1.

As regiões individuais do gel apresentaram “pistas”, sendo que cada pista representou um animal, que apresentou diferentes bandas de proteínas com pesos moleculares distintos, como demonstra a figura 2. Foram selecionadas as áreas sob a curva em cada faixa, representadas pela densidade óptica total, permitindo determinar a porcentagem relativa da densidade de cada banda de proteína em relação a densidade óptica total.

Para efeito de comparação entre os grupos, também foram avaliados a diversidade e número de bandas, bem como em que intervalo de peso molecular (md/dL) havia maior concentração proteica. Os intervalos selecionados foram: 45-55kDa, 56-90kDa, 91-150kDa, 151-200kDa e acima de 200kDa. O objetivo destas comparações foi estabelecer em qual intervalo haveria maior padrão discriminatório entre os grupos.

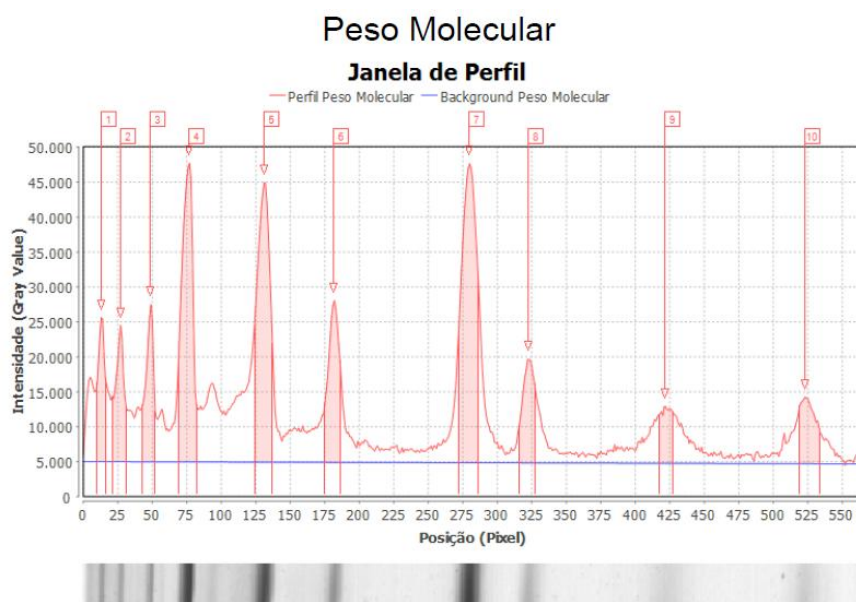


Figura 1. Janela de perfil de peso molecular em gel de leitura por SDS-PAGE obtidos de amostras de urina de cães.

Quando proteínas de peso molecular abaixo de 45kDa estavam presentes considerou-se escore tubular e quando igual ou acima de 45kDa, proteínas que escorificaram proteínas de lesões glomerulares, de acordo com Hokamp *et al.* (2018). Os escores de gravidade glomerular variaram de 0 a 3, onde 0 representa proteinúria glomerular normal ou ausente; 1, proteinúria glomerular leve; 2, proteinúria glomerular moderada; 3, proteinúria glomerular grave. Os escores de gravidade tubular variaram de 0 a 4, onde 0 representa proteinúria normal ou ausente; 1, proteinúria tubular mínima; 2, proteinúria tubular leve; 3, proteinúria tubular moderada e 4, proteinúria tubular grave. As Tabelas 1 e 2 detalham os critérios usados para atribuir escores de gel glomerular e tubular, e a Figura 2 demonstra a aplicação de escores de gel a um conjunto de amostras com padrões e severidades variados de proteinúria.

Tabela 1. Sistema de pontuação em escores de gravidade obtidos a partir da interpretação das bandas proteicas obtidas em gel de poliacrilamida pela técnica de SDS-Page para classificação de lesões glomerulares em cães segundo Hokamp *et al.* (2018).

Resultados do Gel		
<i>Escore de Gel Glomerular</i>	<i>Características de Bandas \geq 45kDa</i>	<i>Exemplos</i>
0	\pm 1 banda fraca de aproximadamente 88-110kDa (proteína Tamm - Horsfall)	Não demonstrado
1	<10 bandas de alto peso molecular; podendo haver até 2 bandas entre 130-150kDa podem ser proeminentes, porém finas (aproximadamente do mesmo tamanho e intensidade de um peso molecular padrão)	Pista* 1 a 8
2	1 banda \geq 200kDa	Não demonstrado
3	5 bandas \geq 200kDa	Não demonstrado

*Pistas se referem aos géis corridos nas canaletas e demonstradas na figura 2.

Tabela 2. Sistema de pontuação em escores de gravidade obtidos a partir da interpretação das bandas proteicas obtidas em gel de poliacrilamida pela técnica de SDS-Page para classificação de lesões tubulares em cães, segundo Hokamp *et al.* (2018).

Resultados do Gel		
<i>Escore de Gel Tubular</i>	<i>Características de Bandas < 4 kDa</i>	<i>Exemplos</i>
0	Uma banda fraca pode estar presente a aproximadamente 24-25,5kDa em machos inteiros, caracterizando líquido prostático.	Não demonstrado
1	\leq 5 bandas de baixo peso molecular; excluindo a banda de líquido prostático	Pistas* 2, 3, 5 e 6
2	< 13 bandas de baixo peso molecular; excluindo a banda de líquido prostático	Pistas* 4, 7 e 8.
3	\leq 13 bandas de baixo peso molecular; excluindo a banda de líquido prostático	Não demonstrado
4	\geq 13 bandas de baixo peso molecular (excluindo banda prostático) e / ou \geq 3 bandas de baixo peso molecular escuras / intensas	Pista*1

*Pistas se referem aos géis corridos nas canaletas e demonstradas na figura 2.

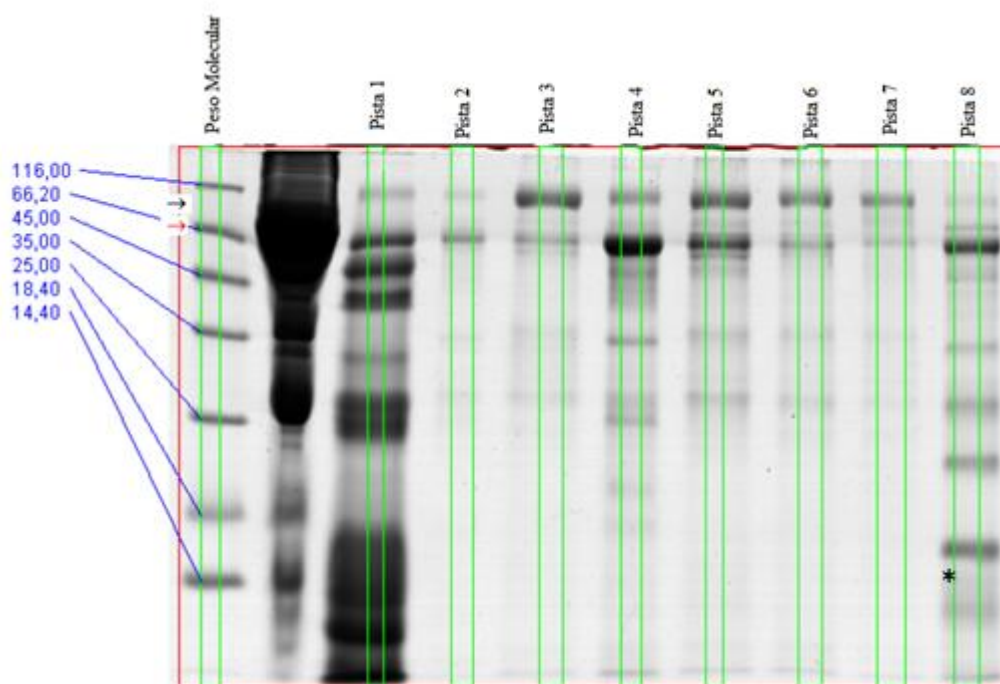


Figura 2. Amostras de urina representativas de cães com amplo espectro de proteinúria apresentadas usando eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para demonstrar a aplicação do sistema de pontuação (Tabelas 1 e 2). As faixas 1 a 8 representam amostras de urina de cães proteinúricos. Pista 1 (GLNT): Escore glomerular = 1; Escore tubular = 4. Pistas 2, 3, 5 e 6 (GC): Escore glomerular = 1; Escore tubular = 1. Pistas 4, 7 e 8 (GLT): Escore glomerular = 1; Escore tubular = 2. *denota proteínas do líquido prostático vistas em cães machos inteiros. A seta vermelha indica banda de albumina e a seta preta a banda de proteína de Tamm - Horsfall.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi realizado conforme Sampaio (2015) sendo utilizados dados da literatura que demonstraram coeficiente de variação de 19% para variável creatinina urinária (dentre as variáveis a ser estudadas é a que apresenta maior variância segundo a literatura consultada), e média de 0,99 (SANTIN et al., 2006), a partir da fórmula:

$$\Delta = T\alpha \times \frac{S}{\sqrt{n}},$$

onde Δ é o tamanho do efeito esperado que se deseja mensurar, $T\alpha$ é o valor crítico da distribuição T de Student considerando um α pré-determinado (normalmente considerado como 0,05 o que equivale a uma confiança de 95%), S é o desvio padrão da variável de interesse (estimado através de um estudo piloto ou através da literatura) e n é o tamanho amostral que se deseja estimar.

Considerando um coeficiente de variação de 19% e um média de aproximadamente 1, temos um desvio padrão estimado de 0,19. Além disso, considerando um tamanho do efeito de 12% em relação à média, obtemos um valor de 0,12. O valor de $T\alpha$ tabelado para uma confiança de 95% é de aproximadamente 2, dessa forma temos:

$$0,12 = 2,0 \times \frac{0,19}{\sqrt{n}} \rightarrow \sqrt{n} = 2 \times \frac{0,19}{0,12} \rightarrow \sqrt{n} = 3,16 \rightarrow n = 10,02 \text{ animais por grupo.}$$

Realizou-se análise descritiva do perfil dos pacientes a partir da tabela de dados. Esta análise descritiva objetivou avaliar todas as variáveis numéricas e categóricas. Para as variáveis numéricas foram calculados os principais índices de estatística descritiva (e.g. média, mediana, desvio-padrão, coeficiente de variação e quartis). Foi testada a normalidade de cada variável na sua unidade original e, quando possível aplicou-se a transformação logarítmica. Para as variáveis categóricas foram calculadas as frequências relativas e absolutas para cada classe. Esta análise foi realizada para todos os pacientes disponíveis no banco de dados, sem separação de grupos, a fim de fornecer um perfil geral. Em seguida, foram aplicados testes de diferenças individualmente para cada variável numérica, buscando identificar quais dessas variáveis diferiram entre os grupos avaliados.

Para testar as diferenças entre grupos, foram ajustados modelos de regressão para variáveis preditivas categóricas. Escolheu-se as distribuições de probabilidade mais adequadas para cada variável resposta de interesse. Para as variáveis bem-comportadas e com distribuição normal, aplicou-se um modelo de regressão linear clássico (ANOVA). Para as variáveis com valores positivos e com distribuições assimétricas, com presença de valores discrepantes, utilizou-se um ajuste por modelos lineares generalizados com a distribuição gama. Foi ajustado um modelo separado para cada variável resposta mensurada, sendo que o grupo foi utilizado como preditor (variável independente). Após o ajuste do modelo, testou-se o efeito do grupo de forma global (*overall*) e calculou-se os valores médios e seus respectivos intervalos de confiança para cada grupo (95%). Para verificar a significância da diferença entre duplas, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (*pairwise*). Para estes testes aplicou-se a correção de Tukey.

A partir dos dados de SDS-PAGE extraíram-se de cada uma das bandas os valores de peso molecular e a concentração para cada animal. Em seguida, cada animal foi categorizado no seu respectivo grupo (GC, GLT, GLNT), sendo classificados como réplicas do seu respectivo grupo. Aplicou-se um método de regressão não linear (Ajuste de Regressão Polinomial Local ou *Local Polynomial Regression Fitting*) para cada grupo individualmente. Este método de ajuste suavizou as

linhas, permitindo visualizar quais os pesos de proteínas apresentavam as maiores quantidades para cada grupo.

Para análise dos componentes principais a tabela de dados foi preparada para análise e convertidas no formato apropriado. A correlação não paramétrica de *Spearman* foi calculada para todos os pares de variáveis e as correlações moderadas, fortes e muito fortes foram reportadas. A análise de componentes principais foi realizada utilizando-se a matriz de correlação não paramétrica de *Spearman*.

As variáveis com a maior variabilidade relativa (estimada pelo coeficiente de variação) foram: proteínas urinárias com peso molecular acima de 200kDa, RPC, ALP, proteínas entre 151 e 200kDa, ALT e BUN. As variáveis PLQ, PHOS, HCT, ERI e CA apresentaram distribuição com comportamento mais estável e aproximadamente normal na sua unidade original. As variáveis Leucócitos, ALT, ALP, SDMA, número de bandas, proteínas urinárias entre 45 e 55kDa, entre 50 e 90kDa e 91 a 150kDa apresentaram distribuição próximo do normal após transformação logarítmica. Algumas variáveis rejeitaram a normalidade apenas pela presença de um único ponto discrepante.

Acima de cada gráfico observa-se o valor p do efeito global (*overall*). Se este valor p for menor que 0,05 há evidência de que, pelo menos uma dupla difere entre si. Os gráficos apresentam as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo. As letras acima de cada média representam as comparações múltiplas (*pairwise*). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. Recomenda-se interpretar as diferenças apenas quando ambos os testes (*overall* e *pairwise*) forem concordantes, isto é, apenas quando o teste global reportar um valor de p significativo e o teste par-a-par evidenciar pelo menos uma dupla diferente entre si. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comparação entre os grupos

Na análise final dos resultados dos exames dos animais estudados, observou-se que os cães dos grupos infectados por *L. infantum* estavam em estadiamento II a III da LVC de acordo com o BRASILEISH (2018). Desses animais, 8 cães do GLT foram estadiados em grau II e 2 em grau III e

do GLNT, 6 cães foram estadiados em grau II e 4 cães em grau III. Entretanto, vale ressaltar que o objetivo deste trabalho foi verificar se há um padrão discriminatório no proteinograma urinário entre os grupos, independente do tempo do tratamento e da terapia instituída.

5.1.1 Alterações hematológicas

Na avaliação dos resultados da contagem de eritrócitos e determinação do hematócrito e da hemoglobina, dois de 10 animais (20%) do grupo GLNT apresentaram valores abaixo da referência para espécie, entretanto, ambos apresentavam anemia microcítica hipocrômica, com presença de reticulócitos, demonstrando que apesar de classificada como arregenerativa ainda se tratava de uma anemia responsiva, esse achado pode ser justificado pelo momento da doença, uma vez que esses animais estavam em estágio III da LVC de acordo com o BRASILEISH (2018). A hiperplasia eritroide, mieloide e de megacariócitos é uma resposta esperada da medula óssea pela destruição destas células maduras na circulação periférica, principalmente de animais sintomáticos. Se a medula óssea consegue suprir esta demanda, verifica-se no sangue periférico aumento das formas eritroides imaturas, com reticulocitose e aumento do hematócrito (RASKIN e MESSICK, 2012), da mesma forma que o observado em alguns animais deste estudo. Esse achado, embora em número pequeno de animais, difere do mais frequentemente encontrado em cães infectados em estadiamentos mais avançados conforme apontado por Solano-Gallego (2011).

Embora alguns autores considerem a anemia como um achado pouco frequente na LVC (ALVAR *et al.*, 2004; AMUSATEGUI *et al.*, 2003), outros mencionam a anemia como um achado frequente, sendo reportada em cerca de 70% dos cães infectados com leishmaniose (FIGUEREDO *et al.*, 2012). A principal classificação da anemia nestes cães é a normocitose com normocromia, o que a caracteriza como sendo arregenerativa quanto à resposta medular (BANETH, 2006). De acordo com COSTA-VAL (2004) as principais causas envolvem a perda sanguínea pela epistaxe, ulcerações da pele, hemólise, inflamação generalizada, DRC e hipoplasia ou aplasia medulares. Além disso, há também a anemia imunomediada, não incomum na LVC, de acordo com Ribeiro, 2020.

Um animal do GC apresentava valor de eritrócito, hematócrito e hemoglobina discretamente acima do valor de referência, entretanto, não apresentou nenhuma alteração nos demais exames bioquímicos e parasitológicos associados, sendo possivelmente esses valores devido a um quadro

transitório de desidratação ou contração esplênica no momento da coleta, o que pode ser interpretado como uma policitemia relativa (ALMEIDA, 2014).

A análise do hemograma (leucograma e eritrograma) corresponde a um importante parâmetro que permite acompanhar a progressão da doença, funcionando como um biomarcador de prognóstico clínico-laboratorial pós-terapêutico. Em intervenções terapêuticas, caso a mesma tenha sido eficaz, esses parâmetros tendem à restauração de seus valores normais (COSTA, 2009; CARDOSO, 2018). Os animais do GLT apresentaram esses valores dentro do intervalo de referência considerado normal para espécie, sugerindo que as intervenções terapêuticas realizadas nesses pacientes, foram eficaz em conservar esses parâmetros em valores normais (CARDOSO, 2018).

Na figura 3 pode-se observar que os valores de eritrócito, hematócrito e hemoglobina diferiram estatisticamente entre os cães do GLNT e os dos GC e GLT, demonstrando a maior frequência da anemia em cães infectados *com L. infantum* não tratados. Embora a média dos cães do GLT tenha sido menor do que a do GC, não se observou diferença estatística entre os grupos, o que permite considerar que o tratamento leva o animal infectado a condição assintomática (BANETH e SHAW, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2013). Outros autores também referiram diminuição de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina no grupo de cães infectados e doentes, quando comparados a cães infectados assintomáticos, expostos saudáveis ou não infectados (COURA-VITAL *et al.*, 2011; FREITAS *et al.*, 2012; BRASILEISH, 2018).

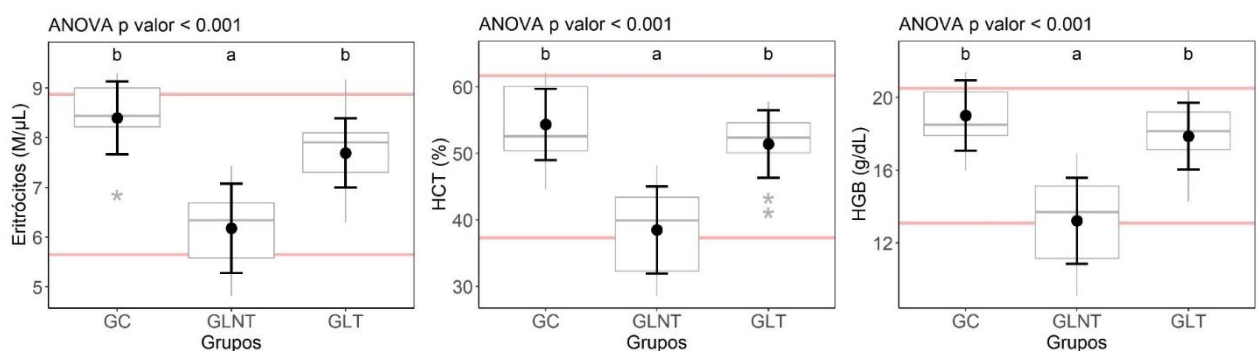


Figura 3: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média do hematócrito (HCT), contagem de eritrócitos e determinação de hemoglobina (HGB) de cães hígdios (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

As contagens total e diferencial de leucócitos não obedeceram a qualquer padrão nos cães infectados, tratados ou não. Alguns animais apresentaram leucocitose com desvio à esquerda do tipo regenerativo enquanto outros apresentam leucopenia, geralmente por neutropenia, ou mesmo perfil leucocitário normal, da mesma forma que descreveram alguns autores (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA-VAL, 2004; SOLANO-GALLEGU *et al.*, 2011; RIBEIRO, 2020).

Apenas um animal do GLNT apresentou leucocitose (18.220/ μ L), o que aumentou a amplitude do *box plot*, conforme observado na figura 4, entretanto, pode-se observar que, ainda assim a contagem total de leucócitos não diferiu estatisticamente entre os grupos.

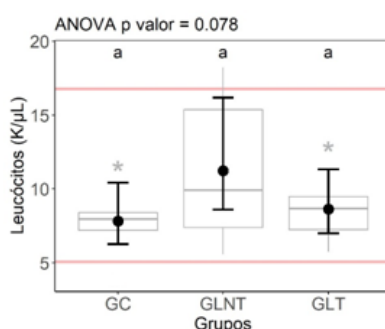


Figura 4: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da contagem total de leucócitos de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

A leucocitose foi descrita por Riley e Rupert (2015) em associação a processos sistêmicos relacionados a doenças inflamatórias crônicas. Possivelmente a leucocitose esteja relacionada a piores prognósticos, embora ainda não tenha sido avaliada em modelos experimentais preditores de desfecho para cães com LVC. A magnitude de aumento, associada à presença de células imaturas da linhagem neutrofílica, ressalta o intercurso de processo inflamatório e, que mesmo tendo sido encontrado em apenas um animal, demonstrou gravidade. De acordo com e Solano-Gallego (2011) e Ribeiro (2020) a variação de leucocitose ou leucopenia é associada a possíveis coinfeções ou parasitismo medular.

Sabe-se que a exacerbação de respostas anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias determina o êxito ou a falha de infecção por *Leishmania sp* (BARBIÉRI, 2006). O alto envolvimento de órgãos e sistemas devido à elevada produção de citocinas inflamatórias são típicas da síndrome inflamatória

sistêmica que se instala gradativamente no paciente como descreveram COSTA *et al.* (2010). Oliveira (2017) ressaltou em seu estudo que durante a doença, o intenso parasitismo e a inflamação crônica contribuíram para o constante recrutamento de monócitos para os tecidos afetados.

Embora trabalhando com outra afecção, a leptospirose, pesquisadores avaliaram 90 cães positivos e correlacionaram o desfecho aos achados clínicos e laboratoriais, considerando anemia, trombocitopenia e leucocitose bons preditores de gravidade (KNÖPFLER *et al.*, 2017). Monócitos e plaquetas também foram indicados como importantes parâmetros de prognóstico da resolução da LVC e do seu tratamento, podendo atuar como biomarcadores, melhorando assim a abordagem terapêutica no trabalho feito por Oliveira, 2017.

Segundo a literatura, a trombocitopenia ocorre em aproximadamente 40% dos cães com leishmaniose, o que pode refletir em alterações no perfil hemostático do paciente (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA-VAL, 2004). Um animal do GLNT e um do GLT apresentaram trombocitopenia (43.000/ μ L e 11.000/ μ L respectivamente). Nenhum destes animais apresentava sinais de hemorragia ou trombose, da mesma forma que os animais avaliados por Amusatogui *et al.*, (2003) com LVC. Outro estudo, entretanto, apontou para uma frequência de trombocitopenia de 82,4% (FIGUEREDO *et al.*, 2012) em cães com o diagnóstico de LVC em Pernambuco, Brasil. Dessa forma a trombocitopenia é um achado variável dentre os estudos levantados e depende do mecanismo envolvido na patogenia da leishmaniose e do estágio da doença sistêmica. Quanto mais grave o comprometimento sistêmico, maior a chance desta observação (AMUSATEGUI *et al.*, 2003; COSTA-VAL, 2004; OLIVEIRA, 2017).

A trombocitopenia e a trombocitopenia podem resultar de alterações na parede do vaso devido à vasculite, esplenomegalia, alterações na trombocitopoiese, aumento na destruição plaquetária e/ou insuficiência renal ou hepática (CORTESE *et al.*, 2009). Terrazzano e seus colaboradores (2006) observaram uma associação significativa entre a presença de anticorpos antiplaquetários e sinais clínicos moderados a graves em cães infectados e, em particular, em animais com trombocitopenia moderada a grave, e presumiram que os dados indicavam uma trombocitopenia imunomediada secundária, entretanto, o diagnóstico dessa trombocitopenia mediada por anticorpos em cães é complicado pela falta de um ensaio sensível e específico para a detecção de anticorpos antiplaquetários. Cortese e colaboradores (2009) também relataram que as amostras de soro obtidas a partir de os cães infectados com *L. infantum* continham anticorpos IgM e IgG que foram capazes

de se ligar às plaquetas e que nenhuma atividade de ligação foi observada nas amostras dos cães saudáveis, sugerindo que os anticorpos antiplaquetários podem desempenhar um papel na trombocitopenia dos cães. Em dose anti-inflamatória a prednisona associada à quimioterapia anti-leishmania clássica com antimoniato de meglumina e alopurinol aumenta a taxa das plaquetas e diminui a agregação dessas células em cães infectados doentes (CORTESE *et al.*, 2009).

Um animal do GLT apresentou trombocitose (806.000/ μL), entretanto, como este valor apareceu isolado, acredita-se que se trata de uma causa transitória, como um possível processo inflamatório, ou contração com mobilização esplênica, ou ainda, de acordo com Ribeiro (2020) os casos de trombocitose podem estar relacionados à agregação plaquetária em processos de sangramento ocultos. Apesar dessas alterações, pode-se observar na figura 5 que os valores de plaquetas não diferiram estatisticamente entre os grupos, assim como também foi observado nos animais do trabalho realizado por Silva (2007).

De modo geral, os valores médios para as contagens totais e diferenciais dos leucócitos, e contagem de plaquetas, não sofreram influências significativas nos animais infectados em tratamento ou ainda não tratados. O infiltrado inflamatório e o parasitismo medular parecem não influenciar negativamente as células precursoras de leucócitos e plaquetas, como se supõe que ocorra com as hemácias. Achados e discussões semelhantes foram realizados por COSTA-VAL (2004).

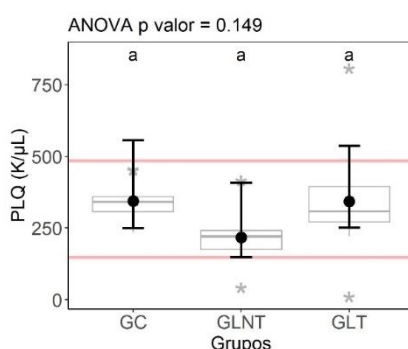


Figura 5: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da contagem de plaquetas de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Em relação às proteínas séricas totais, apenas um animal do GLNT apresentou valor discretamente abaixo (5,0g/dl) do valor de referência (5,2g/dl) (GRAUER, 2010). Nessa variável os animais em

todos os grupos não apresentaram diferença estatística entre si (figura 6). Porém, no perfil das proteínas plasmáticas dos cães infectados houve alterações principalmente quanto à relação albumina e globulina séricas (A/G). Três animais do GLNT (30%) apresentaram os valores de albumina abaixo do valor de referência (2,2 - 3,9g/dL), e desses animais, dois (20%) apresentaram valores de globulina acima do valor de referência (2,5 - 4,5 g/dL) (GRAUER, 2010). Três animais deste grupo apresentaram inversão dos valores da A/G, com resultados inferiores a 0,6 que segundo Silva (2007) são considerados indicativos de evolução da doença no animal. As proteínas séricas são chave na caracterização da evolução e na manifestação da lesão renal, uma vez que ela se associa a síndrome da hiperviscosidade e da deposição dos imunocomplexos, comumente encontrada nos animais em estágios III ou mais avançados da LVC (SOLANO-GALLEGO, 2011 E RIBEIRO, 2020).

Na figura 6 são observados os valores de albumina e globulinas. Para a concentração sérica de albumina foram observadas diferenças entre os cães do GLNT e dos GC e GLT, sendo semelhantes entre GC e GLT. Para a concentração sérica de globulina a diferença só pôde ser observada entre cães do GLT e GLNT e os valores de globulinas de ambos os grupos não diferiram do GC. Embora se tenha notado que os resultados das globulinas de animais positivos para leishmaniose e tratados sejam muito semelhantes aos do GC, provavelmente a semelhança entre GLNT e GC se deveu a maior amplitude dos resultados observados nos cães do GLNT.

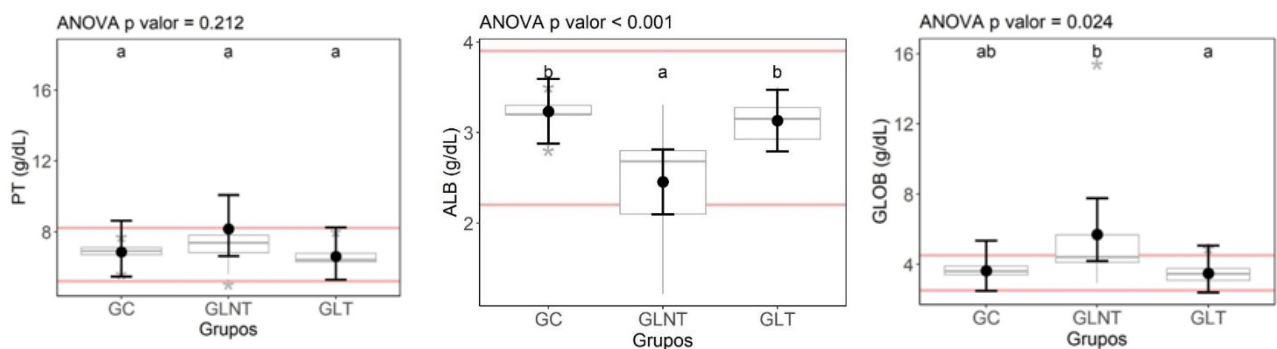


Figura 6: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica de proteínas totais (PT), albumina (ALB) e globulinas (GLOB) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Um animal apresentou elevação na atividade de ALP no GC (231U/L), mas sem demais alterações em outros exames clínicos ou laboratoriais. Dois animais do GC também apresentaram aumento da atividade da ALT (254 U/L e 147U/L), também considerados isolados. Dois animais no GLNT também apresentaram aumento da atividade da ALT (174U/L e 264U/L), e apenas um cão do GLT (354U/L). Talvez pela distribuição dos resultados, pode-se observar na figura 7 que os valores de ALP e ALT não diferiram estatisticamente entre os grupos. Valem ressaltar que, alguns dos animais do GLNT e do GLT apresentaram valores de ALT 62% e 75% maiores que os considerados como intervalos de referência para a espécie canina (125U/L), respectivamente.

Alguns autores relatam que o aumento na atividade das enzimas hepáticas, bem como nas concentrações de bilirrubinas, não ocorre com frequência nos cães portadores de LV (AMUSATEGUI *et al.*, 2003) e, quando ocorrem estão relacionadas à evolução da doença, em função da multiplicação das formas amastigotas nos macrófagos teciduais (TAFURI *et al.*, 1989). Em geral, a hepatite crônica observada nesses animais é caracterizada por infiltrado linfohistioplasmocitário periportal, com proliferação fibroblástica, hipertrofia e hiperplasia das células de Kupffer (FERRER, 2002).

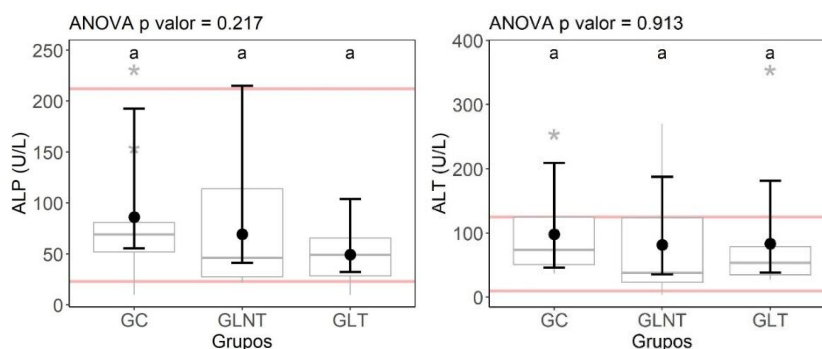


Figura 7: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica das atividades de fosfatase alcalina (ALP) e alanina aminotransferase (ALT) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%.**Representam indivíduos *outliers*.

5.1.2 Marcadores e estadiamento da função renal

Nesse estudo foi realizada a dosagem de BUN que equivale a 2,15mg/dL de ureia (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Na figura 9 pode-se observar que os valores de BUN diferiram estatisticamente entre os cães do GLNT do GC e do GLT, mas os valores de creatinina não apresentaram diferença, novamente justificado pela heterogeneidade dos resultados observados em cães infectados por *L. infantum* assintomáticos ou doentes, que se mostrou maior nos animais do GLNT (vide *box plot*), com um ponto (asterisco) muito acima da média do grupo. Todos os animais do GC apresentaram resultados dentro da faixa de normalidade para esta variável. Somente um animal do GLT apresentou aumento muito discreto no valor de creatinina (1,5mg/dL), mas com o valor de BUN normal. Esse aumento de creatinina ainda manteve esse animal em estágio I da IRA, de acordo com a IRIS que estabeleceu recentemente valor máximo de 1,4mg/dL para cães (IRIS, 2019).

No GLNT, três animais apresentaram valores de BUN sérico muito elevados (171, 160 e 78mg/dl), e dois deles também apresentaram valores de creatinina acima do intervalo de referência (1,8 e 3,9mg/dl) para a espécie canina (<1,4mg/dL), demonstrando que apesar de não apresentarem alteração de imagem renal ultrassonográfica, esses cães já apresentavam IRA grau II e grau III. Oito animais do GLNT e 10 animais do GLT foram estadiados como IRA grau I devido aos valores encontrados de creatinina séricas e a presença da LVC que predispõe esses pacientes ao dano renal. De acordo com o IRIS esses animais devem ter os valores de creatinina e débito urinário monitorados (IRIS, 2019).

Tabela 3: Estadiamento da injúria renal aguda (IRA) segundo a sociedade internacional de interesse renal (IRIS) de cães infectados por *Leishmania infantum* tratados (GLT) e não tratados (GLNT) segundo a BRASILEISH (2018).

Classificação*	GLNT	GLT
Grau I	8	10
Grau II	1	0
Grau III	0	0
Grau IV	0	0
IRIS –IRA Grau V	0	0

*Grau I : Creatinina <1,6mg/dL. Grau II: Crea 1,7-2,5mg/dL. Grau III: Crea 2,6-5 mg/dL. Grau IV: 5,1-10 mg/dL. Grau V: >10 mg/dL (IRIS, 2019).

As alterações na atividade funcional dos rins, representadas pelo aumento das concentrações séricas ureia e creatinina é um achado relativamente comum em cães com LVC (PALTRINIERI *et al.*, 2016). Segundo alguns estudos, cerca de 50% dos animais portadores de LVC apresentam azotemia (AMUSATEGUI *et al.*, 2003).

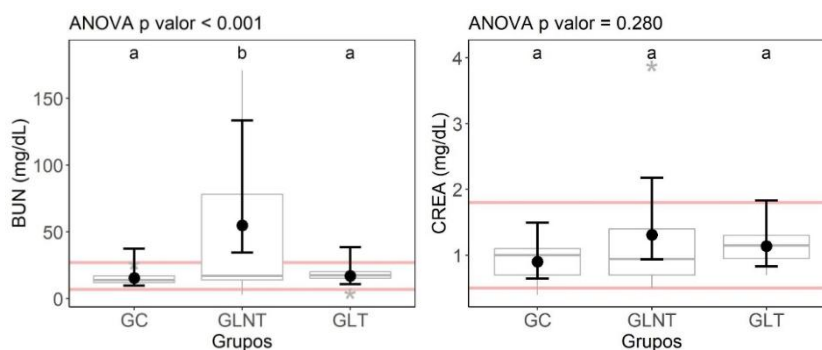


Figura 8: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média das concentrações séricas de nitrogênio ureico sanguíneo (BUN) e creatinina (CREA) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Três animais do GLNT apresentavam valores elevados de SDMA (19, 22 e 29 μ g/dl), desses, dois são os mesmos que apresentavam também valores aumentados de creatinina (1,8 e 3,9mg/dl). Esses cães também apresentavam os maiores valores de RPC, reforçando que esses animais (30%) apresentavam uma lesão renal ativa. Apenas um cão do grupo de GLT apresentou valor discretamente aumentado de SDMA (17 μ g/dl), porém sem aumento de creatinina. Segundo as recomendações da IRIS este animal deve ser monitorado e os resultados confrontados com os da urinálise, mas sugere se tratar de um nefropata que, ainda não apresentou aumento de creatinina, mas pode ter causado redução na TGF. Pode-se observar a diferença estatística entre os cães do GLNT e dos GC e GLT no gráfico da figura 9.

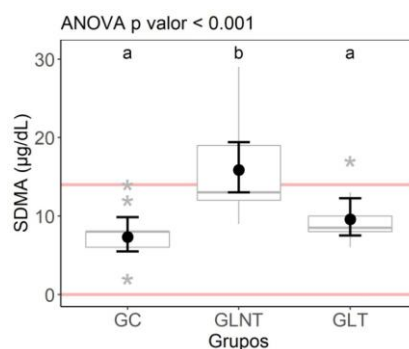


Figura 9: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da concentração sérica de dimetilarginina simétrica (SDMA) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Independente da etiologia da doença de base, os principais desfechos em pacientes com DRC são as suas complicações, que envolvem anemia, acidose metabólica, desnutrição e alteração do metabolismo de cálcio e fósforo, decorrentes da perda funcional renal (KIRSZTAJN *et al.*, 2011). Em relação à dosagem sérica de fósforo, o GLT diferiu estatisticamente do GLNT apesar de todos apresentarem valores de fósforo sérico dentro da referência para espécie (figura 11). A hiperfosfatemia ocorre com regularidade em cães com a TFG diminuída, em geral, as concentrações séricas de ureia acompanham as do fósforo. Em pacientes com DRC a hipocalcemia também pode ser observada por perda da capacidade reabsortiva diferente da IRA que normalmente não há alterações no cálcio sérico (GRAUER, 2010). Os valores de cálcio e fósforo séricos de todos os grupos apresentaram-se dentro dos valores de referência para espécie, com exceção de um animal do GLT (10%) que apresentou leve diminuição de cálcio (7,2mg/dl), entretanto, esse animal apresentava todos os demais parâmetros clínico laboratoriais analisados dentro dos valores de normalidade.

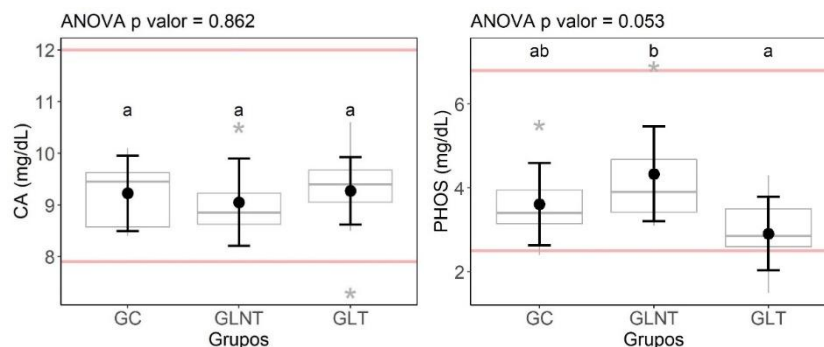


Figura 10: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média das concentrações séricas de cálcio (CA) e fósforo (PHOS) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

5.1.2.1 Avaliação urinária

5.1.2.1.1 Urinálise

Os animais deste estudo mantinham a capacidade de conservar a concentração urinária em todos os grupos como pode ser observado na tabela 3. Alguns apresentaram, entretanto, aumento da densidade, contudo a análise deste aumento deve ser avaliada junto com demais parâmetros presentes na urinálise, feitas e apresentadas posteriormente. É importante lembrar que variações na densidade e no pH podem ocorrer também devido ao estado de hidratação do paciente e consumo de dieta hiperproteica respectivamente (NAKAMAE, 1980). Tanto o valor de pH como o de densidade urinária não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Tabela 4. Valores de pH e de densidade urinária em cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT).

pH	GC	6,35 ±0,84a
	GLT	6,6±0,80a
	GLNT	6,83±0,85a
Densidade	GC	1039±15,34a
	GLT	1032±12,31a
	GLNT	1038±11,91a

Letras iguais representam equivalência estatística (P>0,05)

Glicosúria e hemoglobinúria foram observados em 10% dos animais do GLT e hemoglobinúria em 10% do GC, e, portanto, não puderam ser estatisticamente comparados.

Na urinálise é fundamental, dentre outras variáveis, verificar a densidade, que comumente se encontra normal ou aumentada na IRA devido às causas pré e pós-renais, diferente do observado em cães portadores de DRC, que são geralmente isostenúricos em consequência da perda da reserva funcional levando a redução na capacidade de concentrar urina caracterizando insuficiência renal leve se a azotemia ainda não estiver presente (BERGSTRÖM, 2004; SQUIRES, 2014; VEADO *et al.*, 2014). Alterações como proteinúria, cilindrúria, hematúria e do pH podem ser observadas tanto na IRA como na DRC (VEADO *et al.*, 2014).

É importante ressaltar que a perda de proteínas detectada através da urinálise deve ser analisada junto à densidade urinária e classificada de acordo com o local da perda ou com os mecanismos que a induziram, abrangendo causas pré-renais, renais e pós-renais (BARSANTI e FINCO, 1979). Na análise microscópica observou-se sedimento ativo em alguns animais no GC, embora estes tenham sido considerados clinicamente hígidos, esses animais apresentaram alterações urinárias compatíveis com quadros de cistite, provavelmente de origem bacteriana, devido às alterações de flora observadas (tabela 5). Isso pode justificar a proteinúria destes animais, considerada de origem pós-renal (tabela 4).

Ocorre bilirrubinúria sempre que há elevação desse pigmento no sangue, em quantidade superior ao limiar renal (NAKAMAE, 1980), o que sugere distúrbios da função hepática ou hemólise excessiva, entretanto nos cães, diferente de outras espécies, os rins apresentam um papel ativo no metabolismo da bilirrubina. As células dos túbulos renais apresentam todas as enzimas necessárias para produzir bilirrubina a partir do grupo heme e conjuga-la, possibilitando sua excreção. Consequentemente, a urina de um cão normal pode conter quantidades mínimas, porém detectáveis de bilirrubina (GRAUER, 2010). Na tabela 4 pode-se observar que 90% dos animais do GC apresentou uma cruz, enquanto que 40% dos cães do GLNT apresentaram 3 cruces de bilirrubinúria, sinalizando distúrbio da função hepática excretora.

Tabela 5. Distribuição % de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT) apresentando proteinúria e bilirrubinúria, segundo tira reagente.

	Proteína			
	Traços	1+	2+	3+
GC	30%	40%	10%	20%
GLT	10%	60%	20%	10%
GLNT	0%	33%	50%	17%
	Bilirrubinúria			
	Neg.	1+	2+	3+
GC	0%	90%	0%	10%
GLT	30%	40%	20%	10%
GLNT	40%	0%	20%	40%

Tabela 6. Distribuição % de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT) apresentando alterações sedimentoscópicas.

	Eritrocitúria			
	Neg.	1+	2+	3+
GC	80%	10%	10%	0%
GLT	10%	70%	10%	10%
GLNT	33%	33%	17%	17%
	Leucocitúria			
	Neg.	1+	2+	3+
GC	80%	20%	0%	0%
GLT	20%	80%	0%	0%
GLNT	33%	67%	0%	0%
	Bacteriúria			
	Neg.	1+	2+	3+
GC	0%	70%	20%	10%
GLT	10%	70%	20%	0%
GLNT	16%	67%	17%	0%
	Cristalúria (cristais amorfos)			
	Neg.	1+	2+	3+
GC	40%	50%	10%	0%
GLT	70%	10%	10%	10%
GLNT	66%	0%	17%	17%

A presença de cilindros granulares ou celulares pode ser consistente com dano tubular (PALTRINIERI *et al.*, 2016). Apenas um animal do GLT e um do GLNT apresentaram cilindros. Uma cruz de células de transição foi observada em amostras de urina de 60% dos cães hígidos (GC), em 30% dos do GLT e em 17% do GLNT. Células renais puderam ser observadas em 10%

das urinas avaliadas nos GC e GLT e em 50% das amostras do GLNT. A seguir, a presença desse achado foi confrontado com a RPC desses animais.

Apesar dos cristais de xantina ocorrerem com muita frequência em cães submetidos ao tratamento com o alopurinol (PALTRINIERI *et al.*, 2016; VIANA, 2019), nenhum animal apresentou traços desses cristais neste trabalho.

5.1.2.1.2 Relação proteína/ Creatinina urinária (RPC)

Braga e colaboradores (2015) ressaltaram a importância da identificação da causa primária da disfunção renal e dos fatores secundários que podem contribuir para a progressão da doença, como hipertensão e proteinúria, buscando estabelecer um tratamento adequado para reduzir a progressão da doença renal para o estágio final de insuficiência.

A avaliação da proteinúria é obrigatória, pois se trata de um fator de risco para a progressão da nefropatia. De acordo com as diretrizes do American College for Veterinary Internal Medicine (ACVIM), a proteinúria deve ser avaliada em qualquer cão que sofre de uma doença predisponente, como a LVC (PALTRINIERI *et al.*, 2016). Segundo a literatura a proteinúria é a alteração mais frequentemente descrita na LCV, variando de 70% a 100% dos casos (LESS *et al.*, 2005; HARLEY e LANGSTON, 2012). Barsanti e Finco (1979) sugeriram que o melhor indicador de perda proteica urinária é a determinação da relação proteína creatinina urinárias (RPC), visto que minimiza as interferências do volume urinário. Os cães não proteinúricos têm uma proporção RPC <0,2, a proteinúria limítrofe varia de 0,2 a 0,5 e os cães proteinúricos têm uma proporção RPC > 0,5 de acordo com a classificação IRIS. Entretanto, é fundamental a confirmação da persistência do aumento da RPC duas a três ocasiões com intervalo mínimo de 15 dias para confirmar a proteinúria (POLZIN *et al.*, 2005).

Três animais do GLNT apresentavam valores bem superiores de RPC (3,02; 16,88 e 15) ao intervalo considerado fisiológico para a RPC de cães, estes resultados apontam para proteinúria renal persistente e geralmente se deve à doença glomerular renal, conforme postularam vários autores, e ainda justifica presença de células renais encontrada no sedimento urinário desses animais (LESS *et al.*, 2005; HARLEY e LANGSTON, 2012). Apesar de apresentarem valores menores que

o GLNT, três animais do GLT também apresentaram valor aumentados para RPC (2,86; 3,04; 0,78).

Paltrinieri e colaboradores (2016) relataram que, após o tratamento *leishmanicida*, o grau de proteinúria diminui em 4–8 semanas, entretanto, esses autores se referiram ao uso de antimoniais e ressaltaram que os tratamentos com miltefosina podem exigir mais tempo para serem benéficos, o que também foi concluído por Manna *et al.* (2015).

A possibilidade de restaurar a função renal normal depende da gravidade do dano renal no momento do primeiro diagnóstico. Portanto, a creatinina sérica e a proteinúria devem ser avaliadas repetidamente durante todo o acompanhamento do paciente (PALTRINIERI *et al.* (2016).

Na figura 11 observam-se os valores de RPC e a diferença estatística entre os cães do GLNT para os dos GC, demonstrando que os animais do GLNT apresentaram proteinúria importante. Apesar dos grupos com cães infectados por *L. infantum* não terem demonstrado diferença estatística entre si devido à heterogeneidade dos resultados no GLNT, 30% dos cães desse grupo demonstraram proteinúria significativa, apontando para um importante dano glomerular.

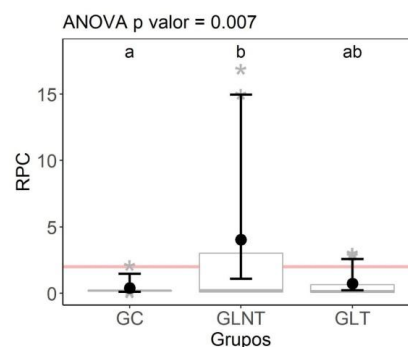


Figura 11: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da relação proteína creatinina urinárias (RPC) de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

O aumento da excreção urinária de proteínas está correlacionado com a diminuição da sobrevivência e isso é independente da doença de base e de qualquer outro fator. A doença renal proteinúrica progride mais rapidamente do que a não proteinúrica, e a redução na excreção proteica urinária

retarda a progressão da doença renal e a inflamação intersticial em humanos e cães. Se a proteinúria estiver presente e persistente, esforços devem ser feitos para diagnosticar a causa e reduzir a gravidade (HARLEY e LANGSTON, 2012). Além dos exames seriados para confirmação da persistência do aumento da RPC a investigação da origem da proteína urinária pode ser feita através do exame de SDS-PAGE, já que de acordo com as diretrizes recentes da IRIS, a biópsia renal é recomendada apenas no caso de progressão rápida da DRC ou em cães que não respondem aos tratamentos convencionais (PALTRINIERI *et al.*, 2016; IRIS, 2019).

5.1.2.4 Análise Eletroforética da Urina

A análise eletroforética das proteínas urinárias pode orientar o clínico em relação à identificação do compartimento renal comprometido e gravidade do dano renal, através da análise das características e padrão das bandas demonstradas no gel de eletroforese (HOKAMP *et al.*, 2018). Poucos estudos com eletroforese urinária de cães encontram-se na literatura e, nenhum com LVC foi encontrado em buscas recentes aos bancos de dados disponíveis, tais como o PubMed. Este é, portanto, o primeiro trabalho que traz resultados como este, na expectativa de caracterizar a proteinúria em quantidade e qualidade, predizendo localização e gravidade de lesão em cães infectados por *L. infantum*, submetidos ou não a tratamentos.

O número de bandas total diferiu entre os grupos e, por si só já é um dado importante, visto que animais do GC apresentaram quantidade menor e menos heterogeneidade de perfil proteico, de forma semelhante aos animais do GLT, com ambos os grupos diferindo da perda proteica urinária dos cães do GLNT, como observado na figura 12.

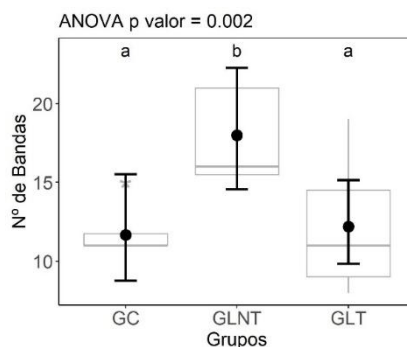


Figura 12: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média do número de bandas de eletroforese urinária de cães hígdos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Estudos relataram que até 100% dos cães com LV apresentam glomerulonefrites proliferativas e quase 80% apresentavam nefrite intersticial (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008). Na separação por escores para diferenciar a origem da proteinúria, se glomerular (≥ 45 kDa) ou tubular (< 45 kDa) a partir do peso molecular pode-se reparar, na figura 13 que não houve diferença entre os grupos. A média do PM proteico se comportou de forma semelhante, sugerindo uma tendência dos cães do GLNT a apresentar uma média maior na perda de proteínas de origem tubular que cães do GC ou GLT. Embora a estatística não tenha demonstrado diferença entre os grupos com perda proteica superior a 151kDa, o grupo que apresentou maior número de animais com esse PM foi, também o GLNT, sugerindo a presença de lesão glomerular mais intensa em cães desse grupo.

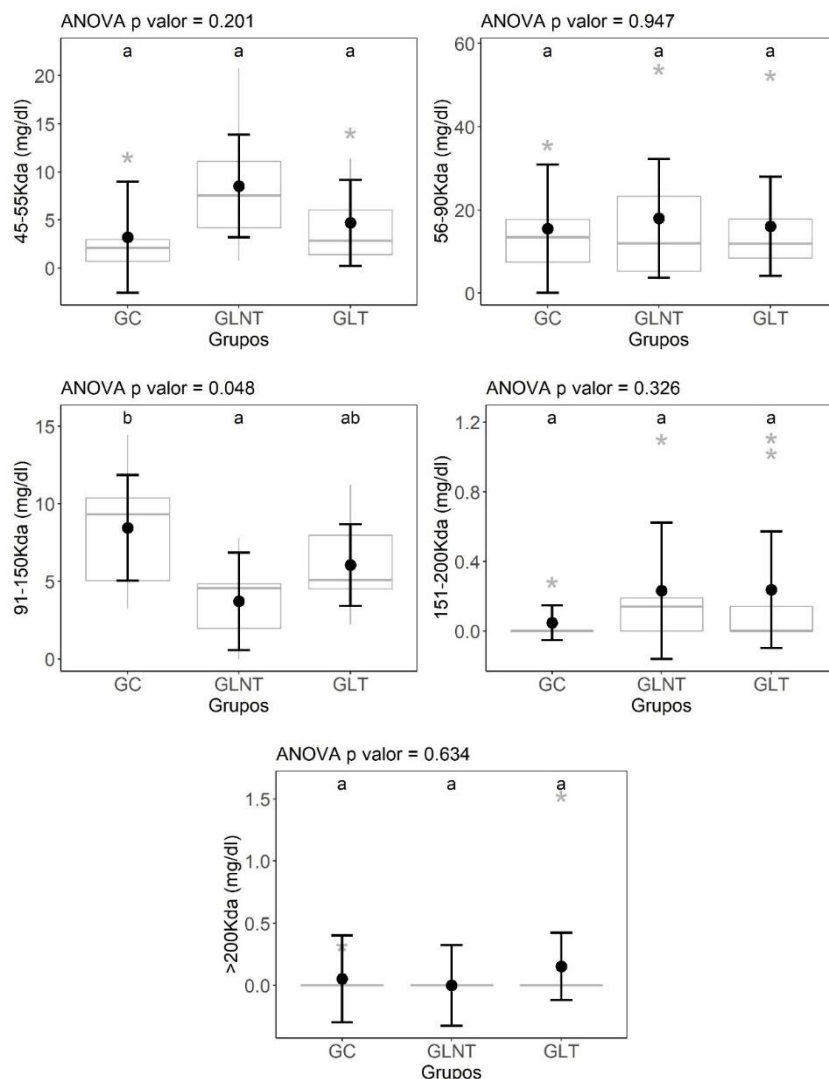


Figura 13: Gráficos demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da estratificação de peso molecular proteico de bandas de eletroforese urinária de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Para Zatelli *et al.* (2003), lesões glomerulares que caracterizam o envolvimento renal em cães devido a LVC determinam o aparecimento de proteinúria que varia de normal a patológica. A avaliação qualitativa dessas proteínas assume um papel central no diagnóstico precoce de condições glomerulares que, de acordo com esses autores são tipicamente lesões primárias detectadas durante o curso de condições patológicas imunomediadas. Com base nos resultados do SDS-PAGE, ao analisar o escore de severidade de lesão glomerular na figura 14, observa-se que não houve

diferença estatística entre os grupos. A presença desse escore em animais do GC pode apontar processos insidiosos, subclínicos ou subdiagnosticados.

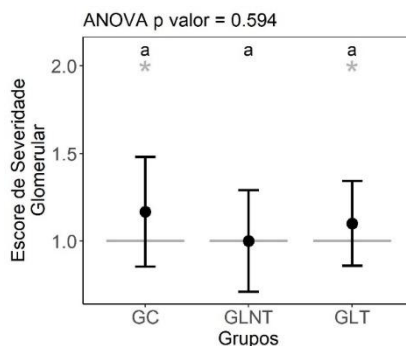


Figura 14: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média dos escores de severidade glomerular de bandas de eletroforese urinária de cães hígdos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

No estudo feito por Zatelli e colaboradores (2003) 95% dos cães com LVC tiveram proteinúria glomerular não seletiva, evidenciado pela detecção de albumina, transferrina e IgG e somente 5% proteinúria mista (tubular e glomerular). Frazílio *et al.* (2018) sugeriram que o dano glomerular permite a filtração de proteínas, causando proteinúria que danifica o epitélio tubular renal, assim como explica Brenner (1982). Já Paltrinieri e colaboradores (2016) usando SDS-PAGE, demonstraram que cães infectados por *L. infantum* têm um padrão glomerular e tubular misto, os autores citaram que ocasionalmente, proteinúria de baixo peso molecular sem sinais de doença glomerular pode ser observada, possivelmente devido à proteinúria da cadeia leve livre, ou seja, proteinúria pré-renal associada à produção de anticorpos altamente ativados, em vez de dano tubular. Neste trabalho, o GLNT demonstrou um escore de severidade tubular maior quando comparado com os outros grupos, corroborando com os relatos da literatura que demonstraram que a LVC provoca lesões renais intersticiais e tubulares, específicas da doença independente de alterações glomerulares (ALBUQUERQUE *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2008), conforme demonstrado na figura 15.

O grau de escore tubular no GLNT mostra a importância de se mensurar a GGT urinária em cães infectados por *L. infantum*, já que sua presença na urina reflete perdas a partir das microvilosidades das células tubulares do túbulo proximal, sendo, portanto, um importante marcador de injúria renal

que pode demonstrar lesão em quadro inicial, que pode inclusive preceder dano glomerular, visto que a doença renal é sempre de caráter progressivo e pode se tornar irreversível (GRAUER, 2010; COWGILL *et al.*, 2016). Assim, a GGT urinária associada ao SDS-PAGE e a RPC pode ajudar a diferenciar se há o dano tubular ou se trata de proteinúria pré-renal associada à produção de anticorpos como sugeriu Paltrinieri e colaboradores (2016). Frazilio *et al.*, (2018) também reforçaram a importância da avaliação da RPC e enzimúria em cães com LVC mesmo que com excreção renal normal.

Apesar do GLT não ter diferido estatisticamente do GLNT a média do escore do grupo de cães tratados está bem próxima do GC, indicando que a terapêutica nos cães desse estudo pode ter colaborado para a redução do grau de severidade de lesão tubular causado pela doença.

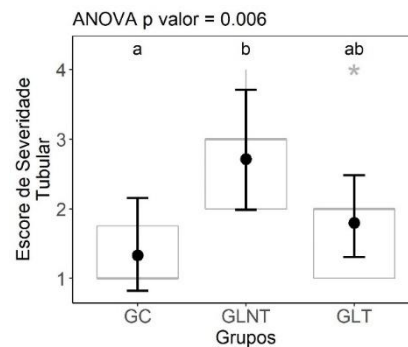


Figura 15: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média dos escores de severidade tubular de bandas de eletroforese urinária de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

5.1.3 Análise de componente principal

A figura 16 demonstra a análise multivariada dos componentes principais, onde foram analisadas variáveis com variáveis (seta com seta), animal com animal (ponto com ponto) e variável com animal (ponto com seta). Para interpretar o gráfico na figura 16, observamos aquelas que apresentam as maiores flechas. Duplas de variáveis com correlações positivas muito fortes aparecerão muito próximas entre si, com flechas apontando para o mesmo sentido. Duplas de variáveis com correlações negativas muito fortes aparecerão diametralmente opostas, com flechas apontando em sentidos opostos. Variáveis com setas perpendiculares entre si apresentam uma

correlação próxima à zero. Cada um dos pontos representa um animal. Pontos próximos entre si representam animais que são similares em relação às variáveis analisadas. Pontos que se localizam na mesma direção da ponta da seta, tendem a possuir maiores valores dessa variável e se os pontos estiverem na direção oposta, então estes animais tendem a possuir valores menores dessa variável.

Analisando o gráfico, podemos notar uma relativa separação dos animais dos grupos GC e GLT que tenderam a se localizar à esquerda, apresentando maiores valores das variáveis Escore de Severidade Glomerular, proteínas urinárias com peso superior a 200Kda, HCT e Albumina. Já os animais do grupo GLNT tenderam a se localizar à direita apresentando menores valores das variáveis citadas e maiores valores das outras variáveis cujas setas apontam para a direita, principalmente BUN, CREA, SDMA, RPC e Escore de Severidade Tubular.

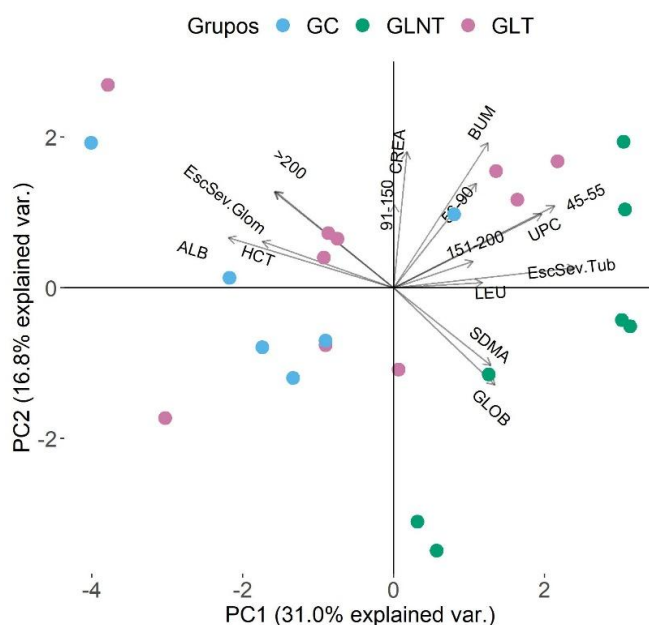


Figura 16: Gráfico dos primeiros dois eixos obtidos através da Análise de Componentes Principais. EscSev.Tub (Escore de severidade de lesão tubular). EscSev.Glom (Escore de severidade de lesão glomerular).

Na figura 17 encontra-se apresentado o gráfico com as curvas suavizadas ajustadas para cada grupo, onde se observa que os três grupos apresentaram um pico entre 60 e 70kDa, devido a presença de albumina, sendo o GLNT com os maiores valores. O GC também apresentou um pico em 40kDa, enquanto o grupo GLT apresentou um pico em 50kDa, evidenciando que há nesses pesos algum potencial biomarcador que diferencia os grupos, ainda não identificado, e diferente das proteínas de baixo peso molecular revisadas neste trabalho, visto que as principais proteínas de baixo peso

molecular como β 2- microglobulina, cistatina C, RBP, IL- 8, NGAL e α 1M possuem PM de 12, 13, 21, 24, 25 e 26kDa respectivamente (YU *et al.*, 1983; MOTTA, 2000; FREY *et al.*, 2008; GRAUER, 2016; DUSSE *et al.*, 2017). Estes resultados vão conduzir para maiores investigações proteômica das amostras estocadas, visando à busca de um possível novo biomarcador de lesão.

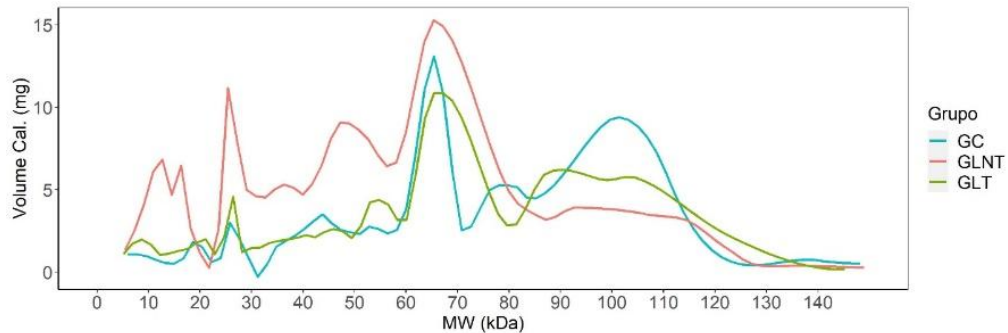


Figura 17: Médias dos volumes calculados para cada peso molecular das proteínas urinárias de cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT).

Outros picos menores puderam ser verificados para o grupo GLNT por volta de 9 e 18kDa e 24-30kDa sugerindo a presença de proteínas como a cistatina C, α 1M, RBP e IL-18. Observando os picos, foi feita uma análise refinando as bandas para melhor visualização da diferença entre os grupos e a análise estatística não demonstrou diferença significativa para a presença de proteínas com PM de 47-53kDa, mas apresentou diferença para presença de proteínas entre 9-18 e 24-30kDa e de (figura 18 e 19).

Na figura 18 observa-se que o GLNT diferiu dos grupos GC e GLT, com o GLNT apresentando maior quantidade de proteínas com PM entre 9-18 e 24-30kDa que o GLT.

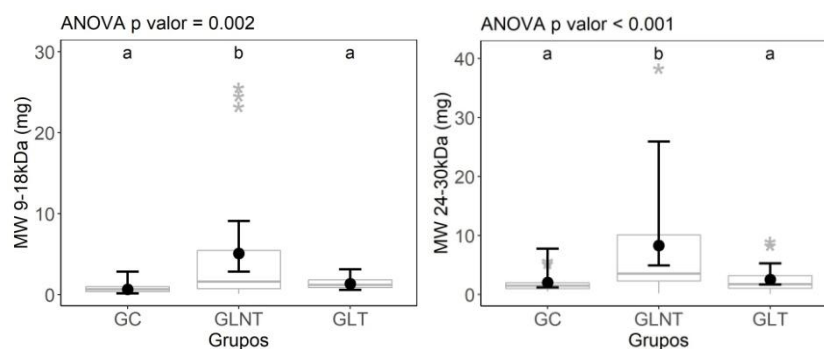


Figura 18: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da presença de proteínas com peso molecular entre 9-18 kDa e 24-30kDa em cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Na figura 19 observa-se que o GLNT apresentou maior quantidade de proteínas com PM entre 47-53kDa, com o valor p global da ANOVA significativo, mas as comparações múltiplas não encontraram diferenças entre o grupos.

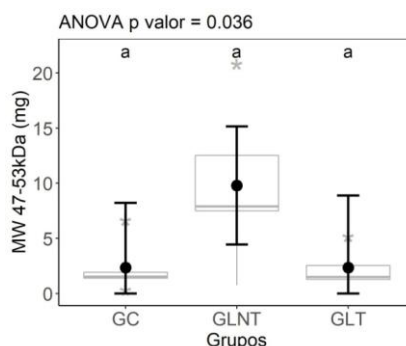


Figura 19: Gráfico demonstrando as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para a média da presença de proteínas com peso molecular 47-53kDa em cães hígidos (GC), infectados por *Leishmania infantum* e tratados (GLT) e infectados não tratados (GLNT). Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra não possuem diferenças significativas entre si a significância de 5%. *Representam indivíduos *outliers*.

Como observado na figura 18, o grupo de animais sem tratamento apresentou diferença estatística para presença de proteína urinária com PM entre 9-18kDa e 24-30kDa para o GLNT. Discriminar quais as proteínas nessas bandas através da proteômica pode favorecer o diagnóstico e prognóstico nesses animais.

A urina final em humanos é composta por aproximadamente 40% de albumina, 40% de proteína de Tamm-Horsfall e 20% de IgA, IgG e cadeias leves κ e λ (MORALES, 2002). Um trabalho que defina a composição proteica da urina de cães hípidos não foi encontrado, e é fundamental para compreensão da dinâmica proteica nas doenças, dessa forma considera-se promissor o ponto de partida obtido através das amostras de cães considerados hípidos neste experimento.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que esse experimento foi realizado e com a seleção dessa amostragem pode-se concluir que:

- A lesão renal causada pela leishmaniose é predominantemente de origem glomerular grau I e tubular grau 3.
- Testes de avaliação de enzimúria e proteinúria devem ser incluídos no protocolo para estadiamento dos cães infectados por *L. infantum*, mesmo em pacientes com função excretora normal.
- O tratamento implementado seguindo as diretrizes da BRASILEISH melhora a condição proteinúrica de animais infectados por *L. infantum* quando comparados a animais infectados não tratados.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros hematológicos e bioquímicos apresentados demonstram um comportamento semelhante entre os cães do grupo controle (GC) e infectados com *L. infantum* sob tratamento, evidenciando que os cães positivos e não tratados são cães com alterações sistêmicas e, portanto considerados doentes. Há um padrão muito heterogêneo de proteínas urinárias que difere muito entre animais hípidos e animais infectados por *L. infantum*, assim como entre os animais infectados tratados e não tratados.

Todo paciente com leishmaniose deve ter seu proteinograma analisado para melhor monitoração de lesão glomerular e tubular, uma vez que a resposta imune humoral leva a hiperglobulinemia com

glomerulonefrite imunomediada que progride. Animais com lesão tubular que não são tratados têm maior chance de apresentar maior heterogeneidade de proteínas urinárias e maior progressão da lesão renal.

A análise de proteínas urinárias, incluindo eletroforese, pode revelar anormalidades precoces durante o curso da doença, apesar da maioria dos trabalhos ressaltarem a lesão glomerular provocada pela LVC, neste trabalho o grau de severidade tubular foi mais marcante que o grau de severidade glomerular em cães não tratados, reforçando a importância da avaliação das enzimas urinárias que devem fazer parte do perfil laboratorial de diagnóstico e acompanhamento dos cães infectados com *L. infantum*.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

Apesar desse estudo não citar as proteínas encontradas, a determinação desses intervalos de peso molecular que diferenciou os grupos aponta para os *spots* proteicos que podem ser retirados do gel e submetidos a análises adicionais, como caracterização por espectrometria de massas, visando identificar essas proteínas por meio de sua massa e caracterização de sua estrutura química.

a) Identificar se outras afecções que comprometem os rins teriam o mesmo padrão proteico daquele observado em animais infectados por *L. infantum*.

b) Identificar no intervalo 9-18kDa e 24-30kDa as proteínas que diferenciou GLNT dos grupos GC e GLT um bom biomarcador na proteômica, podendo demonstrar resposta frente ao tratamento e prognóstico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, B. C. N. C.; MAIA, F. C. L.; SILVA JR, V. A.; LIMA, A.M. A.; ALBUQUERQUE, E. R. C.; PIMENTEL, D. S.; et al. Alterações estruturais em rins de caninos naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*. v.15. p. 3-5. 2008.
- ALMEIDA, T. A. C. *Análises Laboratoriais: Principais Alterações e como Interpretá-los*. In: SANTOS, K. K. F. *Guia Prático de Nefrologia Em Cães e Gatos*. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros LTDA. p. 143–156. 2014.
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO, J.; NIETO, J. Canine leishmaniasis. *Advances Parasitology*. v. 57. p. 1-87. 2004.
- ALVES, M. A .V. F. R. *Biomarcadores em Glomerulopatias*. In: ABENSUR,H. Biomarcadores da nefrologia. cap. 3. p. 37-40. 2011.
- ALVES, W. *Controle da leishmaniose visceral baseado no reservatório canino*. In: Consulta De Expertos Ops/Oms Sobre Leishmaniasis Visceral En Las Am...Ricas, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud. p. 94-98. 2006.
- AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. vol. 6. n. 2. p.13.2003.
- AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRIGUEZ F.; TESOURO M. A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*. v. 18, n. 2. p. 147-156. 2003.
- BANETH, G.; SHAW, S.E. *Chemotherapy of canine leishmaniosis*. *Veterinary Parasitology*. v.106, p. 315–324. 2002.
- BANETH, G. *Leishmaniasis*. In: GREENE, C. E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3a ed. Canada: Saunders Elsever. cap. 73. p. 685-698. 2006.
- BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*., v. 28. n. 7. p. 329-337. 2006.
- BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Protein Concentration in Urine of Normal Dogs. *American Journal of Veterinary Research*. v. 40. n. 11. p. 1583 – 1588. 1979.
- BASILE, D. P.; ANDERSON, M. D.; SUTTON, T. A. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. *Comprehensive Physiology*. v. 2. n. 2. p. 1303–1353. 2014.
- BERGSTRÖM, J. *Uremic toxicity*. In: KOPPLE, J. D.; MASSRY, S. G. (Eds.). . Nutritional management of renal disease. Williams & ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. p. 97–190. 2004.
- BAZZI, C.; PETRINI, C.; RIZZA, V.; NAPODANO, P.; PAPARELLA, M.; ARRIGO, G.; PISANO, L.; D'AMICO, G. Fractional excretion of IgG predicts renal outcome and response to

therapy in primary focal segmental glomerulosclerosis: a pilot study. *American Journal Kidney Disease*. Fev. v 41. n.2. p. 328-335. 2003.

BEASLEY-GREEN, A. Urine proteomics in the era of mass spectrometry. *International Neurolology Journal*. v. 20, p. 70–75, 2016.

BENSIMON, A.; HECK, A. J. R.; AEBERSOLD, R. Mass Spectrometry–Based Proteomics and Network Biology. *Annual Review of Biochemistry*, 2012.

BIRN, H. e CHRISTENSEN, E. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney international*. v. 69. n.3. p. 440-449. 2006.

BONEGIO, R. G. B.; SALANT, D.J. Glomerular Diseases. *ACP Medicine*. p.1-27. 2011.

BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Evaluation of proteinuria in leishmaniotic patient. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON CANINE LEISHMANIASIS. *Abstract book of the International congress on canine leishmaniasis*. p. 13-18, 2004.

BORJA-CABRERA, G. P.; MENDES, A. C.; DE SOUZA, E. P.; HASHIMOTO, O. L. I.; TRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; REIS, A. B.; GENARO, O.; BATISTA, L. M.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Effective immunotherapy against canine visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine*. v. 22. p. 2234-43. 2004.

BOTTINI, P.V. e GARLIPP, C.R. Diagnóstico laboratorial precoce de glomerulopatias. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*. n.26. p. 88-91. 1990.

BRAGA, E. T. ; LEITE, J. H. A. C.; ROSA, F. A.; TIVELLI, P.; ARAÚJO, A. M.; ALMEIDA, B. F. M.; FERRARI, H. F.; CIARLINI, P. C.; MACHADO, G. F.; MARCONDES, M. Hypertension and its correlation with renal lesions in dogs with leishmaniosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Jaboticabal. v. 24. n. 1. p. 45-51. 2015.

BRASILEISH. DIRETRIZES PARA O DIAGNOSTICO, ESTADIAMENTO, TRATAMENTO E PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE CANINA. *Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal*. 2018. 16p. Disponível em: <https://www.brasileish.com.br>. Acessado em 06 de outubro de 2020.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. *New England Journal of Medicine*. v.307. n.11. p.652-659. 1982.

BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S. Glomerular involvement in kalazar. *American Journal of Tropical Medicine*. n. 24. p.8-18.1975.

BROWN, S.A.; CROWELL, W. A.; BROWN J. A.; BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Pathophysiology and Management of Progressive Renal Disease. *Veterinary Journal*. n. 154. p. 93-107. 1997.

BROWN, S. A. *Symmetric Dimethylarginine (SDMA): New Biomarker Of Renal Function In Cats And Dogs*. IRIS-Kidney.Atenas, EUA. 2p. 2015. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/education/renal_biomarkers.html. Acessado em: 15 de janeiro de 2019.

CARDOSO, J. M. *Tratamento da leishmaniose visceral canina empregando duas abordagens terapêuticas distintas: quimioterapia com antimoniato de meglumina lipossomal e imunoterapia com anticorpo monoclonal bloqueador do receptor de IL-10*. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. 175p. 2018.

CHEUNG, C.; COCKRAM, C. S.; YEUNG, V. T.; SWAMINATHAN, R. Urinary excretion of transferrin by non-insulin-dependent diabetics: a marker for early complications?. *Clinical Chemistry*. v. 35. n.8. p. 1672-1674. 1989.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. *Acute Renal Failure*. In: *Canine and Feline Nephrology and Urology*. 2. ed. Missouri: Elsevier. 2011. p. 341–390.

COCA, S. G.; YALAVARTHY, R.; CONCATO, J.; PARIKH, C. R. *Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: A systematic review*. *Kidney International*. v. 73. n. 9. p. 1008–1016, 2008.

COELHO, P. M. R. *Novos marcadores da nefropatia diabética: a necessidade de marcadores precoces*. Dissertação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, da Universidade do Porto. 31p. 2015.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v.8, p.227-234, 1966.

COMPER, W.D.; GLASGOW, E. F. Charge selectivity in kidney ultrafiltration. *Kidney International*. vol. 47. p.1242-1257. 1995.

CONTRERAS, I. K.; MACHADO, M. A.; ROCHA, C. O. J. M.; OLIVEIRA, G. R.; CARVALHO, F. C. G. Sinais clínicos apresentados por cães positivos para leishmaniose visceral no município de Vassouras. *PUBVET*. Rio de Janeiro. v. 13. n. 4.152p. 2019.

CORTESE, L.; SICA, M.; PIANTEDOSI, D.; RUGGIERO, G.; PERO, M. E.; TERRAZZANO, G.; MASTELLONE, V.; CIARAMELLA, P. Secondary immune-mediated thrombocytopenia in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*. n. 164. p. 778-782. 2009.

COSTA, D. L. Fatores De Prognóstico Na Leishmaniose Visceral: Alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte (Tese). Universidade Federal de Minas Gerais. Ciências da Saúde. Belo Horizonte. 219p. 2009.

COSTA, F. A.; PRIANTI, M. G.; SILVA, T. C.; SILVA, S. M.; GUERRA, J. L.; GOTO, H. T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infect Dis*. PubMed.n.10.112p. 2010.

COSTA VAL, A. B. P. D. *Tratamento da Leishmaniose Visceral canina com antimonial pentavalente encapsulado em lipossoma*. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 125p. 2004.

COURA-VITAL, W.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MOREIRA, N.D.; VITORIANO-SOUZA, J.; VIEIRA, P.M.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A.; CARNEIRO, M. REIS, A.B. Humoral and cellular

immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *The Veterinary Journal*. v.190. p.43–47, 2011.

COWGILL, L.; POLZIN D.J.; ELLIOTT, J.; NABITY, M.B.; SEGEV, G.; GRAUER, G.F.; BROWN, S.; LANGSTON, C.; VAN DONGEN, A. M. *Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury?*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v. 46. n. 6. nov. p. 995–1013. 2016.

CRMV-MG. *Boletim Informativo do Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais*. Ano IV. v. 39. Jun. 2011.

DEEN, W.M.; BRIDGES, C.R.; BRENNER, B.M.; MYERS, B.D. Heteroporous model of glomerular size selectivity: Application to normal and nephrotic humans. *American Physiological Society Journal*. 249. p. 374-389. 1985.

DIBARTOLA, S. P. *Abordagem clínica e avaliação laboratorial da doença renal*. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças do Cão e do Gato*. 5. ed. São Paulo: Manole. p. 1686–1701. 2004

DUSSE, L.M.S.; RIOS, D.R.A.; SOUSA, L.P.N.; MORAES, R.M.M.S.; DOMINGUETI, C. P. ; GOMES, K. B. Biomarkers Of Renal Function: What Is Currently Available? *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. v. 49. n. 1. 11p. 2017.

FARIA, A.; ANDRADE, H. Diagnóstico da leishmaniose visceral canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. v. 3. p. 47-57. 2012.

FERRER, L. M. *The pathology of canine leishmaniasis*. In: *Canine Leishmaniasis: Moving Towards A Solution.. Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha. p. 21-24. 2002

FIGUEREDO, L. A.; PAIVA-CAVALCANTI, M.; ALMEIDA, E. L. ; BRANDÃO-FILHO, S. P. ; DANTAS-TORRES, F. Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. Jaboticabal. v. 21. n. 4. p. 418-420. 2012.

FILHO, N. S.; FERREIRA, T. M. A.F.; COSTA, J. M. L. Envolvimento da função renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. mar-abr. n. 36. p. 217-221. 2003.

FINCO, D.R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. *Canine and feline nephrology and urology*. Baltimore: Williams & Wilkins. 2.ed. p.211-215. 1995.

FRANÇA-SILVA, J. C., BARATA, R. A., COSTA, R. T., MONTEIRO, E. M., MACHADO-COELHO, G. L. L., VIEIRA, E. P., FORTES-DIAS, C. L. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality. Minas Gerais. Brazil. *Veterinary Parasitology*. vol. 131. n.3-4. p.213-220. 2005.

FRAZILIO, F. O.; BORGES, F. A.; ALDA IZABEL DE SOUZA, A. I.; PALUMBO, M. I. P.; RAMOS, C. A. N.; FREIRE, D. H.; GALVÃO, A. L. B.; FREITAS, M. G.; BARBOSA, F. B.

Biomarkers and renal arterial resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*. 7p. 2018.

FREITAS, J.C.C.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; LOPES NETO, B.E.; SANTOS, G.J.L.; ABREU, C.R.A.; BRAGA, R.R.; CAMPOS, R.A.; OLIVEIRA, L.F. Clinical and laboratory alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.45. n.1. p.24-29. 2012.

FREITAS, G. C.; VEADO, J. C. C.; CARREGARO, A. B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. *Semina: Ciências Agrárias*. v. 35. n. 1. p. 411–426. 2014.

FREY, S. K.; NAGL, B.; HENZE, A.; RAILA, J.; SCHLOSSER, B.; BERG, T.; TEPEL, M.; ZIDEK, W.; WEICKERT, M. O.; PFEIFFER, A. F. H.; SCHWEIGERT, F. Isoforms of Retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipids in Health and Disease*. v7. 29p. 2008

GEBRIN, A. C. *Proteinúria glomerular: correlação entre seletividade e disfunção tubular*. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas, SP. 59p. 2006.

GÓMEZ, C. E.; SÁNCHEZ, F. Z.; MONTERO, G. U. Revisión Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada *Acta Médica Costarricense*. Colegio de Médicos y Cirujanos Resumen. *Acta Médica Costarricense*. v. 49. n. 2. p. 83–89. 2007.

GOMES, L. A.; GOTO, H.; GUERRA, J. L. G.; MINEIRO, A.L.B.; SILVA, S. M. M. S.; COSTA, F. A. L. Lesões renais intersticiais e tubulares na leishmaniose visceral. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*.n.103. p. 157-163. 2008.

GOMÉZ-OCHOA, P.; CASTILLO, J. Á.; GASCÓN, J. J.; ZARATE J. J.; ALVAREZ, F.; COUTO, G. G. Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a critical trial. *Veterinary Journal*. v.179. n.2. p.259-63. 2009.

GRADONI, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: CANINE LEISHMANIASIS: MOVING TOWARDS A SOLUTION, 2., 2002, Sevilha. *Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum*. Sevilha. p. 7-14. 2002.

GRAUER, G. F. *Insuficiência renal aguda e doença renal crônica*. In: NELSON, N.W.; COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.647-662. 2010.

GRAUER, G. F. *Tratamento da Insuficiência Renal Aguda*. In: *BSAVA Manual de Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos*. 2. ed. São Paulo: Roca. p. 241–248. 2014

GRAUER, G. F. *Measurement and interpretation of proteinuria and albuminuria*. Manhattan, KS, USA. 2016. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/education/proteinuria.html>. Acesso em: 22 de maio de 2020.

GRUBB, A. Diagnostic value of analysis of cystatin c and protein HC in biological fluids. *Clinical Nephrology*. 38 (suppl1). p. 20-27. 1992.

HARLEY, L. e LANGSTON, C. Proteinuria in dogs and cats. *The Canadian Veterinary Journal*. v. 53. p. 631–638. 2012.

HOKAMP, J. A.; LEIDY, S. A.; GAYNANOVA, I.; CIANCIOLO, R. E.; NABITY, M. B. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. Nabity. *Veterinary Clinical Pathology*. n. 47.p. 425–434. 2018.

IRIS. *IRIS Bylaws*. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/about/bylaws_intro.html. Acesso em 15 de fevereiro de 2019.

KALANTARI, S.; JAFARI, A.; MORADPOOR, R.; GHASEMI, E.; KHALKHAL, E.. Human Urine Proteomics: Analytical Techniques and Clinical Applications in Renal Diseases. *International Journal of Proteomics*. v. 2015. 18p. 2015.

KASISKE, B. L.; KEANE, W. F: Laboratory Assessment of Renal Disease: Clearance, Urinalysis, and Renal Biopsy. In: BRENNER, B. M. *The Kidney*. Philadelphia. W.B. Saunders Co. 6a ed. p. 1129-1170. 2000.

KANAUCHI, M.; AKAI, Y.; HASHIMOTO, T. Transferrinuria in type 2 diabetic patients with early nephropathy and tubulointerstitial injury. *European Journal of Internal Medicine*, v. 13. n.3. p. 190-193. 2002.

KILLICK-KENDRICK, R.; KILLICK-KENDRICK, M.; PINELLI, D. R. G.; MOLINA, R.; VITUTIA, M.M. et al. A laboratory model of canine Leishmaniasis: the inoculation of dogs with *Leishmania infantum* promastigotes from midguts of experimentally infected phlebotomine sandflies. *Parasite*. 1(4):311–318. 1994

KIRSZTAJN, G.M. Avaliação do ritmo de filtração glomerular, *Jornal Brasileiro Patologia Medica Laboratorial*. v.43. n.4. p.257-264. 2007.

KNÖPFLER, S. ; MAYER-SCHOLL, A. ; LUGE, E. ;KLOPFLEISCH, R. ; GRUBER, A. D.; NÖCKLER, K. ; KOHN, B. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. *Journal of Small Animal Practice*. British Small Animal Veterinary Association. 7p. 2017.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A.A.; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta. Rio Grande do Sul. Brasil. *Ciência Rural*. n. 37. 2007.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227. n. 5259. p. 680-685. 1970.

LEFEBVRE, H. *Renal function testing*. In: BARTGES, J.; POLSIN, D. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Wiley-Blackwell. p. 91-97. 2011.

LESS, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G.F. VADEN, S. L. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). ACVIM Consensus Statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. n. 19. p.377–385. 2005.

LEVI, T. M.; SOUZA, S. P. S.; MAGALHÃES, J. G.; CARVALHO, M. S.; CUNHA, A. L. B.; DANTAS, J. G. A. O.; CRUZ, M. G.; GUIMARÃES, Y. L. M.; CRUZ, C. M. S. Comparação dos critérios RIFLE, AKIN e KDIGO quanto à capacidade de predição de mortalidade em pacientes graves. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. v. 25. n. 4. p. 290–296. 2013.

LINDSTRÖM, K.E.; JOHNSON, E.; HARALDSSON, B. Glomerular charge selectivity for proteins larger than serum albumin as revealed by lactate dehydrogenase isoforms. *Acta Physiologica*. Apr. v. 162. n. 4. p.481-488. 1998.

MAGRO, M. C. S.; VATTIMO, M. F. F. Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. Junho. v. 19. n.2. p.182-185. 2007.

MANCIANTI, F.; POLI, A.; BIONDA, A. Analysis of renal immune-deposits in canine leishmaniasis. Preliminary results. *Parasitology*. v. 31, n. 2-3, p. 213-30, 1989.

MANNA, L.; CORSO, R., GALIERO, G.; CERRONE, A.; MUZZI, P.; GRAVINO, A. E. (2015). Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasites & Vectors*. p. 81-89. 2015

MAPA. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Brasília. Diário Oficial da União. 24p. 2008.

MARTÍNEZ-MORENO, A.; MORENO, T.; MARTÍNEZ-MORENO, F.J.; ACOSTA, I.; HERNÁNDEZ, S. Humoral and cellmediated immunity in natural and experimental canine leishmaniasis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. n. 48. p. 209-220. 1995.

MCPHERSON, R. A. *Proteínas específicas*. In: HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 18a ed. São Paulo: Manole. p.245-260. 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral*. Brasília: Ministério da Saúde. 120 p. 2006.

MIRÓ, G.; GÁLVEZ, R.; FRAILE, C.; DESCALZO, M. A.; MOLINA, R. Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasite Vectors*. v.14. p. 52. 2011.

MORALES, J. V. *Índice Proteína/Creatinina em Amostra de Urina em Pacientes Adultos com Glomerulopatia e Diferentes Níveis de Função Renal*. Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Nefrologia, Porto Alegre. 101p. 2002.

MORENO, J.; ALVAR, J. Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitology*. v. 18, n. 9. p. 399-405, 2002.

MOTTA, V. T. Aminoácidos e peptídeos. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**, v. 8. p. 94–117. 2000.

NASCIMENTO, M. R.; LIMA, C. S.; BARROS, J. C. PADOVAN, M. CINTRA, C. A.; AYER, I. M.; BORGES, L. P. B.; CRIVELLENTI, L. Z. Conceitos E Aplicabilidade Dos Principais

Biomarcadores Na Nefrologia Veterinária – Revisão De Literatura. *Revista Investigação*. Franca. São Paulo. n.15. v.8. p. 37-43. 2017.

NAKAMAE, D. D. et alii. Exame de urina: todo o rigor na colheita de amostras. *Revista da Escola de Enfermagem. USP. São Paulo*. v. 74. n.1. p.51-57. 1980.

NICOLAS, L.; MILON, G.; PRINA, E. Rapid differentiation of Old World Leishmania species by LightCycler polymerase chain reaction and melting curve analysis. *Journal of microbiological methods*. v. 51 n. 3. p. 295–9, 2002.

NIETO, J.; SAUGAR, J. M.; MIRET, J.; GONZÁLES, F. La Leishmaniosis canina. 1a Parte.Terapéutica. *Rev Ofic Con Gen Col Vet España*. p. 34-40, 2005.

NOGUEIRA, F. S.; RIBEIRO, V. M. Leishmaniose visceral. In: Jericó MM, Andrade Neto JPA, Kogika MM, editors. *Tratado de medicina interna de cães e gatos*. Rio de Janeiro: Roca. p. 718–733.2015

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine old world visceral leishmaniasis: a systematic review. *Veterinary Dermatology*. v. 16, p.213-232, 2005.

OLIVEIRA, G. G.; SANTORO, F.; SADIGURSKY, M. The subclinincal form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Crus*. v. 88. p. 243-248. 1993.

OLIVEIRA, F. C. B. Avaliação de parâmetros sanguíneos, como marcadores de prognóstico, em cães infectados naturalmente por *leishmania infantum* submetidos ao tratamento com imunoterapia vacinal associada ao alopurinol(Tese). Programa de Pós-Graduação em Patologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 98p. 2017

OLIVER, J. D.; ANDERSON, S.; TROY, J. L.; BRENNER, B. M.; DEEN, W.M. Determination of glomerular size-selectivity in the normal rat with Ficoll. *Journal of the American Society of Nephrology*. n.3 p. 214-228. 1992.

PALTRINIERI, S.; LUIGI GRADONI, L.; ROURA, X.; ZATELLI, A.; ZINI, E. Laboratory tests for diagnosing and monitoring canine leishmaniasis. *Veterinary Clinical Pathology*.v.45. n. 4. p.552-578. 2016.

PENNICK, D e D'ANJOU, M. *Kidneys and Ureters*. In: *Atlas of small animal ultrasonography*. 2º ed.. Willey Blackwell. p.331-362. 2015.

PINEDA, C.; TEJERO, E. A.; MORALES, M. C.; LORENZO, S. B.; NIETO, L. C. G.; GARCIA, P.; MORENO, J. M. M.; ORTIZ, M. E. R.; LOPEZ, I. Treatment of canine leishmaniasis with marbofloxacin in dogs with renal disease. *Plos One*. October. v. 5. 17p. 2017.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. *Chronic renal failure*. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Textbook of veterinary internal medicine : diseases of the dog and cat*. W. B. Saun ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 1756–1785. 2005.

PRODROMIDI, E.I.; POULSOM, R.; JEFFERY, R.; ROUFOSSE, C.A; POLLARD, P.J; PUSEY, C.D. Bone marrow-derived cells contribute to podocyte regeneration and amelioration of renal disease in a mouse model of Alport syndrome. *Stem Cells*. n.24: p.2448-2455. 2006

QUINNELL, R.J; COURTENAY, O.; SHAW, MA.; GARCEZ, L.; DYE, C. Tissue Cytokine Responses in Canine Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*. n.183. p.1421-4. 2001.

RAMOS, J. G. L.; BARROS, E. G.; COSTA, S. M. Índice proteinúria/creatinúria em gestantes com hipertensão arterial. *Revista Hospital de Clínicas Porto Alegre*, v. 20. n. 2. p. 124–137. 2000.

RASOULI, Z.; GHAVAMI, R. Simultaneous optical detection of human serum albumin and transferrin in body fluids. *Microchim Acta*. p.187-208. 2020

RASKIN, R. E.; MESSICK, J. B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. v.42. p.23-42. 2012.

RIBEIRO, V. M. Tratamento da LV canina e seu impacto na incidência de LV humana e na prevalência da LV em cães. Uma experiência em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. In: CONSULTA DE EXPERTOS OPS/OMS SOBRE LEISHMANIASIS VISCERAL EN LAS AMÉRICAS, 1., 2005, Brasília. *Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas*. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud. p. 104-107. 2006.

RIBEIRO, V. M.; BAHIA, E. M.; TELES, P. P. A. Evaluation of immunotherapy assessment Leish-Tec associated with allopurinol in dogs naturally infected by *Leishmania infantum* - preliminary results. In: WorldLeish 5, 2013, Porto de Galinhas. WORLDLEISH 5 Fifth World Congress on Leishmaniasis.630p. 2013

RIBEIRO, V. M. Leishmanioses. In: Associação Nacional de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais. PROMEVET Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária: Ciclo 5. v. 4.Porto Alegre: Artmed Panamericana; p. 75-109. 2020

RILEY, L. K.; RUPERT, J. Evaluation of Patients with Leukocytosis. *American Family Physician*. v. 92. n. 11. p. 1004- 1011. 2015

RIPPE, C.; RIPPE A.; TORFFVIT, O. Size and charge selectivity of the glomerular filter in early experimental diabetes in rats. *American journal of physiology*. Renal physiology. n.293. v.5.p.1533-8153. 2007.

RODRIGUES, P. G. *Expressão Gênica de Moléculas Associadas ao Podócito em Pacientes Portadores de Glomerulopatias Proteinúrias*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. 91p. 2012.

ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES R. D.; REIS, L. E.; CARDOSO, J. M. O.; MATHIAS, F. A.; BRITO, R. C.; SILVA, S. M.; GONTIJO, N. G.; FERREIRA, S. A.; VALENZUELA, J. G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GIUNCHETTI, R. C.; REIS, A. B. A vaccine therapy for canine visceral leishmaniasis promoted significant improvement of clinical and immune status with reduction in parasite burden. *Frontiers in Immunology*. v. 8, p. 217, 2017.

SANTOS, A. M. R.; LEMOS, C. C. S.; BREGMAN, R. Revisão: Proteinúria – marcador clássico de comprometimento glomerular. *Jornal Brasileiro de Nefrologia* .v.23. n.4.p. 217-220. 2001.

SBMT- Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Núcleo de Medicina Tropical* – UnB. Brasília. Distrito Federal. Out. 2016. Disponível em: <<https://www.sbmt.org.br/portal/tratamento-de-caes-com-lvc-fica-autorizado-com-o-milteforan/>>. Acesso em de outubro de 2020.

SCHULTZE, A. E.; JENSEN, R. K. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. *Veterinary clinical pathology*. v. 18. n. 4. p. 93–7. 1998.

SEGEV, G. Biomarcadores da doença renal: utilidades potenciais. Escola de Medicina Veterinária Koret, Universidade Hebraica de Jerusalém, Israel. 2018. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/education/renal_biomarkers.html. Acessado em: 15 de janeiro de 2019.

SILVA, L. S. Imunopatologia da nefropatia em cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e co-infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Centro de Ciências Agrárias/UFPI. Teresina. nov. 134p. 2015.

SILVA, R. B. S.; MENDES, R. S.; SANTANA, V. L.; SOUZA, H. C.; RAMOS, C. P. S.; SOUZA, A. P.; ANDRADE, P. P.; MELO, M. A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. v. 36. n. 7. p. 625-629. 2016.

SILVA, R. O. P.; LOPES A. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Revista Médica de Minas Gerais*. v. 18. n. 2. p. 116-122. 2008.

SILVA, S. M. *Avaliação Clínica e Laboratorial de Cães Naturalmente Infectados por Leishmania (Leishmania) Chagasi (Cunha e Chagas, 1937), Submetidos a um Protocolo Terapêutico em Clínica Veterinária de Belo Horizonte*. Dissertação (Mestrado). Curso de Parasitologia. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 133p. 2007.

SOLANO-GALLEGO, L., KOUTINAS, A., MIRÓ, G., CARDOSO, L., PENNISI, M. G., FERRER, L., BOURDEAU, P., OLIVA, G. & BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*. n. 165. p. 1-18. 2009

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ G; KOUTINAS, A; CARDOSO, L; PENNISI, M.G; FERRER, L. et al. Leishvet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*. p.4:86. 2011

SOUZA, E. M. *Validação da Técnica Imunoturbidimétrica para Dosagem de Cistatina C e Sua Comparação com Outros Marcadores de Injúria Renal Aguda em Cães Criticamente Enfermos*. Tese (Doutorado). Departamento de Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte. 127p. 2017.

SQUIRES, R. A. *Uremia*. In: BSAVA Manual de Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos. p. 63–78. 2014.

STOCKHAM, S. L; SCOTT, M. A. *Sistema Urinário*. In: *Fundamentos de Patologia clínica veterinária*. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap. 8. p. 342-411. 2011.

TAFURI, W. L.; MICHALICK, M. S. M.; DIAS, M.; GENARO, O.; LEITE, V. H. R.; BARBOSA, A. J. A.; BAMBIRRA, E. A.; DA COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MAYRINK, W. Optical and electron microscopical studies of canine kidney naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 31. n. 3. p. 139- 145. 1989.

TASSINI, L. E. S.; LEME, F. O. P.; VEADO, J. C. C.; ROSA, D. B. S. K.; LEMPEK, M. R.; VALLE, P. G. N-acetyl- β -d-glucosaminidase (nag): estabilidade da enzima em amostras de urina de cães hígidos. 37º Congresso Brasileiro da Anclivepa. Anais do 37º Congresso Brasileiro da Anclivepa. Goiânia. p. 798-802. 2016.

TERRAZZANO, G., CORTESE, L., PIANTEDOSI, D., ZAPPACOSTA, S., DI LORIA, A., SANTORO, D., RUGGIERO, G. & CIARAMELLA, P. (2006) Presence of antiplatelet IgM and IgG antibodies in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. n. 110. p. 331-337. 2006.

THONGBOONKERD, V. Proteomics in nephrology: current status and future directions. *Journal of the American Society of Nephrology*. v.24. n.3, mai. 19p. 2004

VAIDYA, V. S. WAIKAR, S. S.; FERGUSON, M. A.; COLLINGS, F. B.; SUNDERLAND, K.; GIOULES, C.; BRADWIN, G.; MATSOUAKA, R.; BETENSKY, R. A.; CURHAN, G. C.; BONVENTRE, J. V. Urinary Biomarkers for Sensitive and Specific Detection of Acute Kidney Injury in Humans. *Clinical and Translational Science*. v. 1. n. 3. 2008 p. 200–208. 2008.

VEADO, J. C. C.; ROCHA, D. F.; COBUCCI, G. C.; MELO, M. M.; BANDEIRA, C. M.; PAES, P. R. O. γ -Glutamyltransferase urinária, proteína urinária e fósforo sérico no diagnóstico precoce da insuficiência renal aguda induzida em cães. In: Conferência Sulamericana De Medicina Veterinária. Rio de Janeiro. p.10. 2010.

VEADO, J. C.C.; SANTOS, K. K. F.; ANJOS, T. M. Injúria Renal Aguda. In: SANTOS, K. K. F. *Guia Prático de Nefrologia em Cães e Gatos*. 1. ed. Rio de Janeiro: L. F. Livros de veterinária Ltda. p. 23-31. 2014.

VIANA, F. A. B. *Guia Terapêutico Veterinário*. 4ed. Lagoa Santa: Editora CEM. 528p. 2019.
WALLER, K.V.; WARD, K.M.; MAHAN, J.D.; WISMATT, D.K. Current concepts in proteinuria. *Clinical Chemistry*. n. 35. p. 755-765. 1989.

WHITTEMORE, J. C.; MIYOSHI, Z.; JENSEN, W. A.; RADECKI, S. V. R.; LAPPIN, M. R. Association of microalbuminuria and the urine albumin-to-creatinine ratio with systemic disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. n. 230. p. 1165–1169. 2007.

WHO. *Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO reported on neglected tropical diseases*. Geneva: World Health Organization. 184p. 2010.

YU, H.; YANAGISAWA, Y.; FORBES, M. A.; COOPER E. H.; CROCKSON, R. A.; MACLENNAN, I. C. Alfa-1-microglobulina: uma proteína indicadora da função tubular renal. *Journal of Clinical Pathology*. mar. v. 36. n. 3. p. 253–259. 1983.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; DURAN, E.; GONZÁLEZ, M.; MAÑÉ, M. C. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Research*. v. 34. n. 2, mar. p. 137–151. 2003.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; DURAN, E.; GONZÁLEZ, M.; MAÑÉ, M. C. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by SDS–PAGE and Western blot *Theriogenology*. v. 61, n. 7–8. maio 2004, p. 1259–1272. 2004.

ZATELLI, A.; BORGARELLI, M.; SANTILLI, R.; BONFANTI, U.; NIGRISOLI, E.; ZANATTA, R.; TARDUCCI, A.; GUARRACI, A. Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *American Journal of Veterinary Research*. v.64. n. 5. p. 558-561. 2003.



UFMG

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: 88/2018

Título do projeto: Biomarcadores da Injúria Renal Aguda

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 do dia 18/06/2018. Validade: 18/06/2018 à 17/06/2023

Belo Horizonte, 18/06/2018.

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 - ceua@prpq.ufmg.br

Aquiescência/Consentimento livre e esclarecido

Eu Sr (a) _____, portador(a) do RG: _____,
CPF: _____, residente e domiciliado na Rua _____,
Bairro: _____, Cidade: _____, MG, CEP _____,
Tel: _____, Cel: _____, e-mail: _____, neste ato oferto a
participação de meu (s) animal (is) da espécie canina de nome _____, raça _____, sexo _____, idade
_____, para participar(rem) deste projeto.

De acordo com o que me foi esclarecido, minha participação neste projeto é voluntária, não havendo nenhum custo a mim conferido, portanto, não existe remuneração ou vínculo empregatício, e poderei me recusar a participar e retirar meu animal do estudo sem prejuízo ou justificativa a qualquer momento.

Fui informado que não existe risco associado ao tratamento, sendo que qualquer enfermidade ocorrida durante a pesquisa não é de responsabilidade da equipe, uma vez que os procedimentos adotados não estão associados a qualquer dano a saúde. Assim a equipe de trabalho fica isenta da obrigação de tratamento de enfermidade no (s) animal (is) durante o estudo.

Ao participar deste estudo permitirei que o (a) médico (a) veterinário (a) colete sangue, urina, realize exame de imagem (ultrassonografia abdominal) e faça avaliação clínica, ficando os resultados dos exames obtidos à minha disposição. Também fico ciente que serão coletados dados sobre meu animal e a sua criação.

A participação neste projeto não traz complicações legais. Os procedimentos adotados neste projeto obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e à Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008.

Todas as informações coletadas neste estudo serão utilizadas apenas para fins acadêmicos.

Assinatura do (a) Tutor (a)

Belo Horizonte, _____ de _____ de 201__.