

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM
DOENÇA RENAL CRÔNICA

Daniela Bastos de Souza Karam Rosa

Belo Horizonte
UFMG - Escola de Veterinária
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM

DOENÇA RENAL CRÔNICA

Daniela Bastos de Souza Karam Rosa

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

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

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

Co-orientador: Prof. Dr. Júlio César Cambraia Veado

Co-orientador: Prof^a. Dra. Ana Paula Lucas Mota

Belo Horizonte

UFMG - Escola de Veterinária

2021

R788a Rosa, Daniela Bastos de Souza Karam, 1973 -
Avaliação do estresse oxidativo em cães com doença renal crônica/ Daniela Bastos de Souza
Karam Rosa. – 2021.

95 f.:il.

Orientadora: Fabiola Oliveira Paes Leme

Coorientadores: Ana Paula Lucas Mota

Júlio César Cambraia Veado.

Tese (Doutorado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Bibliografia: f.84 a 88.

1. Cão - Doenças - Teses – 2. Rins – Doenças - Teses – 3. Urina – Análise - Teses –
I. Leme, Fabiola Oliveira Paes – II. Mota, Ana Paula Lucas – III. Veado, Júlio César Cambraia -
IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V. Título.

CDD – 636. 089

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

DANIELA BASTOS DE SOUZA KARAM ROSA

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 setembro de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fabíola de Oliveira Paes Leme
Presidente – Orientador(a)

Dr.(a). Julio Cesar Cambraia Veado

Dr.(a). Ana Paula Lucas Mota

Dr.(a). Jane Prado-Roller

Dr.(a). Marcia Kikuyu Notomi

Dr.(a). Leandro Abreu da Fonseca

Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho



Documento assinado eletronicamente por **Leandro Abreu da Fonseca, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 14:40, 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 **Fabíola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior**, em 05/10/2021, às 14:57, 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 **Jane Prado-Roller, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 18:19, 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 **Marcia Kikuyu Notomi, Usuário Externo**, em 05/10/2021, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Julio Cesar Cambraia Veado, Professor do Magistério Superior**, em 06/10/2021, às 08:57, 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, Professora do Magistério Superior**, em 06/10/2021, às 11:28, 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 11/10/2021, às 13:35, 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 **1004145** e o código CRC **44A4CA14**.

À minha família

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser meu rumo, meu norte, por cuidar de tudo e me permitir tantas experiências.

Ao meu amado Leo, meu parceiro de todas as horas, pelo incentivo e por sempre me mostrar o lado leve de todas as coisas.

As minhas filhas, Mariana, Laura e Isabela, amores da minha vida, pelo carinho, amor e compreensão.

Aos meus queridos e amados pais por tudo que sempre fizeram por mim, pelos conselhos e orações.

A Prof^a. Fabiola de Oliveira Paes Leme que, além de desempenhar com perfeição o seu papel de orientadora, foi e é fonte de inspiração, não só pelo muito que sabe das questões acadêmicas, mas também pela dedicação e amor em tudo o que faz, pela amizade, generosidade e empatia inesgotáveis.

Ao Prof. Júlio César Cambraia Veado que me ensinou a trilhar os primeiros passos do caminho acadêmico e me transmitiu, generosamente, seu conhecimento.

A Prof^a. Ana Paula Lucas Mota pela importante e valiosa colaboração e boa vontade.

A Ana Luísa Mota, Ana Flávia Santos, Elom Nascimento, Brenda Leal, Mateus Ferreira, Roberta Ferreira, Fabiana Fadel, Juliana Massieiro, Priscila Fonte Boa, Sibebe Souza, Nathália Dorneles, Guilherme Henrique Costa, pelo espírito de equipe e companheirismo nesta jornada e em outras mais. A todos os outros colegas de jornada que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização desta pesquisa.

Aos residentes e funcionários do Laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG.

À diretoria do Hospital Veterinário da UFMG e aos funcionários, em especial à Elizete, que contribuíram para a realização desta pesquisa.

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

Gratidão eterna a todos os cães participantes deste estudo (aqueles que ainda estão entre nós e aqueles que já se foram) pela pureza de seus sentimentos. Aos tutores, que aceitaram o convite, disponibilizaram parte do seu tempo e confiaram na proposta do estudo.

A São Francisco de Assis, por me inspirar.

A vida, por me proporcionar aprendizado constante.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível e, de repente, estará fazendo o impossível” São Francisco de Assis

RESUMO

Na doença renal crônica (DRC), além da disfunção do órgão, condições importantes de estresse oxidativo (EO) estão presentes em diferentes graus. O principal objetivo desta pesquisa foi estudar biomarcadores de EO em cães doentes renais crônicos. Onze cães hígidos e dezesseis cães portadores de DRC foram admitidos ao estudo e submetidos à avaliação clínica e laboratorial, sendo os pacientes doentes renais avaliados em cinco tempos, sob efeito do tratamento conservador. Foram avaliados os seguintes biomarcadores de EO: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma, o *status* antioxidante total (TAS) e a glutational peroxidase (GSH-Px) em amostras de plasma e urina e a superóxido dismutase (SOD) em concentrado de hemácias e na urina. As variáveis que mais apresentaram alterações condizentes com EO no grupo de cães com DRC foram o TBARS, TAS e GSH-Px plasmáticos e o TAS urinário. Concluiu-se que é possível dosar biomarcadores de EO em cães portadores de DRC, que o EO está presente nestes pacientes e, quanto maior o estágio da DRC maior é o EO.

Palavras-chave: dano oxidativo, biomarcadores, antioxidante, nefropatia crônica, canino

ABSTRACT

In chronic kidney disease (CKD), beside the organ dysfunction, important conditions of oxidative stress (OS) are present in different grades. The main objective of this research was to evaluate OE markers in dogs with CKD. Eleven control dogs and sixteen dogs with CKD were selected and submitted to clinical and laboratory evaluation. The CKD patients were evaluated in five periods under effect of conservative treatment. The following OS markers were evaluated: Thiobarbituric acid-reactivity (TBARS) in plasma, total antioxidant status (TAS) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in plasma and urine samples and the dismutase superoxide (SOD) in concentrated red blood cells and urine sample. The variables that most show alteration compatible with OS in the group of dogs with CKD were TBARS, TAS and GSH-Px in plasma and TAS in urine. It was concluded that it is possible to dose OS markers in dogs with CKD, OS is present in these patients and the higher the CKD stage more intense is the OS.

Keywords: oxidative damage, biomarkers, antioxidant, chronic nephropathy, canine

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estádios da doença renal crônica em cães baseados nas concentrações séricas de creatinina e SDMA (dimetilarginina simétrica).....	21
Figura 2: Sub estádios da doença renal crônica em cães baseados na pressão arterial sistólica (PAS) e na razão proteína creatinina urinárias (RPC).....	21
Figura 3: Representação esquemática resumida do modelo de autoperpetuação do estresse oxidativo e da inflamação na doença renal crônica.....	30
Figura 4: Classificação do índice de massa muscular (digitopressão sobre osso temporal, escápula e ossos pélvicos).....	34
Figura 5: Frequência relativa dos grupos de cães controle (GC) e de cães doentes renais crônicos (GDRC) por estágio (1 a 4).....	39
Figura 6: Relação dos animais do GDRC e classificação quanto à idade, sexo, estágio da DRC, presença de proteinúria (Prot.), hipertensão arterial sistólica (Hipert.) e peso corporal, escore de condição corporal e índice de massa muscular de acordo com os 5 tempos (T1 ao T5).....	41
Figura 7: Média estimada das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), ureia (mg/dL), SDMA (mcg/dL), creatinina urinária (mg/dL), amilase (U/L) e lipase (U/L) nos grupos de cães controle (Híg) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	42
Figura 8: Comportamento da média estimada da concentração da creatinina sérica (mg/dL) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da creatinina sérica (mg/dL) dos cães do grupo controle no tempo 1.....	44
Figura 9: Média estimada da densidade urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	45
Figura 10: Média estimada das concentrações de albumina e colesterol séricos, proteína urinária e razão proteína creatinina urinárias (RPC) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	46
Figura 11: Média estimada das concentrações séricas de fósforo e cálcio total nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	48
Figura 12: Média estimada das concentrações séricas de glicose (mg/dL) e colesterol (mg/dL) e plasmática de NEFA (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	50
Figura 13: Média estimada da contagem de hemácias (milhões/mm ³), e dos valores do hematócrito (%) e hemoglobina (g%) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	52
Figura 14: Comportamento da média estimada da contagem de hemácias (milhões/mm ³), e dos valores do hematócrito (%) e hemoglobina (g%) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.....	53
Figura 15: Média estimada da concentração plasmática de ferro (µmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	55
Figura 16: Comportamento da média estimada das concentrações plasmáticas de ferro (µmol/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de	

avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.....	56
Figura 17: Média estimada da concentração plasmática de IBC ($\mu\text{mol/L}$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1	57
Figura 18: Comportamento da média estimada das concentrações plasmáticas de IBC ($\mu\text{mol/L}$) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.....	58
Figura 19: Média estimada da contagem de leucócitos totais ($/\text{mm}^3$), segmentados ($/\text{mm}^3$), monócitos ($/\text{mm}^3$) e linfócitos ($/\text{mm}^3$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1	59
Figura 20: Comportamento da média estimada da contagem de leucócitos totais ($/\text{mm}^3$), segmentados ($/\text{mm}^3$) e monócitos ($/\text{mm}^3$) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1	60
Figura 21: Média estimada da contagem de plaquetas ($\times 1000/\text{mm}^3$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1	62
Figura 22: Média estimada das concentrações plasmáticas de TBARS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1	63
Figura 23: Comportamento da média estimada da concentração plasmática do TBARS (mmol/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração plasmática do TBARS (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.....	64
Figura 24: Média estimada das concentrações plasmáticas de TAS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.	66
Figura 25: Comportamento da média estimada da concentração plasmática do TAS (mmol/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração plasmática do TAS (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1	67
Figura 26: Média estimada das concentrações urinárias de TAS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.	68
Figura 27: Média estimada da atividade da GSH-Px (RANSEL - U/L) plasmática nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.	69
Figura 28: Comportamento da média estimada da atividade da GSH-Px plasmática (RANSEL - U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da GSH-Px plasmática (U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.....	70
Figura 29: Média estimada da atividade da GSH-Px (RANSEL - U/L) urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1	71
Figura 30: Comportamento da média estimada da atividade da GSH-Px urinária (RANSEL - U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da GSH-Px urinária (RANSEL - U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.....	72

Figura 31: Média estimada da atividade da SOD (RANSOD - U/L) no concentrado de hemácias nos grupos de cães controle (Híg.) e cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.....	73
Figura 32: Comportamento das médias estimadas da atividade SOD no concentrado de hemácias (U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da SOD (RANSOD-U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.....	74
Figura 33: Média estimada da atividade da SOD (RANSOD - U/L) urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.	75
Figura 34: Comportamento das médias estimadas da atividade SOD (RANSOD-U/L) urinária em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da SOD (RANSOD-U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.	75
Figura 35: Médias estimadas das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), SDMA (mcg/dL) e amilase (UI/L) no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo.	77
Figura 36: Média estimada dos valores de linfócitos/mm ³ no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo	78
Figura 37: Médias estimadas das concentrações plasmáticas de TBARS (mmol/L) e da atividade da GSH-Px (RANSEL – U/L) urinária no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus centígrados
μL - microlitro
μmol - micromolar
ALB - albumina
ALB/GLOB - razão albumina/ globulina
ALKP - fosfatase alcalina
ALT- alanina aminotransferase
AMYL - amilase
BHB - beta-hidroxibutirato
BUN - nitrogênio ureico sanguíneo
BUN/CREA - frações nitrogênio ureico/creatinina sanguínea
CA - cálcio total
CAT – catalase
CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média
CHOL - colesterol
CREA - creatinina sérica
DAMPs – padrões moleculares associados ao dano
dL - decilitro(s)
DNA - ácido desoxirribonucleico
DRC - doença renal crônica
DRC1, DRC2, DRC3, DRC4 - cães doentes renais crônicos estadiados pela IRIS em 1,2,3 e 4
ECC - escore de condição corporal
EDTA - ácido etilenodiamino tetra acético
EO - estresse oxidativo
EPO - eritropoetina
ERO - espécies reativas de oxigênio
Fe - ferro total
fig. - figura
GC - grupo de cães controle
GDRC - grupo de cães portadores de doença renal crônica
GGT - gama-glutamyltransferase
GLOB - globulina
GSH-Px - glutathione peroxidase
GLU - glicose
Hb - hemoglobina
He - eritrócitos
Ht - hematócrito
IBC - capacidade de fixação de ferro
IL-1β - interleucina 1 beta
IL-6 - interleucina 6
IMM - índice de massa muscular
Kg – quilograma(s)
L - litro(s)
LIPA - lipase
mcg - micrograma(s)

mL – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
Mmol - milimolar
MULTILAB - Unidade multiusuária de experimentação animal
NEFA - ácidos graxos não esterificados
NFkB - fator nuclear kappa B
NLRP3 - *Nod like receptor P3*
nm – nanômetro(s)
NOS - óxido nítrico sintetase
Nrf2 - fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2
PAS - pressão arterial sistólica
PCR – proteína C reativa
PHOS - fósforo
Prot. - proteinúria
RDW - amplitude de distribuição eritrocitária
RPC - razão entre proteína e creatinina urinárias
SDMA - dimetilarginina simétrica sérica
SOD - superóxido dismutase
TAS - estado antioxidante total
TBARS - espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBIL - bilirrubinas totais
TFG – taxa de filtração glomerular
TLR-4 - *toll like receptors-4*
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TP - proteínas totais
UI - unidade internacional
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
VCM - volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1 Doença renal crônica em cães	20
3.2. Alterações clínico laboratoriais observadas no cão portador de DRC	23
3.3. O estresse oxidativo e a inflamação na doença renal crônica	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. Aprovação do projeto	32
4.2. Animais	32
4.3. Grupos experimentais.....	32
4.4. Critérios para inclusão / exclusão.....	32
4.5. Tempos do estudo e local de realização	33
4.6. Avaliação clínica.....	33
4.7. Coletas de amostras e exames	34
4.7.1. Hemograma	35
4.7.2. Perfil Bioquímico	36
4.7.3. Perfil Urinário	36
4.7.4. Perfil do Estresse Oxidativo.....	37
4.7.5. Delineamento experimental e análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Características dos animais estudados.....	39
5.2. Aspectos clínicos dos cães portadores de DRC.....	39
5.3. Parâmetros bioquímicos dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos do estudo.....	42
5.3.1. Creatinina, Ureia, SDMA, Amilase e Lipase séricas e Creatinina urinária.....	42
5.3.2. Densidade urinária.....	45
5.3.3. Albumina e colesterol séricos, proteína urinária e razão proteína creatinina urinárias (RPC)	46
5.3.4. Fósforo e cálcio total séricos.....	47
5.3.5. Glicose, colesterol e ácidos graxos não esterificados (NEFA).....	49
5.4. Parâmetros hematológicos e concentração plasmática do ferro e IBC dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos do estudo	51
5.4.1. Hemácias, hematócrito, hemoglobina	51

5.4.2. Ferro e IBC.....	54
5.4.3. Leucócitos totais, Segmentados, Monócitos, Linfócitos e Plaquetas	59
5.5. Variáveis relacionadas ao estresse oxidativo dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos do estudo.....	63
5.5.1. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma.....	63
5.5.2. <i>Status</i> Antioxidante Total (TAS) no plasma	65
5.5.3. <i>Status</i> Antioxidante Total (TAS) na urina.....	68
5.5.4. Glutathiona peroxidase (GSH-Px) no plasma	69
5.5.5. Glutathiona peroxidase (GSH-Px) na urina.....	71
5.5.6. Superóxido dismutase (SOD) no concentrado de hemácias	72
5.5.7. Superóxido dismutase (SOD) na urina.....	75
5.6. Efeito da utilização ou não da dieta renal pelos cães portadores de DRC sobre as variáveis analisadas quando da admissão ao estudo.....	76
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. CONCLUSÕES.....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido (cães do grupo controle)	89
Declaração de consentimento (cães do grupo controle).....	91
ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido (cães doentes renais crônicos)	92
Declaração de consentimento (cães doentes renais crônicos)	94
ANEXO C - Procedimento operacional padrão da separação do concentrado de hemácias.....	95

1. INTRODUÇÃO

Na doença renal crônica (DRC), além da disfunção do órgão em si, condições importantes de estresse oxidativo (EO) e inflamação estão presentes em diferentes graus, dependendo do estágio da doença. Sabe-se que o EO que ocorre na DRC desencadeia e autoperpetua a cascata inflamatória no organismo, sendo a recíproca também verdadeira (Yilmaz et al., 2007 e Zoccali et al., 2017). Várias pesquisas sobre a DRC têm se dedicado a entender estes mecanismos, dada à complexidade das suas vias moleculares e a descoberta de novas moléculas e vias inflamatórias, proporcionando uma visão mais abrangente da DRC do que há algumas décadas (Vilaysane et al., 2010; Moreno et al., 2011; Gupta et al., 2012; Aminzadeh et al., 2013). Segundo Raj et al. (2020), o EO desencadeia a inflamação e esta, por sua vez, contribui para a progressão da DRC, perpetua o EO e ainda predispõe a complicações multiorgânicas.

Mesmo com todos os avanços nesta área, ainda existem vários questionamentos sobre o manejo do EO e da inflamação na DRC, como por exemplo: Qual a forma ideal de avaliá-los? Quais são os biomarcadores mais adequados? Quais seriam os alvos terapêuticos? Portadores de DRC produzem mais radicais livres? Existem moléculas pró-inflamatórias mais específicas para o diagnóstico desta condição ou seria necessário um painel mais amplo? Qual o grau ideal de controle terapêutico da inflamação sem que haja comprometimento importante na função da defesa celular?

O EO em cães doentes renais crônicos ainda é um assunto pouco estudado sendo este o principal objetivo desta pesquisa. Acredita-se que os resultados possam contribuir para um melhor entendimento do mecanismo oxidativo-inflamatório da DRC, favorecendo o diagnóstico de tal condição e o desenvolvimento de estratégias que visem o seu controle e, conseqüentemente, a diminuição da progressão da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar biomarcadores de estresse oxidativo (EO) em cães portadores de DRC.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Estadiar o doente renal crônico por meio dos parâmetros propostos pela *International Renal Interest Society* (IRIS);
- 2.2.2. Comparar os parâmetros laboratoriais dos cães DRC, estadiados pela IRIS, entre os estádios e ao longo dos tempos avaliados;
- 2.2.3. Verificar o efeito ou não da dieta renal sobre parâmetros laboratoriais quando da admissão ao estudo (tempo 1);
- 2.2.4. Dosar biomarcadores de estresse oxidativo no concentrado de hemácias, plasma e urina de cães portadores de DRC;
- 2.2.5. Avaliar o estresse oxidativo com o estadiamento da doença renal crônica segundo a IRIS, em um período de acompanhamento de 6 meses;
- 2.2.6. Avaliar os biomarcadores de estresse oxidativo com demais parâmetros laboratoriais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Doença renal crônica em cães

Estima-se que cerca de 0,5 a 1,5% da população canina seja portadora de doença renal crônica (DRC), sendo esta considerada uma das doenças mais comuns entre cães de idade avançada (Chew et al., 2011). A DRC é a condição em que os rins apresentam comprometimento estrutural e funcional de forma progressiva e irreversível (Bartges, 2012). Alterações estruturais renais, sejam adquiridas, congênitas ou genéticas, prejudicam a capacidade funcional do órgão, diminuindo o tempo de vida do paciente. Trata-se de uma situação na qual podem ocorrer várias alterações sistêmicas, uma vez que os rins exercem diferentes funções. O comprometimento da função excretora, do equilíbrio hidroeletrólítico e ácido básico e da função secretora são observados principalmente naqueles animais cuja doença encontra-se em estádios mais avançados (Polzin, 2013; IRIS, 2019a).

O diagnóstico da DRC pode ser realizado com base em anormalidades da função renal, persistentes por 3 meses ou mais, incluindo: azotemia, baixa densidade urinária, proteinúria renal (glomerular e/ ou tubular) e glicosúria com normoglicemia. Alterações morfológicas dos rins ao exame ultrassonográfico, como por exemplo, perda de definição entre regiões cortical e medular, hiperecogenicidade persistente da cortical renal, presença de múltiplos cistos, áreas sugestivas de infarto renal, rins diminuídos de tamanho ou com superfícies irregulares, também auxiliam no diagnóstico da DRC (IRIS, 2019).

Outros sinais que auxiliam no diagnóstico são o relato de poliúria e polidipsia persistentes e a perda progressiva de peso corporal e de massa muscular. Por isso, a avaliação e anotação do escore da condição corporal (ECC) e do índice de massa muscular (IMM) no prontuário da paciente são importantes, tanto para auxiliar no diagnóstico quanto no monitoramento da DRC (Polzin, 2013; IRIS, 2019).

Após o diagnóstico da DRC, a *International Renal Interest Society* - IRIS (2019), recomenda a sua classificação em 4 estádios (fig.1) de acordo com as concentrações séricas de creatinina e de dimetil arginina simétrica (SDMA).

Figura 1: Estádios da doença renal crônica em cães, baseados nas concentrações séricas de creatinina e SDMA (dimetilarginina simétrica).

Concentração sérica	Estádio 1	Estádio 2	Estádio 3	Estádio 4
Creatinina (mg/dL)	< 1,4	1,4 – 2,8	2,9 – 5,0	> 5,0
SDMA (µg/dL)	< 18	18 – 35	36 – 54	> 54

Fonte: Adaptado de IRIS- Staging of CKD (2019a).

Destaca-se que, para valores séricos da SDMA acima do estágio referente ao indicado pelo valor sérico da creatinina, prevalece o valor da SDMA para o estadiamento. Para evitar equívocos, há necessidade de, no mínimo, duas mensurações da concentração sérica de creatinina e da SDMA com intervalos, em média, de 2 semanas e com o paciente hidratado e em jejum de pelo menos 12 horas antes da coleta das amostras.

A IRIS (2019) também propõe o sub estadiamento da DRC, baseado na razão proteína creatinina urinárias (RPC) e na pressão arterial sistólica (PAS) (fig.2).

Figura 2: Sub estádios da doença renal crônica em cães baseados na pressão arterial sistólica (PAS) e na razão proteína creatinina urinárias (RPC).

RPC	Subestádio	PAS (mmHg)	Subestádio
< 0,2	Não proteinúrico	<140	Normotenso
De 0,2 a 0,5	Border line	140 - 159	Pré-hipertenso
> 0,5	Proteinúrico	160 – 179	Hipertenso
-	-	≥ 180	Severamente hipertenso

Fonte: Adaptado de IRIS- Staging of CKD (2019a).

Quando alteradas, mensurações seriadas da RPC e da PAS são necessárias, a fim de confirmar a persistência das alterações (IRIS, 2019a). Para interpretar corretamente o resultado da RPC, deve-se descartar as amostras de urina que apresentem sedimento ativo compatível com proteinúria de origem pós-renal e certificar-se de que não haja possibilidade de proteinúria pré renal (Vaden e Elliott, 2016). Critérios importantes devem ser seguidos no momento da aferição da PAS, de acordo com as diretrizes da Declaração de Consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACVIM, 2018). Estes critérios incluem:

- Indivíduo qualificado e experiente tanto no manuseio dos animais quanto do aparelho para as mensurações;

- Aferição realizada em local tranquilo, após pelo menos 5 a 10 minutos para aclimatação do paciente e, de preferência, na presença do tutor;
- Seleção do manguito adequado para o porte do paciente;
- Posicionamento correto do paciente no momento da aferição;
- Uso de fone de ouvido para ausculta do pulso a ser captado pelo doppler;
- Avaliação dos valores obtidos de PAS descartando-se a primeira mensuração e levando-se em consideração, no mínimo, mais 5 a 7 mensurações ou mais, até que se obtenham valores com menor amplitude de variação.

A finalidade principal do estadiamento e do sub estadiamento da DRC é facilitar a abordagem do paciente quanto ao tratamento, monitoramento e prognóstico.

A busca por alternativas que possam amenizar a progressão da DRC é incessante, com intuito de oferecer longevidade com qualidade de vida aos pacientes. Para tanto, a principal ferramenta é o tratamento conservador, cujo objetivo é desacelerar o declínio da função renal, melhorar a condição clínica e os parâmetros bioquímicos do paciente e mantê-lo em um estado nutricional adequado. Essa abordagem consiste no monitoramento periódico e controle terapêutico de alterações como: desidratação, proteinúria, hipertensão, náuseas, vômitos, acidose metabólica, anemia, úlceras na cavidade oral e distúrbios endócrinos. O tratamento conservador a ser instituído depende do estágio da DRC e compreende dieta específica (dieta renal), suplementos, antiproteinúricos, anti-hipertensivos, quelantes de fósforo, fluidoterapia, orexígenos, anti-nausea, antieméticos, hormônios e outros medicamentos para tratamento sintomático das alterações presentes (Bartges, 2012; Polzin, 2013; Quimby, 2016; IRIS, 2019b).

O prognóstico da DRC em cães, assim como o tratamento, também varia de acordo com o estágio da doença. Aqueles em estágio 3 e 4 apresentam um quadro mais progressivo e complicado de ser controlado e, conseqüentemente, menor expectativa de vida. Da mesma forma, aqueles sub estadiados como proteinúricos e/ou hipertensos, além dos hiperfosfatêmicos e com atrofia muscular, também se correlacionam com um pior prognóstico (Polzin, 2013; Quimby, 2016; Rudinsky et al., 2018). Mesmo assim, a instituição de um tratamento conservador adequado à condição do paciente, pode incrementar a longevidade, nos primeiros estádios da doença. Já nos estádios mais avançados da DRC o maior objetivo do tratamento conservador é oferecer qualidade de vida (Polzin, 2013; Quimby, 2016).

3.2. Alterações clínico laboratoriais observadas no cão portador de DRC

Devido ao comprometimento das funções renais com consequentes desordens metabólicas, são esperadas alterações sistêmicas que podem ser identificadas tanto pela condição clínica quanto pelos exames laboratoriais. Por isso, o acompanhamento periódico deste paciente é fundamental, a fim de identificar a necessidade de intervenções terapêuticas adequadas a cada situação. O exame físico geral, a determinação do escore da condição corporal (ECC), do índice de massa muscular (IMM), a aferição da PAS, bem como as dosagens séricas de ureia, creatinina, fósforo, cálcio iônico, albumina, SDMA, além da urinálise e da mensuração da RPC, associados ao hemograma, são importantes na avaliação deste paciente. A hemogasometria, quando possível, deve fazer parte do perfil de avaliação especialmente dos pacientes em estádios avançados (Bartges, 2012; Polzin, 2013; IRIS, 2019b).

As manifestações clínicas podem variar desde a ausência de sinais até a ocorrência de hiporexia, anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, halitose, úlceras na cavidade oral, poliúria, polidipsia, desidratação, mucosas hipocoradas, letargia, fraqueza, baixo ECC e IMM, sinais de cistite e hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Bartges, 2012; Quimby, 2016; IRIS, 2019a).

A HAS ocorre, em parte, devido a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, aumento das concentrações séricas do hormônio antidiurético e do tônus simpático, contribuindo para a ocorrência de proteinúria e para a progressão da DRC. Pode ainda comprometer a função cardíaca, gerar sinais neurológicos como encefalopatia isquêmica e convulsão, além de alterações oculares como hifema, hemorragia ou descolamento retiniano e cegueira (Bartges, 2012).

Dos achados laboratoriais mais frequentes, tem-se azotemia com baixa densidade urinária (<1,030 em cães), aumento da concentração sérica da SDMA, proteinúria, hipoalbuminemia, acidose metabólica, hiperfosfatemia, anemia arregenerativa, dislipidemia e urocultura positiva para crescimento bacteriano (IRIS, 2019a). A ocorrência dessas alterações varia de acordo com o estágio da doença (Bartges, 2012).

Alterações na concentração sérica de creatinina podem ocorrer ainda dentro do intervalo de normalidade para a espécie. Dessa forma, quando a análise das amostras é realizada pela mesma metodologia, no mesmo laboratório e identificam-se aumentos >0,3mg/dL em intervalos de semanas a meses, há um decréscimo da função excretora renal, o que pode

significar DRC em estágio 1, ou seja, não azotêmico. Durante a interpretação destes resultados é importante descartar fatores pré-renais e o IMM do paciente (IRIS, 2019).

Quanto menos néfrons remanescentes, menor será a capacidade excretora e, por isso, maiores serão as concentrações séricas de ureia e creatinina (IRIS, 2019a). Devido a creatinina ser um subproduto do metabolismo muscular, aqueles pacientes com perda considerável de massa magra, geralmente apresentam uma concentração sérica de creatinina subestimada. Nestes casos, o valor sérico da SDMA auxilia na definição do real estágio da DRC no qual o paciente se encontra, devido a sua boa correlação com a taxa de filtração glomerular (TFG) em cães com doença renal progressiva (Nabity et al., 2015).

A SDMA é considerada um biomarcador mais sensível do que a creatinina, tanto para o diagnóstico precoce da DRC quanto para o seu estadiamento e monitoramento (IRIS, 2019a). Estima-se que a concentração sérica da SDMA aumente quando apenas 25% do parênquima renal está comprometido, ao contrário da creatinina sérica, que normalmente só se mostra alterada quando o comprometimento do parênquima renal chega a 75%. Valores persistentemente alterados de SDMA ($>14\mu\text{g/dL}$) podem ser considerados como fator de diagnóstico precoce da DRC. Assim, é possível encontrar SDMA alterada já no estágio 1 da DRC. Porém, ainda não há estudos prospectivos em larga escala que permitam o entendimento de todos os fatores que influenciam a especificidade da SDMA (IRIS, 2019a).

Em cães, a urinálise, muitas vezes, é a primeira análise laboratorial a se mostrar alterada, geralmente pela diminuição da densidade urinária, devido a incapacidade dos túbulos em reabsorver a água do filtrado glomerular, ocasionando poliúria e polidipsia a partir de um determinado momento de evolução da doença renal (Bartges, 2012; IRIS, 2019). Outro achado comum da urinálise na DRC é a presença de proteinúria, condição comum, provocada pela hipertensão glomerular (Brenner et al., 1982) e confirmada pelo aumento no valor da RPC (Maniaki e Finch, 2018).

Quanto maior a magnitude e a persistência da RPC, maior a chance de hipoalbuminemia, que pode se agravar pelo mau estado nutricional do paciente nos estágios avançados da DRC. Como forma de compensação da hipoalbuminemia pode ocorrer, após um determinado período, uma hipercolesterolemia na tentativa, por parte do fígado, de manter a pressão oncótica dentro dos vasos sanguíneos (Maniaki e Finch, 2018).

Desordens metabólicas são observadas, incluindo a acidose e distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo. A acidose metabólica ocorre devido, principalmente, à deficiência na excreção de íons hidrogênio e na reabsorção do bicarbonato. Além disso, em casos de desidratação e baixa perfusão, ainda há a contribuição da acidose láctica que agrava este distúrbio metabólico (Langston, 2016). No estudo de Kogika et al. (2006), no qual foram avaliados 25 cães portadores de DRC e com acidose metabólica foi demonstrado que 56% destes cães apresentaram hipocalcemia. Porém, não houve correlação entre o pH sanguíneo e o cálcio ionizado, acreditando-se que a calcemia seja mais comumente alterada por outros fatores ligados à DRC como, por exemplo, a hiperfosfatemia.

O decréscimo da TFG gera hiperfosfatemia que, por sua vez, afeta o apetite além de poder resultar em mineralização distrófica e na progressão da DRC. Como reflexo da hiperfosfatemia é esperado que haja, como resposta inicial, uma hipocalcemia em decorrência da formação de complexos séricos entre o fósforo e o cálcio, como reflexo da lei de equação das massas. Além disso, com a perda de néfrons, a produção de calcitriol (forma ativa da vitamina D) pelas células renais tubulares fica comprometida, o que leva a uma menor absorção de cálcio pelo intestino intensificando a hipocalcemia. Essa hipocalcemia, por sua vez, estimula a secreção do paratormônio, predispondo ao hiperparatireoidismo renal secundário. Altas concentrações séricas de paratormônio estimulam a reabsorção óssea (liberação de cálcio e fósforo para a corrente sanguínea) e a produção de calcitriol, na tentativa de restabelecer as concentrações séricas de cálcio. Porém, como as células tubulares renais não são capazes de produzir calcitriol satisfatoriamente, a fim de restabelecer a homeostase do cálcio e fósforo, o estímulo para reabsorção óssea não cessa, podendo gerar, nos casos mais avançados, a osteodistrofia fibrosa (Bartges, 2012; Giovaninni, 2015).

Uma anemia progressiva, geralmente normocítica, normocrômica, hipoproliferativa está presente à medida que a doença evolui para o estágio final, estando, portanto, positivamente correlacionada a concentrações séricas de creatinina. Sua etiologia é multifatorial e inclui causas que irão variar de acordo com o estágio da DRC. Estas causas são o EO e o estado inflamatório gerando apoptoses dos eritrócitos, toxinas urêmicas ocasionando a redução da meia vida dessas células, o déficit nutricional em função da hiporexia/anorexia, a produção insuficiente de eritropoetina e a perda de sangue por microhemorragias devido a vasculite e gastroenterite urêmica (Bartges, 2012; Polzin, 2013; IRIS, 2019b). Acredita-se que a anemia esteja associada à gravidade da progressão da DRC devido ao decréscimo do fluxo sanguíneo

para os rins comprometendo a oxigenação renal e aumentando o estresse oxidativo (EO) e a indução de fibrose (Bartges, 2012).

3.3. O estresse oxidativo e a inflamação na doença renal crônica

Sabe-se que a DRC implica em um quadro de EO permanente concomitante à inflamação no organismo (Oberg et al., 2004; Bartges, 2012; Amdur, et al., 2016; Machowska et al., 2016; Zoccali et al., 2017; Raj et al., 2020), sendo estas duas condições ainda pouco pesquisadas em cães.

No metabolismo celular normal, a fosforilação oxidativa aeróbica produz constantemente espécies reativas do oxigênio (ERO). Estas ERO podem ocasionar injúria oxidativa em lipídios, proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e provocar, com isso, danos celulares. Porém, existem vários mecanismos naturais de defesa antioxidante no organismo, responsáveis por neutralizar estas ERO. Admite-se que o EO intensifique quando há um desequilíbrio no organismo levando a uma maior produção das ERO e ou uma menor capacidade de remoção das mesmas pelo mecanismo de defesa antioxidante (Ozbek, 2012; Small et al., 2012; Ling e Kuo, 2018).

As células renais, especialmente as tubulares, são umas das células mais metabolicamente ativas no organismo, por isso, os rins mantêm alto fluxo de sangue arterial com alto nível de fosforilação oxidativa mitocondrial em suas células, ocorrendo assim, grande produção de ERO (Bartges, 2012). Vários tipos de ERO são produzidas pelo metabolismo aeróbico normal das células renais, incluindo os superóxidos, peróxido de hidrogênio, hidroxila, hidroperóxidos lipídicos ou de DNA, radicais peroxi-lipídicos (ou lipoperóxidos), ácido hipocloroso e peroxi nitrito (Aruna e Devi, 2014). Além disso, os rins são órgãos altamente vulneráveis aos danos causados pelas ERO devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa que compõem os lipídios presentes em sua estrutura, sendo estes compostos, facilmente oxidados pelas ERO (Ozbek, 2012).

A mensuração direta das ERO é difícil de ser realizada *in vivo* pois geralmente encontram-se em baixas concentrações, têm meia vida muito curta e são altamente reativas. Opta-se, então, por dosar dois principais tipos de substâncias relacionadas ao EO: os produtos dos danos causados pelas ERO, ou então, as substâncias antioxidantes do mecanismo de defesa natural do organismo (Ling e Kuo, 2018).

Há vários produtos do dano oxidativo, entre eles, as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). O malondialdeído (MAD) é uma destas substâncias, sendo um subproduto da peroxidação lipídica envolvido diretamente nas glomerulopatias, permitindo assim, avaliar a intensidade do dano renal e possuindo valor diagnóstico semelhante ao do TBARS (Aruna e Devi, 2014). O MAD é citotóxico e genotóxico e é usado na medicina para detectar EO em várias doenças como lúpus eritematoso sistêmico, diabetes, Alzheimer, câncer e doenças pulmonares (Russo e Bracarense, 2016). É um marcador simples de mensurar, sensível, específico e está positivamente correlacionado com a severidade da DRC em humanos (Aruna e Devi, 2014).

O sistema antioxidante renal é formado por compostos enzimáticos incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), óxido nítrico sintetase (NOS) e por compostos não enzimáticos como a glutathione (GSH), vitaminas E e C, carotenoides, albumina e eritrócitos (Brown, 2008; Aruna e Devi, 2014).

O alto metabolismo celular renal associado às alterações morfofuncionais dos rins na DRC geram um estado de EO local e, muitas vezes, sistêmico, dependendo do estágio da doença (Brown, 2008). Tal fato decorre da tentativa dos néfrons remanescentes de compensar o déficit da função renal, encontrando-se em um constante estado hiper funcional. Estes néfrons entram em maior atividade metabólica e, conseqüentemente, maior fosforilação oxidativa celular, com aumento na produção das ERO e maior possibilidade de desenvolvimento do EO.

Outras condições, geralmente presentes na DRC, também contribuem para o aumento das ERO como, por exemplo, a ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, a proteinúria, a HAS, a anemia, o estado inflamatório crônico sistêmico já instalado, a idade avançada, entre outras (Brown, 2008). A ativação do sistema renina angiotensina aldosterona renal faz com que a angiotensina II aumente a produção do íon superóxido pelas células mesangiais e tubulares (Hannken et al, 1998; James et al., 1998). Em relação à proteinúria, o que ocorre é que, a albumina, especialmente a oxidada, age sobre a membrana luminal das células dos túbulos proximais estimulando a produção de citocinas próinflamatórias e quimiocinas, que, por sua vez, estimularão maior produção de ERO. Já na HAS ocorre um incremento da TFG, intensificando a condição de hiperfunção dos néfrons e, conseqüentemente de geração de ERO, da mesma forma que a hipóxia renal gerada pela anemia, também provoca o aumento da produção das ERO (Brown, 2008).

Assim, é esperado que o paciente portador de DRC esteja constantemente sob efeito do EO, o qual aumenta quanto mais a doença progride, provocando maior dano celular. Este estado fisiopatológico é um importante mecanismo que explica a característica progressiva da DRC (Small et al., 2012). Acredita-se que o EO renal em cães e gatos contribua para a fibrose intersticial, a glomeruloesclerose, a hipertensão sistêmica e glomerular, o estado inflamatório renal e sistêmico e o declínio progressivo da função do órgão (Brown, 2008).

O EO e a inflamação sistêmica presentes na DRC contribuem para a ocorrência de complicações e para o aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes (Oberg et al., 2004; Yilmaz et al., 2007; Machowska et al., 2016; Zoccali et al., 2017; Raj et al., 2020). Em uma revisão sobre o assunto, Yilmaz et al. (2007) citaram vários estudos que mostram o estado inflamatório em pacientes humanos com DRC, mesmo em estados urêmicos iniciais e intermediários da doença. Acredita-se que a intensificação da resposta inflamatória ocorra paralelamente à diminuição da função renal (Yilmaz et al., 2007; Zoccali et al., 2017).

Com a ocorrência do EO, as ERO, que não foram neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante, estimulam uma maior produção de citocinas pro-inflamatórias que, por sua vez, estão com sua excreção renal diminuída, o que eleva suas concentrações sanguíneas e contribui para a inflamação observada na DRC. Associado a isso, a acidose metabólica, a hiperfosfatemia, as toxinas absorvidas pelo intestino alterado, infecções oportunistas e possíveis comorbidades intensificam o estado inflamatório do paciente (Yilmaz et al., 2007; Machowska et al., 2016; Zoccali et al., 2017; Raj et al., 2020).

Várias citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento agem em conjunto nos rins e promovem um acúmulo de matriz extracelular, com conseqüente glomeruloesclerose e fibrose intersticial. Estas biomoléculas inflamatórias estimulam a geração de mais ERO e de espécies reativas de nitrogênio, levando à intensificação do EO e, conseqüentemente, mais inflamação. Algumas citocinas ainda aumentam a atividade endotelial pró-coagulante e a proliferação celular (Amdur et al., 2016; Raj et al., 2020).

O EO e o conseqüente envelhecimento celular acelerado causam o maior número de apoptoses observados na DRC (Small et al., 2012). Estas células danificadas liberam moléculas endógenas (auto-antígenos), também chamados de DAMPs, “padrões moleculares associados ao dano”. Os DAMPs ativam inflamassomas (NLRs) que são um grupo de receptores proteicos, contidos no citoplasma e que fazem parte do sistema imune inato.

Quando ativados, estes inflamassomas desencadeiam e amplificam o processo inflamatório (Raj et al., 2020). O NLRP3 é um destes inflamassomas e está presente em vários órgãos, entre eles os rins (Vilaysane et al., 2010; Alvarenga et al., 2020).

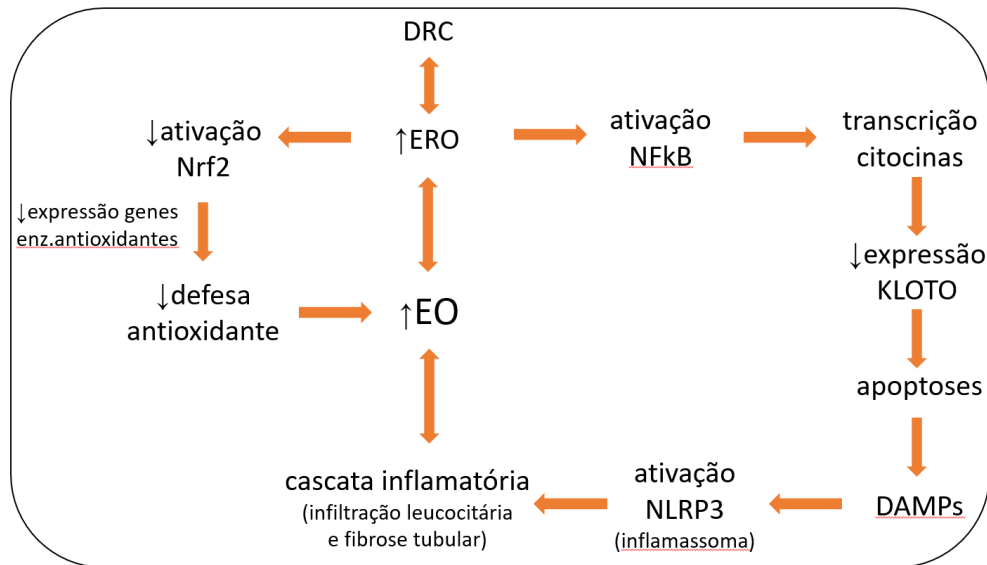
Em humanos, já foi demonstrado o aumento da expressão do NLRP3 na DRC. Foi observado que a ausência do NLRP3 resulta em atenuação da injúria tubular, redução da infiltração leucocitária e da fibrose tubular. Desta forma, o NLRP3 tem sido encarado como um importante alvo na intervenção terapêutica das doenças renais (Vilaysane et al., 2010).

Outro fator importante na cascata inflamatória é o fator nuclear kappa B (NF-kB). Ele é um fator de transcrição envolvido na expressão de diversos genes ligados à produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas (Aminzadeh et al., 2013), mas seu papel ainda não foi totalmente elucidado na DRC (Moreno et al., 2011). O aumento na produção das ERO na DRC, ativa o fator de transcrição NF-kB dentro das células. Uma vez ativado, ele também ativa o NLRP3 (Alvarenga et al., 2020) e ainda comanda a transcrição de citocinas que são capazes de diminuir a expressão do Kloto nas células renais. Kloto é um hormônio proteico secretado pelos rins com propriedades antienvhecimento. A diminuição da sua expressão, portanto, está relacionada ao processo de envelhecimento celular acelerado e injúria renal. Assim, pode-se dizer que o EO, diminui a expressão do Kloto causando envelhecimento celular e ativa o NF-kB contribuindo para o avanço da inflamação na DRC (Moreno et al., 2011).

O EO também prejudica a ativação do fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é o maior regulador de genes codificadores de enzimas antioxidantes. No estudo de Aminzadeh et al. (2013) que induziram DRC em ratos, foi demonstrado que o EO e a inflamação renal foram acompanhados de falha na ativação do Nrf2, com baixa expressão dos genes codificadores da catalase, heme-oxigenase-1 e glutamato-cisteína ligase, enzimas que participam do sistema de defesa contra o EO.

Portanto, o EO é capaz tanto de ativar fatores nucleares responsáveis pela produção de citocinas pro-inflamatórias, quanto inibir fatores nucleares relacionados ao sistema de defesa antioxidante (Fig.3).

Figura 3: Representação esquemática resumida do modelo de autoperpetuação do estresse oxidativo e da inflamação na doença renal crônica.



DRC= doença renal crônica, ERO= espécies reativas de oxigênio, EO= estresse oxidativo, NFκB= fator nuclear kappa B, DAMPs= padrões moleculares associados ao dano, NLRP3= *Nod like receptor* P3, Nrf2= fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2.

A respeito do estado inflamatório em indivíduos DRC ainda não há um consenso sobre quais são as citocinas ideais para melhor caracterização deste estado e nem quais seriam seus valores de referência. Sendo assim, utilizam-se vários biomarcadores que caracterizam a condição inflamatória do paciente (Raj et al., 2020).

Gupta et al. (2012) estudaram a associação entre albuminúria, função renal e o perfil de biomarcadores inflamatórios em 3.939 pacientes do “Chronic Renal Insufficiency Cohort”. Um escore de inflamação foi desenvolvido a partir das concentrações plasmáticas dos biomarcadores que apresentaram maior alteração, sendo eles IL-1β, IL-6, TNF-α, PCR e fibrinogênio. Chegou-se à conclusão de que indivíduos com menor TFG e maior magnitude de albuminúria apresentaram um maior escore inflamatório.

Outro fator correlacionado à inflamação na DRC é a anemia. Concentrações elevadas de IL-6, TNF- α e PCR estão associadas com a resistência à ação da eritropoetina (EPO), propiciando a ocorrência de anemia funcional, geralmente relatada em pacientes com DRC mais avançada. Além disso, o efeito de certas citocinas pró-inflamatórias inibem tanto a produção de EPO quanto a proliferação de células progenitoras eritróides (Raj et al., 2020). Outra molécula importante na anemia da DRC é a hepcidina, cujo aumento da sua produção é influenciado

pela IL-6. Altas concentrações de hepcidina no sangue diminuem as concentrações de ferro circulante, favorecendo a anemia (Ganz e Nemeth, 2012; Antunes e Canziani, 2016).

A inflamação sistêmica persistente da DRC está relacionada também ao comprometimento das respostas imunes inata e adquirida, predispondo a infecções (Machowska et al., 2016; Raj et al., 2020). Acredita-se que a uremia exerça um efeito de diminuição na expressão dos “toll like receptors-4” (TLR-4) que são receptores de membrana ativadores da resposta celular. Com a menor ativação dos TLR-4, as células mononucleares de defesa tornam-se hiporreativas, aumentando a suscetibilidade do indivíduo à infecção, e esta, quando instalada, intensifica a condição inflamatória (Yilmaz et al., 2007). Os distúrbios metabólicos e nutricionais também contribuem para o estado inflamatório do portador de DRC e pacientes humanos inflamados são mais susceptíveis a doenças cardiovasculares (Yilmaz et al., 2007; Machowska et al., 2016; Raj et al., 2020).

Muito se tem estudado a respeito de estratégias antioxidantes que possam contribuir para diminuição do EO e da inflamação na doença renal (Sener et al., 2004; Yu e Paetau-Robinson, 2006; Small et al., 2012; Valle et al., 2015; Yong et al., 2019; Alvarenga et al., 2020), porém há muito o que se pesquisar sobre este complexo sistema oxidativo-inflamatório.

Vários são os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e progressão do EO e da inflamação na DRC. Apesar de diversas pesquisas já terem sido desenvolvidas sobre este assunto, especialmente em humanos e cobaias, muito ainda necessita ser esclarecido, principalmente no que diz respeito a espécie canina. Quanto maior o avanço nesta área, maiores as possibilidades terapêuticas direcionadas a alvos específicos, com aumento da chance de sucesso no controle do EO, da inflamação e, conseqüentemente, da progressão da DRC.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Aprovação do projeto

Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de animais (CEUA-UFMG) sob o protocolo de nº 59/2021.

4.2. Animais

Foram selecionados 29 animais, entre machos e fêmeas, castrados e não castrados, de diferentes idades e raças, de tutores particulares residentes no município de Belo Horizonte e região, os quais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1 e 2).

Os cães doentes renais crônicos foram provenientes da casuística do setor de Nefrologia da Hospital Veterinário da UFMG e de uma clínica veterinária particular de propriedade de um dos colaboradores do projeto. Já os cães do grupo controle estavam sob a tutela de alunos da graduação, pós-graduação e professores da Escola de Veterinária da UFMG ou sob a mesma tutela que o cão portador de DRC.

Dos 29 animais, 11 foram classificados como não sendo portadores de DRC e apresentando exames clínico e laboratoriais normais e 18 foram classificados como portadores de DRC, porém dois dos cães portadores de DRC precisaram ser excluídos ao longo do tempo por não se adequarem aos critérios de inclusão.

4.3. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos entre grupo controle (GC), ou seja, sem DRC e grupo de cães portadores de doença renal crônica (GDRC). Todos os cães portadores de DRC, para efeito de padronização, receberam dieta específica para a doença renal (Equilíbrio Veterinary – Renal RE - canino[®]) e suplemento a base de ômega-3, vitamina E, selenito de sódio, gluconato de cobre, gluconato de zinco, sulfato de condroitina e glucosamina (Gerioox[®]). Tanto a dieta renal quanto o suplemento tiveram suas doses diárias calculadas de acordo com a recomendação do fabricante, baseada no peso corporal.

4.4. Critérios para inclusão / exclusão

Os cães admitidos como controle (GC), foram aqueles que, pelo histórico e pelos exames clínicos e laboratoriais, demonstraram ausência de DRC e de qualquer outra afecção aparente.

Os cães admitidos no grupo GDRC foram aqueles diagnosticados como portadores de DRC pelos critérios de diagnóstico propostos pela IRIS (2019), sendo classificados, de acordo com o estágio, em DRC1, DRC2, DRC3 ou DRC4. Estes cães necessitariam estar em condição de estabilidade clínica, tanto em relação à DRC, quanto a qualquer possível comorbidade pré-existente, apresentando exame clínico dentro dos parâmetros de normalidade para o estágio da DRC em que se encontravam.

Pacientes do GDRC que apresentassem quadro de descompensação persistente como apatia, vômito, diarreia, convulsão, ou qualquer outra anormalidade clínica aguda, deveriam ser excluídos do estudo.

4.5. Tempos do estudo e local de realização

Foram propostos cinco tempos (tempo 1 ao tempo 5) de acompanhamento para os cães do grupo GDRC, os quais foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial. Entre os tempos 1, 2 e 3, os intervalos foram de 30 dias e entre os tempos 3, 4 e 5, os intervalos foram de 60 dias, totalizando 180 dias de avaliação.

As análises dos pacientes portadores de DRC, em vários tempos, com intervalos relativamente longos, objetivou obter um perfil no qual a média dos diversos parâmetros avaliados pudesse retratar valores, o mais próximos possíveis da realidade de cada paciente, especialmente no que diz respeito ao EO, principal objetivo deste estudo.

Os cães do GC foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial em um único tempo uma vez que, ao constatar a seu estado de higidez, não seria esperado grandes variações nos parâmetros avaliados.

Todas as etapas da avaliação clínica e coleta de sangue e urina foram realizadas nas dependências do Hospital Veterinário da UFMG.

4.6. Avaliação clínica

Todos os cães do estudo foram submetidos a anamnese e exame físico completo, incluindo inspeção da coloração das mucosas orais e oculares, avaliação da hidratação através do turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar, medição da frequência cardíaca pela auscultação, do pulso por palpação digital em artéria femoral e da frequência respiratória pela visualização dos movimentos respiratórios por minuto, além de palpação

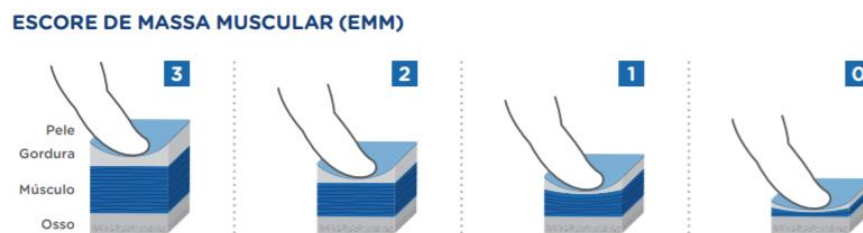
abdominal, inspeção de linfonodos, aferição da PAS por sistema ultra-sônico (Doppler Parks 811B) e esfigmomanômetro (Gamma G5) e da temperatura retal por termômetro digital. Além disso, foi realizada a classificação de cada cão pelo escore de condição corporal (ECC) e pelo índice de massa muscular (IMM), seguindo os critérios de:

- ECC 1 a 3 = muito magro
- ECC 4 ou 5 = condição corporal ideal
- ECC 6 = sobrepeso
- ECC 7, 8 ou 9 = obeso

Para o IMM utilizou-se classificação de 3 a 0 (Fig. 4), onde:

- IMM 3 = nenhuma perda de massa muscular
- IMM 2 = perda leve de massa muscular
- IMM 1 = perda moderada de massa muscular
- IMM 0 = perda acentuada de massa muscular

Figura 4: Classificação do índice de massa muscular (digitopressão sobre osso temporal, escápula e ossos pélvicos)



Fonte: WSAVA Global Nutritional Guidelines, 2011.

4.7. Coletas de amostras e exames

As amostras de sangue e de urina foram obtidas de cada animal sob condições de jejum alimentar de 12 horas, sempre pela manhã, estando todos os animais hidratados e sem intercorrências clínicas tais como êmese ou diarreia nas últimas 24 horas. Os animais do grupo GC tiveram apenas um tempo de coleta e os do grupo GDRC, tiveram 5 tempos de coleta.

A coleta de sangue foi realizada por venopunção com seringas de 10 mL e agulha 25x7mm, na jugular externa, após a devida antissepsia. O sangue obtido foi distribuído e acondicionado da seguinte forma:

- 0,5mL em microtubo com EDTA (10%) para realização do hemograma;

- 4,0mL em tubo contendo ativador de coágulo para separação do coágulo e obtenção de soro;
- 4,0mL em tubo contendo heparina sódica para obtenção do concentrado de hemácias e plasma heparinizado.

Coletou-se 10mL de urina de cada fêmea, pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom, utilizando-se seringa de 10 mL e agulha 25x7mm. Quanto aos machos, coletou-se 10 mL de urina pela técnica do cateterismo, após a devida antissepsia da região prepucial, utilizando-se sonda uretral de calibre adequado ao porte de cada cão.

As amostras de urina e sangue em EDTA foram processadas no prazo máximo de duas horas após a coleta, sendo todos os exames executados no Laboratório de Patologia Clínica e na estrutura do MULTILAB, ambos na Escola de Veterinária da UFMG. O sangue do tubo contendo heparina sódica foi centrifugado para separação entre o concentrado de hemácias e plasma, a 3000 rpm por 5 min, em centrífuga de bancada (Coleman[®]), de acordo com a descrição do anexo 3. O plasma foi aliqotado em microtubos de 0,5mL e congelado a -80°C. O concentrado de hemácias foi preparado conforme procedimento operacional padrão (anexo 3), aliqotado e congelado da mesma forma que o plasma. Parte do sobrenadante da urina foi aliqotado em microtubos de 0,5mL e congelado a -80°C conforme descrição no item 4.7.4. As amostras do concentrado de hemácias, plasma e urina foram congeladas a -80°C em ultrafreezer a fim de possibilitar a dosagem dos biomarcadores do EO em um mesmo momento, para melhor aproveitamento dos kits.

4.7.1. Hemograma

O sangue foi processado em analisador hematológico automático de impedância - Incounter 3D (Diagno), segundo técnica de rotina do laboratório de Patologia Clínica da Escola de Veterinária da UFMG. Para o eritrograma avaliou-se o número total de eritrócitos (He), hematócrito (Ht) e a hemoglobina (Hb), além do volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e a amplitude de distribuição eritrocitária (RDW). Também avaliaram-se o número total de leucócitos e plaquetas. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos de todas as amostras, fixando-se a lâmina com metanol, por 5 minutos, seguido da coloração com Romanowsky (Panotico-Newprov), para realização de hematoscopia e contagem diferencial de leucócitos, de acordo com o protocolo operacional padrão do laboratório.

4.7.2. Perfil Bioquímico

As amostras de sangue em tubo com ativador de coágulo foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos, em centrífuga de bancada (Coleman[®]), para a obtenção do soro. Para realização das análises bioquímicas do soro foi utilizado o analisador bioquímico Catalyst One (IDEXX[®]) por meio de bioquímica seca (IDEXX Laboratories, 2016). A análise bioquímica de cada amostra de soro foi feita individualmente. Utilizou-se o painel CHEM 17 para os parâmetros bioquímicos séricos e suas frações, sendo eles: glicose (GLU), creatinina sérica (CREA), nitrogênio ureico sanguíneo (BUN), frações nitrogênio ureico/creatinina sanguínea (BUN/CREA), fósforo (PHOS), cálcio total (CA), proteínas totais (TP), albumina (ALB), globulina (GLOB), razão albumina/ globulina (ALB/GLOB), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALKP), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubinas totais (TBIL), colesterol (CHOL), amilase (AMYL) e lipase (LIPA). O *slide* para dosagem da dimetilarginina simétrica sérica (SDMA) foi adicionado ao analisador bioquímico no momento da análise do painel CHEM 17. Para todas as mensurações foram seguidas as instruções do fabricante.

Para a dosagem de ácidos graxos não esterificados (NEFA), ferro total (Fe) e capacidade de fixação de ferro (IBC) foram utilizados kits comerciais (Biotecnica[®]), com leitura em espectrofotômetro semiautomático (Cobas Mira Plus- Roche[®]), seguindo as instruções de uso.

4.7.3. Perfil Urinário

Realizou-se inicialmente o exame físico das amostras, ou seja, volume, cor, odor, turbidez e densidade, esta última por refratometria, utilizando-se refratômetro (Biobrix[®]). Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas em centrífuga de bancada (Coleman[®]), à 3.000rpm durante 10 minutos. Em seguida separou-se o sobrenadante da porção decantada, sendo 1mL deste sobrenadante destinado à análise bioquímica da proteína e creatinina urinárias, em analisador bioquímico (Cobas Mira Plus[®]), utilizando-se kits comerciais (Biotecnica[®]). Outra parte do sobrenadante foi aliquoteado em cinco microtubos de 0,5mL para congelamento em ultrafreezer a -80°C e posterior análise dos biomarcadores do EO. A dosagem de creatinina urinária foi realizada pelo método Jaffé e a da proteína urinária pelo método vermelho de pirogalol. Por meio dos valores da proteína e creatinina urinárias, calculou-se o valor da razão entre eles (RPC).

O sedimento resultante da centrifugação de cada amostra foi homogeneizado e, com o auxílio de micropipeta monocanal (Peguet®) foram pipetados 20µL e transferidos para o centro de uma lâmina de vidro (Invicta®, Brasil), seguidos de sobreposição de cada volume por uma lamínula 24 x 24 mm (Invicta®, Brasil). Em seguida, foi analisado à microscopia óptica, nas objetivas de 20 e 40 vezes, para avaliação da presença e morfologia de possíveis elementos como, cilindros, cristais, células, bactérias e muco.

4.7.4. Perfil do Estresse Oxidativo

Para estabelecer o perfil do estresse oxidativo, foram utilizadas amostras de plasma, urina e concentrado de hemácias, previamente aliqüotadas e congeladas no ultrafreezer -80°C. Realizou-se as dosagens das TBARS (reações ao ácido tiobarbitúrico), TAS (estado antioxidante total), GSH-Px (glutaciona peroxidase) e SOD (superóxido dismutase) nas seguintes amostras:

- TBARS: plasma
- TAS: plasma e urina
- GSH-Px: plasma e urina
- SOD: concentrado de hemácias

Inicialmente foi realizado um estudo piloto no qual comparou-se as dosagens da atividade da GSH-Px e SOD em diferentes amostras biológicas (plasma, soro, concentrado de hemácias e urina). Os resultados apontaram para a possibilidade do uso dos quatro tipos de amostras biológicas (dados não publicados).

Para a determinação das TBARS foi utilizado o kit comercial *Thiobarbituric Acid Reactions*®, segundo as instruções do fabricante (Elabscience® - USA), pelo método colorimétrico em leitor de microplaca (532nm).

Para mensurar o estado antioxidante total (TAS) e as atividades da SOD (RANSOD-Randox®) e da GSH-Px (RANSEL- Randox®) foram utilizados kits comerciais, seguindo as instruções do fabricante (Randox Laboratories Ltd. - Reino Unido), com leitura em espectrofotômetro semi automático (Cobas Mira Plus-Roche).

4.7.5. Delineamento experimental e análise estatística

Para testar as diferenças entre estádios, levando em consideração o tempo, foram ajustados modelos de equações de estimativas generalizadas para cada variável resposta. Estes modelos de regressão são adequados a dados com realização de medidas repetidas no mesmo indivíduo ao longo do tempo, sendo bastante flexíveis quanto à distribuição de probabilidade da variável resposta (Guimarães e Hirakata, 2012). Foi ajustado um modelo separado para cada variável resposta mensurada, sendo que o grupo e o tempo, juntamente com a interação entre essas duas variáveis, foram utilizados como preditores (variáveis independentes).

A ingestão de dieta renal antes do tempo 1 também foi incluída como variável preditora, porém sem interação com nenhuma outra variável. Como o tempo e o estágio de DRC são variáveis categóricas ordinais, ajustou-se um polinômio de 3º grau para cada uma, buscando-se ajustar uma curva suavizada. Esta escolha se deve ao fato que há um desbalanço grande no número de animais em cada estágio, sendo que alguns estágios tinham um número muito pequeno de animais, o que impossibilitaria a análise separadamente para cada estágio. Para todas as variáveis foi utilizada uma estrutura de autocorrelação temporal de simetria composta. Escolheram-se as distribuições de probabilidade mais adequadas para cada variável resposta de interesse. Para as variáveis com distribuições bem-comportadas, utilizou-se a distribuição gaussiana e para variáveis com valores positivos e distribuições assimétricas, utilizou-se a distribuição gama, que é adequada para modelar dados com esta característica.

Após o ajuste do modelo, testaram-se os efeitos dos estágios, do tempo, da interação e da dieta renal de forma global (*overall*) e calculou-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada estágio e para cada tempo. Para verificar a significância da diferença entre estágios para cada tempo, ou da diferença entre tempos para cada estágio, aplicou-se testes de comparações múltiplas (*pairwise*), com a correção de Tukey.

Para testar as diferenças entre os animais do grupo controle e os animais com DRC utilizou-se a mesma metodologia descrita acima, com a diferença que não houve o fator tempo nesta análise e os cães do grupo controle foram incluídos como sendo estágio igual a zero.

Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características dos animais estudados

Dos 11 cães do grupo controle três eram machos e oito fêmeas, com idades variando entre oito meses e sete anos, com média de peso de 14,9Kg (mín. de 2,4Kg e máx. de 32Kg). Seis deles não tinham raça definida e os outros cinco eram: um labrador retriever, um maltês, um whippet e dois Yorkshire terrier.

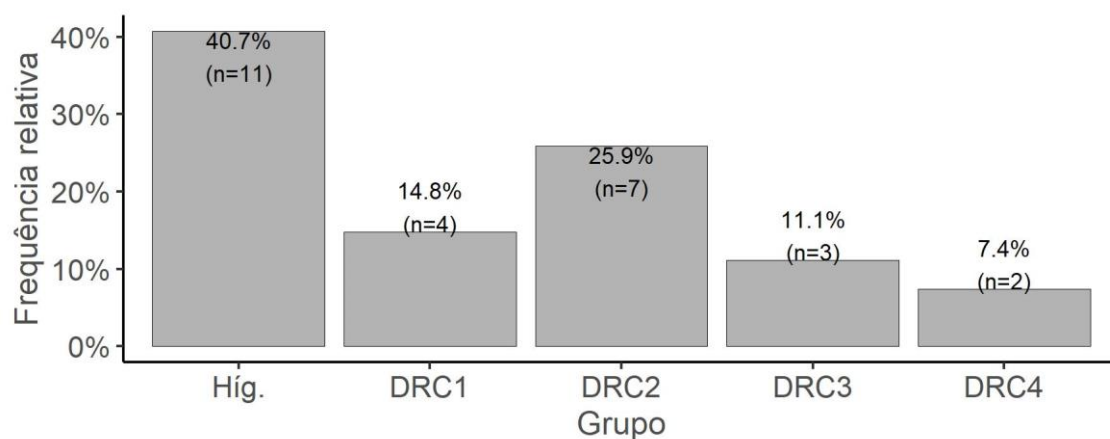
Dos 18 animais do GDRC, 13 eram machos e cinco fêmeas, com idades variando entre quatro e treze anos e média de peso de 12,8Kg (mín. de 3,9Kg e máx. de 33,5kg). Seis deles não tinham raça definida e os outros eram um border collie, um bulldog inglês, dois golden retriever, um pastor alemão, um pequinês, dois poodles, dois Yorkshire terrier e dois shih tzu.

Dois animais do GDRC (border collie e pastor alemão) foram excluídos por se apresentarem descompensados no tempo 1. O primeiro devido à leishmaniose visceral canina e o segundo, anteriormente estadiado em DRC 4, por apresentar descompensação da própria DRC, vindo a óbito rapidamente. Desta forma, o GDRC passou a ser composto por 16 animais.

5.2. Aspectos clínicos dos cães portadores de DRC

Dos cães do GDRC, 4/16 (25%) estavam em estágio 1, 7/16 (43,75%) estágio 2, 3/16 (18,75%) estágio 3 e 2/16 (12,5%) em estágio 4 (Fig 5).

Figura 5: Frequência relativa dos grupos de cães controle (Híg.) e de cães doentes renais crônicos (DRC) por estágio (1 a 4).



Levando em consideração o caráter insidioso da DRC é de se esperar que o diagnóstico desta afecção no estágio 1 seja menos frequente, pois o paciente não se encontra azotêmico e por isso, não apresenta sinais clínicos evidentes. Já no estágio 2, uma azotemia discreta está presente, o que pode provocar sinais clínicos leves, muitas vezes inespecíficos e já podem ser observadas alterações em exames laboratoriais, facilitando o diagnóstico e explicando a maior incidência de cães neste estágio. Já nos estágios 3 e 4 a DRC apresenta-se mais grave, com maiores chances de complicações e, com isso, menor expectativa de vida, especialmente no estágio 4. Isto explica a dificuldade em se ter um maior número de cães portadores de DRC em estágio avançado participando de pesquisas, especialmente naquelas de maior duração, devido a possibilidade de óbito durante o estudo, fato inclusive ocorrido, durante este estudo, com dois pacientes, um estágio 3 que evoluiu para estágio 4 e outro estágio 4.

Dos 16 animais portadores de DRC, 11/16 (68,75%) eram DRC1 e DRC2 e 5/16 (31,25%) eram DRC3 e DRC4. Destes mesmos cães, 10/16 (62,5%) tinham entre 7 anos e 13 anos, reforçando a maior ocorrência de DRC em animais idosos (Chew et al., 2011; Bartges, 2012; Polzin, 2013). Dez (62,5%) eram proteinúricos e cinco (31,25%) eram hipertensos, estando a incidência de HAS de acordo com Quimby, 2016. A frequência de proteinúria foi maior que a de HAS. Como as aferições de PAS foram realizadas em todos os tempos do estudo, acredita-se que o estresse possa ter sido amenizado ao longo das aferições e os pacientes possam ter sido diagnosticados com maior precisão quanto à HAS (Acierno et al., 2018). A proteinúria esteve presente em todos os estágios da DRC e a hipertensão apenas do estágio 2 em diante. Dois dos quatro cães DRC1 eram proteinúricos, demonstrando que, neste estágio, já ocorre a hipertensão glomerular, que contribui para o quadro inflamatório renal ocasionado também pela proteinúria e, se há inflamação, há estresse oxidativo.

Houve predomínio do ECC 5 e 6 (escala de 1 a 9) e do IMM 2 (escala de 0 a 3). A mudança do peso corporal de alguns pacientes não refletiu em mudança no ECC ou no IMM, como pôde ser verificado nos cães de nº 5, nº 9 e nº 15 (Fig.6). O animal de nº 9 era um golden retriever que, apesar de ter aceitado bem a dieta renal e ter ganhado peso, ainda não tinha sido suficiente para aumentar o seu ECC e IMM, pois era um cão idoso e que se encontrava muito magro quando do início do estudo. O contrário aconteceu com o cão de nº 13, o qual, antes de iniciar a dieta renal, fazia uso de dieta para obesidade e, ao ser substituída, refletiu em ganho considerável de peso com mudança no ECC, mas não do IMM. A aferição destes dois parâmetros no paciente DRC é importante e o escore corporal desejado é aquele igual a 5 ou

próximo disto (Bartges, 2012; Polzin, 2013). Perdas tanto no ECC quanto no IMM são condizentes com menor taxa de sobrevivência em cães com DRC (Rudinsky et al., 2018) e por isso requerem reavaliação do paciente, não só quanto ao aspecto nutricional, como também em relação a complicações como desidratação, acidose metabólica, anemia, infecções do trato urinário e outros tipos de infecções (Bartges, 2012; Polzin, 2013). De uma forma geral, os cães deste estudo apresentaram predomínio do ECC 5 e 6 e de IMM 2 (fig.6), condizente com o fato de que a maior parte dos pacientes eram estágio 2 da DRC, estágio no qual não se observam grandes perdas de condição corporal nem de massa muscular (Rudinsky et al., 2018).

Figura 6: Relação dos animais do GDRC e classificação quanto à idade, sexo, estágio da DRC, presença de proteinúria (Prot.), hipertensão arterial sistólica (Hipert.) e peso corporal, escore de condição corporal e índice de massa muscular de acordo com os 5 tempos (T1 ao T5).

Animal	Classificação		Peso corporal					Escore de condição corporal					Índice de massa muscular							
	Anos	Sexo	Estádio	Prot.	Hipert.	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5	T1	T2	T3	T4	T5
Cão 1	6	M	4	S	S	19,9	19,9	óbito			4	4	óbito			2	2	óbito		
Cão 2	4	F	4	S	N	33,3	33,5	33,3	33,5	32,2	6	6	6	6	5	3	3	3	3	2
Cão 3	9	M	3	S	S	33,0	30,8	29,5	25,8	óbito	8	8	7	6	óbito	3	3	2	2	óbito
Cão 4	7	M	3	S	S	8,7	8,4	8,2	7,5	7,1	7	7	6	6	6	2	2	2	2	2
Cão 5	9	M	3	S	N	3,9	3,9	4,2	4,5	4,5	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
Cão 6	5	M	2	N	N	6,2	6,5	6,3	6,5	6,5	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2
Cão 7	5	F	2	S	N	13	13,1	13,7	14,1	nd	6	6	6	6	nd	3	3	3	3	nd
Cão 8	5	M	2	N	N	9,7	9,8	10	10,7	nd	5	5	6	6	nd	3	3	3	3	3
Cão 9	10	M	2	S	N	24,6	26,8	27,8	27,1	nd	3	3	3	3	nd	1	1	1	1	1
Cão 10	12	M	2	N	S	10,1	10,3	10,5	10,4	10,4	6	6	6	6	6	2	2	2	2	2
Cão 11	8	M	2	S	S	7,6	7,3	óbito			5	5	óbito			2	2	óbito		
Cão 12	13	M	2	N	N	5,2	5,7	5,7	nd	nd	5	6	6	nd	nd	2	2	2	nd	nd
Cão 13	10	M	1	S	N	18,5	19,3	19,9	21,5	21,3	6	7	7	8	8	2	2	2	2	2
Cão 14	7	M	1	S	N	7,5	6,9	7,1	6,9	7,1	6	5	5	5	5	2	2	2	2	2
Cão 15	9	F	1	N	N	4,5	4,4	4,2	4,0	4,1	5	5	5	5	5	2	2	2	2	2
Cão 16	4	F	1	N	N	5,1	5,2	5,2	5,2	5,3	4	4	4	4	4	2	2	2	2	2

M= macho, F= fêmea, N= não, S= sim, nd= não disponível. Cães em vermelho são aqueles que já comiam dieta renal antes do tempo 1 e os cães em verde são os que iniciaram a dieta renal no tempo 1.

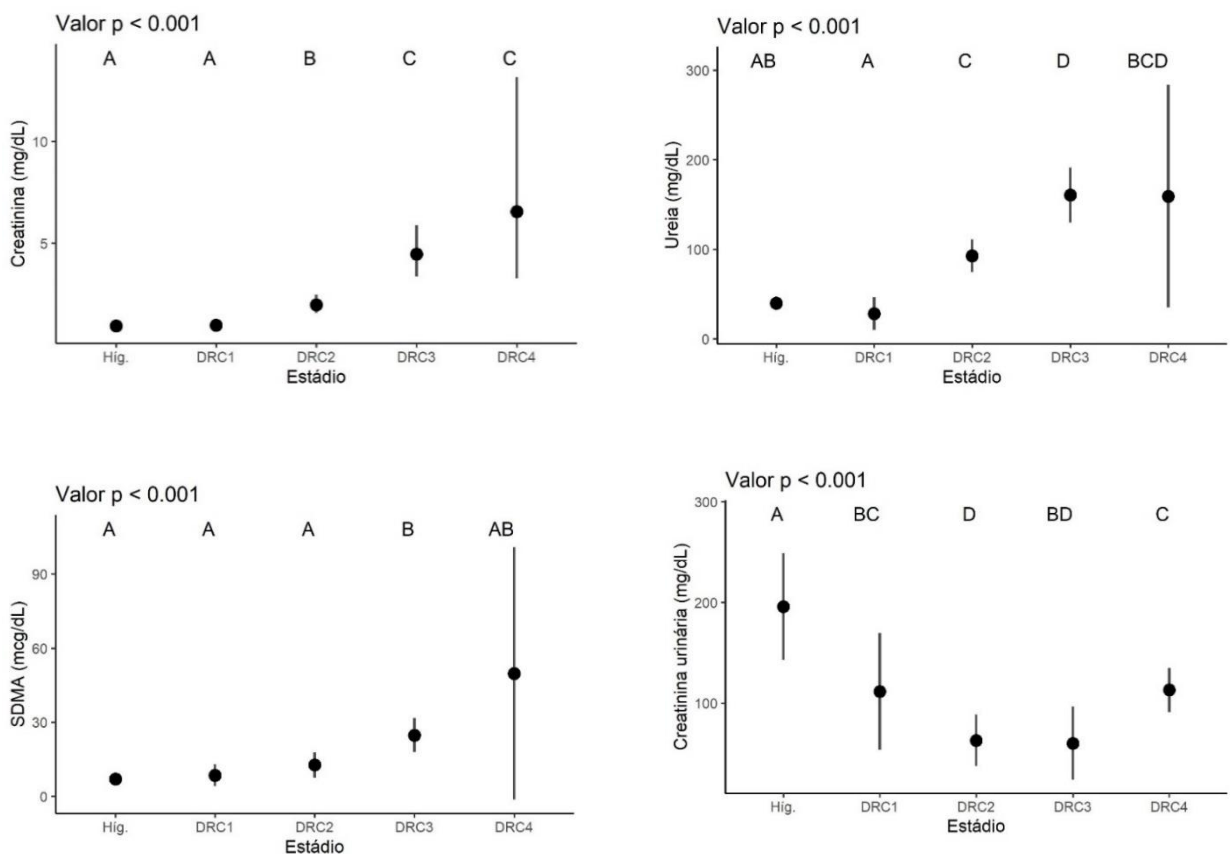
Considerando o estado de hígidez dos cães do grupo controle, nenhum deles apresentou proteinúria, hipertensão ou escore de condição corporal e índice de massa muscular fora do padrão de normalidade.

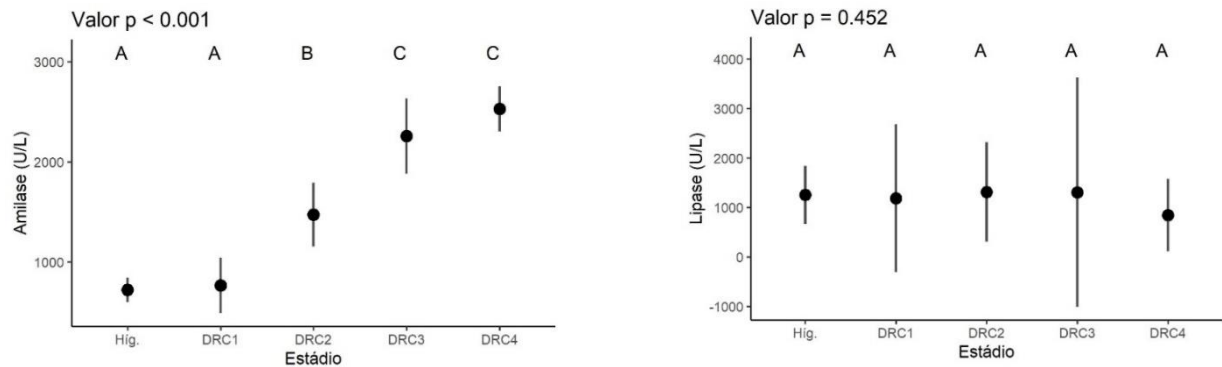
5.3. Parâmetros bioquímicos dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos do estudo

5.3.1. Creatinina, Ureia, SDMA, Amilase e Lipase séricas e Creatinina urinária

Na comparação das médias estimadas destas variáveis entre si e em relação aos estádios da DRC, observou-se que a creatinina, ureia, SDMA e amilase tiveram um comportamento semelhante (fig.7), ou seja, quanto maior o estágio da DRC, maior a concentração sérica destas variáveis. Este fato ocorre em função do maior comprometimento da excreção renal à medida em que a doença avança (Brown et al., 1997; Chew et al., 2011; Bartges, 2012; Quimby, 2016). Dentre essas quatro variáveis, a ureia foi a que demonstrou maior variação, possivelmente em função da maior interferência de fatores extra renais associados ao seu aumento, tais como catabolismo e aproveitamento proteico, bem como equilíbrio hídrico.

Figura 7: Média estimada das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), ureia (mg/dL), SDMA (mcg/dL), creatinina urinária (mg/dL), amilase (U/L) e lipase (U/L) nos grupos de cães controle (híg) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.





Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Percebe-se um comportamento muito semelhante das variáveis entre os cães controle e os cães DRC1, demonstrando o caráter insidioso da DRC. Especialmente em relação à concentração sérica da creatinina e da SDMA, nota-se um aumento discreto no grupo DRC2, não havendo diferença significativa entre os valores da SDMA quando comparada com os grupos de cães controle, DRC1 e DRC2. Assim, apesar da boa correlação da SDMA com a taxa de filtração glomerular em cães com doença renal progressiva, segundo afirmado por Nability et al. (2015), no presente estudo, não houve elevação da sua concentração nos estádios iniciais da DRC. Este achado está de acordo com o estudo de Silva et al. (2021) no qual observou-se que os valores séricos de SDMA não apresentaram aumento perceptível antes do aumento da creatinina sérica. Também no estudo de Pelander et al. (2019) foi concluído que a SDMA e a creatinina apresentaram um valor diagnóstico semelhante na detecção da diminuição da TFG.

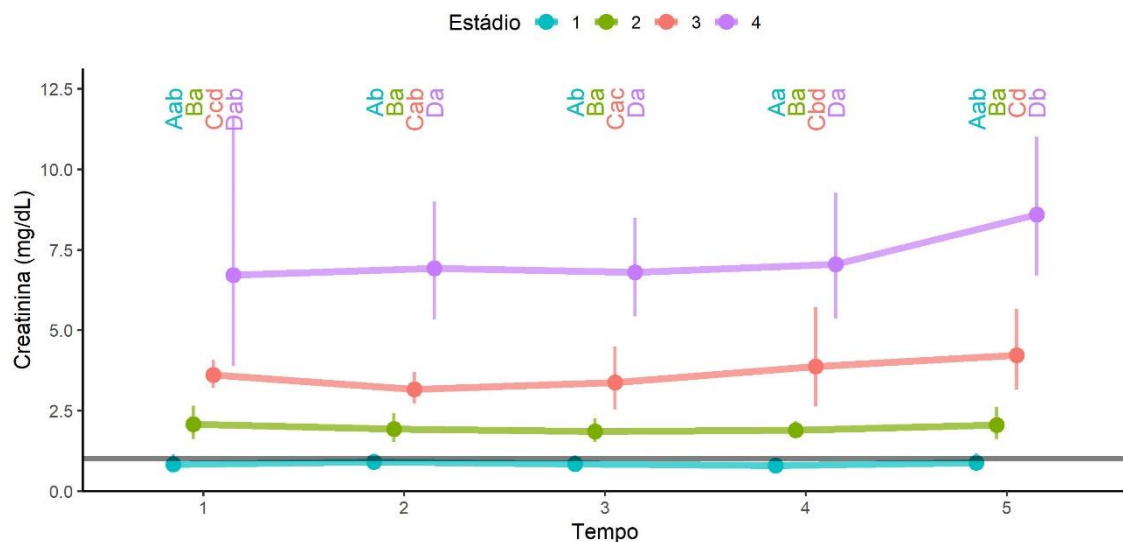
Já em relação ao comportamento da amilase, nota-se que ela acompanhou, mais fielmente, o aumento da creatinina, sendo diferente estatisticamente entre os DRC1, DRC2 e DRC3. Isto faz com que a amilase possa ser utilizada também como um biomarcador da capacidade de excreção renal, não só devido à similaridade com a cinética da creatinina, como também por ser uma análise de baixo custo.

A comparação entre as atividades séricas da amilase e da lipase nos diferentes grupos evidencia que o aumento da atividade da amilase não ocorreu em função de uma possível pancreatite, pois, se assim fosse, seria esperado que a lipase apresentasse uma cinética semelhante à da amilase ou até maior, uma vez a sensibilidade da lipase é maior que a da amilase para sinalizar pancreatite aguda (Mansfield e Jones, 2000; Rosa, 2019). Semelhante achado foi observado no estudo de Buchman et al. (1993) no qual houve correlação

estatisticamente significativa entre amilase e TFG e ausência de correlação com a lipase. Este dado reforça a ideia da atividade da amilase sérica como biomarcador de excreção renal, merecendo ser mais estudada nos pacientes com nefropatias. Em relação à creatinina urinária, notou-se um comportamento inverso ao da creatinina, SDMA e amilase séricas, condizente com a TFG do grupo correspondente, ou seja, aqueles com menor TFG apresentaram uma menor excreção urinária de creatinina.

Comparando-se a creatinina sérica em relação aos tempos avaliados (fig. 8), nota-se um aumento ao longo do tempo, mais evidente nos animais do grupo DRC4, sugerindo o caráter rapidamente progressivo desta doença no estágio mais avançado. Esta diferença possivelmente seria ainda maior caso houvesse um maior número de cães neste estágio. Apesar do grupo de cães controle não ter sido acompanhado ao longo dos tempos deste estudo, traçou-se uma reta no gráfico, utilizada como ponto de referência da média estimada da creatinina sérica destes animais no tempo 1, quando foram avaliados.

Figura 8: Comportamento da média estimada da concentração da creatinina sérica (mg/dL) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da creatinina sérica (mg/dL) dos cães do grupo controle no tempo 1.

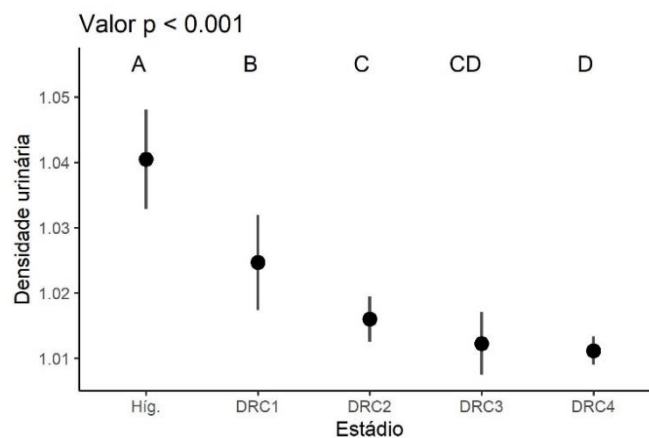


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

5.3.2. Densidade urinária

Foi significativa a diferença da densidade urinária entre os cães controle e os cães DRC de todos os estádios (fig.9) sendo os valores de suas médias estimadas iguais a 1,041 para o GC, 1,024 para o DRC1, 1,017 para o DRC2, 1,010 para o DRC3 e 1,013 para o DRC4.

Figura 9: Média estimada da densidade urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

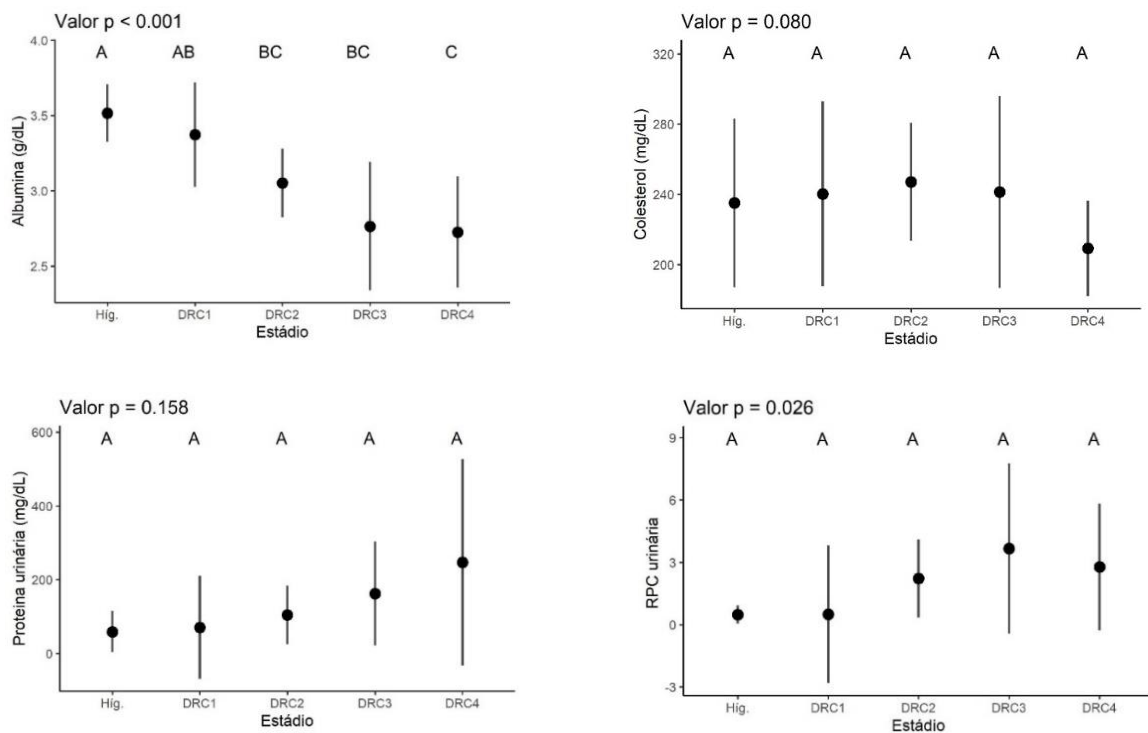
Comparando com o gráfico da creatinina, amilase e SDMA séricas (fig.7), nos quais não houve diferença entre os cães controle e os cães DRC1, nota-se que a redução da densidade urinária é precoce para o diagnóstico da DRC (IRIS, 2019). Porém é importante que se tenha o cuidado na análise deste parâmetro, que deve ser avaliado em amostras seriadas do paciente, com o animal hidratado e sem uso de diuréticos, corticóides ou qualquer outra medicação que possa alterar a densidade urinária. Além disso, as coletas devem ser realizadas, preferencialmente, no mesmo momento do dia.

Também houve diferença da densidade urinária em relação aos estádios da DRC, uma vez que é esperada uma maior perda da capacidade de concentração urinária proporcional à medida que a DRC avança, fazendo inclusive com que os sinais de poliúria e polidipsia compensatória, se intensifiquem (Bartges, 2011; Polzin, 2013).

5.3.3. Albumina e colesterol séricos, proteína urinária e razão proteína creatinina urinárias (RPC)

Os cães do grupo controle apresentaram a maior média estimada de concentração de albumina (3,51mg/dL) seguidos pelos cães com DRC estádios 1, 2, 3 e 4 com os valores de, respectivamente, 3,50mg/dL, 3,09mg/dL, 2,89mg/dL, 2,86mg/dL. Houve semelhança nas concentrações de albumina entre o grupo de cães controle e DRC1, porém, em relação aos demais grupos, a diferença foi significativa (fig.10).

Figura 10: Média estimada das concentrações de albumina e colesterol séricos, proteína urinária e razão proteína creatinina urinárias (RPC) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

É esperado que, cães proteinúricos, dependendo da magnitude e da persistência da proteinúria renal, apresentem uma menor concentração de albumina sérica, podendo tornarem-se hipoalbuminêmicos (Klosterman e Pressler, 2011). A proteinúria renal no paciente com DRC ocorre como consequência da hipertensão glomerular, que está diretamente relacionada ao grau de comprometimento de néfrons (Brenner et al., 1982). Assim, espera-se que animais em

estádios avançados da DRC apresentem maior hipertensão glomerular e, por isso, maior chance de apresentar proteinúria. Tal fato pôde ser percebido nos cães deste estudo pela RPC, sendo que 2/4 cães DRC1 (50%), 3/7 cães DRC2 (42,9%), 3/3 cães DRC3 (100%) e 2/2 cães DRC4 (100%) apresentaram proteinúria (fig.6). Importante considerar ainda que a proteinúria por si só é considerada fator de progressão da DRC, uma vez que desencadeia todo um processo inflamatório glomerular e tubular provocando com isto uma piora da excreção renal (Vaden e Elliott, 2016). Observou-se que o padrão de concentração da albumina sérica nos grupos de cães foi coerente com a frequência de ocorrência de proteinúria nos mesmos. Deve-se levar em consideração também que, pacientes portadores de DRC em estádios mais avançados podem apresentar-se subnutridos em função da hiporexia, podendo este fato contribuir ainda mais para a hipoalbuminemia (Polzin, 2013, Quimby, 2016). Mesmo considerando esta possibilidade, este não foi o caso dos cães com DRC estágio 3 e 4 deste estudo, uma vez que o escore da condição corporal dos mesmos variou entre 6 e 8 e entre 4 e 6, respectivamente.

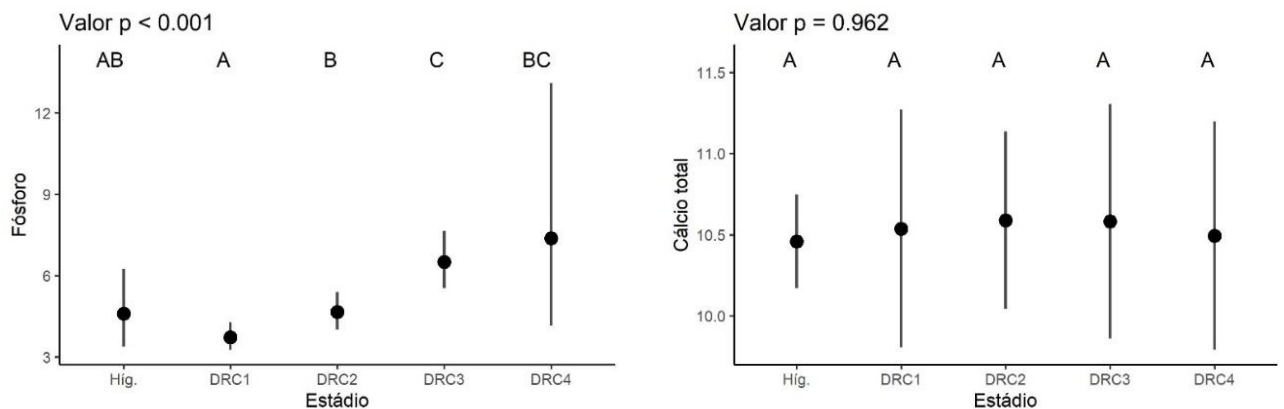
Dependendo da magnitude da hipoalbuminemia, há indução de um aumento na síntese hepática de lipoproteínas e de colesterol, na tentativa de compensar a diminuição da pressão oncótica e da viscosidade do plasma (Klosterman e Pressler, 2011; Maniaki e Finch, 2018). Apesar das médias da concentração sérica da albumina apresentarem-se mais baixas à medida em que se avançou no estágio da DRC, não foram observados valores que caracterizassem hipoalbuminemia, nem hipercolesterolemia entre os grupos. Desta forma, as médias das concentrações séricas do colesterol não variaram de forma significativa entre os grupos, estando de acordo com os resultados da proteína urinária e RPC que também não variaram significativamente (fig.10). É provável que houvesse diferença significativa no comportamento destas variáveis, caso existisse um maior número de animais no grupo DRC3 e DRC4, que são os estádios nos quais espera-se maior ocorrência de proteinúria conforme observado por Rudinsky et al. (2018).

5.3.4. Fósforo e cálcio total séricos

As médias estimadas da concentração sérica do fósforo no tempo 1 foram 4,48mg/dL para os cães controle, 3,94mg/dL para os cães DRC1, 4,31mg/dL para os cães DRC2, 7,32mg/dL para os cães DRC3 e 6,40mg/dL para os cães DRC4. Apesar da média do grupo de cães controle ainda estar dentro do intervalo de referência de 2,6-6,2mg/dL (Kaneko 2008), notou-se que o

fósforo dos cães controle esteve ligeiramente acima ao dos cães DRC1 (fig.11). Isto provavelmente se deve ao fato de que dois dos onze cães controle se alimentavam de dieta própria para filhotes, a qual possui maior teor proteico, o que pode ter aumentado a média estimada do fósforo no grupo controle.

Figura 11: Média estimada das concentrações séricas de fósforo (mg/dL) e cálcio total (mg/dL) nos grupos de cães controle (Híg) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Ao se comparar o comportamento do fósforo entre os cães com DRC, notou-se diferença na sua concentração entre os diferentes estádios da doença (fig.11) e tal diferença se manteve ao longo de todos os tempos do estudo. Este resultado condiz com o fato de que há um déficit na excreção renal do fósforo nestes pacientes, o qual tende a ser mais evidente naqueles do estágio 3 em diante, quando já se observam maiores alterações nos parâmetros de excreção renal (Rudinsky et al., 2018). O controle adequado da concentração sérica de fósforo nos estádios mais avançados da DRC é difícil de alcançar apenas por meio da dieta específica, sendo necessário, muitas vezes, instituir quelantes de fósforo, por via oral, no momento das refeições (Polzin, 2013). O objetivo terapêutico proposto pela IRIS (2019b) é o de que a concentração sérica do fósforo para cada estágio da DRC seja <4,6mg/dL para o DRC1 e DRC2, <5,0mg/dL para o DRC3 e <6,0mg/dL para o DRC4.

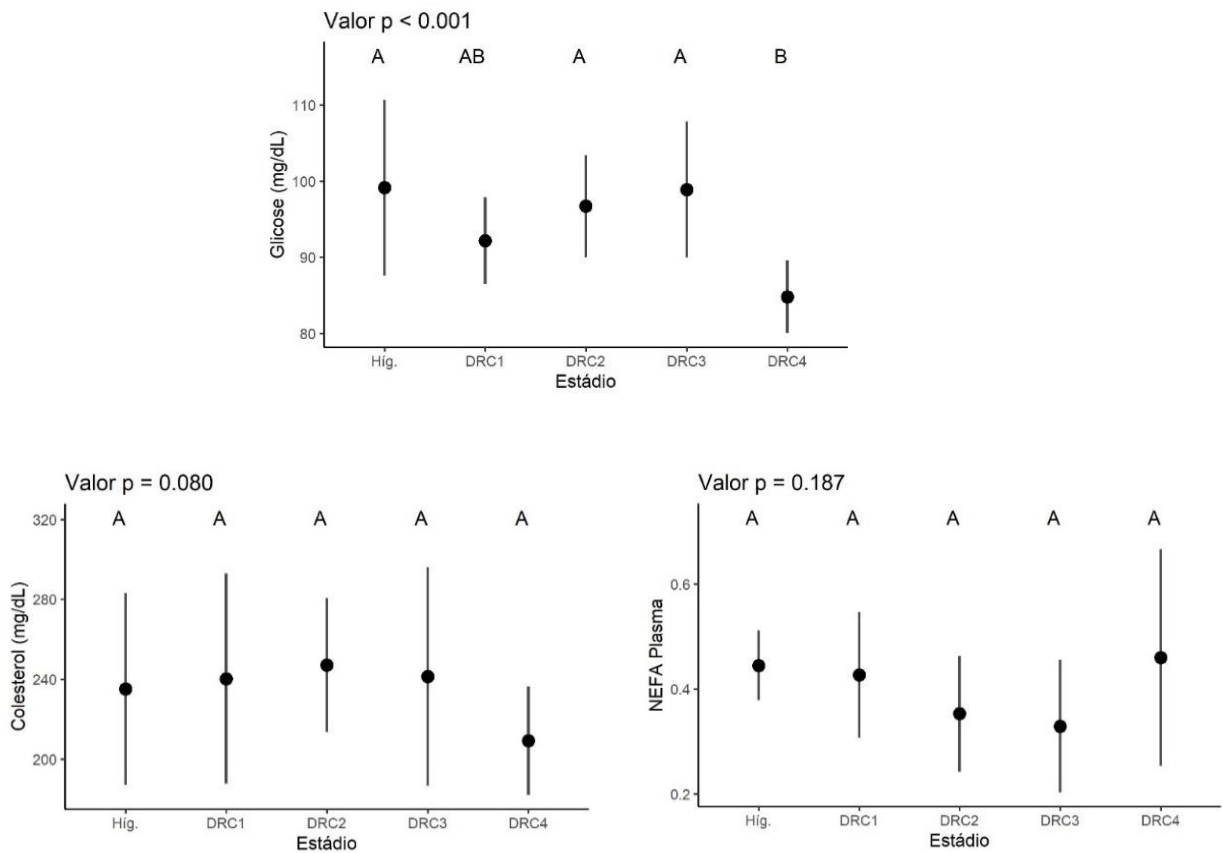
Como reflexo da hiperfosfatemia é esperado que haja, como resposta inicial, uma hipocalcemia em decorrência da formação de complexos séricos entre o fósforo e o cálcio,

como reflexo da lei de equação das massas. A hipocalcemia pode ocorrer também, dependendo do estágio da DRC, devido à menor produção de calcitriol pelas células tubulares renais que estão comprometidas, levando a menor absorção intestinal do cálcio. A persistência da hipocalcemia promove o estímulo para a produção do paratormônio (PTH), cuja função principal é manter as concentrações séricas de cálcio nos valores fisiológicos. Porém, com a absorção intestinal do cálcio comprometida na DRC, o estímulo para a secreção do PTH continua acontecendo, instalando-se assim o hiperparatireoidismo secundário renal (Giovaninni, 2015). É quando então ocorre a hipercalcemia por excesso de produção do PTH, podendo culminar com a reabsorção óssea e osteodistrofia fibrosa. Assim, dependendo do momento em que se encontra o paciente portador de DRC, a concentração sérica de cálcio pode estar normal, diminuída ou aumentada. Nos cães deste estudo, não foram observadas alterações significativas nas concentrações séricas de cálcio total, não havendo diferença entre o grupo controle e os cães com DRC (fig.11). Porém, deve-se levar em consideração que, a melhor forma para se detectar alterações na concentração sérica do cálcio é por meio da mensuração do cálcio iônico (Giovaninni, 2015), que não foi possível de ser realizada neste estudo. Optou-se por não determinar a concentração sérica de cálcio iônico por meio de equação de ajuste utilizando-se a albumina, pelo fato de que, no estudo de Schenck e Chew (2005), este método não se mostrou eficaz para prever a concentração sérica do cálcio iônico em cães. No estudo de Kogika et al. (2006), no qual foram avaliados 25 cães portadores de DRC, 56% dos cães apresentaram hipocalcemia iônica que foi atribuída à hiperfosfatemia. Segundo Langston (2016), distúrbios do metabolismo do cálcio e fósforo estão entre os distúrbios metabólicos mais comuns no paciente com DRC.

5.3.5. Glicose, colesterol e ácidos graxos não esterificados (NEFA)

Dentre as variáveis relacionadas ao balanço energético, a glicose apresentou diferença entre o GC e GDRC, porém, apenas no estágio 4 da DRC, com valores mais baixos na sua concentração sérica (fig.12). É provável que este achado seja devido a cães em estágio 4 apresentarem, frequentemente, um apetite instável, com momentos de hiporexia ou anorexia devido a uremia acompanhada de náusea. Além disso, a anemia, comum no estágio 4, também contribui para diminuições no apetite (Polzin, 2013). Assim, é esperado que a glicemia esteja mais baixa nos cães DRC4 quando comparada com a dos cães dos outros estádios.

Figura 12: Média estimada das concentrações séricas de glicose (mg/dL) e colesterol (mg/dL) e plasmática de NEFA (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Uma vez exaurida a reserva de glicose, há uma intensificação do metabolismo lipídico com formação de corpos cetônicos, entre eles os ácidos graxos não esterificados (NEFA) e o beta-hidroxibutirato (BHB) que são utilizados como fonte de energia para o organismo (Palomba e Okada, 2010). A intensificação do metabolismo lipídico leva a uma diminuição nas reservas lipídicas e aumento nas concentrações séricas dos corpos cetônicos. Neste estudo, no entanto, não houve diferença nas concentrações séricas de colesterol e de NEFA quando se comparou cães do GC com os do GDRC (fig.12) sugerindo que não ocorreu um déficit energético suficiente, nos cães com DRC, para acionar este mecanismo de obtenção de energia. Este mecanismo é mais comumente percebido em cães que se encontram em déficit energético por um tempo maior, como é o caso de cães criticamente enfermos (Rosa et al., 2021a), entre eles os doentes renais crônicos descompensados. Assim, os resultados das concentrações séricas

de glicose, colesterol e NEFA estão condizentes com o esperado para os cães do GDRC cujo pré-requisito para a participação neste estudo era o de que estivessem clinicamente estáveis.

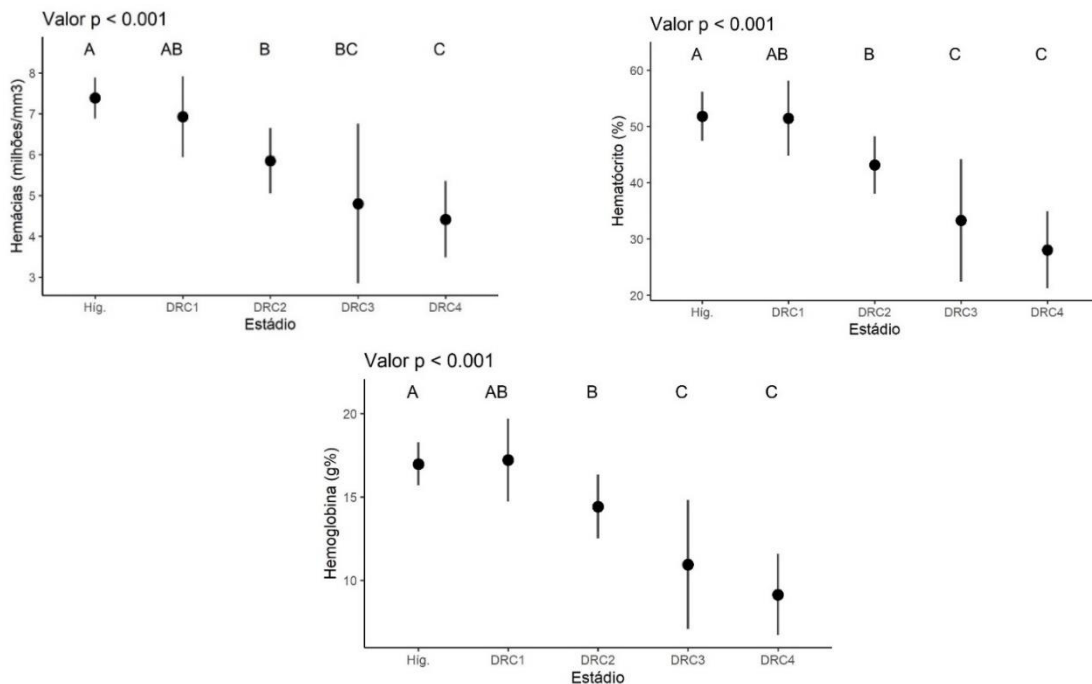
Apesar de não ter havido diferença estatística entre os grupos no gráfico do colesterol e do NEFA é interessante perceber que, no grupo DRC4, no qual houve uma diminuição significativa da glicemia, percebeu-se uma diminuição do colesterol sérico e aumento do NEFA em comparação às concentrações médias dos demais grupos.

5.4. Parâmetros hematológicos e concentração plasmática do ferro e IBC dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos.

5.4.1. Hemácias, hematócrito, hemoglobina

Observou-se diferença ($p < 0,001$) das médias estimadas da contagem de hemácias (milhões/mm³), hematócrito (%) e hemoglobina (g%) entre os cães do GC e do GDRC no tempo 1. Estes resultados foram diferentes não só entre estes dois grupos como também entre os estádios da DRC (fig.13), o que condiz com o fato de que, estes cães, especialmente aqueles nos estádios mais avançados, apresentam anemia.

Figura 13: Média estimada da contagem de hemácias (milhões/mm³), e dos valores do hematócrito (%) e hemoglobina (g%) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

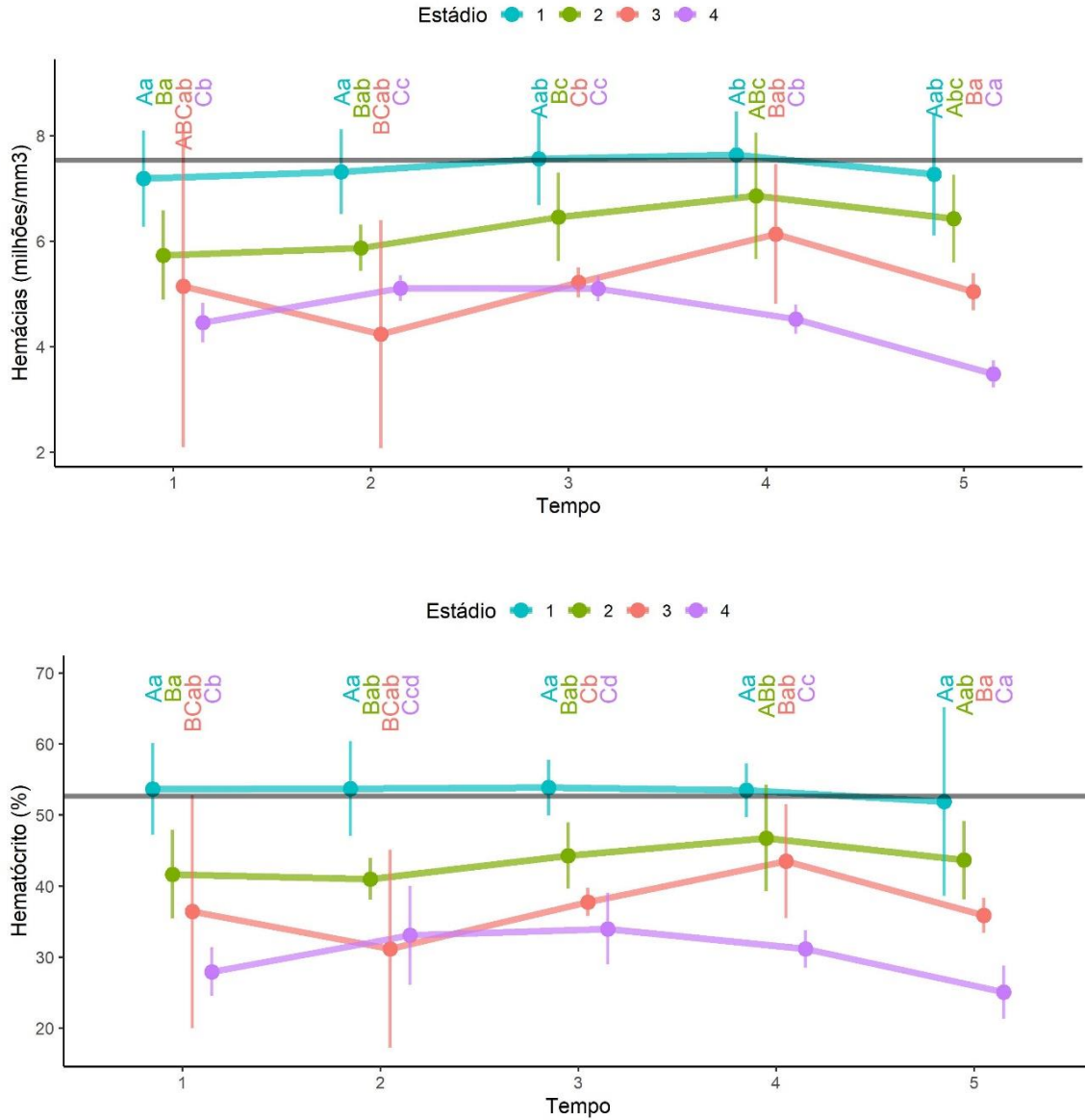


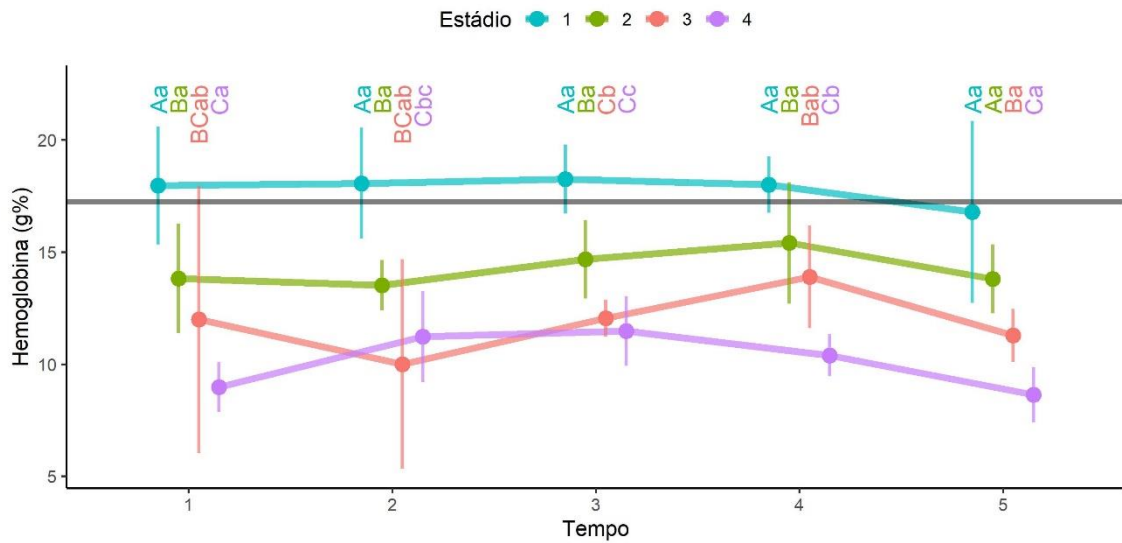
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

A anemia da DRC é multifatorial, podendo-se citar: o EO e o estado inflamatório gerando apoptoses dos eritrócitos, toxinas urêmicas ocasionando a redução da meia vida dessas células, o déficit nutricional em função da hiporexia/anorexia, a resistência à eritropoetina, a produção insuficiente de eritropoetina e a perda de sangue por micro hemorragias devido a vasculite e gastroenterite urêmica (Brown, 2008; Bartges, 2012; Polzin, 2013; IRIS, 2019b). Acredita-se que a anemia esteja associada à gravidade da progressão da DRC devido ao decréscimo do fluxo sanguíneo comprometendo a oxigenação renal e aumentando o estresse oxidativo (EO) e a indução de fibrose (Bartges, 2012).

Os três parâmetros representados nos gráficos da fig.13 apresentaram, além da diferença entre os grupos (GC e GDRC), um decréscimo proporcional ao aumento do estágio da DRC. Observou-se também que, assim como no tempo 1, continuou existindo diferença nos valores das hemácias, hematócrito e hemoglobina entre os estádios ($p < 0,001$) nos demais tempos do estudo (fig.14).

Figura 14: Comportamento da média estimada da contagem de hemácias (milhões/mm³) e dos valores do hematócrito (%) e hemoglobina (g%) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.





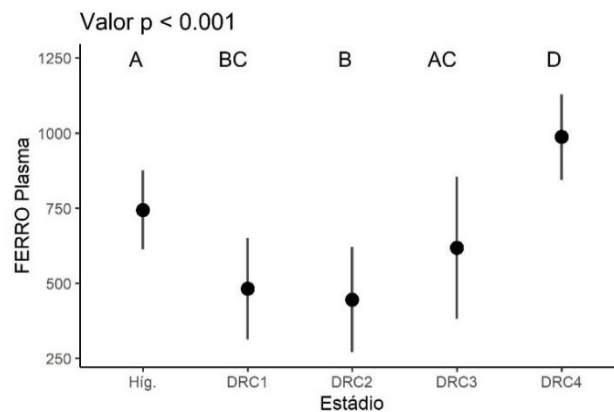
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estádio.

Este achado sugere que há perda de massa eritrocitária durante o curso da DRC, já a partir do estágio 2, mesmo que o paciente ainda não apresente anemia no hemograma e aponta para a necessidade de preocupação com a vida média dos eritrócitos já nos estádios iniciais. Considerando que o EO também age sobre a viabilidade dos eritrócitos, espera-se que o uso de antioxidantes contribua neste aspecto desde os estádios iniciais da DRC. Estudos direcionados à maior compreensão dos diversos fatores causadores da anemia na DRC devem ser estimulados, com o intuito de descobrir formas de desacelerar a perda de massa eritrocitária, objetivando melhor oxigenação do parênquima renal, menor EO e menor progressão da DRC.

5.4.2. Ferro e IBC

Os valores da concentração plasmática média do ferro no tempo 1 mostraram diferença ($p=0,001$) entre o GC e o GDRC (fig.15). Porém observou-se um comportamento diferente do esperado em relação ao grupo DRC4, cuja concentração de ferro foi maior do que a de todos os outros grupos (fig.15).

Figura 15: Média estimada da concentração plasmática de ferro ($\mu\text{mol/L}$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

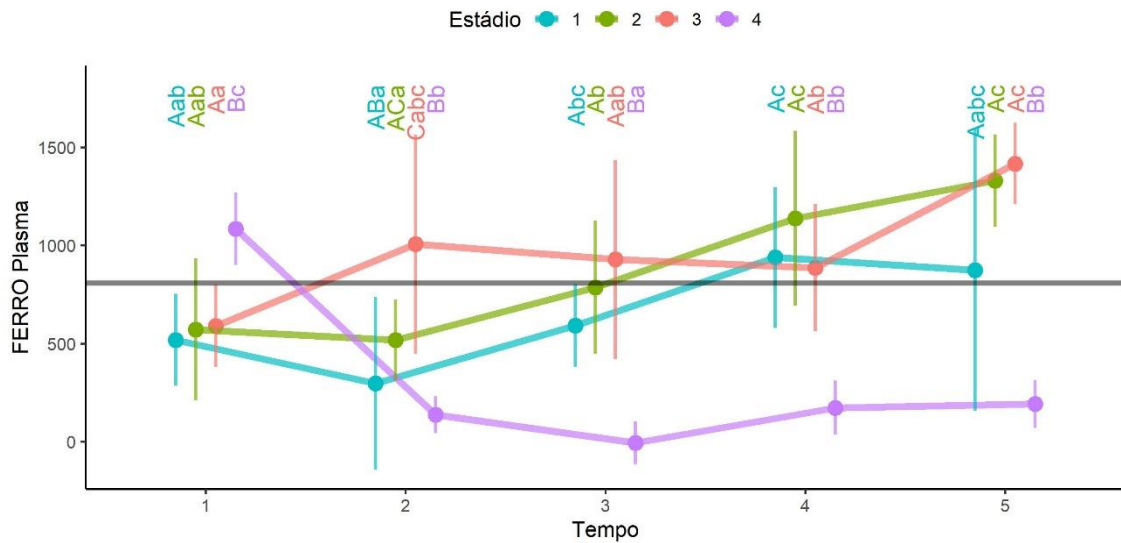


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Foi descartada a possibilidade de interferência pré-analítica nas concentrações séricas do ferro em função do ciclo circadiano (Pires et al, 2011) uma vez que todas as amostras, de todos os cães, foram coletadas pela manhã. Esta concentração maior do que a esperada foi referente a um dos dois cães que compunham o estádio DRC4, uma vez que o outro cão não teve a dosagem do ferro realizada no tempo 1 devido a amostra insuficiente. Não foi possível determinar a causa da hiperferremia deste paciente pois ele estava sob uma dieta controlada (dieta renal) e não havia relato de suplementação à base de ferro. Desta maneira, a concentração plasmática de ferro deste paciente originou um gráfico, no tempo 1, diferente do que seria o esperado para o DRC4. Comparando os demais estádios DRC1, DRC2 e DRC3 com a média da concentração plasmática de ferro dos cães controle, observou-se que houve diferença e que as concentrações, nestes estádios, foram mais baixas do que a dos cães controle (fig.15).

Já no tempo 2, quando o paciente até então hiperferrêmico foi atendido, havia queixa de hematúria profusa há 3 dias, confirmada pelo exame de urina rotina, o que explicou uma concentração plasmática de ferro consideravelmente mais baixa no grupo DRC4 (fig.16), neste tempo, devido a perda de ferro deste paciente, pela hematúria. O paciente em questão, veio a óbito antes de chegar ao tempo 3. A partir de então, o DRC4 foi representado por um único cão que permaneceu clinicamente estável durante todos os tempos do estudo.

Figura 16: Comportamento da média estimada das concentrações plasmáticas de ferro ($\mu\text{mol/L}$) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.

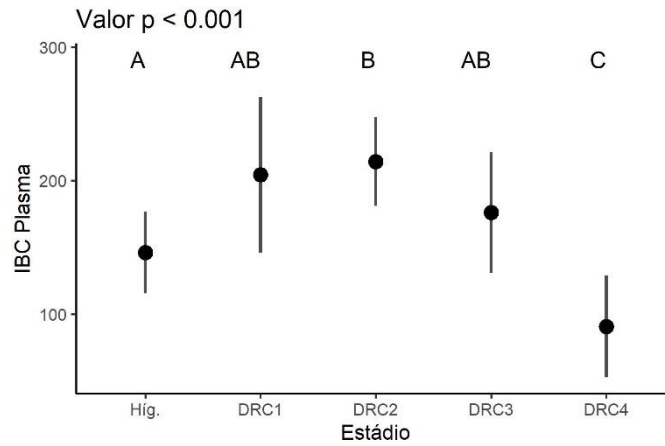


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estádio.

Na análise dos diferentes estádios da DRC ao longo dos tempos do estudo, observou-se que, a partir do tempo 2, as concentrações plasmáticas do ferro mostraram-se mais baixas no DRC4 comparados aos demais estádios (fig.16). No processo inflamatório da DRC a interleucina 6 tem uma atuação importante (Gupta et al., 2012; Raj et al., 2020) e, entre as suas várias ações no organismo, há o estímulo para a produção de hepcidina no fígado. A hepcidina atua sobre a ferroportina presente na membrana do enterócito, inibindo a absorção do ferro para a corrente sanguínea e, com isso, contribui para a deficiência de ferro nos pacientes sob efeito do processo inflamatório crônico (Lemos et al., 2010; Fuqua et al., 2012; Ganz e Nemeth, 2012; Antunes e Canziani, 2016, Quimby, 2016). Esta pode ser uma das causas das menores concentrações plasmáticas de ferro no DRC4 ao longo do tempo. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de perdas ocultas de ferro devido a possíveis microhemorragias gastrointestinais em função da uremia (Bartges, 2012; Chalhoub et al., 2011; Polzin 2013).

Quanto às concentrações plasmáticas de IBC (capacidade de ligação de ferro), foi observado um comportamento contrário ao das concentrações do ferro sérico entre os grupos GC e GDRC no tempo 1 (fig.17).

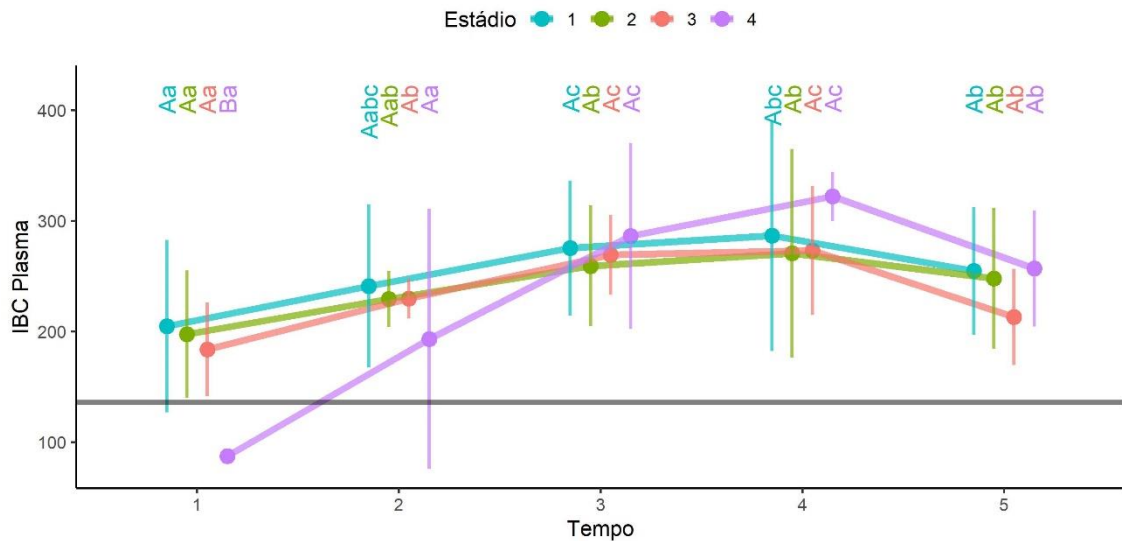
Figura 17: Média estimada da concentração plasmática de IBC ($\mu\text{mol/L}$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

No tempo 1, os cães dos grupos DRC1, DRC2, e DRC3 apresentaram maior concentração plasmática de IBC em contraposição à menor concentração plasmática de ferro, acontecendo o contrário no DRC4, ou seja, menor concentração plasmática de IBC e maior de ferro sérico. O mesmo ocorreu quando se comparou os estádios ao longo dos tempos, ou seja, o estádio que se manteve com menor concentração de ferro a partir do tempo 2 (DRC4) foi o que apresentou maior concentração de IBC (fig.18).

Figura 18: Comportamento da média estimada das concentrações plasmáticas de IBC ($\mu\text{mol/L}$) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (tracado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.



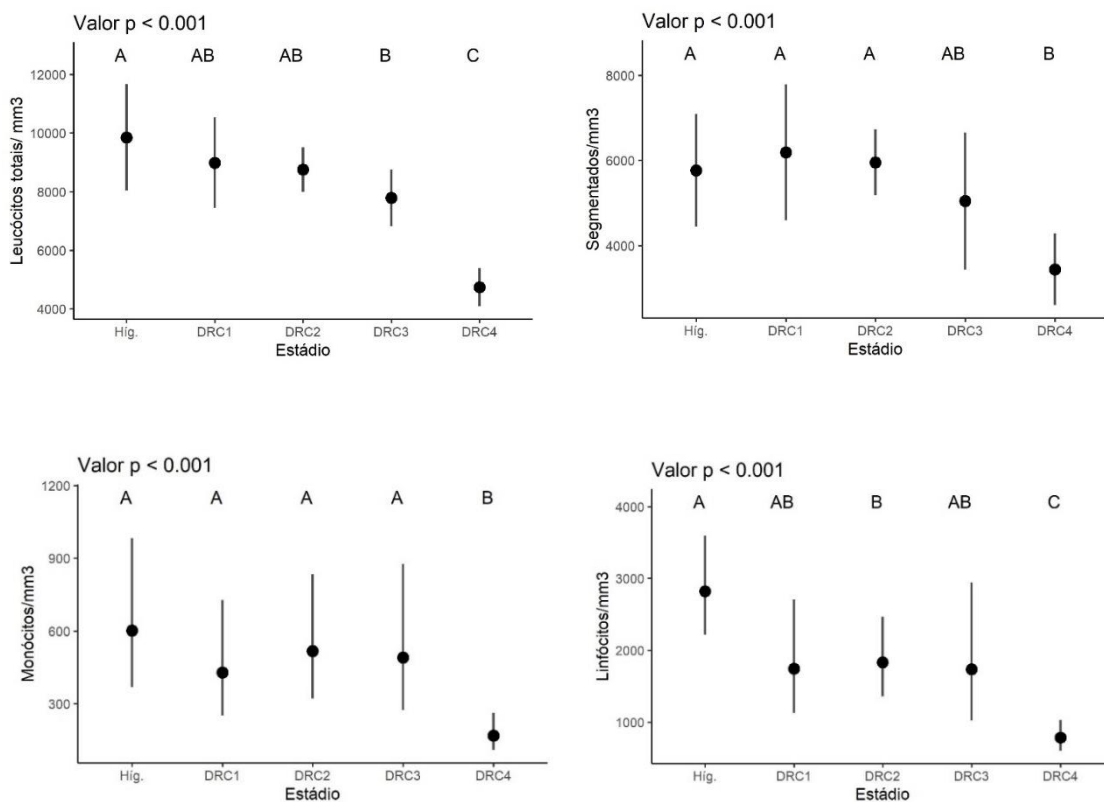
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

A IBC é uma forma indireta de mensurar a transferrina e, por isso, flutuações nas concentrações de IBC refletem flutuações na concentração de transferrina que é a proteína que transporta o ferro no sangue. Altas concentrações de ferro na circulação saturam a transferrina e, com isso, tem-se uma menor capacidade de ligação de ferro. Ao contrário, baixas concentrações de ferro no sangue, levam a maior quantidade de transferrina disponível e com isso maior capacidade de ligação de ferro (Pires et al, 2011; Ganz e Nemeth, 2012). De acordo com os resultados de hipoferremia e alta concentração sérica de IBC/transferrina, pode-se concluir que a anemia do paciente DRC4, que chegou ao final do estudo, apresentou característica “ferropriva”, o que não exclui as demais possíveis causas de anemia da DRC. É importante considerar que a transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, era de se esperar que ela apresentasse menores concentrações séricas em cães portadores de DRC em estágio avançado (Queiroz et al., 2016). O fato da sua concentração sérica estar aumentada, portanto, reforça a ideia da deficiência de ferro neste paciente, sendo a ação da hepcidina, uma possível causa desta deficiência.

5.4.3. Leucócitos totais, Segmentados, Monócitos, Linfócitos e Plaquetas

Observou-se diferença ($p < 0,001$) nas contagens de leucócitos totais, segmentados, monócitos e linfócitos entre os cães do GC e GDRC, no tempo 1, com decréscimo na contagem destas células no GDRC, mais evidente no DRC4 (fig.19).

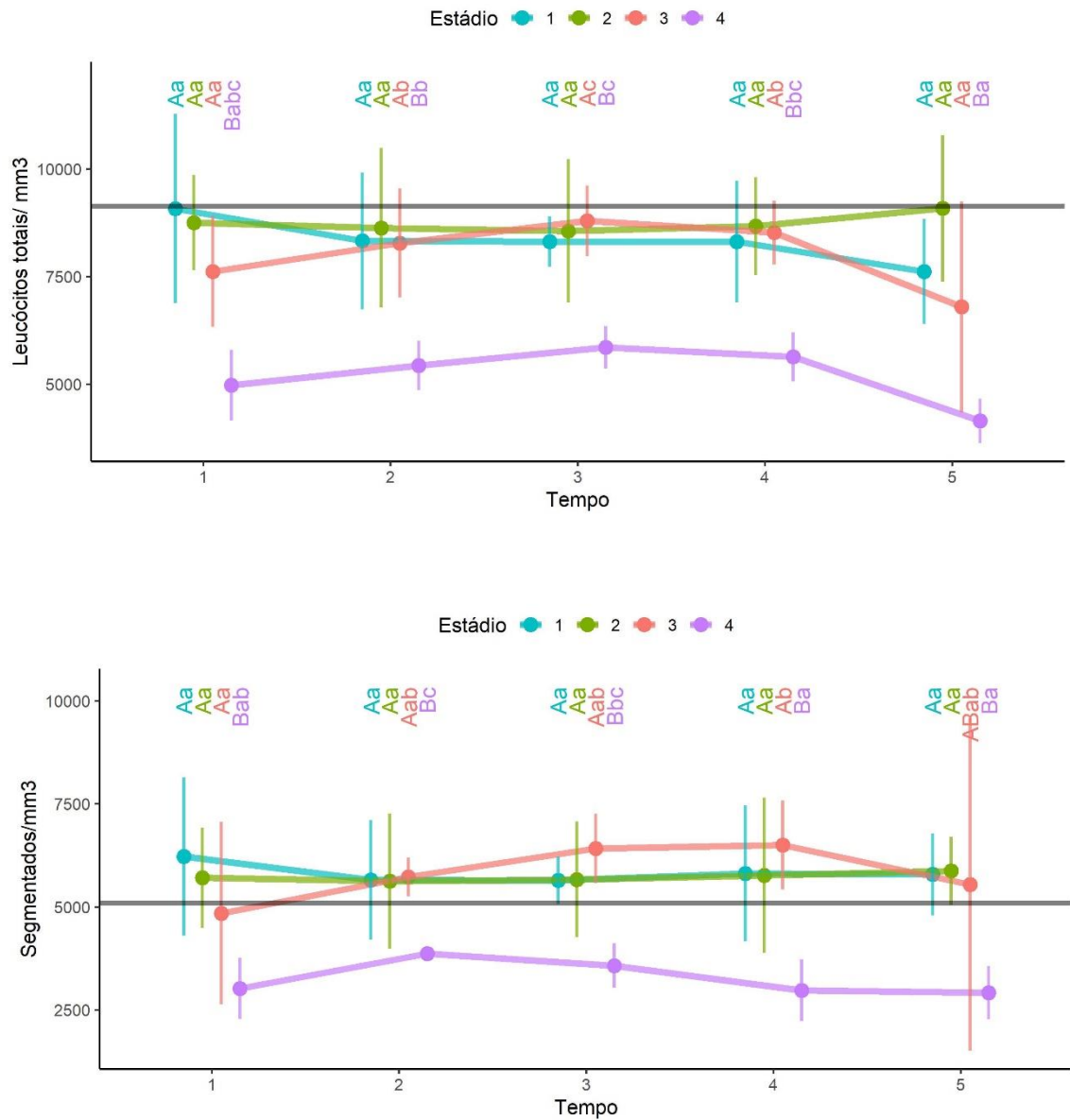
Figura 19: Média estimada da contagem de leucócitos totais (/mm³), segmentados (/mm³), monócitos (/mm³) e linfócitos (/mm³) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

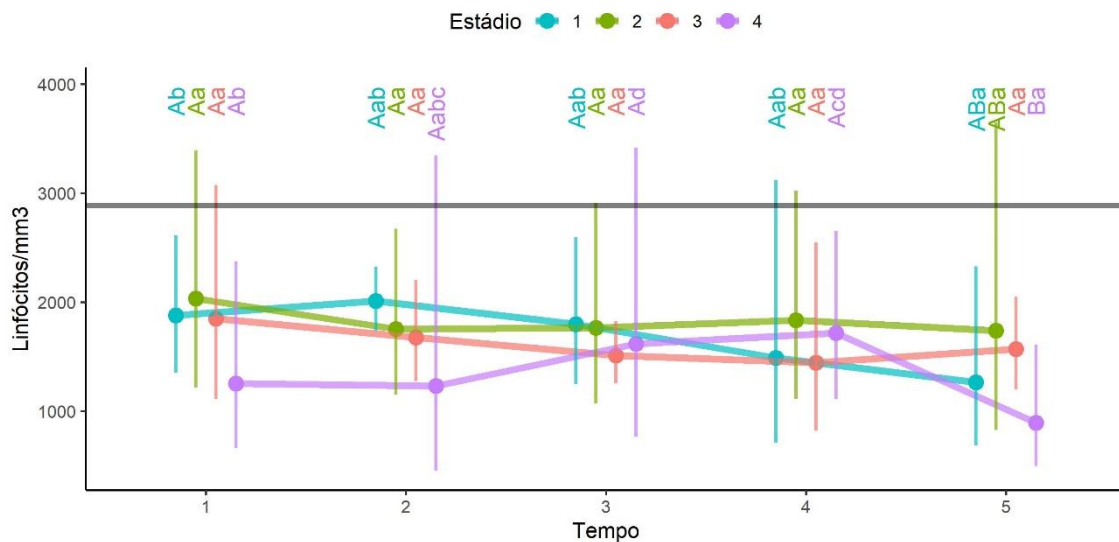
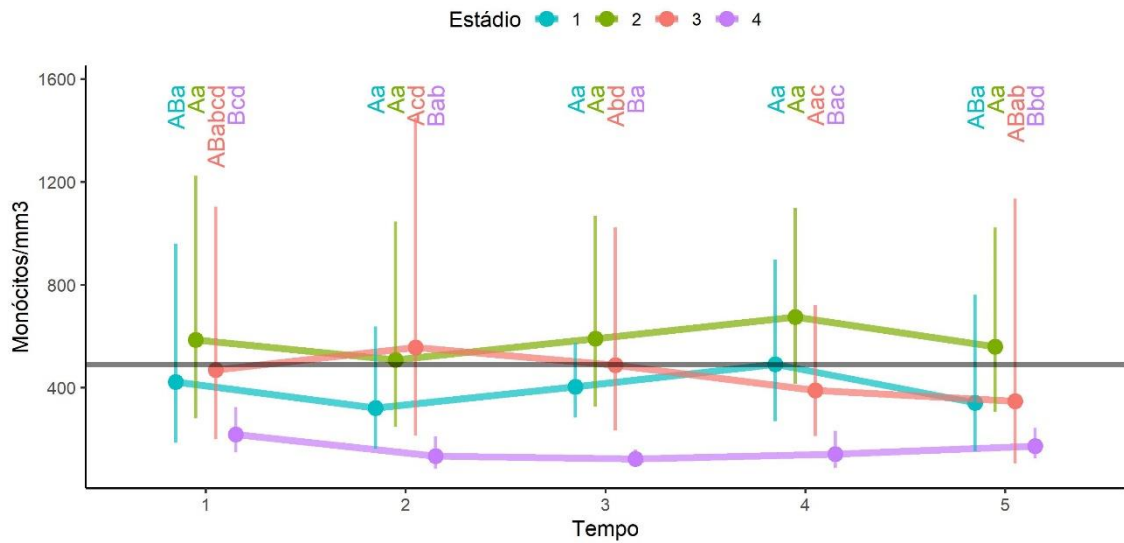


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Entre segmentados, monócitos e linfócitos, foram os linfócitos as células que mais variaram entre os estádios da DRC no tempo 1, apresentando-se em número cada vez menor a medida em que o estádio avançava. Ao longo dos outros tempos do estudo (tempos 2, 3, 4 e 5), observou-se que esta diferença permaneceu ($p < 0,001$) na contagem de leucócitos, segmentados e monócitos no DRC4 quando comparadas às contagens no DRC1, DRC2 e DRC3 (fig.20), estando o DRC4 sempre com as contagens mais baixas.

Figura 20: Comportamento da média estimada da contagem de leucócitos totais (/mm³), segmentados (/mm³) e monócitos (/mm³) e linfócitos (/mm³) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração das mesmas variáveis nos cães do grupo controle no tempo 1.





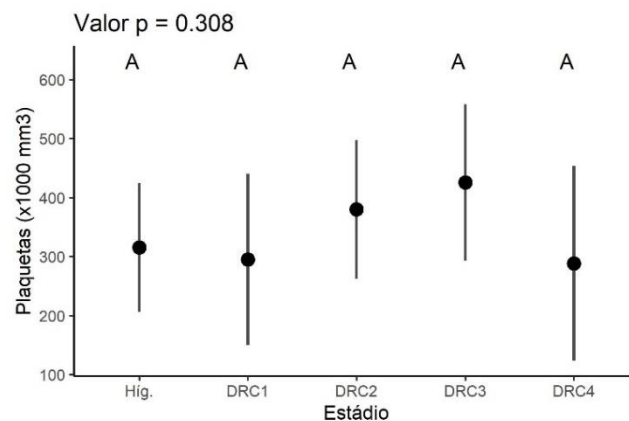
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estádio.

As menores médias estimadas do DRC4 nas contagens de leucócitos, segmentados e monócitos estão de acordo com o fato de que animais portadores de DRC em estágio avançado sofrem maior influência da uremia e da anemia, ambas contribuindo para a hiporexia/anorexia e, conseqüentemente, subnutrição, podendo afetar negativamente seu sistema imunológico (Quimby, 2016). Além disso, acredita-se que a uremia exerça um efeito de diminuição na expressão dos “toll like receptors-4” (TLR-4) que são receptores de membrana ativadores da resposta celular. Com a menor ativação dos TLR-4, as células mononucleares de defesa tornam-se hiporreativas e ainda podem sofrer apoptose em função

do EO diminuir a expressão do Klotto, causando envelhecimento celular (Moreno et al., 2011; Machowska et al., 2016; Raj et al., 2020). Interações entre as células de defesa são importantes nas respostas imunes do organismo e, a redução do seu número, afeta negativamente o paciente, que fica mais susceptível a complicações (Gasparyan et al., 2019).

Quanto a contagem de plaquetas, não foi observada diferença ($p=0,308$) entre os cães do GC e do GDRC no tempo 1 (fig.21).

Figura 21: Média estimada da contagem de plaquetas ($\times 1000/\text{mm}^3$) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

As plaquetas, além de participarem da cascata da coagulação, são ricas em agentes pró inflamatórios, sendo capazes de liberar micropartículas que interagem com outras células do sangue, podendo contribuir e perpetuar a inflamação. Uma vez que as plaquetas são da linhagem mieloide, assim como os leucócitos, cuja produção está aumentada em estados inflamatórios graves, é comum observar-se trombocitose nestes casos, que pode repercutir em distúrbios graves da coagulação (Kaser et al., 2001). A trombocitopenia também pode ocorrer em quadros graves de inflamação, devido ao seu consumo, como é caso, por exemplo, de pacientes em síndrome hemolítico-urêmica (Karpman et al., 2006). A relação plaqueta/linfócito tem sido estudada como marcador inflamatório e preditor de complicações pró trombóticas em humanos com doenças inflamatórias crônicas, sugerindo que, quanto maior a relação, maiores as chances de complicações e óbito (Gasparyan et al., 2019). No caso dos pacientes deste estudo, além de não ter sido detectada diferença ($p= 0,308$) entre as

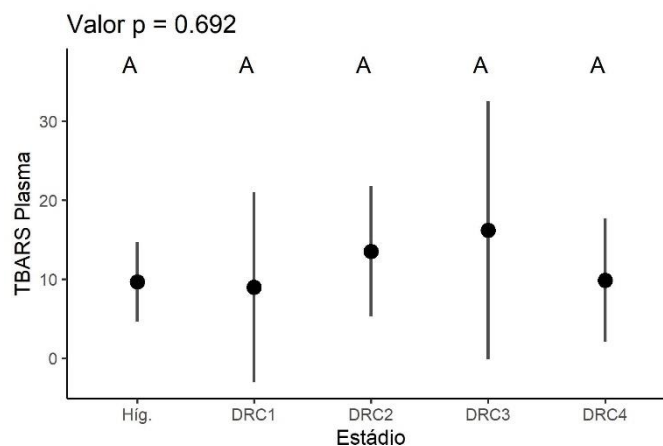
médias da contagem plaquetária do GC e do GRDC no tempo 1, também não se observou diferença ($p=0,131$) na contagem das plaquetas ao longo dos tempos do estudo, entre os cães com DRC. Estes achados apontam para a possibilidade de que o quadro inflamatório destes pacientes não era suficientemente grave para gerar alterações plaquetárias e, o tratamento conservador a que foram submetidos, possivelmente contribuiu para manter esta condição. Se o número de pacientes em estágio 4 da DRC fosse maior, este cenário poderia ser diferente.

5.5. Variáveis relacionadas ao estresse oxidativo dos grupos de cães controle e DRC no tempo 1 e quanto aos estádios da DRC nos cinco tempos do estudo

5.5.1. Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma

As médias estimadas do TBARS plasmático (fig.22) não apresentaram diferença entre o GC e o GDRC ($p=0,692$).

Figura 22: Média estimada das concentrações plasmáticas de TBARS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

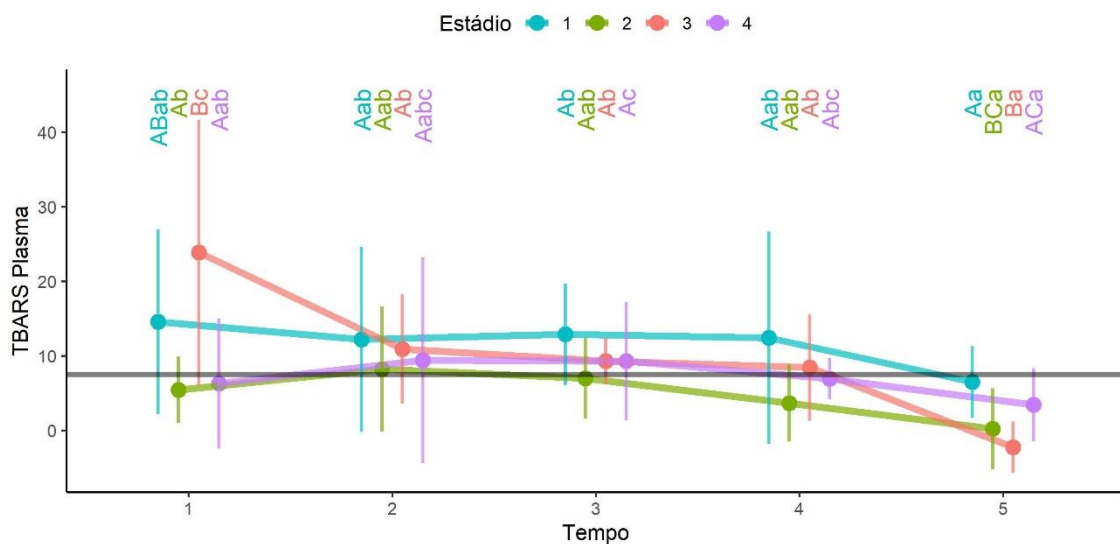


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Os rins são órgãos altamente vulneráveis aos danos causados pelas ERO devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa que compõem os lipídios presentes em sua estrutura, sendo estes compostos, facilmente oxidados pelas ERO por meio da reação de peroxidação lipídica (Ozbek, 2012). As TBARS refletem a presença de subprodutos desta reação, principalmente o malondialdeído. Assim, é esperado um aumento

de TBARS nos indivíduos com doença renal, devido a maior ocorrência de EO (Small et al., 2012). No presente estudo, não se observou aumento das TBARS nos cães do GDRC, no tempo 1, quando comparados aos cães controle, concordando com Percário (2010) que dosou malondialdeído no plasma de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Outros estudos relataram o aumento das TBARS como os de: Aruna e Devi (2014) que dosaram TBARS no soro de 60 humanos com vários tipos de nefropatias; Sener et al. (2004) que dosaram TBARS no plasma e tecido renal de ratos com DRC induzida, Agarwal (2003) que dosou malondialdeído no plasma e urina de humanos com DRC e Kargin (2001) que dosou malondialdeído no plasma de cães doentes renais. Aruna e Devi (2014) demonstraram uma correlação positiva entre as concentrações de TBARS e a gravidade da DRC em humanos. Na comparação de cada estágio da DRC ao longo do tempo (fig.23 – letras minúsculas de mesma cor), houve diminuição na concentração do TBARS ($p < 0,001$).

Figura 23: Comportamento da média estimada da concentração plasmática do TBARS (mmol/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração plasmática do TBARS (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

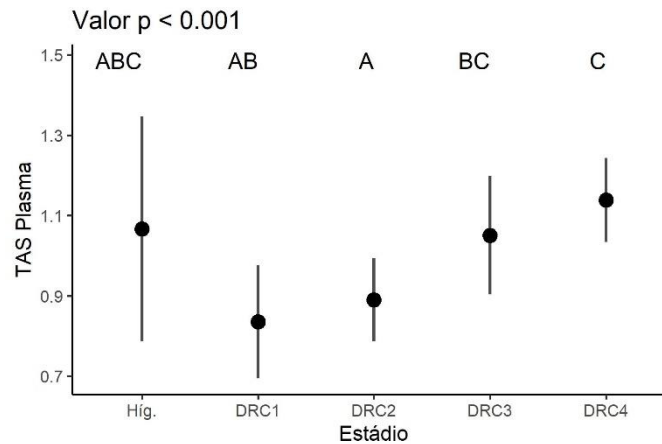
Resultado semelhante foi observado por Silva et al. (2013) que dosou TBARS no plasma de cães DRC estádios 3 e 4, em tratamento, e encontrou uma diminuição nas suas concentrações quando comparado aos cães controle. No caso do presente estudo, deve-se considerar que os

cães receberam, durante todo o período da pesquisa, por questões de ética médica e para efeito de padronização, os recursos terapêuticos propostos pela IRIS (2019b) para o tratamento conservador da DRC, entre eles, a dieta renal (Equilíbrio Veterinary – Renal RE - canino[®]) e um suplemento a base de ômega-3, vitamina E, selenito de sódio, gluconato de cobre, gluconato de zinco, sulfato de condroitina e glucosamina (Gerioox[®]). Tanto a dieta quanto o suplemento possuem características antioxidantes e, possivelmente, contribuíram para a diminuição nas concentrações de TBARS ao longo do tempo ($p < 0,001$) nos cães do GDRC, com maior homogeneidade nos valores de TBARS, entre os estádios da DRC, após instituído o tratamento, sugerindo menor grau de peroxidação lipídica. Estudos do efeito da suplementação de pacientes doentes renais com antioxidantes corroboram com o achado do presente estudo, como foi o caso do estudo de Yu et al. (2006) onde demonstrou-se redução no EO em gatos com doença renal suplementados com vitamina E, vitamina C e beta caroteno. O mesmo ocorreu no estudo de Aruna e Devi (2014) que relataram diminuição nas concentrações séricas de TBARS em humanos doentes renais crônicos após suplementação com vitamina E.

5.5.2. Status Antioxidante Total (TAS) no plasma

As médias estimadas das concentrações plasmáticas do TAS apresentaram diferença ($p < 0,001$) entre o GC e GDRC e entre os estádios do GDRC (fig.24). Espera-se que um maior EO provoque uma maior reação do sistema antioxidante do organismo, acionando todo o seu potencial neutralizador de radicais livres e, com isso, aumentando os valores do TAS. Tal fato foi observado no momento da admissão ao estudo, entre os diferentes estádios dos cães com DRC, ou seja, aqueles do estágio 4 apresentaram um TAS maior do que os do estágio 3, que por sua vez apresentaram um TAS maior que os do estágio 2 e assim por diante (fig.24), sugerindo um maior EO nos cães com DRC mais avançada.

Figura 24: Média estimada das concentrações plasmáticas de TAS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

O contrário foi observado no estudo de Silva et al. (2013) no qual demonstrou-se uma diminuição do TAS plasmático nos cães portadores de DRC comparados ao grupo controle. Eram dezesseis cães em estágio avançado da DRC (estádios 3 e 4), nos quais demonstrou-se alto índice de apoptose em neutrófilos, caracterizando maior EO e sugerindo assim um maior consumo das substâncias antioxidantes endógenas levando à diminuição do TAS. Outro ponto abordado foi o de que as amostras foram armazenadas a -20°C , o que pode ter interferido na viabilidade para a dosagem do TAS. Keegan e Webb (2010) também demonstraram um significativo decréscimo no TAS plasmático de gatos com DRC quando comparados aos gatos controle. Em contrapartida, Krofic Zel et al (2014), relataram que não houve diferença do TAS plasmático entre o grupo controle e o grupo de gatos com DRC. Esta variação de resultados entre os estudos mostra o quanto ainda são necessárias mais pesquisas sobre o assunto, levando-se em consideração a espécie, a metodologia, o tipo de amostra biológica, armazenamento, entre outros.

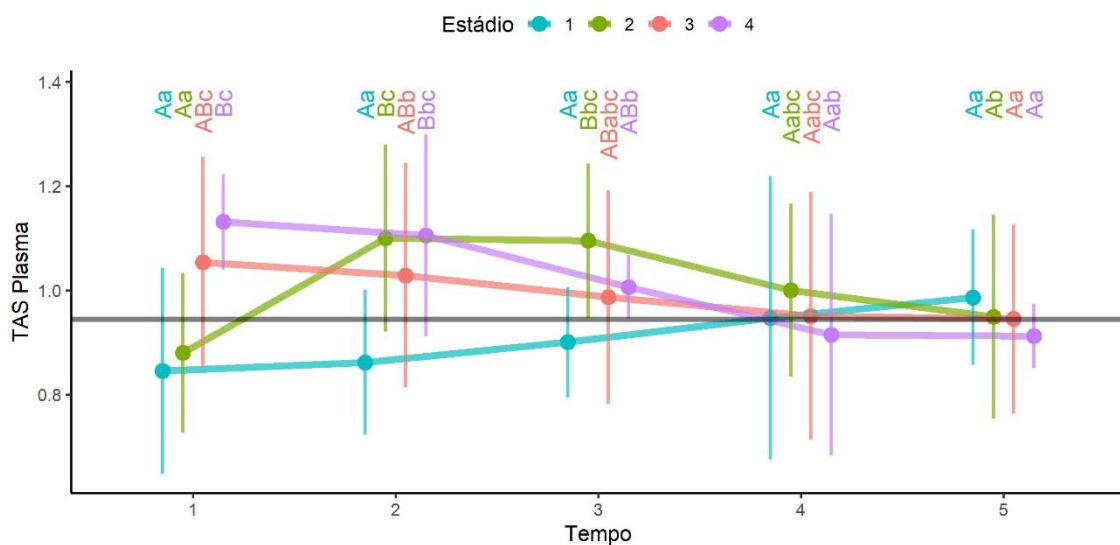
Em se tratando dos animais do grupo controle, possivelmente devido a não terem sido submetidos a uma dieta única, com ingredientes antioxidantes e nem à suplementação antioxidante, observou-se uma maior amplitude de resultados neste grupo originando uma equivalência estatística com os animais do GDRC (fig.24).

Até o momento em que este estudo foi realizado, não havia, na literatura, parâmetros sobre os valores de referência do TAS em cães em diferentes idades e nem sobre o efeito da dieta ou

de suplementos sobre esta variável. O TAS representa o efeito de moléculas não enzimáticas em resposta ao EO, tais como eletrólitos, minerais, proteínas diversas, entre outros (Ferrari, 2010). A associação do TAS com as determinações das atividades da SOD e da GSHPx, embora seja a ferramenta mais estudada e difundida dentre os pesquisadores do EO, mostra limitações para a completa elucidação das causas e efeitos do EO.

Ao se comparar os diferentes estádios da DRC entre si, nos diferentes tempos (fig.25), observou-se que, no tempo 1 havia uma maior diferença dos valores do TAS entre os estádios, sendo maiores nos estádios mais avançados (DRC3 e DRC4). Com o passar do tempo, provavelmente pelo efeito do tratamento conservador que contribuiu para diminuir o EO nestes animais, os valores do TAS entre os estádios da DRC tornaram-se mais semelhantes entre si, havendo diminuição significativa das médias dos resultados dos DRC3 e DRC4.

Figura 25: Comportamento da média estimada da concentração plasmática do TAS (mmol/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração plasmática do TAS (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estádio.

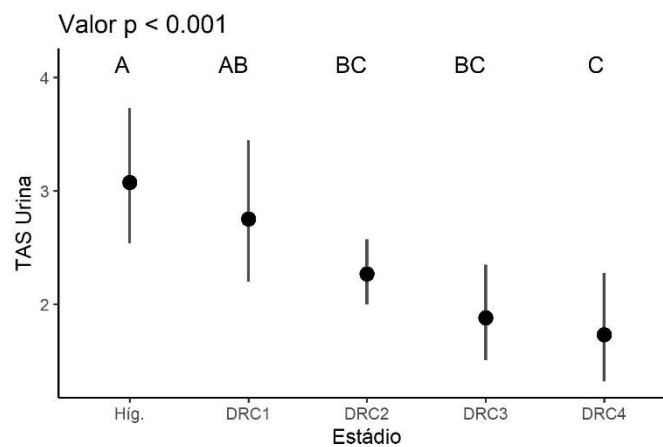
Pôde-se observar ainda que os cães do DRC 2 tiveram um maior aumento no tempo 2 e tempo 3 e, embora tenham sofrido redução no tempo 4 e tempo 5, não voltaram a valores equivalentes aos iniciais, podendo apontar para a necessidade de maior atenção quanto ao EO nos cães deste estádio da DRC. O único grupo que não sofreu efeito da interação estádio x

tempo foi o DRC 1, provavelmente devido ao menor comprometimento da função renal, quando comparado aos demais grupos.

5.5.3. Status Antioxidante Total (TAS) na urina

Houve diferença das concentrações urinárias de TAS (mmol/L) entre os cães do GC e do GDRC e entre os estádios da DRC entre si ($p < 0,001$) no tempo 1, observando-se diminuição gradativa das concentrações à medida em que o estádio da DRC aumentou (fig.26).

Figura 26: Média estimada das concentrações urinárias de TAS (mmol/L) nos grupos de cães controle (Híg) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

O *status* antioxidante representa uma linha de defesa contra os radicais livres produzidos, dessa forma, considera-se que pacientes com menos capacidade antioxidante total, estejam mais predispostos ao desenvolvimento das consequências deletérias do EO (Ferrari, 2010).

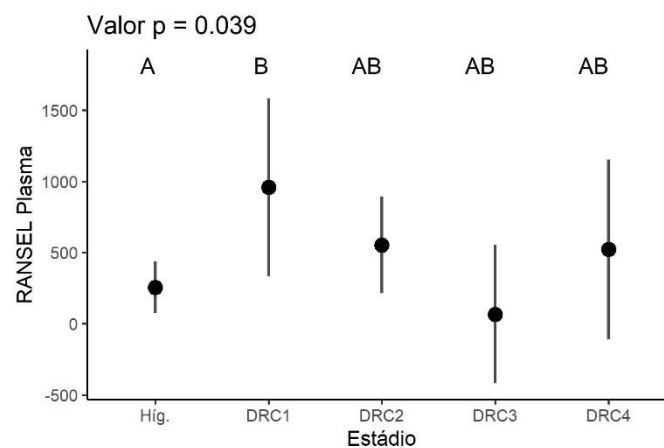
A intenção em realizar a dosagem do TAS bem como dos demais biomarcadores do EO em amostras de urina foi a de estudar melhor o efeito do EO no rim, uma vez que não foi possível obter amostras de tecido renal destes animais através de biopsias. Além disso, segundo Agarwal (2003), a mensuração de biomarcadores de dano oxidativo em lipídios parece ser mais sensível em amostras de urina que no plasma de pacientes humanos com DRC. Ao se comparar o TAS urinário entre os grupos no tempo 1 (fig.26), observou-se um comportamento inverso ao do TAS plasmático (fig.24). Especula-se que a lesão renal progressiva tenha levado ao consumo da reserva antioxidante não enzimática relacionada ao

TAS no tecido renal, corroborando com os estudos que apontam para a maior ocorrência de EO em doentes renais crônicos (Yilmaz et al., 2007, Silva et al., 2013; Aruna e Devi, 2014; Zoccali et al., 2017). Contrapondo a diminuição do TAS urinário dos cães DRC no tempo 1, com o aumento do TAS plasmático no mesmo tempo, pressupõe-se que o EO instalado localmente nos rins, representado pela diminuição do TAS urinário pudesse estar iniciando uma repercussão sistêmica caracterizada pelo aumento do TAS plasmático. Comparando com o estudo de Silva et al. (2013), no qual o TAS plasmático estava diminuído, sugere-se que os cães do presente estudo estariam em uma etapa anterior no mecanismo de EO da DRC quando comparados aos cães estudados por Silva et al. (2013), os quais se encontravam em estádios mais avançados da DRC (estádios 3 e 4).

5.5.4. Glutationa peroxidase (GSH-Px) no plasma

Observou-se diferença entre as médias da atividade plasmática da GSH-Px (RANSEL) do GC e do GDRC ($p=0,039$), sendo a maior atividade registrada no GDRC (fig.27).

Figura 27: Média estimada da atividade da GSH-Px (RANSEL - U/L) plasmática nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

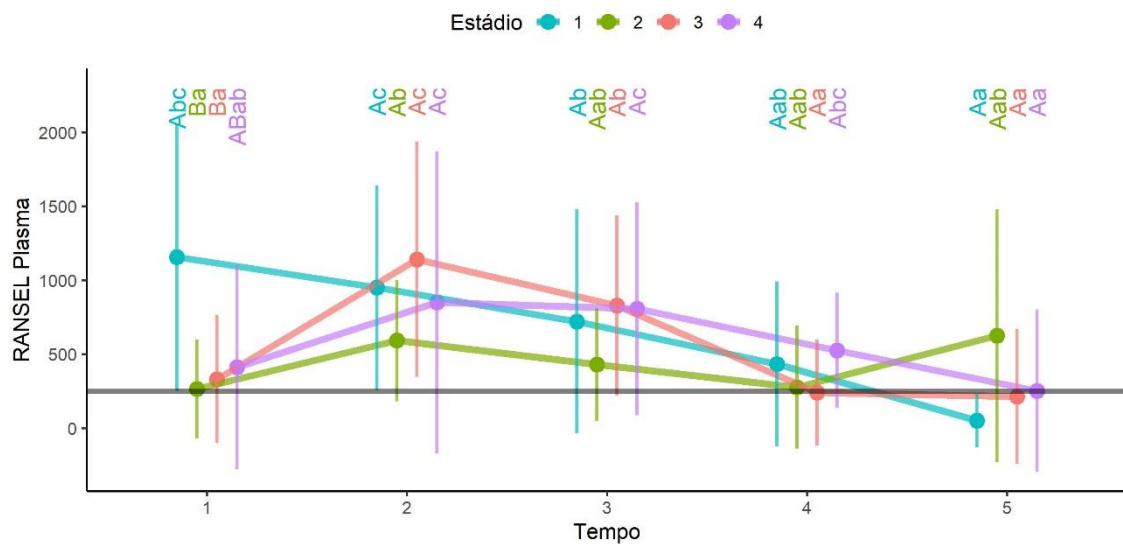


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Sabendo-se que a GSH-Px é uma enzima antioxidante do sistema de defesa do organismo, o aumento da sua atividade está condicionado ao aumento dos radicais livres. Assim, os valores da atividade plasmática da GSH-Px, no momento da admissão ao estudo, sugerem que os cães do GDRC estavam sob maior condição de EO sistêmico que os do GC. No estudo de Krophic

Zel et al (2014) no qual estudou-se o comportamento da GSH-Px plasmática em gatos nos vários estádios da DRC, constatou-se aumento da GSH-Px naqueles de estágio 4. Kendall et al. (2017), ao dosar a atividade da GSH-Px no sangue total de cães anêmicos demonstrou uma menor atividade da enzima nestes cães quando comparados aos cães do grupo controle. Este achado corrobora com o observado no presente estudo a respeito da menor atividade da GSH-Px nos cães DRC2, DRC3 e DRC4 nos quais constatou-se menor massa eritrocitária quando comparados aos cães controle e DRC1. Já a menor atividade da GSH-Px observada nos cães controle supõe-se ser devido ao menor estímulo do sistema de defesa antioxidante. Observou-se também diferença na atividade da GSH-Px de cada estágio em relação aos tempos do estudo ($p < 0,001$), com tendência de diminuição da atividade à medida que o tempo avançou, condizente com a amenização do EO devido ao suporte antioxidante fornecido pela dieta e pela suplementação do tempo 1 ao 5 (fig.28).

Figura 28: Comportamento da média estimada da atividade da GSH-Px plasmática (RANSEL - U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da GSH-Px plasmática (U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.

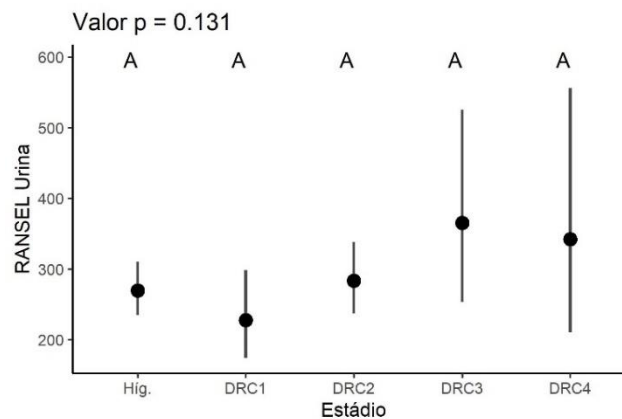


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

5.5.5. Glutationa peroxidase (GSH-Px) na urina

Não houve diferença ($p=0,131$) entre as médias estimadas da atividade da GSH-Px (RANSEL-U/L) urinária entre GC e GDRC (fig.29). Porém, percebeu-se no gráfico, uma tendência de elevação da GSH-Px à medida que o estágio da DRC aumentou, sugerindo que houve uma maior atividade desta enzima em pacientes de estágio mais avançado da DRC, o que vem ao encontro do fato de que quanto maior for o estágio da doença, maior é o EO.

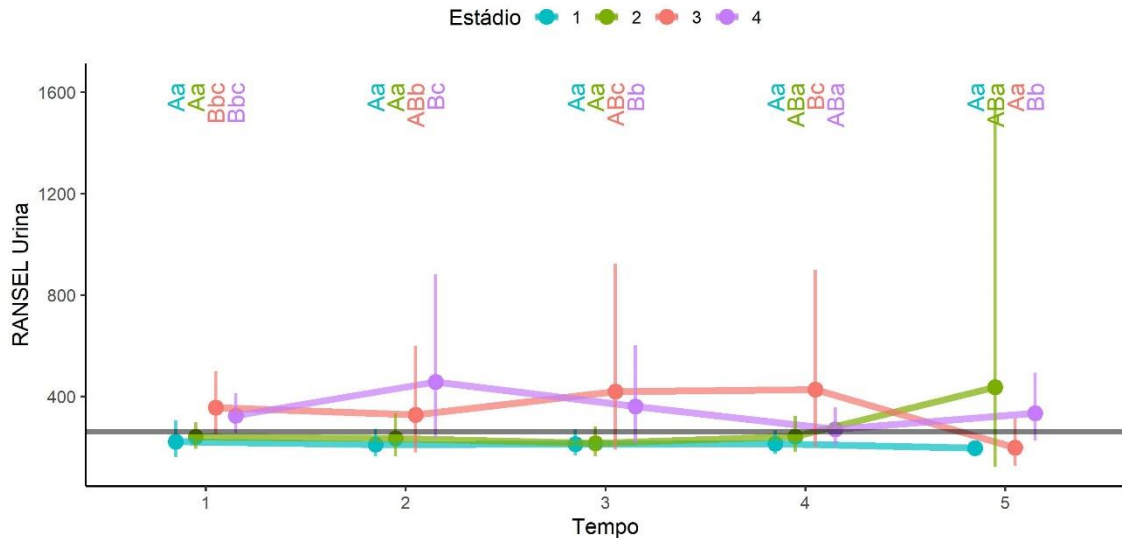
Figura 29: Média estimada da atividade da GSH-Px (RANSEL - U/L) urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Sobre a atividade da GSH-Px urinária entre os estádios da DRC e em relação aos tempos do estudo (fig.30) não foi observada diferença ($p=0,071$), mas notou-se que, assim como na figura 29, houve uma tendência de maiores valores nos estágios mais avançados, que pôde ser observado no DRC3 e DRC4 nos tempos 1, 2 e 3, sugerindo maior possibilidade de EO nestes animais, nestes tempos.

Figura 30: Comportamento da média estimada da atividade da GSH-Px urinária (RANSEL - U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da GSH-Px urinária (RANSEL - U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.



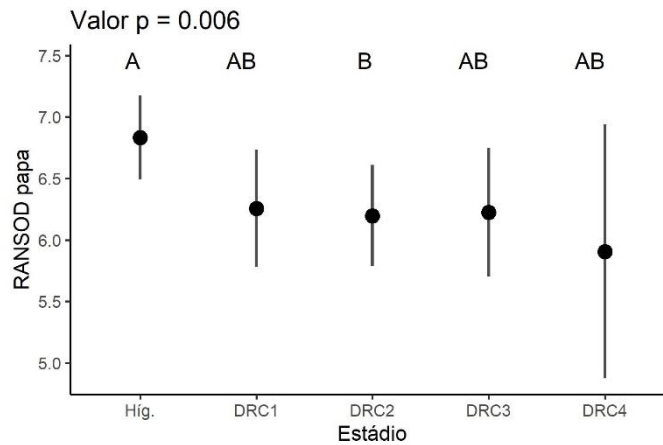
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

E ainda, na fig.37 foi possível perceber diferença quando se comparou a atividade da GSH-Px urinária entre os cães que ingeriam dieta renal e os que não ingeriam, no tempo 1. Como a GSH-Px é uma das enzimas antioxidantes do sistema de defesa natural do organismo contra os radicais livres, a sua menor atividade na urina reflete a possibilidade de menor EO nos rins destes cães, o que leva a crer que a dieta renal possa ter contribuído para amenizar o EO no tecido renal.

5.5.6. Superóxido dismutase (SOD) no concentrado de hemácias

Observou-se diferença entre as médias estimadas da atividade da superóxido dismutase - SOD (RANSOD- U/L) no concentrado de hemácias entre o GC e o GDRC no tempo 1 ($p < 0,006$), observando-se uma menor atividade de SOD no GDRC (fig.31). Este achado corrobora com o estudo de Kargin (2001) no qual houve diminuição da atividade da SOD no concentrado de hemácias em cães doentes renais e com o estudo de Sener et al. (2004) que observaram uma diminuição na atividade da SOD em ratos com DRC induzida, porém em amostra de plasma.

Figura 31: Média estimada da atividade da SOD (RANSOD - U/L) no concentrado de hemácias nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.

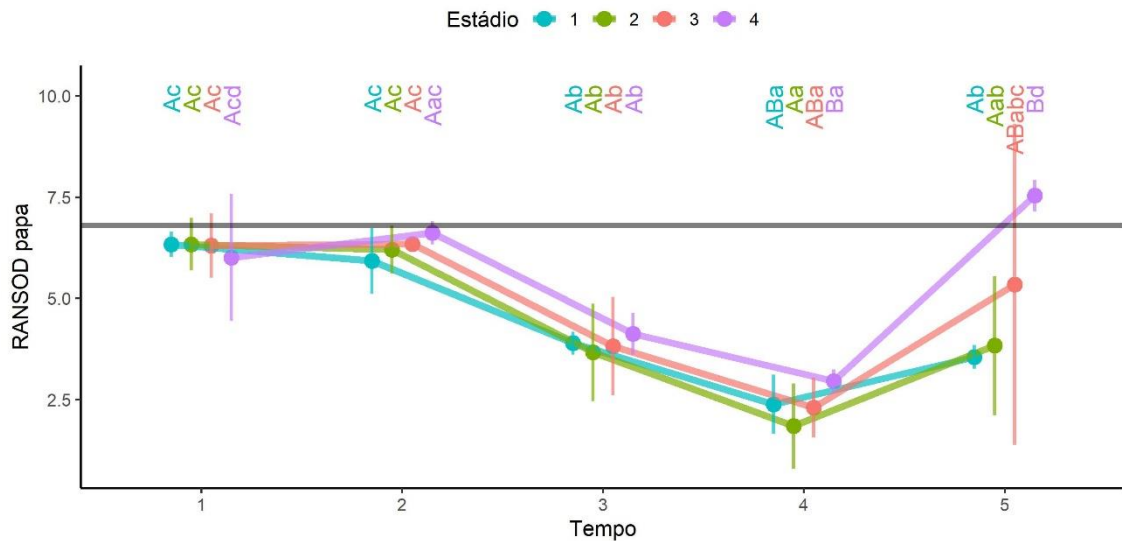


Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

De acordo com Brown (2008) o alto metabolismo celular renal associado às alterações morfofuncionais dos rins na DRC geram um estado de EO local e, muitas vezes, sistêmico, dependendo do estágio da doença. Porém, por se tratar de uma enzima, a atividade sistêmica pode não se apresentar aumentada em casos de baixas especificidade, sensibilidade ou acurácia diagnósticas. Além disso, deve-se considerar a possibilidade de deficiência de cofatores, baixa estabilidade do tipo de amostra ou do tipo de armazenamento. Outro fato a ser considerado é a meia vida desta enzima em cães, que ainda é desconhecida. Considerando-se a SOD uma das principais enzimas antioxidantes, juntamente com catalase (CAT), glutatona peroxidase (GSH-Px), óxido nítrico sintetase (NOS) (Brown, 2008; Aruna e Devi, 2014), pode-se dizer que pacientes DRC que apresentem menor atividade de alguma(s) dessas enzimas, podem desenvolver piores consequências do EO.

Observou-se também diferença ($p < 0,001$) das médias estimadas da atividade da superóxido dismutase - SOD (RANSOD- U/L) no concentrado de hemácias tanto entre os diferentes estádios da DRC quanto entre os tempos dentro de cada estágio (fig.32).

Figura 32: Médias estimadas da atividade SOD no concentrado de hemácias (U/L) em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da SOD (RANSOD-U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.



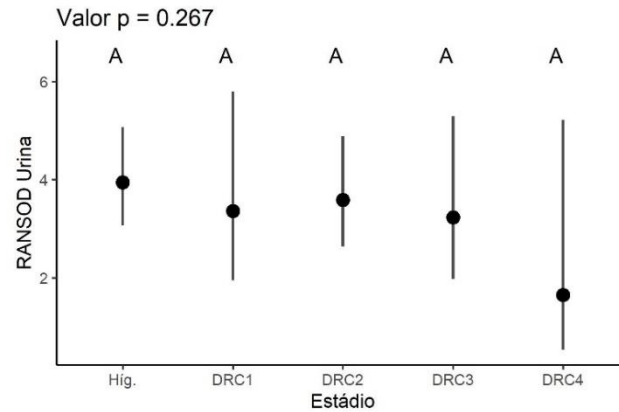
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estágio.

Em relação à atividade da SOD nos diferentes estádios da DRC e ao longo do tempo do estudo percebeu-se que, até o tempo 4, a atividade da SOD foi semelhante entre os estádios e houve uma tendência de diminuição da atividade ao longo do tempo, provavelmente devido ao efeito antioxidante do tratamento conservador instituído. Porém, do tempo 4 para o tempo 5 a atividade da SOD principalmente dos cães DRC3 e DRC4 voltou a aumentar, possivelmente em função de um maior dano oxidativo nos eritrócitos devido à evolução da doença com o decorrer do tempo. Sabe-se que a DRC progride mais rapidamente principalmente quando nos estádios mais avançados. A ação das toxinas urêmicas, entre elas citocinas inflamatórias, aumentam o EO sobre os eritrócitos com diminuição da sua meia vida útil e, conseqüentemente, diminuição do seu número, conforme evidenciado na fig.14. Ao se comparar a fig.14 com a fig.32 percebe-se um comportamento de diminuição dos eritrócitos, do tempo 4 para o tempo 5, coerente com o aumento da atividade da SOD eritrocitária, provavelmente pela tentativa de manter os eritrócitos viáveis frente ao maior EO, principalmente nos cães DRC3 e DRC4.

5.5.7. Superóxido dismutase (SOD) na urina

A atividade da SOD urinária não demonstrou diferença entre GC e GDRC no tempo 1 (fig.33).

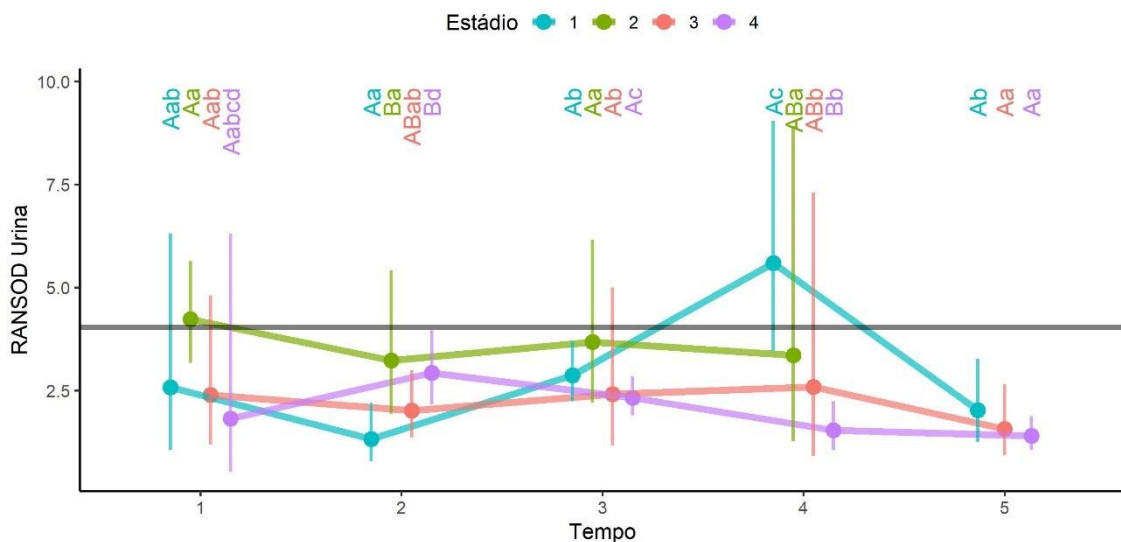
Figura 33: Média estimada da atividade da SOD (RANSOD - U/L) urinária nos grupos de cães controle (Híg.) e de cães DRC estádios 1, 2, 3 e 4, no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Porém foi constatada diferença entre os estádios ($p=0,004$) e entre os tempos em cada estádio ($p=0,001$) (fig.34). A determinação da atividade da SOD nos cães do grupo DRC3, no tempo 5, não foi realizada e, por isso, não aparece a sua média estimada na fig.34.

Figura 34: Comportamento das médias estimadas da atividade SOD (RANSOD-U/L) urinária em relação aos estádios 1, 2, 3 e 4 da DRC (traçado colorido) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3, 4 e 5). A reta representa uma referência para a média estimada da atividade da SOD (RANSOD-U/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças entre estádios em cada tempo. Letras minúsculas diferentes representam diferença entre os tempos dentro de cada estádio.

Observando-se a atividade da SOD urinária entre os estádios ao longo do tempo, nota-se que, apesar de terem ocorrido flutuações na sua atividade, registradas no tempo 2 e no tempo 4, que justificaram diferenças entre os estádios (letras maiúsculas diferentes), ao chegar ao tempo 5, houve uma tendência de maior homogeneidade da sua atividade entre os estádios (letras maiúsculas iguais). Especula-se que o efeito da dieta e da suplementação possa ter contribuído para um menor acionamento do sistema antioxidante com menor atividade da SOD urinária ao longo dos tempos. Vale pensar também, por outro lado, que o motivo dessa menor atividade da SOD seja devido a uma exaustão do mecanismo antioxidante local em função de um maior EO renal. Esta segunda possibilidade está em consonância com a diminuição do TAS urinário observada nos cães com DRC quando comparados aos do grupo controle, especialmente nos estádios mais avançados. Diante destas especulações percebe-se o quão pouco se conhece a respeito da dinâmica destas enzimas no cão, da sua sensibilidade para indução de maior atividade, sua meia vida, entre outras questões. Comparando com a GSH-Px urinária, a SOD urinária demonstrou um comportamento mais heterogêneo e, por isto, mais desafiador quanto à sua interpretação.

5.6. Efeito da utilização ou não da dieta renal pelos cães portadores de DRC sobre as variáveis analisadas quando da admissão ao estudo

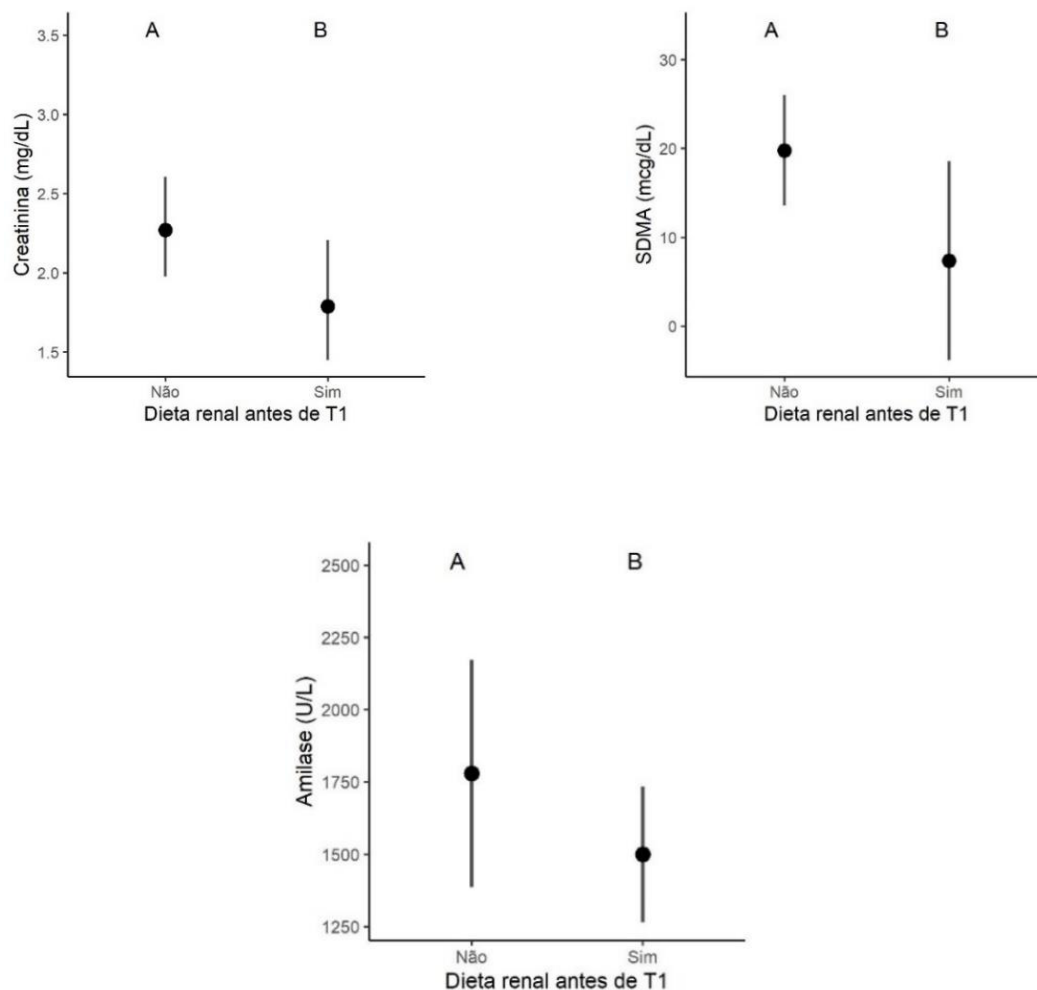
Dos 16 cães portadores de DRC, cinco iniciaram o estudo já em uso de dieta renal, sendo um do estágio 4 da DRC, um do estágio 3, dois do estágio 2 e um do estágio 1. Os outros 11 cães que não comiam dieta renal quando da admissão ao estudo compuseram o outro grupo, sendo um animal do estágio 4 da DRC, dois do estágio 3, cinco do estágio 2 e três do estágio 1.

De todas as variáveis analisadas neste estudo, as que mostraram diferença em relação ao uso ou não da dieta renal no momento da admissão (tempo 1) foram a creatinina sérica ($p=0,006$), SDMA sérica ($p=0,019$), amilase sérica ($p=0,023$), linfócitos ($p=0,014$), TBARS plasmático ($p=0,037$) e GSH-Px (RANSEL) urinária ($p=0,019$).

As médias estimadas da creatinina, SDMA e amilase séricas foram menores nos cães que já usavam a dieta renal (fig.35), sugerindo que a dieta seja capaz de melhorar a excreção renal destes cães, conforme afirmado por Bartges (2012) e Polzin (2013). Tal fato pode ser explicado devido às dietas específicas para cães com DRC serem enriquecidas com ácidos graxos (ômega-3), vitaminas e minerais e outros antioxidantes importantes para o melhor funcionamento renal, contribuindo assim, para a melhora da TFG. Este fato vem de encontro

ao que Valle et al (2015) demonstraram sobre a combinação de ômega-3 com vitamina E, selênio, cobre, zinco, sulfato de condroitina e glucosamina agindo positivamente sobre a qualidade da excreção renal em cães. Em um estudo com humanos não diabéticos portadores de DRC que foram suplementados com ômega 3, foi observado um decréscimo nas concentrações séricas de interleucina 18 (Yong et al., 2019), fato que, indiretamente, pode contribuir para a melhora da excreção renal pela diminuição da inflamação.

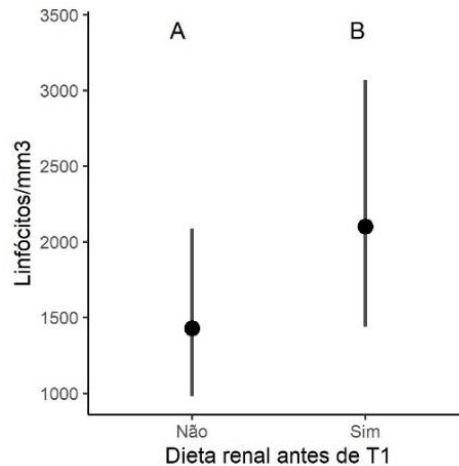
Figura 35: Médias estimadas das concentrações séricas de creatinina (mg/dL), SDMA (mcg/dL) e amilase (U/L) no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Quanto aos linfócitos, a média foi maior nos pacientes sob uso de dieta renal (fig.36).

Figura 36: Média estimada dos valores de linfócitos/mm³ no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo.



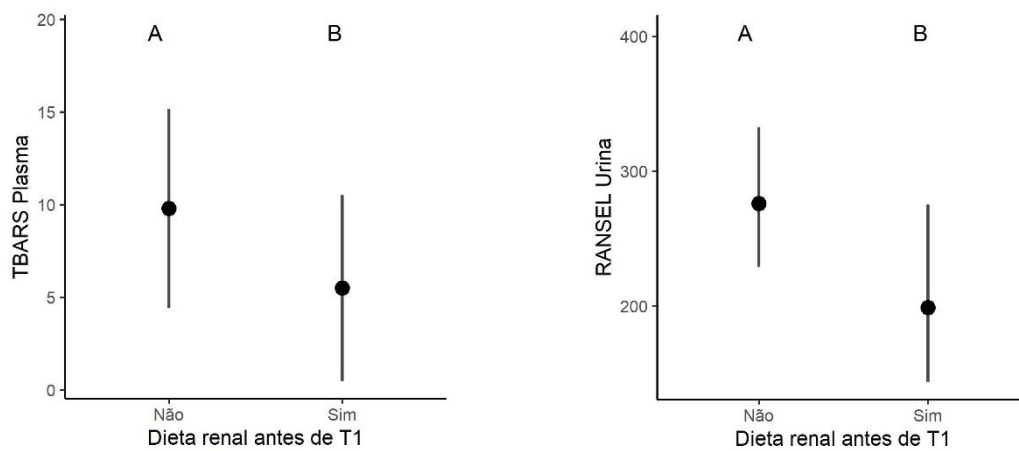
Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Atualmente, a medicina tem pesquisado sobre algumas relações celulares como sendo melhores biomarcadores para prever inflamação sistêmica, do que a simples contagem destas células. A razão neutrófilo/linfócito e a razão plaqueta/linfócito estão entre as mais estudadas e, geralmente estão aumentadas em pacientes considerados sistemicamente “inflamados” (Wang et al., 2018; Gasparyan et al., 2019), sendo este um assunto que merece ser estudado na medicina veterinária. Especula-se que maior média de linfócitos nos cães sob uso de dieta renal, poderia repercutir em uma menor relação neutrófilo/linfócito e plaqueta/linfócito, indicando com isso, menor grau de inflamação, possivelmente em função de certos componentes antioxidantes da dieta que podem ter diminuído o EO.

Em relação à média estimada da concentração de TBARS no plasma, observou-se que esta foi menor nos cães que já faziam uso da dieta renal quando da admissão ao estudo (fig.37). Considerando que o TBARS é um indicador de peroxidação lipídica e, sendo esta reação, frequente na patogenia da DRC (Aruna e Devi 2014), a sua menor concentração nestes cães pode ser indício de que a dieta contribuiu para diminuição do EO sistêmico, pelo seu já discutido potencial anti-inflamatório e, quanto menor a inflamação, menor o EO.

Quanto à GSH-Px urinária constatou-se menor atividade desta enzima nos cães sob uso de dieta renal (fig.37). Como a GSH-Px é uma das enzimas antioxidantes do sistema de defesa natural do organismo contra os radicais livres, inclusive no tecido renal, a sua menor atividade na urina reflete a possibilidade de menor EO nos rins destes cães, concordando mais uma vez com a possibilidade de contribuição da dieta para amenizar o EO renal.

Figura 37: Médias estimadas das concentrações plasmáticas de TBARS (mmol/L) e da atividade da GSH-Px (RANSEL – U/L) urinária no grupo de animais que usavam ou não dieta renal quando da admissão ao estudo.



Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que o principal objetivo desse estudo foi avaliar o estresse oxidativo (EO) em cães doentes renais crônicos é importante ressaltar as variáveis diretamente relacionadas ao EO que se apresentaram significativamente alteradas, em algum momento, no grupo de cães com DRC, quando comparados ao grupo controle. Estas variáveis foram: TBARS, TAS e GSH-Px plasmáticos, o TAS urinário e a SOD na papa de hemácias.

O TBARS, um subproduto da peroxidação lipídica, decresceu nos cães doentes renais crônicos à medida em que receberam o tratamento conservador e, por isso, justifica acreditar que o tratamento colaborou para menor intensidade do EO.

O TAS plasmático apresentou-se mais elevado e diretamente proporcional ao estágio da DRC, no tempo de admissão dos cães ao estudo, fazendo acreditar que quanto maior o estágio da DRC, maior o recrutamento do sistema de defesa antioxidante do organismo, sinalizando uma tendência para o EO sistêmico. Em contrapartida o TAS urinário, apresentou-se diminuído e inversamente proporcional aos estágios da DRC, indicando que os estágios mais avançados da DRC levam a um maior consumo dos componentes do sistema de defesa antioxidante renal, sugerindo, portanto, uma condição de EO renal já instalada.

A GSH-Px (RANSEL) plasmática, como um componente antioxidante enzimático do organismo, mostrou-se em maior atividade nos cães doentes renais crônicos, no tempo de admissão ao estudo, quando comparada ao grupo controle, apontando, assim como o TAS, para uma tendência ao EO sistêmico.

A atividade da SOD da papa de hemácias, apesar de ter apresentado alterações significativas nos pacientes com DRC, tanto em relação aos estágios, aos tempos do estudo e aos cães controle, foi uma variável que demonstrou um comportamento pouco coerente com o das demais variáveis do EO, dificultando a sua interpretação.

Ainda sobre as variáveis relativas ao EO, destacaram-se a GSH-Px urinária e o TBARS plasmático que variaram significativamente nos cães que já faziam uso da dieta renal anteriormente à admissão ao estudo, mostrando-se como bons biomarcadores para o efeito positivo da dieta no controle do EO.

Ao se avaliar os vários estádios da DRC ao longo dos cinco tempos do estudo, observou-se que os biomarcadores plasmáticos TBARS, TAS e GSH-Px tiveram um comportamento que demonstrou melhora da condição de EO nestes animais à medida em que se avançou no tratamento conservador da DRC.

Apesar do objetivo principal do estudo ser a avaliação de biomarcadores do EO nos cães com DRC, alguns outros pontos relevantes foram observados no decorrer da pesquisa. Devido a amilase sérica ter apresentado um comportamento bastante semelhante ao da creatinina, sem que se observasse alterações nas concentrações séricas de lipase, acredita-se que essa enzima mereça ser mais estudada como um parâmetro de excreção renal. Outro ponto a ser destacado foi o fato do hematócrito, a contagem de hemácias e a hemoglobina, apresentarem-se significativamente diferentes entre os estádios da DRC, com índices abaixo do dos cães controle já no estágio 2, mesmo ainda não havendo anemia. Além disso, a dosagem plasmática do ferro e do IBC (medida indireta da transferrina no sangue) apontaram para ocorrência de anemia “ferropriva” nos cães com DRC, sendo esta, uma causa de anemia que deve ser investigada nestes pacientes.

A avaliação do estresse oxidativo (EO) em cães com DRC é algo desafiador por uma série de questões. O primeiro desafio é a obtenção de um grupo homogêneo de animais a serem estudados, uma vez que a casuística é imprevisível. A heterogeneidade dos cães deste estudo em relação aos estádios da DRC foi um dos fatores que precisou ser levado em consideração no momento da avaliação do EO. Além disso, como cães com DRC em estágio 3 e 4 apresentam uma menor expectativa de vida, tem-se um fator limitador do n amostral, especialmente em estudos longitudinais, como foi o caso desta pesquisa. Assim, é correto pensar que, a medida em que há predomínio de animais em estádios iniciais da DRC no grupo estudado, naturalmente o EO tende a ser subestimado.

Outro desafio é o fato de ainda não haver estudos suficientes que caracterizem o EO e a sua magnitude em cães com DRC, fazendo-se importante analisar o maior número possível de biomarcadores, o que aumenta, consideravelmente, o custo das análises laboratoriais do EO/inflamação. Porém, a pesquisa não deve ser intimidada por estas limitações e precisa avançar, objetivando o melhor entendimento da patogenia da DRC para que outras formas de controle possam ser desenvolvidas e ou aperfeiçoadas. Há revisões bibliográficas a respeito do EO na DRC baseadas principalmente em estudos com humanos e em cobaias, porém, há

poucos estudos prospectivos que possam elucidar qual o comportamento dos biomarcadores do EO no cão com DRC. Sendo assim, acredita-se que este estudo tenha apontado para questões importantes a serem pesquisadas neste complexo universo do EO da DRC na espécie canina. São necessárias mais pesquisas sobre biomarcadores do EO na DRC, citocinas inflamatórias envolvidas, bem como novas estratégias nutricionais que possam amenizar a condição progressiva da DRC imposta pelo processo oxidativo-inflamatório.

7. CONCLUSÕES

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

É possível avaliar a concentração de biomarcadores de EO em cães portadores de DRC.

É possível dosar biomarcadores de EO no concentrado de hemácias, plasma e urina de cães.

Amilase, densidade urinária, albumina, hemograma, TAS e TBARS plasmáticos e TAS urinária devem ser avaliados em cães portadores de DRC, após diagnóstico e estadiamento segundo a IRIS, a fim de auxiliar no monitoramento e em uma conduta terapêutica mais específica.

Os parâmetros laboratoriais dos cães DRC que mais variam ao longo do tempo são: creatinina, ureia, densidade urinária, eritrograma, GSH-Px plasmática, TBARS plasmático e, portanto, devem ser monitorados.

A dieta renal favorece a excreção renal e melhora os parâmetros relacionados ao EO de cães doentes renais crônicos, devendo ser recomendada desde o diagnóstico, independentemente do estágio.

Quanto maior o estágio da DRC, maior é o EO sistêmico e renal.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACIERNO, M.J.; BROWN, S.; COLEMAN, A. E. ACVIM consensus statement: guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J. Vet Intern Med.* v.32, p.1803-1822, 2018.
- AGARWAL, R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin II blockade. *Am J Physiol Renal Physiol.* v.284, p.863-869, 2003.
- ALVARENGA, L.; CARDOZO, L.F.M.F.; BORGES, N.A. et al. Can nutritional interventions modulate the activation of the NLRP3 inflammasome in chronic kidney disease? *Food Research International.* v.136, 2020.
- AMDUR, R.L.; FELDMAN, H.I.; GUPTA, J. et al. Inflammation and progression of CKD: the CRIC study. *Clin J Am Soc Nephrol.* v.11, p.1546-1556, 2016.
- AMINZADEH, M.A.; NICHOLAS, S.B.; NORRIS, K.C.; VAZIRI, N.D. Role of impaired Nrf2 activation in the pathogenesis of oxidative stress and inflammation in chronic tubulo-interstitial nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* v.28, p.2038-2045, 2013.
- ANTUNES, S.A.; CANZIANI, M.E.F. Hpcidina: um importante regulador do metabolismo de ferro na doença renal crônica. *J Bras Nefrol.* v.38(3), p.351-355, 2016.
- ARUNA, G.; DEVI, K. A. Oxidative stress in chronic renal failure. *Int J Pharm Bio Sci.* v. 5 (1), p.127–133, 2014.
- BARTGES, J.W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice.* v.42 (4), p. 669-692, 2012.
- BRENNER, B.M.; MEYER, T.W.; HOSTETTER, T.H. Dietary protein intake and 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. *The New England Journal of Medicine.* v.307(11), p.652-659, 1982.
- BROWN, S.A.; CROWELL, W.A.; BROWN, C.A. et al. Pathophysiology and management of progressive renal disease. *British Veterinary Journal.* v.154, p.93-109, 1997.
- BROWN, S. A. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet Clin Small Anim.* v. 38, p.157-166, 2008.
- BUCHMAN, A.L.; AMENT, M.E.; MOUKARZEL, A. Total serum amylase but not lipase correlates with measured glomerular filtration rate. *J Clin Gastroenterol.* v.16(3), p.204-206, 1993.
- CHALHOUB S, LANGSTON C, EATROFF A. Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. *J Feline Med Surg.* v.13, p.629-640, 2011.
- CHEW, D.J.; DiBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P.A. Chronic Renal Failure. In: *Canine and Feline Nephrology and Urology.* 2ª ed. St. Louis (MO): Elsevier Saunders; 2011. p.145-196.
- FERRARI, C.K.B. Total antioxidant capacity (TAC) in clinical, experimental and nutritional studies. *J Health Sci Inst.* v.28(4), p.307-310, 2010.

- FUQUA, B. K., VULPE, C. D. & ANDERSON, G. J. Intestinal iron absorption. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. v.26, p.115–119, 2012.
- GANZ, T.; NEMETH, E. Heparin and iron homeostasis. *Biochimica et biophysica acta*. v.1823, p.1434–1443, 2012.
- GASPARYAN, A.Y.; AYVAZYAN, L.; MUKANOVA, U. et al. The platelet-to-lymphocyte ratio as an inflammatory marker in rheumatic diseases. *Ann Lab Med*. v.39, p.345-357, 2019.
- GIOVANINNI, L.H. Hiperparatireoidismo secundário renal. In: *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. 1ªed. Rio de Janeiro. Roca; 2015. p.1410-1415.
- GUIMARÃES, L. S. P.; HIRAKATA, V. N. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Revista HCPA*. Porto Alegre, v.32(4), p.503-511, 2012.
- GUPTA, J.; MITRA, N.; KANETSKY, P.A. et al. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol*. v.7, p.1938-1946, 2012.
- IRIS. INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Early Diagnosis of CKD, 2019. Disponível em <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf> Acessado em 24/04/2020.
- IRIS. INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Staging of CKD, 2019a. Disponível em <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf> Acessado em 24/04/2020.
- IRIS. INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Treatment Recommendations for CKD in Dogs, 2019b. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS-DOG-Treatment_Recommendations_2019.pdf> Acessado em 24/04/2020.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6 ed. Burlington: Elsevier, 928p., 2008.
- KARGIN, F. Kidney Diseases and Antioxidative Metabolism in Dogs. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*. v.25, p.607-613, 2001.
- KARPMAN, D.; MANEA, M.; VAZIRI-SANI, F. et al. Platelet Activation in Hemolytic Uremic Syndrome. *Seminars in thrombosis and hemostasis*. v.32(2), 2006.
- KASER, A.; BRANDACHER, G.; STEURER, W. et al. Interleukin-6 stimulates thrombopoiesis through thrombopoietin: role in inflammatory thrombocytosis. *Blood*. v.98(9), p.2720-2725, 2001.
- KEEGAN, R.F.; WEBB, C.B. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. *J Vet Intern Med*. v.24, p.514–519, 2010.
- KENDALL, A.; WOOLCOCK, A.; BROOKS, A.; MOORE, G.E. Glutathione Peroxidase Activity, Plasma Total Antioxidant Capacity, and Urinary F2- Isoprostanes as Markers of Oxidative Stress in Anemic Dogs. *J Vet Intern Med*. v.31(6), p.1700-1707, 2017.

- KLOSTERMAN, E.S.; PRESSLER, B.M. Nephrotic Syndrome in Dogs: Clinical Features and Evidence-Based Treatment Considerations. *Topics in Companion Animal Medicine*. v. 26 (30), p.135–142, 2011.
- KOGIKA, M.M.; LUSTOZA, M.D.; NOTOMI, M.K. et al. Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Vet Clin Pathol*. v.35 (4), p.441- 445, 2006.
- KROFIC, Z.; TOZON, M.N.; SVETE, A.N. Plasma and Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Serum Selenium Concentration, and Plasma Total Antioxidant Capacity in Cats with IRIS Stages I–IV Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*. v.28, p.130-136, 2014.
- LANGSTON, C. Managing Fluid and Electrolyte Disorders in Kidney Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. v.47(2), p.471-490, 2016.
- LEMOES, A.R.; ISMAEL, L.A.S.; BOATO, C.C.M.; BORGES, M.T.F.; RONDÓ, P.H.C. A hepcidina como parâmetro bioquímico na avaliação da anemia por deficiência de ferro. *Rev Assoc Med Bras*.v.56(5), p.596-599, 2010.
- LING, X.C.; KUO, K.L. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Renal Replacement Therapy*. v.4, p.53, 2018.
- MACHOWSKA, A.; CARRERO, J.J.; LINDHOLM, B.; STENVINKEL, P. Therapeutics targeting persistente inflammation in chronic kidney disease. *Translational Research*.v.167(1), p.204-213, 2016.
- MANIAKI, E.; FINCH, N. Chronic kidney disease in cats and dogs: managing proteinúria. *In Practice*. v.40, p. 266-280, 2018.
- MANSFIELD, C.S.; JONES, B.R. Trypsinogen activation peptide in the diagnosis of canine pancreatitis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.14, p.346, 2000.
- MORENO, J.A.; IZQUIERDO, M.C.; SANCHEZ-NIÑO, M.D. et al. The Inflammatory Cytokines TWEAK and TNF_ Reduce Renal Klotho Expression through NFkB. *J Am Soc Nephrol*. v.22. p.1315–1325, 2011.
- NABITY, M.B.; LEES, G.E.; BOGGESS, M.M. et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med*. v.29, p.1036-1044, 2015.
- BERG, B.P.; MCMENAMIN, E.; LUCAS, F.L. et al. Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney International*. v.65, p.1009-1016, 2004.
- OZBEK, E. Induction of Oxidative Stress in Kidney. *International Journal of Nephrology*, 2012. Article ID 465897, 9 pages, doi:10.1155/2012/465897.
- PALOMBA, H.; OKADA V.M. Nutritional support in acute renal injury. In: Homs E. & Palomba H. (Eds), *Acute Kidney Injury in the Critically ill*. Atheneu, São Paulo. 2010, p.149-154
- PELANDER, L.; HÄGGSTRÖM, J.; LARSSON, A. et al. Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.33(1), p. 630-639, 2019.
- PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Rev Nutr*. v.23(2), p.259-267, 2010.

- PIRES, L.S.A.; DITTRICH, R.L.; SOUZA, A.C. et al. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. *Ciência Rural*. v. 41(2), p.272-277, 2011.
- POLZIN, D.J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. v. 23(2), p.205–215, 2013.
- QUEIROZ, L.L.; CASTRO, L.T.S.; ARIZA, P.C. et al. Proteínas de fase aguda (PFA) em cães. *Enciclopédia Biosfera*. v.13(23), p.1085-1096, 2016.
- QUIMBY, J.M. Update on Medical Management of Clinical Manifestations of Chronic Kidney Disease. *Vet Clin Small Anim*. v.46, p.1163–1181, 2016.
- RAJ, D.S.; PECOITS-FILHO, R.; KIMMEL, P.L. Inflammation in chronic kidney disease. In: Kimmel & Rosenberg: Chronic Renal Disease. 2nd ed. [S.l.]: Elsevier, 2020. p.337-353.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- ROSA, D.B.S.K. Aspectos clínicos, laboratoriais e de imagem de cães criticamente enfermos com injúria renal aguda e sua relação com a pancreatite aguda. 2019. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) Escola de Veterinária - UFMG. Belo Horizonte.
- ROSA, D.B.S.K.; VEADO, J.C.C.; CEREGATTI, M.G. et al. Predisposition to acute pancreatitis in dogs with severe acute renal failure acute renal failure. *Pesq Vet Bras*, DOI: 10.1590/1678-5150-PVB-6697, 2021.
- RUDINSKY, A.J.; HARJES, L.M; BYRON, J. ET AL. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. v.32, p.1977–1982, 2018.
- RUSSO, C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Oxidative stress in dogs. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 37, n. 3, p. 1431-1440, 2016.
- SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Prediction of serum ionized calcium concentration by use of sérum total calcium concentration in dogs. *American Journal Veterinary Research*.v.66(8), p.1330-1336, 2005.
- SENER, G.; PASKALOGLU, K.; TOKLU, H. Melatonin ameliorates chronic renal failure-induced oxidative organ damage in rats. *J. Pineal Res*, 2004. Doi:10.1111/j.1600-079X.2004.00113.x.
- SILVA, A.C.R.A.; ALMEIDA, B.F.M.; SOEIRO, C.S. et al. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. v.77, p.136–141, 2013.
- SILVA, L.R.; RODRIGUES, G.B.; DEL BARRIO, M.A.M.; BRISOLA, M.L. Symmetric dimethylarginine (SDMA) evaluation as a marker of glomerular filtration in dogs and cats pre azotemics. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research*, v.4(1), p.157-169, 2021.
- SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N. et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*. v.17, p.311–321, 2012.
- VADEN, S.L.; ELLIOTT, J. Management of proteinuria in dogs and cats with chronic kidney disease. *Vet Clin Small Anim*. v.46, p.1115–1130, 2016.

VALLE, P.G.; VEADO, J.C.C.; ANJOS, T.M. et al. Effect of the association of diet, omega-three, and antioxidants in dogs with chronic kidney disease. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 36(5), p.3161-3172, 2015.

VILAYSANE, A.; CHUN, J.; SEAMONE, M.E. et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD. *J Am Soc Nephrol*.v.21, p.1732-1744, 2010.

WANG, Q.; MA, J.; JIANG, Z.; MING, L. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio and platelet-to-lymphocyte ratio in acute pulmonary embolism: a systematic review and meta-analysis. *International Angiology*. v.37(1), p.4-11, 2018.

WSAVA Global Nutritional Guidelines, 2011.

<http://www.wsava.org/WSAVA/media/Documents/Guidelines/WSAVA-Global-Nutritional-Assessment-Guidelines-2011-final.pdf>

YONG, K.; MORI, T.; CHEW, G. et al. The Effects of OMEGA-3 Fatty Acid Supplementation Upon Interleukin-12 and Interleukin-18 in Chronic Kidney Disease Patients. *J Ren Nutr*. v.29(5), p.377-385, 2019.

YU, S.; PAETAU-ROBINSON, I. Dietary supplements of vitamins E and C and beta-carotene reduce oxidative stress in cats with renal insufficiency. *Vet Res Commun*. v.30(4), p.403-13, 2006.

ZOCCALI, C.; TRIPEPI, G.; MALLAMACI, F. Dissecting inflammation in ESRD: do cytokines and C-reactive protein have a complementary prognostic value for mortality in dialysis patients? *J Am Soc Nephrol*.v.17, p.169-173, 2017.

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido (cães do grupo controle)

Título do projeto: Avaliação do Estresse Oxidativo em Cães na Doença renal Crônica

Pesquisador principal: Profa. Fabiola Oliveira Paes Leme

Razão social e CiaeP instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais – CiaeP: 02.044.2019

Objetivos do estudo: Avaliar a concentração de biomarcadores de EO em cães portadores de DRC

Procedimentos:

Exame físico: Aferição da pressão arterial sistêmica por doppler vascular; inspeção da coloração de mucosas orais e oculares; estado de hidratação através do turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar; medição da frequência cardíaca pela auscultação; contagem da frequência respiratória pela visualização dos movimentos respiratórios por minuto; palpação abdominal e de linfonodos e aferição da temperatura retal por termômetro digital.

Coleta de material para exames: A coleta de sangue será realizada por venopunção da jugular externa, com seringas de 10mL e agulha 25x7mm. Serão colhidos 8mL de amostra. A coleta de urina em fêmeas será feita pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom, utilizando-se seringa de 10mL e agulha 25x7mm. Já a coleta de urina em machos será por meio de sonda uretral. Serão realizadas coletas tanto de sangue quanto de urina em apenas um único dia a ser previamente combinado.

Segundo o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), os procedimentos adotados neste estudo são de grau 1 de invasividade, ou seja, são procedimentos com pouco ou nenhum desconforto para o animal.

Os riscos para os animais com o exame físico, coleta de sangue e de urina são mínimos, uma vez que são procedimentos simples de serem realizados por profissionais treinados. Pode se formar um hematoma na região da coleta do sangue o qual regride em poucos dias, sem nenhum prejuízo à saúde do animal. Caso haja alguma intercorrência, a equipe envolvida prestará a assistência médico veterinária necessária para a condição em questão.

As dosagens do estresse oxidativo nos cães do grupo controle são necessárias pois serão um parâmetro balizador para o estresse oxidativo nos cães portadores de DRC.

Os animais terão a oportunidade de terem um check up realizado sem nenhum custo.

Pretende-se com este estudo analisar mais uma ferramenta (mensuração do estresse oxidativo) que poderá ser útil na definição de novas estratégias para o tratamento conservador da DRC.

Dependendo dos resultados obtidos, este estudo com modelos animais pode estimular estudos semelhantes na área da medicina, podendo, indiretamente, beneficiar pacientes humanos doentes renais crônicos.

Sua autorização para a inclusão do(s) seu(s) animal(is) nesse estudo é voluntária. Seu(s) animal(is) poderá(ão) ser retirado(s) do estudo, a qualquer momento, sem que isso cause qualquer prejuízo a ele(s). A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

A Médica Veterinário responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será Daniela Bastos de Souza Karam Rosa, inscrita no CRMV sob o n.4996. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: 31-98809.5411 (Dra. Daniela)

Daniela Bastos de Souza Karam Rosa (31-98809-5411)

Av. Augusto de Lima, 527 – Barro Preto – Belo Horizonte/MG.

Dra. Roberta (31-97187.9176)

Declaração de consentimento (cães do grupo controle)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2021.

Assinatura do Responsável:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome e assinatura do tutor:

Documento de Identidade:

Identificação do(s) animal(is):

Nome:

Nº identificação:

Espécie:

Raça:

Nome:

Nº identificação:

Espécie:

Raça:

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido (cães doentes renais crônicos)

Título do projeto: Avaliação do Estresse Oxidativo em Cães na Doença renal Crônica

Pesquisador principal: Profa. Fabiola Oliveira Paes Leme

Razão social e Ciaep instituição da CEUA que aprovou: Universidade Federal de Minas Gerais – Ciaep: 02.044.2019

Objetivos do estudo: Avaliar a concentração de biomarcadores de EO em cães portadores de DRC.

Procedimentos:

Exame físico: Aferição da pressão arterial sistólica por doppler vascular; inspeção da coloração de mucosas orais e oculares; estado de hidratação através do turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar; medição da frequência cardíaca pela auscultação; contagem da frequência respiratória pela visualização dos movimentos respiratórios por minuto; palpação abdominal e de linfonodos e aferição da temperatura retal por termômetro digital.

Coleta de material para exames: A coleta de sangue será realizada por venopunção da jugular externa, com seringas de 10mL e agulha 25x7mm. Serão colhidos 8mL de amostra. A coleta de urina em fêmeas será feita pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom, utilizando-se seringa de 10mL e agulha 25x7mm. Já a coleta de urina em machos será por meio de sonda uretral. Serão realizadas um total de cinco coletas tanto de sangue quanto de urina, nos seguintes dias do estudo: 1º, 30º, 60º, 120º, 180º.

Segundo o CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), os procedimentos adotados neste estudo são de grau 1 de invasividade, ou seja, são procedimentos com pouco ou nenhum desconforto para o animal.

Os riscos para os animais com o exame físico, coleta de sangue e de urina são mínimos, uma vez que são procedimentos simples de serem realizados por profissionais treinados. Pode se formar um hematoma na região da coleta do sangue o qual regride em poucos dias, sem nenhum prejuízo à saúde do animal. Caso haja incômodo ou alguma intercorrência durante o período deste estudo, a equipe envolvida prestará a assistência médico veterinária necessária para a condição em questão.

Este estudo consiste em um período de 180 dias (6 meses) composto por cinco visitas ao Hospital Veterinário (no 1º, 30º, 60º, 120º e 180º dias do estudo). Nestas visitas serão realizados o exame clínico e a coleta de sangue e urina, para análise do estresse oxidativo.

Os cães participantes deste estudo terão assistência médico veterinária em relação à doença renal crônica (DRC), constando de orientações, exame clínico e exames laboratoriais necessários ao acompanhamento desta condição. Além disto, serão fornecidos aos mesmos, a dieta renal e o Gerioox (fonte de ômega e outros antioxidantes), os quais fazem parte do

tratamento conservador da DRC proposto pela IRIS (International Renal Interest Society) em 2019. Desta forma, estes animais serão beneficiados pelo acompanhamento minucioso do seu estado geral em relação à DRC e pelo fornecimento da dieta adequada e do Gerioox.

Pretende-se com este estudo analisar mais uma ferramenta (mensuração do estresse oxidativo) que poderá ser útil na definição de novas estratégias para o tratamento conservador da DRC.

Dependendo dos resultados obtidos, este estudo, com modelos animais, pode estimular estudos semelhantes na área da medicina, podendo, indiretamente, beneficiar pacientes humanos doentes renais crônicos.

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

A confidencialidade dos seus dados pessoais será preservada. Os membros da CEUA ou as autoridades regulatórias poderão solicitar suas informações e, nesse caso, elas serão dirigidas especificamente para fins de inspeções regulares.

A Médica Veterinária responsável pelo(s) seu(s) animal(is) será Daniela Bastos de Souza Karam Rosa, inscrita no CRMV-MG sob o n.4996. Além dela, a equipe do Pesquisador Principal também se responsabilizará pelo bem-estar do (s) seu (s) animal (is) durante todo o estudo e ao final dele. Quando for necessário, durante ou após o período do estudo, você poderá entrar em contato com o Pesquisador Principal ou com a sua equipe pelos contatos:

Tel. de emergência: 31-98809.5411 (Daniela)

Daniela Bastos de Souza Karam Rosa (31-98809-5411)

Av. Augusto de Lima, 527 – Barro Preto – Belo Horizonte/MG

Dra. Roberta (31-97187.9176)

Declaração de consentimento (cães doentes renais crônicos)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador.

Belo Horizonte, _____ de _____ de 2021.

Assinatura do Responsável:

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome e assinatura do tutor:

Documento de Identidade:

Identificação do(s) animal(is):

Nome:

Nº identificação:

Espécie:

Raça:

Nome:

Nº identificação:

Espécie:

Raça:

ANEXO C - Procedimento operacional padrão da separação do concentrado de hemácias

1. O sangue do tubo de tampa verde deve ser centrifugado a 3000 RPM por 5 min (Detalhe: a amostra deverá estar a temperatura ambiente e a rotação deve ser aumentada gradativamente, para evitar hemólise (500 rpm a cada 30''))
2. Após centrifugação, aliquotar o plasma para ependorfs de cor azul, usando pipeta de Paster (que deverá ser identificada com o nome do animal), até retirar todo o plasma do tubo. Identificar os ependorfs com nome cão, número do atendimento, e o tempo de coleta – ex: T1, T2, etc). Na tampa do ependorf colocar apenas o nome do cão e o tempo de coleta. Ao pipetar o plasma, cuidado para não atingir a porção sólida (papa de hemácias).
3. Com uma pipeta de Pasteur destinada para solução salina 0,9%, acrescentar uma quantidade de salina igual à quantidade da papa de hemácias, no próprio tubo de tampa verde, no qual o plasma foi retirado. OBS: Depositar, delicadamente, a solução fisiológica pela parede do tubo, e não diretamente sobre as hemácias.
4. Homogeneizar delicadamente, invertendo o tubo 6 a 8 vezes.
5. Centrifugar a 3000 RPM por 10 min (Detalhe: a rotação deve ser aumentada gradativamente, para evitar hemólise → 500 rpm a cada 30'').
6. Retirar todo o sobrenadante, com a pipeta de Paster utilizada anteriormente para retirar o plasma. Descartar o sobrenadante.
7. Repetir os itens 3, 4, 5 e 6 mais duas vezes, totalizando 3 lavagens da papa de hemácias com salina a 0,9%.
8. Utilizando uma pipeta automática, com uma ponteira nova, chegar até o fundo do tubo e aspirar a papa de hemácias, transferindo-a para criotubos (identificados com nome cão, número do atendimento, tempo de coleta). Na tampa do tubo basta o nome do cão e o tempo de coleta.
9. Colocar os criotubos em refrigerador de 2 a 8°C, por pelo menos 20 minutos. Em seguida, armazená-los no freezer a -80°C.