

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

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS COMO FATORES  
PREDITIVOS, MARCADORES DE PROGNÓSTICO E ELABORAÇÃO DE  
ÍNDICE QUANTITATIVO E MULTIFATORIAL PARA AVALIAÇÃO DE  
EVOLUÇÃO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA*  
*INFANTUM*.**

FELIPE DOS SANTOS MUNIZ

BELO HORIZONTE

2022

FELIPE DOS SANTOS MUNIZ

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS COMO FATORES PREDITIVOS, MARCADORES DE PROGNÓSTICO E ELABORAÇÃO DE ÍNDICE QUANTITATIVO E MULTIFATORIAL PARA AVALIAÇÃO DE EVOLUÇÃO DE CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEISHMANIA INFANTUM*.**

**Versão Final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Adriane Pimenta da Costa-Val Bicalho

**Coorientador:** Prof. Júlio Cesar Cambraia Veado

BELO HORIZONTE

2022

M966a Muniz, Felipe dos Santos, 1984-  
Avaliação de biomarcadores fisiológicos como fatores preditivos, marcadores de prognósticos e elaboração de índice quantitativo e multifatorial para avaliação de evolução de cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* / Felipe dos Santos Muniz . -2022.  
101...il.

Orientadora: Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho  
Coorientador: Júlio Cesar Cambraia Veado  
Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre.  
Bibliografia: f. 75 a 96.

1. Cão - Teses - 2. Leishmania - Teses - 3. Veterinária - Teses - I. Costa Val, Adriane Pimenta da - II. Veado, Júlio Cesar Cambraia - III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. 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

FELIPE DOS SANTOS MUNIZ

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina Veterinária Preventiva.

Aprovado(a) em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Julio Cesar Cambraia Veado

Dr.(a). Vitor Márcio Ribeiro

Dr.(a). Rubens Antônio Carneiro



Documento assinado eletronicamente por **Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho, Cidadã**, em 03/03/2022, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rubens Antonio Carneiro, Professor do Magistério Superior**, em 03/03/2022, às 21:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vitor Marcio Ribeiro, Usuário Externo**, em 04/03/2022, às 15:51, 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 08/03/2022, às 11:19, 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](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1265979** e o código CRC **86064AEC**.

## AGRADECIMENTOS

Esta fase da minha vida é muito especial e não posso deixar de agradecer a Deus por toda força, ânimo e coragem que me ofereceu para ter alcançado minha meta.

Aos meus pais, Paulo e Conceição por todo o carinho e amor incondicional. Mesmo com a distância sempre se mantiveram presentes, com palavras de carinho e suporte durante todo este percurso da pós-graduação.

Minha esposa, Fernanda pelo amor, carinho e compreensão. Sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, sempre me incentivando a buscar novos conhecimentos.

Ao meu irmão, Ricardo por sempre estar presente e apoiando em todos os momentos.

À minha orientadora, professora Adriane por todos os ensinamentos, paciência, por confiar em mim e me acolher como orientado.

Ao meu Coorientador, professor Júlio, pela disposição e prontidão em ajudar e por sempre compartilhar seu conhecimento.

À Rubi e Deka por todos os momentos de alegria e descontração.

À Universidade Federal de Minas Gerais, quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos e com todas as condições que me proporcionaram dias de aprendizagem muito ricos.

À equipe da clínica Prisma Vet pela ajuda e proporcionar tempo para a realização desta etapa.

À equipe do Santo Agostinho Hospital Veterinário, em especial ao Dr, Vitor Ribeiro e Dr. Fernando Ernesto pelos ensinamentos e disposição em contribuir com o trabalho de pesquisa.

É claro que não posso esquecer-me dos amigos, porque foram eles que me incentivaram e inspiraram através de gestos e palavras a superar todas as dificuldades.

A todas as pessoas que de uma alguma forma me ajudaram a acreditar em mim eu quero deixar um agradecimento eterno, porque sem elas não teria sido possível.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”.

(Arthur Schopenhauer)

## **RESUMO**

O comprometimento da função renal é uma das principais características em cães infectados pela *Leishmania infantum*. O diagnóstico precoce da lesão renal é de extrema importância para a melhora do prognóstico do paciente. Atualmente os estadiamentos propostos para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose são qualitativos, utilizando a creatinina sérica e a razão proteína creatinina urinária para avaliação da injúria e insuficiência renal. Este trabalho foi dividido em dois capítulos com objetivos de avaliar os biomarcadores fisiológicos como fatores preditivos de injúria renal e marcadores de prognóstico, além de propor um índice quantitativo e multifatorial. Foram avaliados cães de raças, idades e sexo variados naturalmente infectados por *L. infantum*. Os biomarcadores fisiológicos que apresentaram resultados positivos como fatores preditivos e marcadores de prognóstico foram as plaquetas, leucócitos, hematócrito, fósforo sérico, densidade e pressão arterial sistêmica. A proposta de índice através de modelamento matemático permitiu a previsão de resultados que correspondiam ao quadro clínico dos cães, avaliando o grau de lesão renal e atuando como marcador de prognóstico. Novos estudos prospectivos e multicêntricos devem ser realizados para avaliação do índice.

**Palavras-chave:** Sobrevivência; Prognóstico; Sistema de Pontuação; IRA; LVC



## **ABSTRACT**

Decrease of renal function is one of the main features in dogs infected with *Leishmania infantum*. Early diagnosis of kidney injury is extremely important to improve the patient's prognosis. Currently, the staging proposed for the diagnosis and treatment of leishmaniasis are qualitative, using serum creatinine and urinary protein creatinine ratio to evaluate the injury and renal failure. This work was divided into two chapters with the aim of evaluating physiological biomarkers as predictors of kidney injury and prognostic markers, in addition to proposing a quantitative and multifactorial index. Dogs of different breeds, ages and sex, naturally infected with *L. infantum* were evaluated. The physiological biomarkers that showed positive results as predictive factors and prognostic markers were platelets, leukocytes, hematocrit, serum phosphorus, urinary density and systemic blood pressure. The index proposal through mathematical modeling allowed the prediction of results that corresponded to the clinical condition of the dogs, evaluating the degree of kidney injury and acting as a prognostic marker. New prospective and multicenter studies should be performed to evaluate the index.

**Key Word:** Survivor; Prognosis; Scoring System; AKI; LCan.

## Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma para abordagem diagnóstica em cães com ou sem manifestações clínicas de Leishmaniose, sugeridas pelo grupo Brasileish (2018)	24
---	----

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Número de cães classificados em cada estágio Leishvet (2011)	33
Gráfico 2: Análise do analito peso (kg)	35
Gráfico 3: Análise do analito idade	35
Gráfico 4: Análise do analito SDMA sérica ( $\mu\text{g/dL}$ )	36
Gráfico 5: Análise do analito uréia sérica (mg/dL)	36
Gráfico 6: Análise do analito creatinina sérica (mg/dL)	37
Gráfico 7: Análise do analito fósforo sérico (mg/dL)	37
Gráfico 8: Análise do analito globulina sérica (g/dL)	38
Gráfico 9: Análise do analito albumina sérica (g/dL)	38
Gráfico 10: Análise do analito proteínas séricas totais (g/dL)	39
Gráfico 11: Análise do analito hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	39
Gráfico 12: Análise do analito hematócrito (%)	40
Gráfico 13: Análise do analito plaquetas (ml/ $\mu\text{l}$ )	40
Gráfico 14: Análise do analito reticulócitos ( $/\text{mm}^3$ )	41
Gráfico 15: Análise do analito leucócitos ( $/\mu\text{l}$ )	41
Gráfico 16: Análise do analito densidade urinária	42
Gráfico 17: Análise do analito razão proteína creatinina urinária	42
Gráfico 18: Análise do analito creatinina urinária (mg/dL)	43
Gráfico 19: Análise do analito proteína urinária (mg/dL)	43
Gráfico 20: Análise do analito pressão arterial sistêmica (mmHg)	44
Gráfico 21: Número de cães com SDMA sérica acima dos valores de referência em cada estágio Leishvet (2011)	45
Gráfico 22: Dispersão dos cães levando em consideração o estadiamento e os valores obtidos nas variáveis estudadas	47

Gráfico 23: Progressão dos cães em T0 e T1 levando em consideração o estadiamento e os valores obtidos nas variáveis estudadas	48
Gráfico 24: Resultados obtidos através da aplicação do índice em cada grupo	72

### Lista de Tabelas

Tabela 1: Critérios de classificação da LVC segundo a Leishvet (2011)	25
Tabela 2: Critérios de classificação da LVC segundo o Brasileish (2018)	26
Tabela 3: principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos, quartis, mediana, coeficiente de variação, número e porcentagem de valores válidos) dos biomarcadores fisiológicos dos 59 cães naturalmente infectados por <i>L. infantum</i> avaliados no estudo	33
Tabela 4: Correlações consideradas moderadas e fortes entre os biomarcadores avaliados no estudo	45
Tabela 5: Correlações entre as variáveis estudadas em T0 e T1 que apresentaram significativa estatística	48
Tabela 6: Correlação das variáveis em T0 em conjunto com as variáveis de cães que apresentem creatinina menor que 1,4 mg/L que apresentaram significativa estatística	49
Tabela 7: Melhores modelos, ordenados pelo AIC do maior para o menor	67
Tabela 8: Classificação dos animais utilizando o modelo 1 quanto ao índice estimado comparado o índice real observado	68
Tabela 9: Classificação dos animais utilizando o modelo 2 quanto ao índice estimado comparado o índice real observado	69
Tabela 10: Principais índices de estatística descritiva separados por grupos levando em consideração o quadro clínico do paciente	69
Tabela 11: Principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos) separados por estágio Leishvet (2011)	70
Tabela 12: Percentual de internações, insuficiência renal (IR) e mortes em intervalos do índice obtidos no estudo	73

## Lista de Abreviaturas

DNA	Ácido desoxirribonucleico
ALB	Albumina Sérica
CREAT	Creatinina sérica
CREAT UR	Creatinina urinária
C3	Componente 3 do sistema complemento
dL	Decilitro
DEN UR	Densidade urinária
SDMA	Dimetil arginina simétrica
DRC	Doença renal crônica
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
ECA	Enzima conversora de angiotensina
TNF	Fator de necrose tumoral alpha
FOSF	Fósforo Sérico
GLOB	Globulina sérica
GLI	Glicosil fosfatidil inositol
HTC	Hematócrito
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
Ig	Imunoglobulina Monoclonal
INF	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IRA	Injúria renal aguda
IR	Insuficiência renal

LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
PLAQ	Plaquetas
PA	Pressão arterial sistêmica
PROT	Proteínas séricas totais
RPCU	Razão proteína creatinina urinária
RIFI	Reação de Imuno-florescência Indireta
PCR	Reação em cadeia da polimerase
IRIS	Sociedade internacional de interesse renal
TFG	Taxa de filtração glomerular

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS COMO FATORES DE PREDIÇÃO E MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania infantum</i></b>	
<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>17</b>
1.1 Patogenia .....	17
1.2 Achados da patologia clínica .....	20
1.3 Diagnóstico da infecção por <i>leishmania infantum</i> .....	21
1.3.1 Exames diretos ou parasitológicos .....	22
1.3.2 Exames sorológicos .....	23
1.4 Estadiamento da leishmaniose visceral canina .....	24
1.5 Tratamento .....	28
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>29</b>
<b>3. OBEJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivo geral .....	30
3.2 Objetivo específico .....	30
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
4.1 Animais .....	30
4.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina .....	31
4.3 Exames laboratoriais .....	31
4.4 Mensuração de pressão arterial sistêmica .....	32
4.5 Análise estatística .....	32
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO II: ELABORAÇÃO DE ÍNDICE QUANTITATIVO E MULTI FATORIAL PARA A AVALIAÇÃO DE LESÃO RENAL DE CÃES, NATURALMENTE INFECTADOS POR <i>Leishmania infantum</i></b>	

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>59</b>
1.1 Nefropatia na leishmaniose visceral canina .....	59
1.2 Glomerulonefrites .....	61
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>62</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>63</b>
3.1 Objetivo geral .....	63
3.2 Objetivo Específico .....	63
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
4.1 Animais .....	63
4.2 Diagnóstico da leishmaniose visceral canina .....	65
4.3 Exames laboratoriais .....	65
4.4 Mensuração de pressão arterial sistêmica .....	65
4.5 Análise estatística .....	66
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>66</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>97</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa, sistêmica e zoonótica causada pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelas fêmeas de flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* infectadas (Dantas-Torres e Brandão-Filho, 2006). Na América do Sul, o número de cães infectados é estimado em milhões e, especialmente no Brasil, existem altas taxas de infecção (Marcondes e Day, 2019).

Os cães infectados podem desenvolver a leishmaniose visceral canina (LVC) que pode acometer diversos órgãos e, dessa forma, apresentar diversas características clínicas, podendo variar desde aparente estado sadio, até doença grave e morte, dependendo da resposta imune desencadeada pelo paciente (Moura et al., 2002).

Dentre as alterações clínicas observadas nos animais infectados, o comprometimento da função renal é bastante frequente (Braga et al., 2015). A formação e deposição de imunocomplexos secundários a LVC podem causar glomerulonefrites e lesões túbulo intersticiais (Frazilio et al., 2018), sendo que alguns autores consideraram que as lesões túbulo intersticiais ocorrem secundariamente à glomerulopatia (Pardo-Marín et al., 2017; Frazilio et al., 2018).

Achados laboratoriais comuns na LVC como a hipoalbuminemia causada pela perda glomerular da albumina sérica e/ou menos produção hepática, a hiperglobulinemia causada pela ativação das células B policlonais e consequente produção de anticorpos (Moura et al., 2002) e a proteinúria renal, que é um reflexo do aumento da permeabilidade do capilar glomerular especialmente a albumina, estão associados a produção de imunocomplexos e podem ser indícios de uma injúria renal (Moura et al., 2002; D'amico e Bazzi, 2003; Brown et al., 2013; Ibba et al., 2016).

A não resolução da injúria renal pode causar a evolução do quadro para alteração estrutural renal, causando disfunção excretora devido a comprometimento da taxa de filtração glomerular (TFG), podendo ser instalado quadro de insuficiência renal que pode evoluir para a condição de doença renal crônica ou, se não tratada em tempo, para o óbito do paciente (García-martínez et al., 2015; Cowgill, 2016; Proverbio et al., 2016).



Pacientes em quadros de insuficiência renal (IR), além das alterações dos biomarcadores de injúria renal, apresentam alterações estruturais renais, tendo comprometimento da função renal, podendo apresentar alterações em biomarcadores renais como a creatinina sérica, dimetil arginina simétrica (SDMA) sérica, ureia sérica, fósforo sérico, densidade urinária e quadros anemia (Lees, 2004; Cortadellas et al., 2009; Loor et al., 2013).

A associação de biomarcadores em índices quantitativos e multifatoriais é utilizada na medicina desde os anos 1980, com objetivo preditivo em pacientes em cuidados intensivos e em emergências (Mccarthy, 1996; Fiaccadori et al., 2000). Na medicina veterinária, Segev et al. (2008) propuseram um índice contínuo e multifatorial para avaliação preditiva da injúria renal aguda (IRA) em cães realizando tratamento com hemodiálise, indicando que pacientes com valores mais elevados no índice apresentavam maior probabilidade de óbito. Em 2020, De Souza Gonçalves *et al.* propuseram modelamento matemático utilizando biomarcadores preditivos para avaliação da resposta terapêutica em cães infectados por *L. infantum*. Antes desse estudo, os estudos sobre fatores de prognóstico para o sucesso ou fracasso do tratamento da LVC eram restritos à medicina (Costa et al., 2016; Tourinho et al., 2017).

A análise de biomarcadores fisiológicos como marcadores de prognóstico, fatores de predição e a sugestão de um índice quantitativo multifatorial utilizando um conjunto de biomarcadores de injúria, de insuficiência e de doença renal é desejável, visto que pode auxiliar na avaliação de injúria renal em estágio inicial, avaliar sua gravidade, além de orientar as estratégias para o tratamento e resultados terapêuticos.

# **CAPÍTULO I: AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES FISIOLÓGICOS COMO FATORES DE PREDIÇÃO E MARCADORES DE PROGNÓSTICO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

## **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1 PATOGENIA:**

A infecção em cães por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante à infecção humana, embora no cão, além do acometimento das vísceras, são frequentemente encontradas lesões de pele em animais infectados, podendo levar a um quadro clínico diversificado denominado Leishmaniose Visceral Canina (LVC) ou Leishmaniose Canina (LCan) (Krauspenhar et al., 2007; Ribeiro, 2020).

O quadro clínico é variável e depende da resposta imune do cão e da cepa do parasita inoculado pela picada do inseto vetor infectado (Michalick e Genaro, 2005 citado por De Castro, 2012). A resposta imunológica envolve a atividade dos linfócitos T, macrófagos e o perfil de produção de citocinas por linfócitos T helper (Th) CD4+. Assim, o animal pode estabelecer resposta do tipo Th1 ou Th2 frente ao parasita. As células Th1 produzem IL-2 (interleucina-2), TNF- (fator de necrose tumoral alfa) e INF- (interferon gama), resultando na ativação de macrófagos e conferindo resistência à infecção. Em contraste, células do tipo Th2, que produzem IL-4, IL-5 e IL-10, estimulam uma resposta de linfócitos B que inibe a resposta celular protetora, tornando o hospedeiro susceptível à progressão da doença (Barbiéri, 2006).

No período inicial da infecção em cães susceptíveis, ocorre uma síndrome geral inespecífica, como perda de peso e linfadenopatia (De Lima et al., 2007) que pode passar despercebida, ou até mesmo, ser confundida com outras enfermidades (Grima, 2005) ou associada a outras infecções (Ribeiro, 2020). A progressão da doença é, em geral, crônica e pode levar ao óbito. Entre os sinais clínicos, destacam-se a hipergamaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, anemia e linfadenopatia (De Lima et al., 2007; Krauspenhar et al., 2007; Marcondes e Rossi, 2013; Ribeiro, 2020)

Além disso, alterações dermatológicas podem estar presentes em mais de 50% dos animais infectados (Alvar et al., 2004; Travi et al., 2009) e tem características e extensões variáveis, sendo as mais comuns. Destas, as dermatites que podem ser classificadas como esfoliativa, ulcerativa, nodular ou pustular estéril, hiperqueratose nasal ou de coxim, onicogribose, ulceração de mucosa (Lombardo et al., 2014), às quais estão, frequentemente, relacionadas à ação direta do parasito ou à vasculite necrosante, causada pela deposição de imunocomplexos (Travi et al., 2009).

É comum que ocorra comprometimento renal devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos podendo acarretar glomerulonefrite membranoproliferativa e nefrite intersticial, muitas vezes sendo esta, a principal causa da morte de cães com LVC (Lopez et al., 1996). A nefropatia pode ser causada pelo infiltrado de células T CD4+ detectadas na região glomerular e intersticial dos rins de cães naturalmente infectados com *L. chagasi* (Costa et al., 2000). A *L. chagasi* atualmente é reconhecida como *L. infantum* (Ribeiro, 2020). A IR pode estar presente em cães sem os sinais clínicos sistêmicos de leishmaniose (Ciaramella et al., 1997), como nos estudos de Da Costa et al., (2003) e Moura et al., (2002), demonstrando que em quase 100% dos cães infectados ou doentes foram observadas micro ou macro lesões renais.

Nos órgãos linfoides ocorre a proliferação linfoplasmohistiocitaria, resultando na linfadenomegalia generalizada (Krauspenhar et al., 2007). As lesões hepáticas caracterizam-se por inflamações granulomatosas, hiperplasia e hipertrofia das células de Kupffer, que foram encontradas albergando parasitas (Tafuri et al., 1996; Xavier et al., 2006). Os linfonodos podem conter lesões hipertróficas nas regiões corticais e medulares com amastigotas dentro de macrófagos medulares (Lima et al., 2004). No baço foi observada reação inflamatória crônica e difusa, com macrófagos organizados em granulomas e repletos de amastigotas (Xavier et al., 2006). Na medula óssea, como em outros órgãos linfoides é característica a hipertrofia e a hiperplasia das células. A hipoplasia e aplasia medulares podem resultar em anemia e trombocitopenia. (Tafuri et al., 2004; Krauspenhar et al., 2007).

O coração pode apresentar miocardite multifocal com inflamação linfohistioplasmocitaria acentuada, acompanhada por necrose e degeneração das fibras miocárdicas. Os danos às células cardíacas acontecem pela resposta imune do animal frente à infecção, degenerando as células adjacentes pela presença de infiltrado inflamatório. A presença e envolvimento do parasita como sendo a causa de tais lesões foi evidenciada por técnicas de imunomarcção (Ferrari et al., 2006).

Alterações oftálmicas também são relatadas, ocorrendo em associação a sinais sistêmicos da doença, como queratoconjuntivite, blefarite, inflamação mononuclearplasmocitaria do trato uveal e edema de córnea, formação de sinéquia, lesões em corpo ciliar e íris podem estar associados a depósito de imunocomplexos nestas áreas, fato que pode ser corroborado pela presença de anticorpos específicos anti *Leishmania* em vários tecidos intraoculares, podendo significar lesões de origem imunopatológica (Ciaramella et al., 1997; Brito et al., 2004; Luvizotto, 2006).

No trato gastrointestinal foram observadas diarreia crônica e melena, devido às ulcerações na mucosa gástrica intestinal. A enterite pode ser resultado de dano parasitário direto ou consequência de uma IR (Adamama-Moraitou et al., 2007). Colite ulcerativa e erosiva também podem estar presentes. Inflamações do trato intestinal podem alcançar desde a mucosa até a muscular da submucosa (Luvizotto, 2006).

Alterações neurológicas associadas com LVC como letargia, convulsões, mioclonias, nistagmo, tremores, paralisia de mandíbula, ptose labial, andar em círculos, tetraparesia e rigidez raquial e cervical são descritas. Os sintomas neurológicos na LVC estão associados à inflamação meningial crônica com infiltrado linfoplasmocitario (Viñuelas et al., 2001). Altos níveis de anticorpos anti *Leishmania* são encontrados no líquido cefalorraquidiano vindos, provavelmente, da circulação sanguínea através do rompimento da barreira hematocerebral ocasionado pela *Leishmania* (Lima et al., 2003; Feitosa et al., 2005). Também está identificada presença de formas amastigotas em tecido cerebral e no fluido cefalorraquidiano (Gianuzi et al., 2017).

A LVC também pode manifestar lesões osteológicas e osteoproliferativas de diáfises ósseas com sinais de atrofia muscular (Souza, et al., 2005). O depósito de

imunocomplexos nas articulações pode causar poliartrite, sendo possível, em raros casos, a identificação de formas do parasito no líquido sinovial, onicogribose e atrofia muscular (Luvisotto, 2006; Aguiar et al., 2007).

Hemorragias podem ocorrer em cães infectados pela LV devido à hiperglobulinemia, sequestro esplênico de plaquetas, hipoplasia medular, vasculite por imunocomplexos, uremia e epistaxe (Luvizotto, 2006).

A desordem imunológica também pode originar doenças oportunistas concomitantes a LVC como cistites, pneumonias bacterianas, piodermites, malasseziose, dermatofitoses, demodicose e ainda co-infecções com outros agentes, como *Babesia* e *Dirofilaria* (Luvizotto, 2006).

## **1.2 ACHADOS DA PATOLOGIA CLÍNICA:**

O diagnóstico da LVC é complexo, devido ao amplo espectro clínico e diversidade de anormalidades clínico-patológicas inespecíficas observadas no hemograma, perfil bioquímico e urinálise. Porém estes parâmetros fornecem importantes subsídios para avaliação do estado clínico do animal e prognóstico da evolução da doença (Saridomichelakis, 2009).

O eritrograma de cães infectados por *L. infantum* pode apresentar anemia leve a moderada, que geralmente se apresenta na forma normocítica e normocrômica com caráter não regenerativo (Mattos Jr et al., 2004; Medeiros et al., 2008). Essa característica pode ser consequência de invasão parasitária da medula óssea produzindo inflamação que pode contribuir para a diminuição da produção de eritrócitos (Aguiar et al., 2007; Costa Val et al., 2007), bem como, diminuição dos níveis séricos de eritropoetina, doença inflamatória crônica, deficiências nutricionais, perda de sangue por ulcerações em mucosa nasal, do trato gastrointestinal (Feitosa, 2006).

Outra alteração frequente é a hiperproteinemia, por ativação dos linfócitos B e elevada produção de anticorpos (Medeiros et al., 2008). Ocorre também diminuição da produção de albumina sérica ou perda através da proteinúria e o aumento dos níveis séricos de globulinas fazendo que os níveis de proteínas plasmáticas totais aumentem significativamente durante a LVC (Giunchetti et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009)

promovendo inversão da fração albumina/globulinas durante a evolução da LVC (Ribeiro, 2020).

A trombocitopenia também é comum e ocorre pela vasculite causada pelos imunocomplexos circulantes, distúrbios de trombocitopoiese e destruição plaquetária (Medeiros et al., 2008).

A resposta leucocitária se altera de acordo com a fase da doença. Portanto, em alguns animais, pode ocorrer leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda principalmente em casos de infecção bacteriana secundária. A linfopenia é frequente e ocorre por sequestro dessas células no baço e linfonodos, bem como pela destruição causada pela *Leishmania*. A monocitose ocorre por mecanismo compensatório à presença de linfopenia (Medeiros et al., 2008). Outras alterações comuns, como eosinopenia, monocitopenia estão geralmente associadas à doença clínica severa. A linfocitose pode ser observada em cães assintomáticos (Nicolato et al., 2003; Solano-Gallego et al., 2009).

Nas provas de função renal, a uréia, creatinina e a SDMA séricas podem se apresentar de normais a azotemia ou uremia (Mattos Jr. et al., 2004; Brasileish, 2018). Em relação à urinálise, a proteinúria é a alteração descrita mais frequentemente, variando de cerca de 70% a 100% dos animais portadores de LVC, seja em graus discretos ou até mesmo graves. Em alguns animais, a proteinúria pode ser tão grave que chega a determinar alterações nos valores de normais proteínas plasmáticas (Amusategui et al., 2003; Bonfanti e Zatelli, 2004).

A função hepática também pode estar normal ou com alteração sugestiva de hepatopatias (Mattos Jr. et al., 2004), que podem ser detectadas pelo aumento da atividade das enzimas hepáticas como a fosfatase alcalina e a alanina aminotransferase (Rallis et al., 2005; Abreu-Silva et al., 2008).

### **1.3 DIAGNÓSTICO DA INFECÇÃO POR *Leishmania infantum*:**

Tanto o diagnóstico da infecção por *L. infantum* quanto seu estadiamento clínico são tarefas complicadas devido ao longo período de incubação com diferentes cargas

parasitárias e títulos de anticorpos, curso prolongado da enfermidade, alto pleomorfismo das lesões e à associação com infecções secundárias oportunistas (Solano-Gallego et al., 2011; Faria et al., 2012; Brasileish, 2018; Ribeiro, 2020).

Atualmente, os principais métodos laboratoriais para o diagnóstico da infecção por *L. infantum* são os parasitológicos, sorológicos e moleculares (Gomes et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2011; Brasileish, 2018).

O papel da carga parasitaria e dos títulos de anticorpos na determinação do estadiamento da infecção (Ribeiro, 2020)

### **1.3.1 Exames Diretos ou Parasitológicos:**

A microscopia é o teste padrão ouro para o diagnóstico da infecção. O teste é realizado com amostras teciduais, como baço (93-98,7% de sensibilidade), medula óssea (52-85% de sensibilidade) e linfonodos (52-58% de sensibilidade) (Fonseca, 2013). Nos esfregaços teciduais as formas amastigotas podem ser evidenciadas. A desvantagem do método é a técnica arriscada e dolorosa de aspirado de baço e medula óssea. A especificidade desse método é de aproximadamente 100% e a sensibilidade é em torno de 80% em cães sintomáticos (Brasil, 2006; Fonseca, 2013).

A cultura *in vitro* de diferentes tecidos também é usada para aumentar a sensibilidade do exame parasitológico, porém possuem as mesmas desvantagens dos exames histopatológicos e o resultado final pode demorar até quatro semanas, tornando o método inviável (Lindsay e Zajac, 2002; Gomes et al, 2008).

Outra ferramenta muito útil no diagnóstico das leishmanioses utilizada na pesquisa e que tem sido desenvolvida nos últimos anos, é o método molecular baseado na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Oliveira, 2015). Esta técnica tem demonstrado maiores sensibilidade e especificidade (Santos, 2013). Em estudo desenvolvido por Portella (2018), houve sensibilidade de 100% no teste de PCR para animais infectados por *Leishmania*. As principais vantagens do uso da PCR constituem na sua maior sensibilidade, possibilitando a identificação de material genético de *Leishmania* mesmo em quantidades mínimas, além de a técnica não depender do isolamento e cultivo do parasito, levando uma maior rapidez do diagnóstico (Brito e

pereira, 2014). Para Solano-Gallego et al. (2009) a aplicação da PCR em conjunto com a sorologia pode ajudar a determinar a extensão da infecção subclínica da doença em áreas endêmicas, como observado na Europa. A PCR detecta o DNA do parasita antes da soroconversão enquanto os testes sorológicos têm sensibilidade aumentada com a progressão da doença com o aumento no título de anticorpos (Quinnel et al., 2001).

### **1.3.2 Exames Sorológicos:**

A resposta humoral específica apresentada na LVC é muito intensa e com elevada presença de níveis de anticorpos anti *Leishmania* IgG e por esta razão os testes de diagnóstico sorológico são amplamente utilizados. Os principais testes sorológicos utilizados são os de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) e os testes imunocromatográficos (Lindsay e Zajac, 2002; Brasil, 2006; Faria et al, 2012). Essas técnicas empregam como antígeno, o parasita completo ou seus extratos solúveis, o que torna sua padronização complexa. Geralmente, os métodos que utilizam o parasito completo como antígeno, produzem resultados mais confiáveis, sendo o RIFI a técnica mais utilizada na medicina veterinária (Lindsay e Zajac, 2002; Brasil, 2006; De Paiva - Cavalcanti et al., 2015; Pinto et al., 2016). Os testes imunocromatográficos são mais utilizados como aliados em animais com leishmaniose visceral aguda (Brasil, 2006).

Abaixo, na Figura 1, demonstra-se o fluxograma para abordagem do diagnóstico da LVC em animais com ou sem manifestações clínicas, segundo o Brasileish, 2018.





\* A sorologia qualitativa (testes rápidos de ELISA ou imunocromatografia) pode ser utilizada como teste de triagem.  
 \*\* Considera-se como alto título 3-4 vezes maior que o ponto de corte (cut off) estabelecido pelo laboratório de referência.

Figura 1: Fluxograma para abordagem diagnóstica em cães com ou sem manifestações clínicas de Leishmaniose, sugeridas pelo grupo Brasileish (2018).

Não há descrito em literatura, uma técnica que apresente 100% de sensibilidade e especificidade que possa ser considerada “padrão ouro” para o diagnóstico da LVC. A escolha da técnica irá depender do objetivo específico do exame: para o diagnóstico de um caso clínico, para avaliar a eficácia de um tratamento ou para a identificação de possíveis reservatórios ou transmissores da doença (Silva et al., 2007).

#### 1.4 ESTADIAMENTO CLÍNICO DA LEISHMANIOSE:

Os animais com LVC são inseridos em diferentes estádios da doença de acordo com as alterações clínico-patológicas e sorológicas que apresentam. O objetivo do estadiamento é agrupar os animais que estejam no mesmo grau de acometimento da doença para, então, indicar a terapia mais adequada no seu manejo, e o provável prognóstico (Brasileish, 2018; Solano-Gallego et al., 2011).

Alguns sistemas foram propostos por diferentes grupos de pesquisadores no mundo, como o do grupo Leishvet (2011), demonstrado na Tab.1.

<b><u>Estágio I</u></b>	<b><u>Sorologia negativa a positiva com níveis de anticorpos baixos</u></b>	Paciente com sinais clínicos ausentes ou leves como linfadenopatia periférica, dermatite papular. Geralmente não apresenta alterações laboratoriais. Perfil renal normal.
<b><u>Estágio II</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos baixos a altos</u></b>	Paciente com sinais clínicos do estágio I além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, ulcerações anorexia, epixtase e febre. As alterações laboratoriais podem apresentar anemia não regenerativa moderada, hiperglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro. <b><u>Substádio a)</u></b> Perfil renal normal (creatinina <1,4mg/dL e RPCU < 0,5). <b><u>Substádio b)</u></b> creatinina <1,4mg/dL e RPCU = 0,5 – 1.
<b><u>Estágio III</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos médios a altos</u></b>	Paciente com sinais clínicos do estágio I e II, além de sinais originários de imunocomplexos: vasculite, artrite, uveíte, glomerulonefrite. Alterações laboratoriais do estágio II além de DRC estágio 1 (RPCU > 1) ou 2 (creatinina 1,4 – 2,8 mg/dL) da IRIS.
<b><u>Estágio IV</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos médios a altos</u></b>	Paciente com sinais clínicos do estágio III, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em

		estágio final. Alterações laboratoriais do estágio II além de DRC estágio 3 (creatinina 2,9 – 5 mg/dL) e estágio 4 (creatinina > 5 mg/dL) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria RPCU >5).
--	--	---

Tabela 1 – Critérios de classificação da LVC segundo a Leishvet (2011).

Recentemente, o Brasileish (2018), propôs que o estadiamento da LVC seja dividido em cinco estádios, os quais contemplam desde cães expostos e sem doença, aqueles infectados assintomáticos, sintomáticos, sem e com alteração renal, até animais em severa DRC, conforme demonstrado na Tab. 2.

<b><u>Estágio I</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico negativo</u></b>	Paciente sem sinais clínicos e sem alterações laboratoriais.
<b><u>Estágio II</u></b>	<b><u>Sorologia negativa ou positiva com níveis de anticorpos baixos a médios / parasitológico positivo</u></b>	Paciente com sinais clínicos ausentes ou leves como linfadenopatia periférica, dermatite papular. Geralmente não apresenta alterações laboratoriais. Perfil renal normal.
<b><u>Estágio III</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos baixos a altos / parasitológico positivo</u></b>	Paciente com sinais clínicos do estágio II além de outros como lesões cutâneas difusas ou simétricas, onicogribose, dermatite exfoliativa, anorexia, epixtase e febre. Como alterações laboratoriais pode

		<p>apresentar anemia não regenerativa leve, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, síndrome da hiperviscosidade do soro (proteínas totais acima de 12 mg/dL), oriundos da formação de imunocomplexos como uveíte e glomerulonefrite. <b><u>Substádio a)</u></b> Perfil renal normal (creatinina &lt;1,4mg/dL e RPCU &lt; 0,5). <b><u>Substádio b)</u></b> creatinina &lt;1,4mg/dL e RPCU = 0,5 – 1.</p>
<b><u>Estádio IV</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo</u></b>	<p>Paciente com sinais clínicos do estágio III, sinais originários de imunocomplexos: vasculite, artrite, uveíte, glomerulonefrite. Alterações laboratoriais do estágio III além de DRC estágio 1 (RPCU &gt; 1) ou 2 (creatinina 1,4 – 2,8 mg/dL) da IRIS.</p>
<b><u>Estádio V</u></b>	<b><u>Sorologia positiva com níveis de anticorpos médios a altos / parasitológico positivo</u></b>	<p>Paciente com sinais clínicos do estágio IV, além de tromboembolismo pulmonar ou síndrome nefrótica e doença renal em estágio final. Alterações laboratoriais do estágio IV além de DRC estágio 3 (creatinina 2,9 – 5 mg/dL) e 4 (creatinina &gt; 5 mg/dL) da IRIS, ou síndrome nefrótica (marcada proteinúria RPCU &gt;5).</p>

Tabela 2 – Critérios de classificação da LVC segundo o Brasileish (2018).

Atualmente os estadiamentos sugeridos pelos grupos de estudo sobre leishmaniose, Brasileish (2018) e Leishvet (2011), são estadiamentos qualitativos, que, para avaliação da função renal se baseiam principalmente na creatinina sérica, um biomarcador de insuficiência renal e utilizam em seu sub estadiamento a proteinúria renal, um biomarcador de injúria renal (Solano Gallego et al., 2011; Reguera et al., 2016; Brasileish, 2018).

### **1.5 TRATAMENTO:**

De acordo com as diretrizes do Brasileish, (2018), o tratamento e o manejo da infecção e/ou da LVC deve ser instituído apenas após o diagnóstico preciso, e possui como principais objetivos reduzir a carga parasitária do cão, neutralizando a sua capacidade infectante, restaurando adequadamente a sua resposta imune, promovendo a melhora clínica e prevenindo recaídas.

O tratamento da LVC no Brasil utiliza protocolos diversos que combinam o uso de drogas, com efeito imunomodulador, leishmanicida e leishmanioestático (Brasileish, 2018). As drogas imunomoduladoras podem ser empregadas como estimulantes ou supressoras. As drogas estimulantes, como por exemplo, a domperidona (Travi e Miró, 2018) e a própria vacina para leishmaniose sendo utilizada através de imunoterapias (Gonçalves, 2019; Ribeiro, 2020).

As drogas imunossupressoras são utilizadas no tratamento de distúrbios secundários à LVC provocados pela deposição de imunocomplexos. Essa deposição está associada ao aparecimento de glomerulonefrite, poliartrite, vasculite e trombocitopenia imunomediadas, além de outras alterações (Flora et al., 2014; Ribeiro, 2020). Nesses casos, pode-se optar pelo uso de corticoides, como a prednisona e a dexametasona. Essa terapia diminui a fagocitose de plaquetas por macrófagos, possivelmente aumentando a produção de plaquetas e eventualmente diminuindo a produção de anticorpos (Brites, 2022).

Drogas leishmanioestáticas são aquelas que inibem a multiplicação do parasita. O alopurinol é droga leishmanioestática largamente empregada nos protocolos terapêuticos de LVC em associação a outros medicamentos. Ele é capaz de interromper a síntese

proteica do parasito pela inibição do metabolismo das purinas, exercendo efeito inibitório no crescimento da *Leishmania*. Possui efeitos colaterais incomuns e baixo custo. A principal utilidade dessa droga tem sido demonstrada no controle das recidivas da leishmaniose canina (Yasur-Landau et al., 2016).

Autorizado pelo Ministério da Saúde em 2016, o Milteforan<sup>®</sup>, de princípio ativo miltefosina, é o único leishmanicida regulamentado para tratamento de LVC no Brasil. A miltefosina inibe a biossíntese do receptor de glicosil fosfatidil inositol (GPI), a chave molecular para sobrevivência intracelular de *Leishmania*. A droga também interfere na síntese de fosfolipase e proteína quinase C, que são específicas de *Leishmania*. A ação metabólica deste composto pode afetar a biossíntese de glicolipídios e glicoproteínas de membrana do parasita causando sua apoptose (Nogueira et al., 2019).

O tratamento da LVC envolve diversas classes medicamentosas e varia conforme o estadiamento do paciente. Porém, ele deve ser capaz de promover a melhora clínica do paciente, diminuição significativa da carga parasitária e redução das possibilidades de transmissão da *L. infantum* ao *Lutzomyia longipalpis* (Dantas-Torres et al., 2006; Nery et al., 2017).

Conforme demonstrado no estadiamento proposto pelo Brasileish (2018), o monitoramento da função renal e o diagnóstico precoce da lesão ou injúria renal são de extrema importância no manejo de cães infectados ou doentes. Desta forma, o uso de biomarcadores fisiológicos durante o monitoramento do paciente, auxilia a definição de condutas de tratamento, manejo das possíveis alterações identificadas e no prognóstico dos pacientes.

## **2. HIPÓTESES:**

Biomarcadores fisiológicos contribuem como fatores preditivos e marcadores de prognóstico da injúria renal e insuficiência renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

### **3. OBJETIVOS:**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL:**

Determinação de biomarcadores fisiológicos como fatores preditivos e marcadores de prognóstico da evolução da infecção, da injúria renal e insuficiência renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Avaliar os biomarcadores renais, creatinina sérica e razão proteína creatinina urinária (RPCU) como fatores preditivos e marcadores de prognóstico da injúria renal e insuficiência renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Avaliar a globulina, albumina, uréia, fósforo séricos, densidade urinária e pressão arterial sistêmica como fatores preditivos e marcadores de prognóstico da injúria renal e insuficiência renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Avaliar os parâmetros do hemograma como fatores preditivos da injúria e insuficiência renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Avaliar a correlação entre os biomarcadores em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Avaliar os parâmetros do hemograma e perfil bioquímico como marcadores de prognóstico em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS:**

#### **4.1. ANIMAIS:**

Foram avaliados 59 cães, atendidos em Hospital Veterinário particular de Belo Horizonte - MG e naturalmente infectados por *L. infantum*, sendo 26 fêmeas e 33 machos, de raças e idades variadas.

Os cães foram classificados e divididos nos estágios sugeridos pela Leishvet (2011). Como critério de inclusão os cães deveriam ser classificados a partir do Estágio Leishvet II e estar realizando tratamento com aplicação de imunoterapia, com a vacina Leishtec<sup>®</sup> (Ribeiro, et al., 2013).

Como critério de inclusão o prontuário médico dos cães com anamnese completa, exames de hemograma, reticulócitos, proteínas totais e frações (globulina sérica e albumina sérica), creatinina urinária, creatinina sérica, ureia sérica, fósforo sérico, SDMA sérica, pressão arterial sistêmica, análise de urina e RPCU, todos realizados em um mesmo atendimento, sendo este primeiro momento identificado como T0.

Os critérios de exclusão foram os animais que apresentaram sinais de desidratação, ou que na anamnese fossem relatados episódios de vômitos, diarreia ou inapetência. Animais que apresentaram doença do trato urinário inferior, já que nesses casos, pode haver alterações no valor da RPCU por uma causa pós-renal.

Após seis meses, 24 cães retornaram para avaliação clínica e laboratorial. Esta segunda coleta foi identificada como T1. Alguns cães não retornaram para avaliação ou retornaram em um período superior a seis meses e por isso foram excluídos do estudo.

#### **4.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:**

Como critério de inclusão os cães apresentaram exames parasitológicos positivos para leishmaniose por identificação direta ou molecular do parasito ou titulação acima de 1:160 em exame de RIFI ou valor da amostra 4 vezes maior que o ponto de corte no exame ELISA (Solano Gallego et al., 2011; Brasileish, 2018). Não foram realizados exames para avaliação de coinfeções neste estudo.

#### **4.3. EXAMES LABORATORIAIS:**

A coleta de sangue foi realizada com seringas de 5 mL ou 10 mL e agulha 25x7mm na veia cefálica ou na jugular externa para exames, de acordo com a conveniência para o animal.

A coleta de urina foi realizada pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom utilizando-se seringa de 10 mL e agulha 25x7mm ou por sonda uretral.

Todos os exames foram executados em laboratório interno do hospital veterinário de Belo Horizonte - MG.



Para realização de hemograma e leucograma foram coletados 0,5 mL de sangue venoso e acondicionado em microtubo com EDTA. O sangue foi processado em aparelho automático (Analisador Hematológico Procyte Dx Idexx<sup>®</sup>). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos para contagem celular diferencial, fixando-se a lâmina com metanol, por 5 minutos, seguido da coloração com Romanowsky.

Os exames bioquímicos foram processados a partir do soro proveniente de 3,5 mL de sangue coletado e acondicionado em tubo específico, sem anticoagulante. Os exames bioquímicos, creatinina urinária e proteína urinária, para obtenção da razão proteína creatinina urinária, foram analisados em aparelho automático (Catalist One Idexx<sup>®</sup>) no método de bioquímica seca.

A urina foi processada no prazo máximo de duas horas após a coleta, onde foi realizado o exame de análise de urina (Exame físico, microscópico, e por tiras reativas).

#### **4.4. MENSURAÇÃO DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA:**

A Pressão arterial sistêmica (PA) foi aferida através da utilização de doppler vascular ou através de método oscilométrico com o animal posicionado em decúbito lateral, respeitando critérios de tamanho de manguito e mínimo estresse. Foram realizadas de 3 a 7 mensurações, sendo que a primeira medição foi descartada para se obter uma média das outras medições, considerando o valor da PA do paciente.

#### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Inicialmente foi realizada análise descritiva do perfil dos animais a partir da tabela de dados. Para as variáveis quantitativas, foram calculados os principais índices de estatística descritiva e para as variáveis categóricas foram calculadas as frequências relativas e absolutas para cada classe.

Realizou-se análise de componentes principais (análise multivariada), utilizando as variáveis numéricas. Esta análise avaliou todas as variáveis numéricas em conjunto, levando em consideração a correlação entre elas.

Realizou-se análise de componentes principais com a matriz de correlação de Spearman. Sendo que as correlações moderadas, fortes e muito fortes, com intervalo de

confiança superior a 95%, foram reportadas. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

## 5. RESULTADOS:

Foram classificados 18 (30,5%) cães como estágio IIA do Leishvet e 15 (25,4%) cães como estágio IIB. No estágio III foram classificados 23 (39%) cães e no estágio IV apenas 3 (5,1%) cães como ilustrado no gráfico 1.

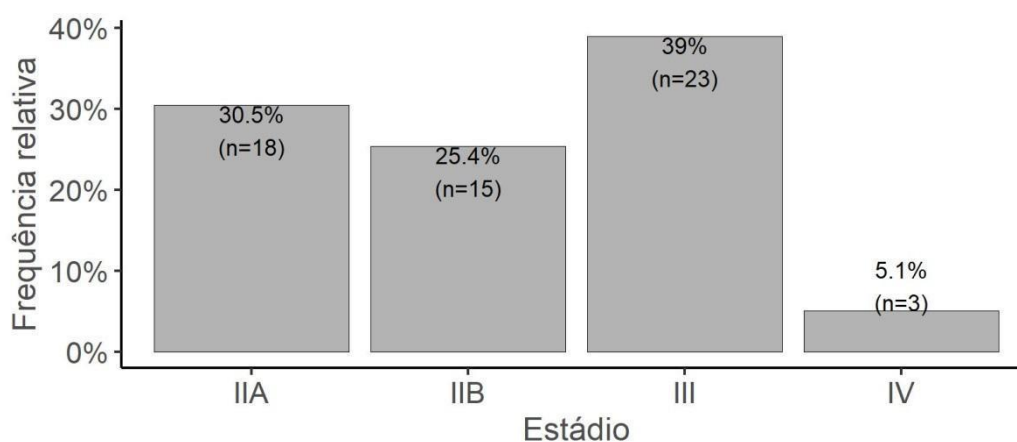


Gráfico 1: número de cães classificados em cada estágio Leishvet (2011).

Os principais índices de estatística descritiva, média, desvio-padrão, mínimos e máximos, mediana e coeficiente de variação dos 59 cães avaliados no estudo são descritos na tabela 3. A tabela referente aos índices de estatística descritiva para cada estágio está descrita no anexo.

Analitos	Média	Desv. Pad.	Mín.	Mediana	Máx.	Coef. Var.
SDMA	16,55	18,84	5	12	140	114%
<b>URÉIA</b>	85,46	124,09	17,12	40,6	701,92	145%
CREATININA	2,04	2,83	0,5	1,2	19,1	139%
<b>FOSFÓFORO</b>	5,14	3,63	1,3	4,1	21,1	71%
GLOBULINA	4,48	1,83	2,2	3,9	14,8	41%
<b>ALBUMINA</b>	2,89	0,53	0,8	2,9	4,5	18%
PROTEÍNAS TOTAIS	7,37	1,80	4	7,1	17,3	24%
<b>HEMÁCIAS</b>	6,25	1,64	1,3	6,42	9,44	26%

Analitos	Média	Desv. Pad.	Min.	Mediana	Máx.	Coef. Var.
HEMATÓCRITO	40,60	11,20	16,4	40,8	63,3	28%
PLAQUETAS	307,70	156,46	19	293	853	51%
RETICULÓCITOS	58,52	36,37	2,5	51,7	157,2	62%
LEUCÓCITOS	12101,57	5520,88	2420	10950	30600	46%
DENSIDE URINÁRIA	1,03	0,01	1,005	1,025	1,054	1%
RPCU	1,29	1,68	0	0,66	9,8	130%
PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	152,16	23,05	110	150	210	15%
CREATINA URINÁRIA	153,59	92,82	32	118	346	60%
PROTEÍNA URINÁRIA	130,10	135,62	5	76	400	104%

Tabela 3: principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos, quartis, mediana, coeficiente de variação, número e porcentagem de valores válidos) dos biomarcadores fisiológicos dos 59 cães naturalmente infectados por *L. infantum* avaliados no estudo.

Os analitos com a maior variabilidade relativa, estimada pelo coeficiente de variação, foram: ureia sérica, creatinina sérica, RPCU, SDMA e Proteína Urinária. As variáveis hematócrito e plaquetas apresentaram distribuição bem-comportada e aproximadamente normal na sua unidade original. Os analitos peso, leucócitos e PA apresentaram distribuição aproximadamente normal após transformação logarítmica. Algumas variáveis rejeitaram a normalidade apenas pela presença de alguns poucos pontos discrepantes, conforme demonstrado nos gráficos abaixo.

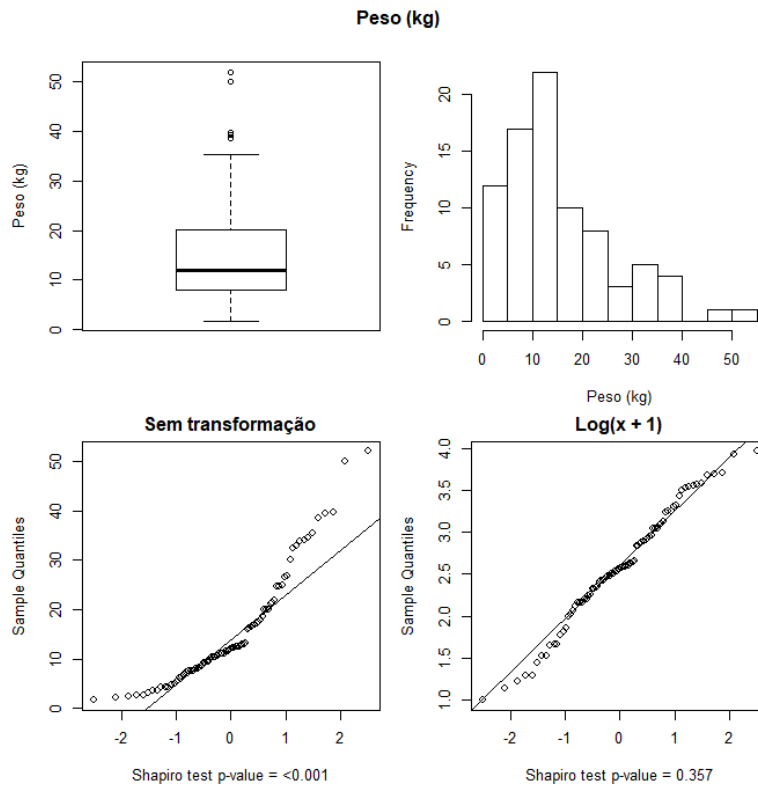


Gráfico 2: Análise do analito peso (kg).

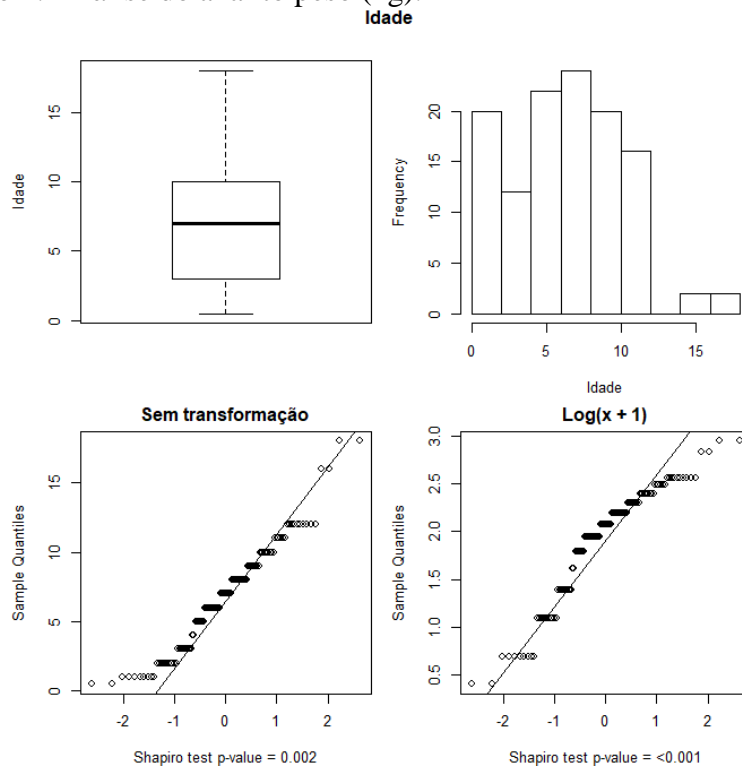


Gráfico 3: Análise do analito idade.

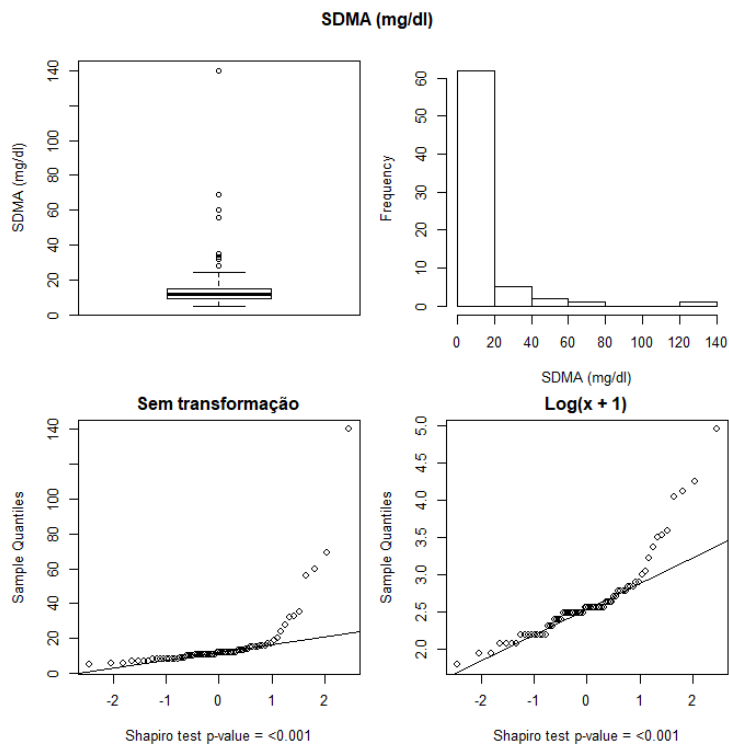


Gráfico 4: Análise do analito SDMA sérica ( $\mu\text{g/dL}$ ).

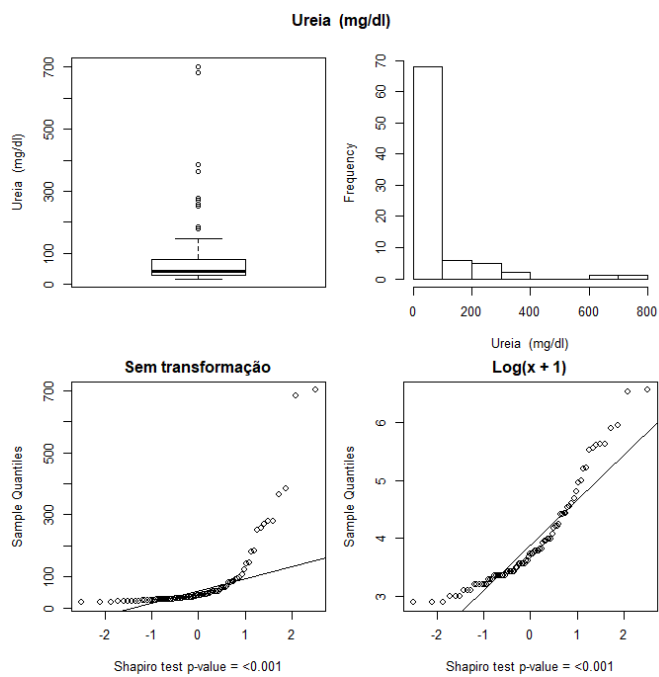


Gráfico 5: Análise do analito uréia sérica (mg/dL).

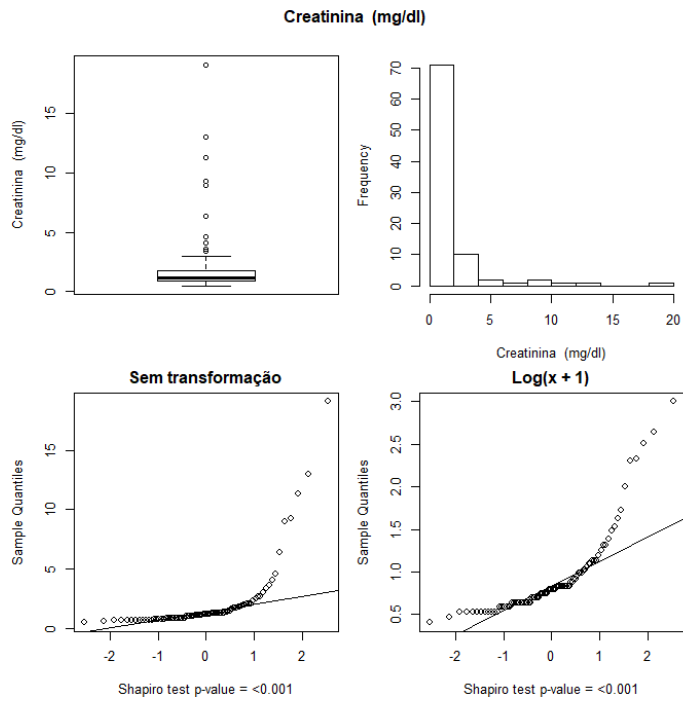


Gráfico 6: Análise do analito creatinina sérica (mg/dL).

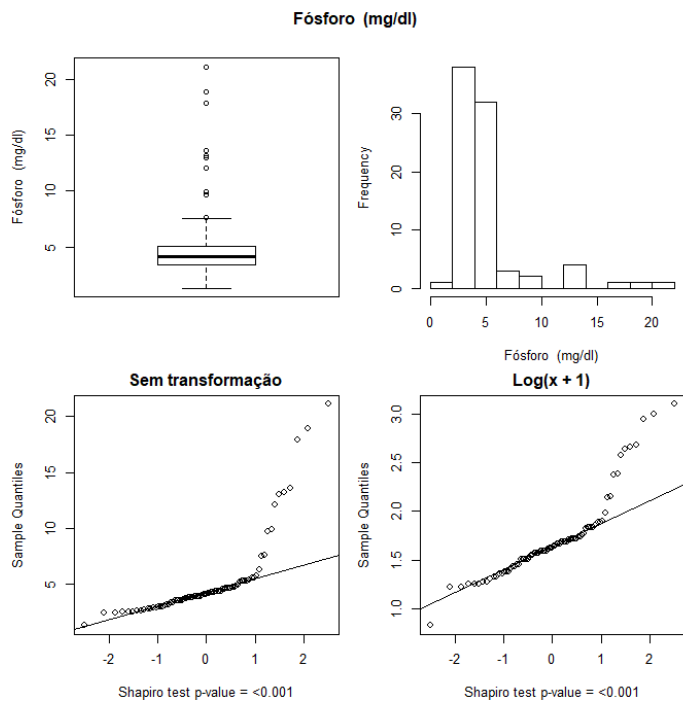


Gráfico 7: Análise do analito fósforo sérico (mg/dL).

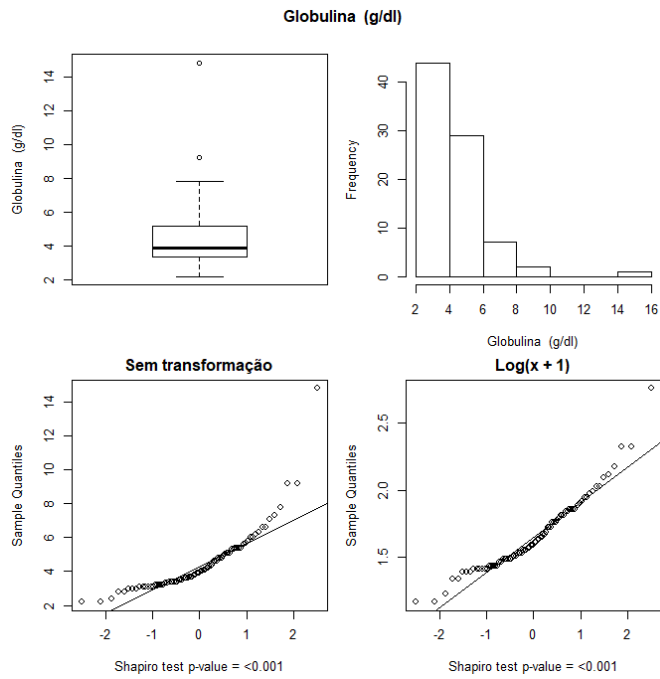


Gráfico 8: Análise do analito globulina sérica (g/dL).

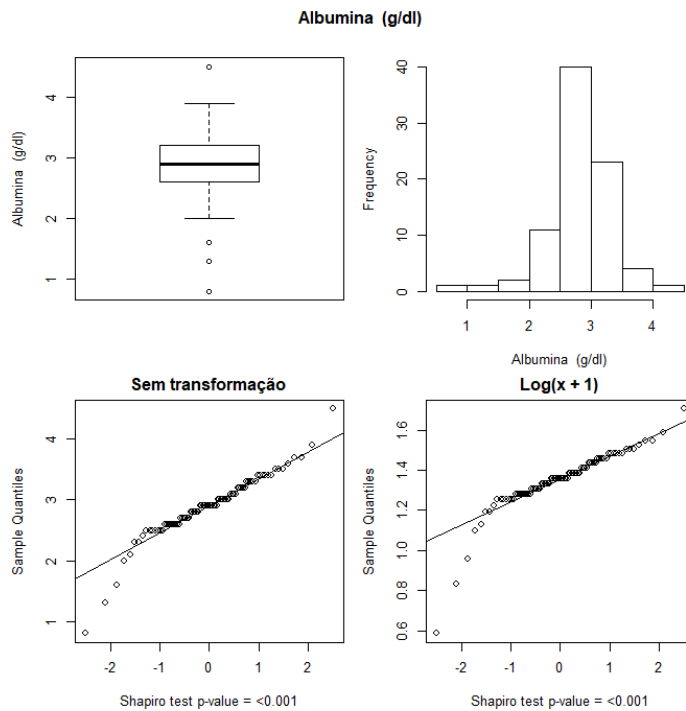


Gráfico 9: Análise do analito albumina sérica (g/dL).

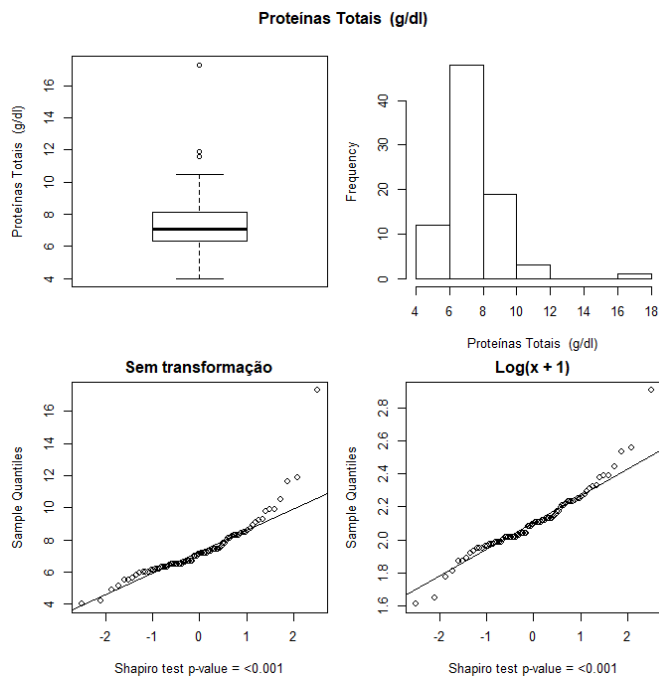


Gráfico 10: Análise do analito proteínas séricas totais (g/dL).

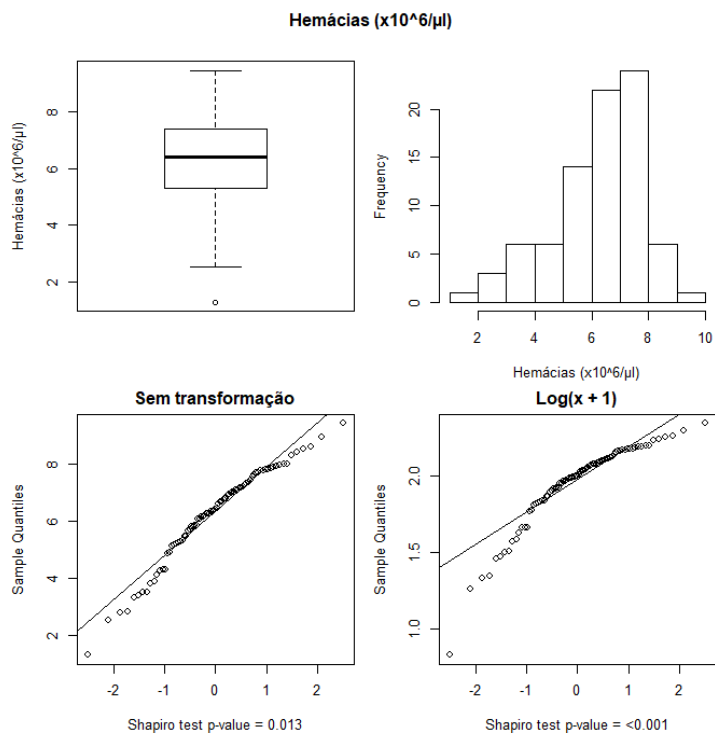


Gráfico 11: Análise do analito hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ ).



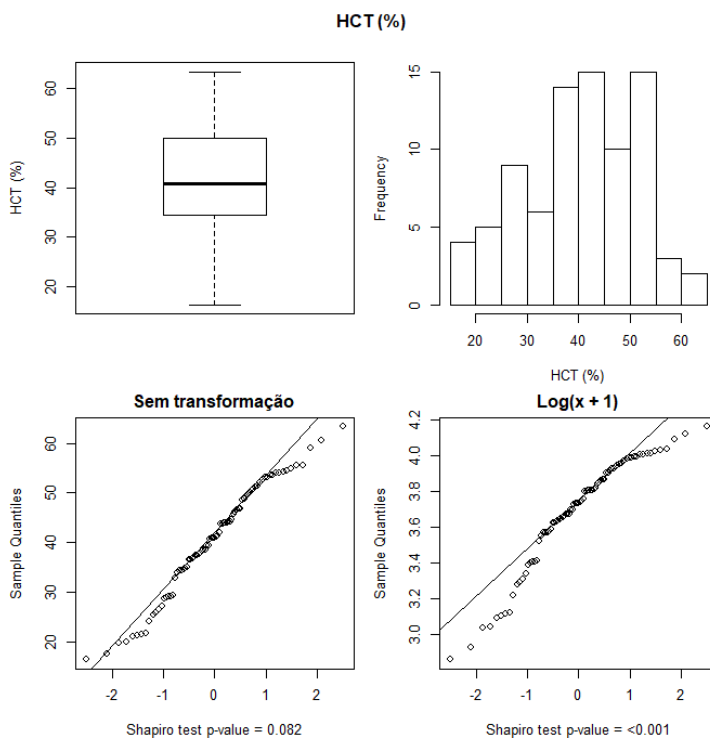


Gráfico 12: Análise do analito hematócrito (%).

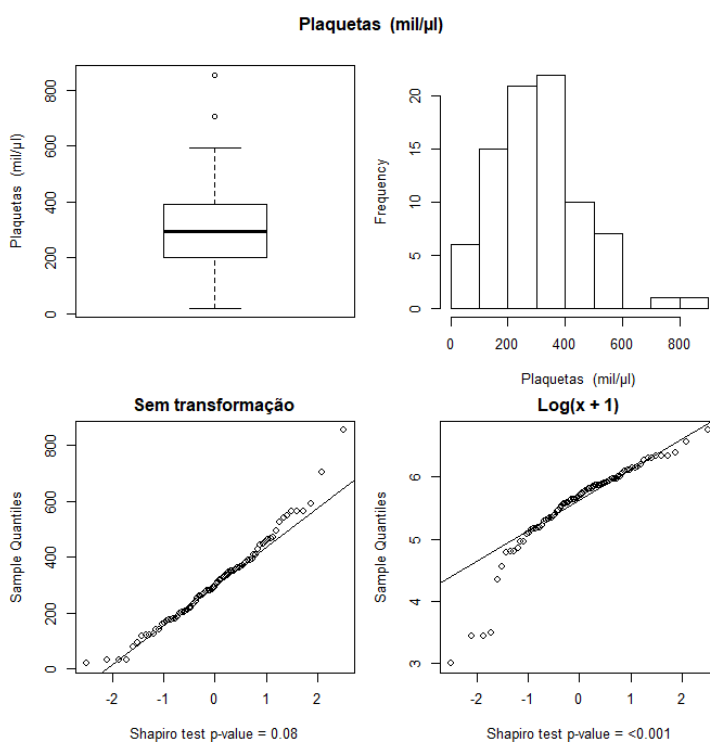


Gráfico 13: Análise do analito plaquetas (ml/μl).

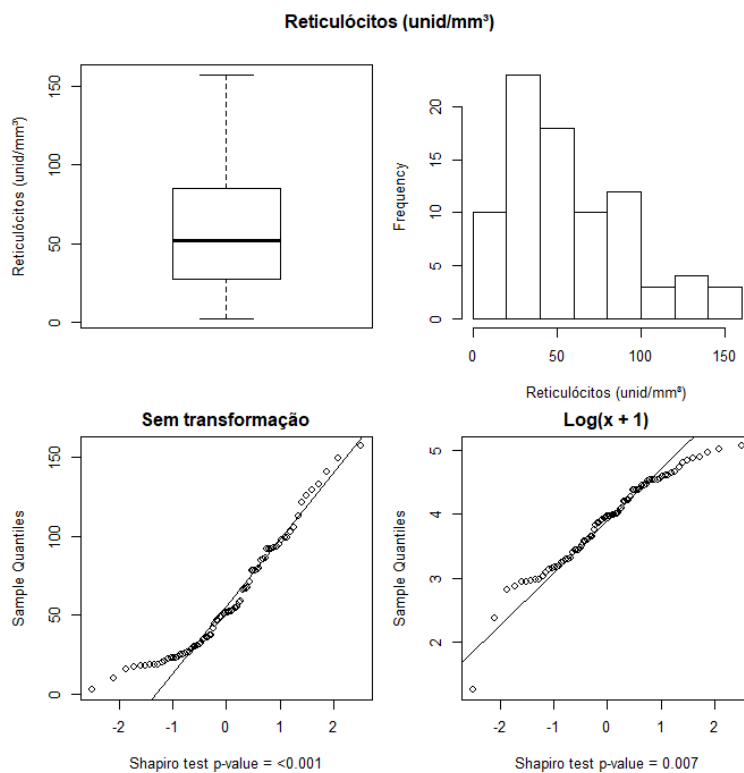


Gráfico 14: Análise do analito reticulócitos (/mm<sup>3</sup>).

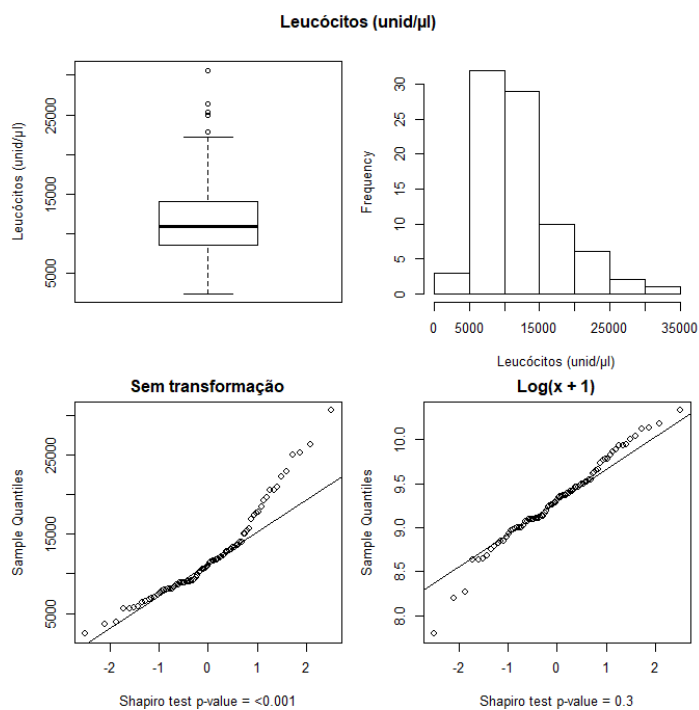


Gráfico 15: Análise do analito leucócitos (/μl).

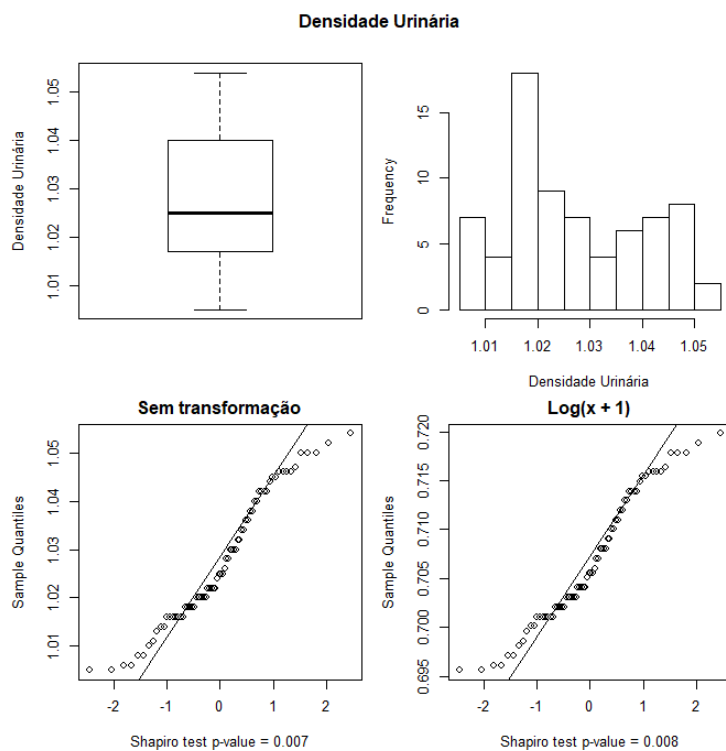


Gráfico 16: Análise do analito densidade urinária.

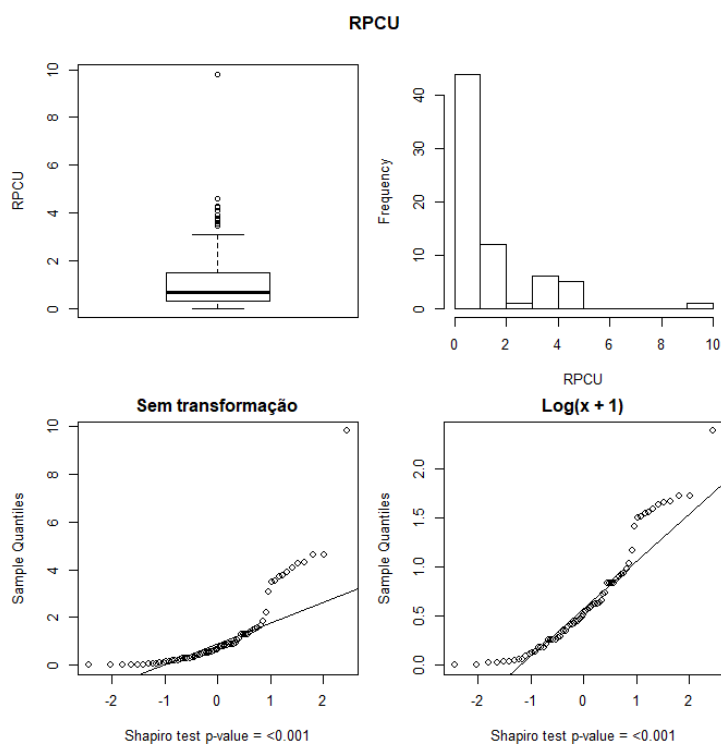


Gráfico 17: Análise do analito razão proteína creatinina urinária.

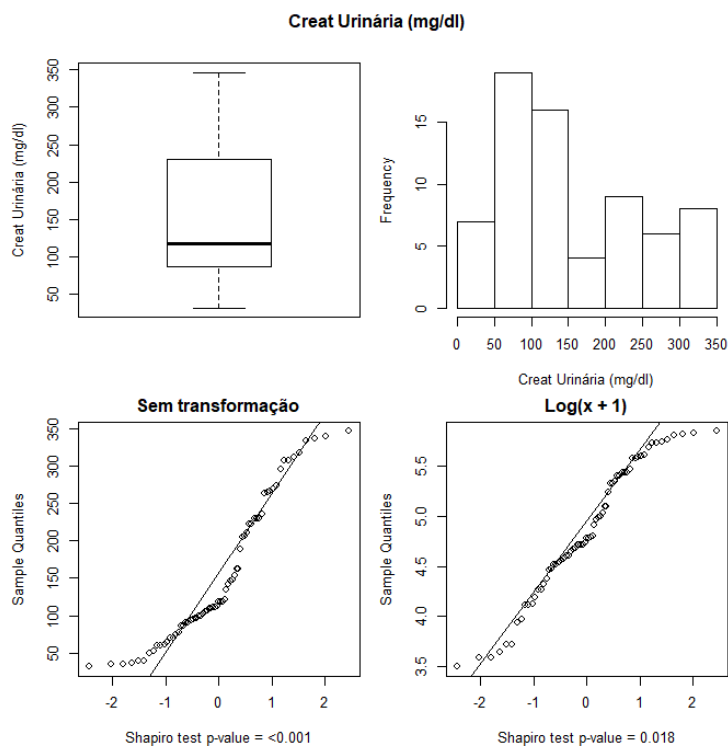


Gráfico 18: Análise do analito creatinina urinária (mg/dL).

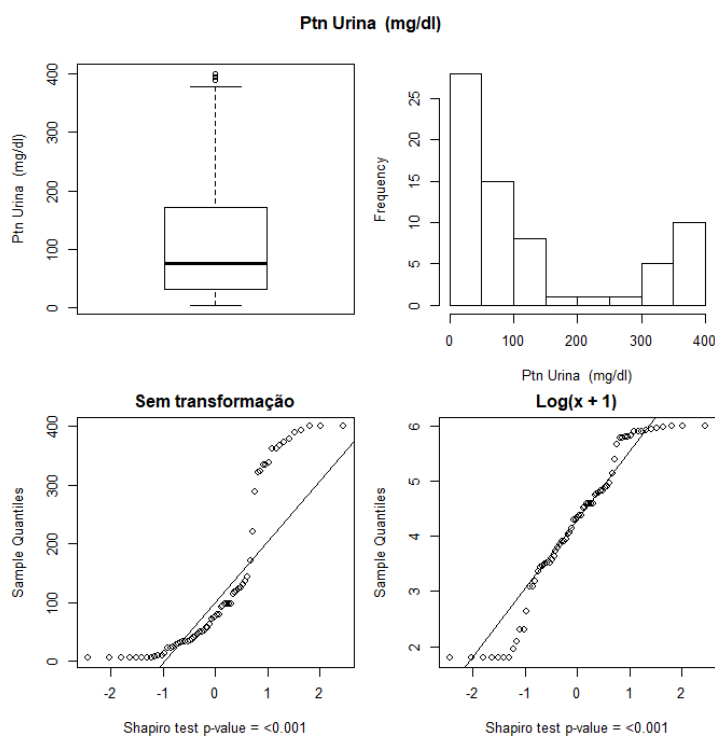


Gráfico 19: Análise do analito proteína urinária (mg/dL).

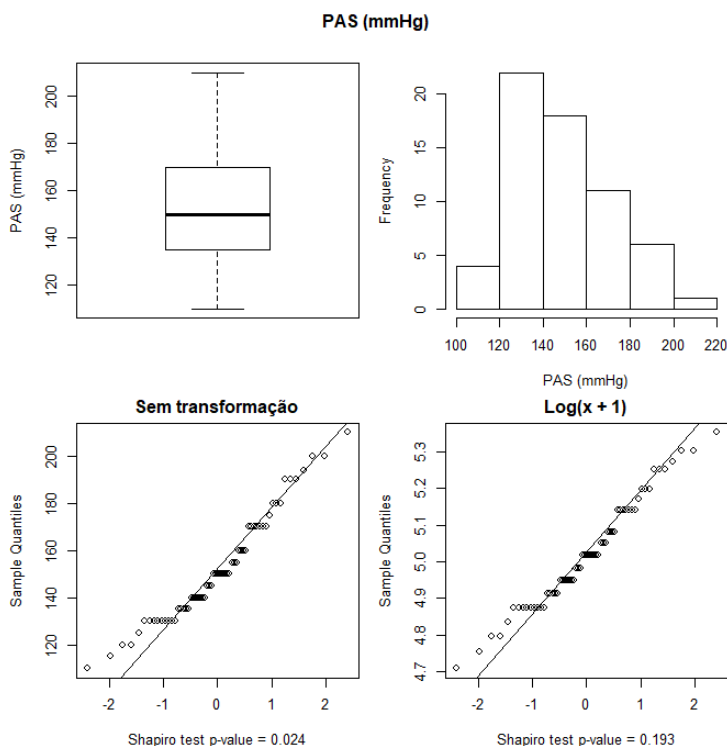


Gráfico 20: Análise do analito pressão arterial sistêmica (mmHg).

Dos 33 cães classificados nos estágios Leishvet IIA e IIB, avaliados neste estudo, em 13 (39%), a RPCU foi o primeiro biomarcador de avaliação de lesão renal, a apresentar valores acima dos valores de referência e a SDMA sérica foi o primeiro biomarcador a apresentar valores acima dos valores de referência em dois cães (6%). A SDMA sérica e a RPCU estavam aumentados simultaneamente em dois (6%) cães classificados nos estágios Leishvet IIA e IIB.

A SDMA sérica apresentou valores acima da referência ( $< 14\mu\text{g/dL}$ ) em 1 (5%) cão classificado no estágio IIA e em 4 (26%) cães classificados no estágio IIB. No estágio III houve aumento da SDMA sérica em 8 (34%) cães e no estágio IV em todos os 3 (100%) cães, como demonstrado no gráfico 21.

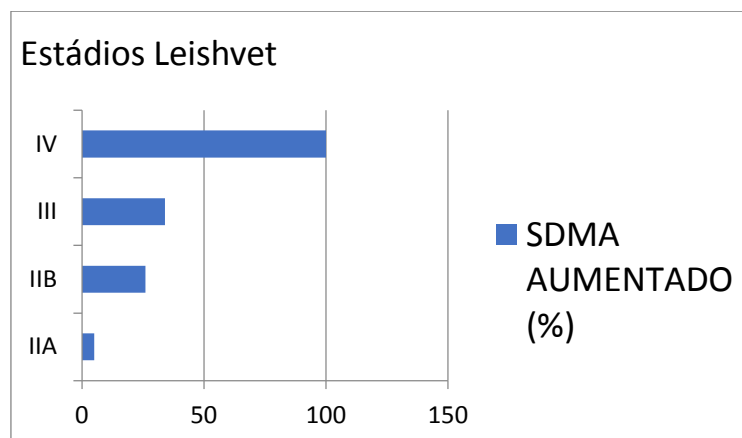


Gráfico 21: número de cães com SDMA acima da referência ( $< 14\mu\text{g/dL}$ ) em cada estágio Leishvet (2011).

A SDMA sérica demonstrou correlação moderada com a uréia e creatinina séricas, além de correlação inversa moderada com o hematócrito. A uréia sérica demonstrou correlação forte com a creatinina sérica e correlação moderada com o fósforo sérico. O fósforo sérico demonstrou correlação moderada com a RPCU, assim como correlação inversa moderada com as hemácias e hematócrito. As proteínas plasmáticas totais apresentaram correlação inversa moderada com as plaquetas. A albumina sérica apresentou correlação moderada com o hematócrito e hemácias. As hemácias apresentaram correlação inversa com a RPCU e com as proteínas urinárias. A densidade urinária apresentou correlação com a creatinina urinária. As correlações foram consideradas moderadas, com valores entre 0,4 e 0,69 e fortes, entre 0,70 e 0,89, como reportadas na tabela 4.

Analitos 1	Analitos 2	Correlação	Valor p
URÉIA	CREATININA	0,77	<0,001
SDMA	UREIA	0,57	<0,001
URÉIA	FOSFÓRO	0,56	<0,001
DENSIDADE URINÁRIA	CREATININA URINÁRIA	0,56	<0,001
FOSFÓRO	HEMATÓCRITO	-0,55	<0,001

<b>ALBUMINA</b>	<b>HEMATÓCRITO</b>	0,51	<0,001
<b>FOSFÓRO</b>	<b>HEMÁCIAS</b>	-0,50	<0,001
<b>ALBUMINA</b>	<b>HEMÁCIAS</b>	0,50	<0,001
<b>FOSFÓRO</b>	<b>RPCU</b>	0,48	<0,001
<b>HEMÁCIAS</b>	<b>PROTEÍNAS URINÁRIAS</b>	-0,48	<0,001
<b>SDMA</b>	<b>CREATININA</b>	0,46	<0,001
<b>HEMÁCIAS</b>	<b>RPCU</b>	-0,46	<0,001
<b>SDMA</b>	<b>HEMATÓCRITO</b>	-0,44	<0,001
<b>PROTEÍNAS TOTAIS</b>	<b>PLAQUETAS</b>	-0,40	<0,001

Tabela 4: correlações consideradas moderadas e fortes entre os biomarcadores avaliados no estudo.

A dispersão dos cães avaliados no estudo é ilustrada no gráfico 22, onde os pontos localizados nos dois quadrantes da direita apresentaram valores maiores principalmente das variáveis creatinina sérica (CREAT), ureia sérica, SDMA sérica, fósforo sérico (FOSF), RPCU e proteína urinária (PTN UR), enquanto valores localizados nos dois quadrantes da esquerda apresentaram maiores valores principalmente das variáveis creatinina urinária (CREAT UR), hematócrito (HTC), albumina sérica (ALBU) e densidade urinária (DEN UR). Pontos localizados nos dois quadrantes superiores apresentaram maiores valores de plaqueta (PLAQ), enquanto pontos localizados nos dois quadrantes inferiores apresentaram maiores valores, principalmente, de proteínas séricas totais (PROT) e globulina sérica (GLOB). Nota-se uma relativa separação entre o grupo IIA, com animais concentrados no lado esquerdo do gráfico e o grupo IV, com animais concentrados no lado direito. Através do gráfico nota-se a dispersão e evolução dos cães dentro de cada estágio no tempo T0 e T1, sendo os cães classificados nos estágios IIA e IIB localizados em nos quadrantes da esquerda e os cães classificados nos estágios III e IV localizados nos quadrantes da direita já que apresentavam valores elevados de creatinina, ureia, SDMA, fósforo séricos e RPCU.

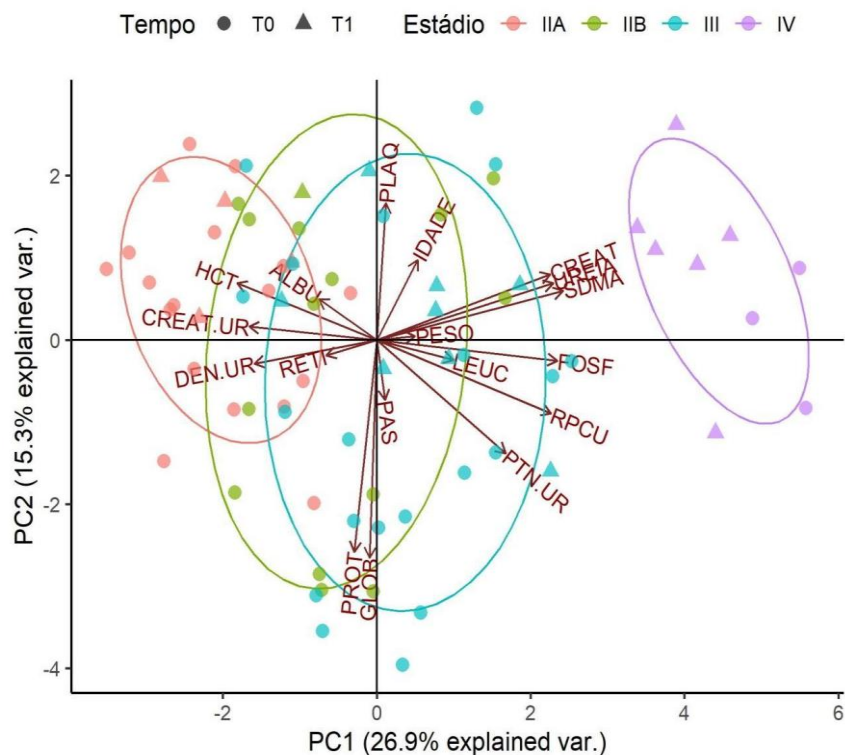


Gráfico 22: dispersão dos cães levando em consideração o estadiamento e os valores obtidos nas variáveis estudadas.

No gráfico. 23 as medidas do mesmo animal em tempos distintos estão ligadas entre si avaliando a progressão dos biomarcadores fisiológicos nos tempos T0 e T1. Neste gráfico é possível observar principalmente os quatro cães que no tempo T0 eram classificados no grupo IIA e que no tempo T1 foram reclassificados como animais do grupo IV, devido a sua progressão clínica.



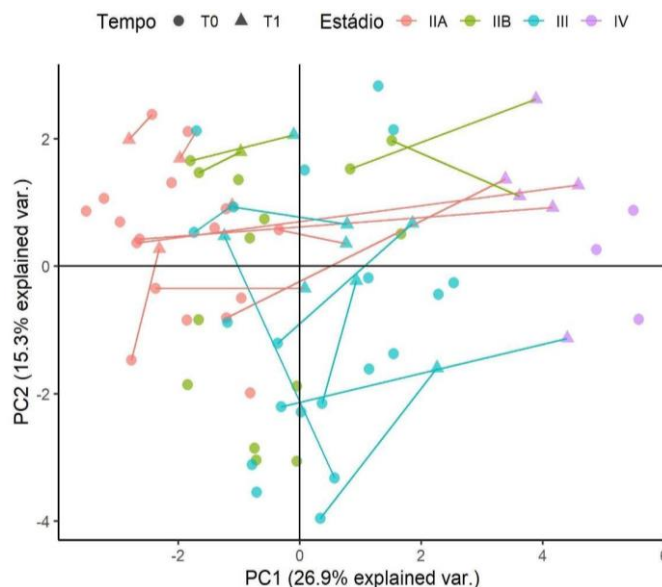


Gráfico 23: progressão dos cães em T0 e T1 levando em consideração o estadiamento e os valores obtidos nas variáveis estudadas.

Quando realizadas as correlações entre os biomarcadores avaliados em T0 e em T1, foi observado que as plaquetas (T0) apresentaram correlação inversa com RPCU e proteína urinária em T1. A densidade urinária (T0) e RPCU (T1) apresentaram correlação inversa. Os leucócitos (T0) apresentaram correlação com a uréia (T1). O fósforo sérico (T0) apresentou correlação com a proteína urinária (T1).

Variável 1	Tempo	Variável 2	Tempo	Correlação	Valor p	Número de pares válidos
CREATININA URINÁRIA	T0	DENSIDADE URINÁRIA	T1	0,73	0,003	14
<b>GLOBULINA</b>	<b>T0</b>	<b>LEUCÓCITOS</b>	<b>T1</b>	0,48	0,019	24
CREATININA URINÁRIA	T0	PROTEÍNA URINÁRIA	T1	-0,71	0,023	10
<b>PLAQUETAS</b>	<b>T0</b>	<b>RPCU</b>	<b>T1</b>	-0,69	0,026	10
PLAQUETAS	T0	PROTEÍNA URINÁRIA	T1	-0,69	0,026	10
<b>PROTEÍNAS TOTAIS</b>	<b>T0</b>	<b>GLOBULINA</b>	<b>T1</b>	0,45	0,027	24
DENSIDADE URINÁRIA	T0	RPCU	T1	-0,69	0,027	10

<b>SDMA</b>	<b>T0</b>	<b>CREATININA URINÁRIA</b>	<b>T1</b>	0,68	0,029	10
CREATININA URINÁRIA	T0	RPCU	T1	-0,68	0,030	10
<b>LEUCÓCITOS</b>	<b>T0</b>	<b>URÉIA</b>	<b>T1</b>	-0,44	0,031	24
PROTEÍNAS TOTAIS	T0	LEUCÓCITOS	T1	0,43	0,034	24
<b>PLAQUETAS</b>	<b>T0</b>	<b>LEUCÓCITOS</b>	<b>T1</b>	-0,43	0,036	24
FOSFÓFORO	T0	PROTEÍNA URINÁRIA	T1	0,66	0,036	10
<b>HEMATÓCRITO</b>	<b>T0</b>	<b>PROTEÍNAS TOTAIS</b>	<b>T1</b>	-0,42	0,043	24
PROTEÍNA URINÁRIA	T0	RPCU	T1	0,65	0,043	10
<b>PLAQUETAS</b>	<b>T0</b>	<b>FOSFÓRO</b>	<b>T1</b>	-0,41	0,048	24
PA	T0	LEUCÓCITOS	T1	0,41	0,049	24

Tabela 5: correlações entre as variáveis estudadas em T0 e T1 que apresentaram significativa estatística.

As correlações entre as demais variáveis em T0 e T1, com valores abaixo de 0,4, foram classificadas como fracas, não apresentando correlações significativas.

Em análise da correlação entre as variáveis em T0 em conjunto com as variáveis de cães que apresentem creatinina menor que 1,4 mg/L em T1, a densidade urinária (T0) apresentou correlação inversa com a RPCU (T1) e correlação com a globulina sérica (T1). A SDMA sérica (T0) apresentou correlação com a creatinina urinária (T1). As plaquetas (T0) apresentaram correlação inversa com a uréia e fósforo séricos (T1). A proteína urinária (T0) apresentou correlação com as proteínas séricas totais (T1). O fósforo sérico e a PA (T0) apresentaram correlação com os leucócitos (T1). Não foi possível realizar a análise para os animais com creatinina sérica igual ou maior que 1,4 mg/L, pois a disponibilidade de dados era muito pequena para fornecer uma análise interpretável.

Variável 1	Tempo	Variável 2	Tempo	Correlação	Valor p*	Número de pares válidos
DENSIDADE URINÁRIA	T0	RPCU	T1	-0,92	0,001	8

SDMA	T0	CREATININA URINÁRIA	T1	0,92	0,001	8
PLAQUETAS	T0	URÉIA	T1	-0,59	0,013	17
DENSIDADE URINÁRIA	T0	GLOBULINA	T1	0,57	0,016	17
PA	T0	LEUCÓCITOS	T1	0,56	0,018	17
PLAQUETAS	T0	FÓSFORO	T1	-0,55	0,022	17
FÓSFORO	T0	LEUCÓCITOS	T1	0,53	0,030	17
PROTEÍNA URINÁRIA	T0	PROTEÍNAS TOTAIS	T1	0,50	0,042	17

Tabela 6: correlação das variáveis em T0 em conjunto com as variáveis de cães que apresentem creatinina menor que 1,4 mg/L que apresentaram significativa estatística.

## 6. DISCUSSÃO:

As apresentações clínicas e as alterações laboratoriais em cães portadores de LV são variáveis (Paltrinieri et al., 2016; Silva et al. 2019). A *L. infantum* pode infectar uma grande variedade de células do hospedeiro canino como as do sistema fagocítico mononuclear, fibroblastos, células endoteliais, hepatócitos, neutrófilos, eosinófilos e até células neoplásicas (Saridomichelakis, 2009).

Como descrito em literatura, observa-se neste estudo alterações no eritrograma de cães infectados pela *L. infantum*, apresentando anemia leve a moderada, que geralmente se apresenta na forma normocítica e normocrômica com caráter não regenerativo (Mattos Jr et al., 2004; Medeiros et al., 2008). Essa característica pode ser consequente à invasão da medula óssea pelo parasito que induz inflamação que pode contribuir para a diminuição da produção de eritrócitos (Da Costa-Val et al., 2007). A trombocitopenia também foi um achado comum nos cães e ocorre pela vasculite causada pelos imunocomplexos circulantes, distúrbios de trombocitopoiese e destruição plaquetária (Medeiros et al., 2008). Medeiros et al. (2008), Solano-Gallego et al. (2009) e Nicolato et al. (2013) relataram alterações no leucograma e descreveram que a resposta leucocitária se altera de acordo com a fase da doença.

Outra alteração descrita em literatura frequentemente foi observada em cães deste estudo foi a hiperproteinemia, por hiperglobulinemia associada à ativação dos linfócitos B e elevada produção de anticorpos (Medeiros et al., 2008; Paltrinieri et al., 2016; Maia

e Campino, 2018). Também foi observada nesse estudo uma diminuição da produção de albumina sérica, porém o aumento dos níveis de globulinas é muito expressivo fazendo que os níveis de proteínas plasmáticas totais aumentem significativamente durante a LVC (Giunchetti et al., 2008; Solano-Gallego et al., 2009).

Nas provas de função renal, a uréia e creatinina se apresentaram de normais a azotemia assim como descrito por Mattos Jr. et al. (2004), Klosterman et al. (2011) e Maia e Campino (2018). Em relação à urinálise, a proteinúria foi no presente estudo a alteração mais frequente dos animais portadores de LVC, seja em graus discretos ou até mesmo graves como descrito por Amusategui et al. (2003) e Bonfanti e Zatelli (2004).

A presença de glomerulonefrites, nefrites túbulo intersticial e nefropatia são frequentes em cães com LV (Frazilio et al., 2018). Inicialmente a glomerulonefrite pode se manifestar como proteinúria assintomática (Koutinasand e Koutinas, 2014; Paltrinieri et al., 2016), porém com a sua progressão pode ocorrer disfunção de excreção com a presença de aumento ou diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) e hipertensão sistêmica (Plevraki et al., 2006; Cortadellas et al., 2008). O aumento da TFG associada com hipertensão pode amplificar a glomerulopatia resultando na progressão da DRC (Koutinasand e Koutinas, 2014). O desenvolvimento de DRC em estágio terminal é uma manifestação severa da progressão da doença e a principal causa de óbitos na LVC. Os dois principais parâmetros utilizados para a classificação do grau de doença renal em cães com LV, de acordo com a Leishvet (2011) são a razão proteína creatinina urinária, utilizado com um marcador de patologia glomerular e a creatinina sérica, utilizada com um marcador de excreção renal (Torrent et al., 2018).

Recentemente, a IRIS (2019) incluiu a SDMA sérica no estadiamento da doença renal crônica (Anexo II). A SDMA é uma arginina metilada produzida pelo catabolismo celular que tem demonstrado uma boa correlação com a creatinina e com a TFG (Nabity et al., 2015). Diversos estudos demonstraram que a SDMA sérica está elevada em cães com DRC (Nabity et al., 2015; Hall et al., 2016) e com IRA (Dahlen et al., 2017). Estudos sugerem que a SDMA sérica, também aumenta de maneira precoce em relação à creatinina sérica (Nabity et al., 2015; Hall et al., 2016), assim como não é influenciada pela massa muscular. Há uma escassez de dados sobre o comportamento da SDMA

sérica em cães naturalmente infectados com *Leishmania*, sendo relatados até a presente data, apenas quatro estudos (Pardo-Marin et al., 2017; Torrent et al. 2018; Frazilio et al. 2018; Giapitzoglou et al., 2020).

A concentração sérica da SDMA estava elevada principalmente em cães azotemicos, com proteinúria severa, e diminuição da densidade urinária, assim como observado por Giapitzoglou et al., (2020). A SDMA sérica apresentou correlação com a creatinina e com a densidade urinária, resultado similar ao obtido Giapitzoglou et al., 2020. Estudo realizado por Torrent et al. (2018) encontrou resultados diferentes, não observando correlação entre a SDMA e a creatinina séricas.

A SDMA sérica apresentou correlação com a uréia e fósforo séricos. É esperado que ocorresse aumento da SDMA, ureia, fósforo e da creatinina séricas e uma redução na densidade urinária conforme ocorre uma piora da excreção renal e redução da TGF.

A SDMA sérica também apresentou correlação inversa com as hemácias e com o hematócrito. Os rins desenvolvem inúmeras funções no metabolismo incluindo sua contribuição para a eritropoiese. Diversos fatores contribuem para a anemia em pacientes com redução na TFG e LVC. A redução da eritropoietina de origem renal é uma causa importante, porém outros mecanismos como a anemia de origem inflamatória, influência de toxinas urêmicas no tempo de sobrevivência da linhagem eritróide, deficiência de cofatores, perda sanguínea por sangramentos diversos e por destruição parasitária (Babitt e Lin, 2012; Fiocchi et al., 2017; Lippi et al., 2021).

O número de cães com a SDMA sérica acima dos valores de referência apresentou aumento significativo e progressivo na comparação entre os grupos. Resultado esperado devido à progressão da doença entre os estádios e demonstra que a SDMA sérica pode ser utilizada na classificação da severidade da LVC como descrito por Giapitzoglou et al., (2020). Resultado diferente do encontrado por Torrent et al. (2018), que não encontrou diferença significativa na comparação entre os estádios da Leishvet (2011). Porém Torrent et al. (2018) elegeram utilizar o ponto de corte para a SDMA sérica de 19µg/dL. Caso tivessem elegido o ponto de corte de 14 µg/dL, utilizado neste estudo, teriam um resultado similar ao obtido neste estudo.

Dois cães não proteinúricos, não azotêmicos e com a SDMA sérica elevada foram observados neste estudo. Cortadellas et al. (2008) elucidaram que em cães com LV e níveis de RPCU entre 0.2 e 0.5 podem apresentar diminuição da TFG. Cães com LV podem apresentar algum comprometimento da perfusão renal secundário a hipovolemia, o que poderia causar um aumento da concentração sérica da SDMA, sem uma associação com um proteinúria ou azotemia renal. Assim como Torrent et al. (2018) sugerimos que cães LV que apresentem alterações na concentração de SDMA sem proteinúria sejam avaliados cuidadosamente para causas pré renais de comprometimento de perfusão renal.

A RPCU apresentou ser um marcador mais precoce de diagnóstico da IRA em relação ao SDMA sérica nos cães naturalmente infectados por *L. infantum* observados neste estudo em concordância com os estudos de Pardo-Marin et al., (2017), Torrent et al. (2018) e Giapitzoglou et al., (2020). A glomerulonefrite é o principal evento patológico da nefropatia causada pela LV, tendo como principal alteração laboratorial a proteinúria. Porém uma patologia glomerular pode ocasionar uma redução da TFG, e o aumento da concentração sérica da SDMA e creatinina (Koutinas and Koutinas, 2014; Paltrinieri et al., 2016).

Quando avaliados como marcadores de prognóstico e como fator preditivo de injúria renal e de insuficiência renal, a RPCU e a SDMA sérica não apresentaram correlação estatística significativa. Em estudo realizado por Pardo-Marin et al. (2017), foi identificado uma redução da concentração da RPCU, porém não notou redução sérica da SDMA em cães após o tratamento antileishmanicida. Neste estudo observamos uma correlação entre a SDMA sérica (T0) e a creatinina urinária (T1), porém, como os cães avaliados neste estudo realizaram tratamento com aplicação da imunoterapia, pode ter ocorrido uma melhora na TFG após redução da injúria causada pela LVC.

Um aumento dos níveis de proteína plasmática total e globulina, associado a uma diminuição nos níveis de albumina sérica foi observado em diversos estudos (Artan et al., 2006; Freitas et al., 2012; Sales et al., 2017). Esse aumento das proteínas totais do plasma e presença de hiperglobulinemia é considerado como uma das alterações mais

comuns na LVC, estando possivelmente, associado ao aumento dos níveis de anticorpos anti *Leishmania*, principalmente em estágios mais crônicos da infecção (Ciaramella e Corona, 2003). Contudo, a hipoalbuminemia observada nos animais se deve, possivelmente, à migração da albumina para o meio extravascular, com formação de edema, alteração clínica bastante comum na LVC (Kumar et al., 2016) e geralmente associados a um processo inflamatório ou albuminúria (Pierantozzi et al., 2013; Proverbio et al., 2016). Tendo em vista esses processos que ocorrem durante a LVC, pela associação da globulina à estimulação de linfócitos B (Vieira et al., 2021), podemos explicar o porquê da concentração sérica de globulina e proteínas plasmáticas totais (T0) apresentaram uma correlação significativa com os Leucócitos (T1). A albumina sérica não apresentou correlação significativa com nenhum biomarcador.

O desenvolvimento de glomerulopatias leva, não só a complicações decorrentes do acúmulo de toxinas urêmicas e desequilíbrios hidroeletrolíticos, como também à hipertensão arterial sistêmica, agravando o quadro clínico dos pacientes, e podendo comprometer outros órgãos como, por exemplo, o coração (Schiffrin et al., 2007). Neste estudo identificados 17 (28%) cães apresentando PA acima de 160 mmHg, sendo que destes, 7 (41%) eram não azotêmicos e não proteinúricos.

Lesões renais primárias causam à diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular, aumentando a fração de filtração e a capacidade de reabsorção de sódio e água pelos túbulos contornados proximais, conseqüentemente elevando a volemia. Por outro lado, a diminuição da pressão arterial renal aumenta a liberação de renina plasmática pelas células justaglomerulares. Esta, por sua vez, transforma o angiotensinogênio plasmático em angiotensina I, a qual, por hidrólise, principalmente no leito vascular pulmonar, será transformada em angiotensina II, por ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A angiotensina II é um potente vasoconstritor, que eleva a pós-carga por aumento da resistência periférica, auxiliando na manutenção de uma pressão arterial elevada e de hipertensão glomerular (Mucha e Camacho, 2003; Acierno e Labato, 2004).

Neste estudo identificamos que a PA (T0) apresentou correlação com os leucócitos (T1). A glomerulonefrite pela LVC pode formar grande quantidade de

complexos antígenos anticorpo incitando a inflamação, sobrecarrega os capilares glomerulares resultando em obstrução que pode elevar ainda mais a pressão glomerular (Harrison et al., 2012). Também há evidências de que células inflamatórias se acumulam na região perivascular do rim (Theuer et al. 2002).

Estímulos como a angiotensina II, alimentação com uso excessivo de sal ou estresse crônico, ativam algumas regiões do cérebro causando uma estimulação do sistema simpático, gerando um aumento da pressão arterial sistêmica e promovendo produção de citocinas. A elevação na pressão como resultado da estimulação de angiotensina II e do aumento de neurotransmissores como a norepinefrina geram uma lesão tecidual, liberação de citocinas derivadas teciduais como IL-6 e formação de neoantígenos que levam a ativação das células T. Esta ativação produz citocinas como a IL-17, que é importante no processo da hipertensão. Esse comprometimento da IL-17, IL-6, catecolaminas e angiotensina II, promovem uma retenção de sódio causando uma retro alimentação e progressão da hipertensão (Harrison et al., 2002).

Diferente da PA, dados da literatura citam que em pacientes urêmicos ocorre destruição dos leucócitos (Minnaqanti et al., 2001; Pahl et al. 2010; Cohen e Hörl, 2012; Moser et al., 2013). Neste estudo observa-se fator preditivo dos leucócitos (T0) e do hematócrito (T1) em relação à ureia sérica, através da correlação inversa. A uremia está associada com algumas anormalidades hematológicas como desordens hemostáticas, granulocíticas, linfocíticas e plaquetárias, principalmente causadas por anormalidades de quimiotaxia, fagocitose e oxidativas. Também são relatadas algumas desordens relacionadas ao processo de apresentação de antígeno em pacientes urêmicos (Cohen e Hörl, 2012). Minnaqanti et al. (2001) demonstrou que pacientes com insuficiência renal apresentam uma defesa prejudicada do organismo. Pahl et al. (2010) reportou que o número reduzido de linfócitos B e a sua capacidade de produção de anticorpos estão reduzidas em pacientes urêmicos. Estudo realizado por Moser et al. (2013) descreveu sobre o esgotamento de células T de memória em pacientes urêmicos. Em cães infectados por LV encontramos alterações hematológicas mais intensas, como a anemia profunda, trombocitopenia e leucopenia, caracterizando um quadro de pancitopenia



muitas vezes associado à hipoplasia ou aplasia de medula óssea como resultado da invasão do microrganismo e do processo imunomediado (Paltrinieri et al. 2016).

O Hematócrito (T0) também apresentou uma correlação inversa com a concentração sérica de proteínas totais (T1). Assim, a presença de leucopenia e anemia podem indicar um processo inicial de imunossupressão e aumento de carga parasitária, podendo ocasionar uma alteração de hiperglobulinemia e um processo inicial de injúria renal e progressão da doença.

As plaquetas também demonstram atuar como marcador de prognóstico e fator preditivo na LVC. Observa-se correlação inversa entre as plaquetas (T0) com o fósforo sérico, leucócitos, RPCU e proteínas urinárias (T1). A trombocitopenia ou trombocitopatias podem resultar de uma anormalidade na parede vascular secundária a uma vasculite, uma alteração da trombocitopoiese, aumento da destruição plaquetária associados ou seguindo para uma insuficiência renal ou hepática (Ciaramella et al., 2005). Cães infectados por LV demonstram um aumento na concentração de imunocomplexos na circulação, os quais ainda mantem seus papéis nos distúrbios plaquetários indeterminados. O aumento na formação da deposição de imunocomplexos pode contribuir tanto para uma lesão vascular quanto para uma alteração na membrana da plaqueta resultando em um comprometimento primário da homeostase. Além disso, também pode ocorrer uma trombocitopenia imunomediada secundária na LVC (Chabanne et al., 2000). Nela, a destruição plaquetária pode resultar de uma ligação entre um complexo imune com receptores Fc nas plaquetas ou da geração de novos antígenos durante uma doença infecciosa (Lewis and Meyers, 1996). A principal classe de anticorpo associada à trombocitopenia imunomediada é a IgG, embora outras classes de anticorpos também estejam associadas. (Lewis et al., 1995). Outra causa de alteração plaquetária ocorre durante a fase inicial da LV, onde ocorre uma ativação das plaquetas, permitindo que haja o recrutamento de fagócitos (resposta primária) aumentando assim a rápida disseminação desses patógenos intracelulares. Entretanto, na fase tardia da infecção, o patógeno passa a modular a linha de produção, refletindo em uma trombocitopenia marcante (Mukherjee et al., 2020). O aumento da RPCU, proteína

urinária, fósforo sérico e leucócitos como progressão de uma trombocitopenia pode ocorrer como um indício inicial de injúria renal devido ao depósito de imunocomplexos.

A concentração de fósforo sérica também apresentou correlação com a proteína urinária. Estudo realizado por Di Iorio et al. (2013) demonstrou importante relação entre o fósforo e proteinúria. Quando analisada a resposta de renoproteção, foi detectado que para uma redução da proteinúria não foi necessária uma redução de ingestão protéica e sim uma redução do fósforo, seja na sua excreção urinária ou na sua concentração sérica. Ou seja, foi demonstrado que pacientes com baixa ingestão de fósforo ou baixos níveis de fósforo sérico foram aqueles que apresentaram a maior redução da proteinúria, independente da excreção de ureia (fator utilizado como estimativa de ingestão protéica). Por outro lado, pacientes que apresentaram elevados níveis de fosfatúria ou de concentração sérica de fósforo não apresentaram melhora na redução da proteinúria independente se tiveram ou não redução da sua ingestão proteica.

Para a interpretação dos resultados e análise dos fatores preditivos e marcadores de prognóstico, avaliamos os gráficos 3 e 4 e isolamos os quatro pacientes que apresentaram uma evolução negativa, partindo de uma classificação nos estádios IIA em T0 para uma classificação no estágio IV em T1. Dois pacientes apresentavam trombocitopenia e hipertensão arterial sistêmica em T0. Ambos não apresentavam proteinúria, azotemia ou hiperglobulinemia e apresentavam SDMA < 14µg/dL. Demonstrando a importância da avaliação da hipertensão sistêmica e da trombocitopenia em cães infectados pela *L. infantum*. Os outros dois pacientes não apresentavam nenhuma alteração de exames laboratoriais em T0.

## **7. CONCLUSÕES:**

A LVC é uma doença complexa que acomete diversos órgãos e sistemas causando inúmeras alterações em hemograma, função bioquímica e urinálise. O diagnóstico precoce da lesão renal é de extrema importância.

O SDMA não demonstrou vantagens em relação à RPCU para avaliação da injúria renal em cães infectados por LV nos tempos estudados. Entretanto, indicamos a

dosagem da SDMA sérica em associação a RPCU, creatinina sérica para avaliação da nefropatia na LVC.

A SDMA sérica e a RPCU não apresentaram valor como fator preditivo ou como marcador de prognóstico nos cães infectados por LV avaliados neste estudo. Ressaltamos que os cães avaliados neste estudo estavam recebendo algum tratamento e por isso, as correlações podem apresentar algum viés.

As plaquetas foram o principal analito a demonstrar valor como fator preditivo e como marcador de prognóstico, estando relacionada com biomarcadores de injúria renal, como o fósforo sérico e RPCU. Os leucócitos, hematócrito, fósforo sérico, densidade urinária e pressão arterial sistêmica também demonstraram valor como fator preditivo ou como marcador de prognóstico nos cães infectados por LV.

Conclui-se que a avaliação da trombocitopenia é importante na avaliação na LVC e sua reversão corresponde a uma melhora no prognóstico. A associação de hemograma completo, biomarcadores séricos e urinários, além da mensuração da pressão arterial são fundamentais para uma avaliação adequada e para a monitorização da LVC.

## **CAPITULO II: PROPOSTA DE ÍNDICE QUANTITATIVO E MULTI FATORIAL PARA A AVALIAÇÃO DE LESÃO RENAL DE CÃES, NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

### **1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **1.1 FISIOPATOLOGIA DA INJÚRIA RENAL EM CÃES COM LEISHMANIOSE:**

Os aspectos imunopatológicos em órgãos pertencentes ao sistema fagocítico mononuclear são classicamente descritos em cães com LV (Tafari, 2001; Reis et al., 2009). No entanto, órgãos como rins, coração e pulmão também são acometidos e estudos recentes têm caracterizado a lesão tecidual e os seus mecanismos patológicos (Alves et al., 2010; Costa et al., 2010; Rigo et al., 2013). Desses órgãos, o comprometimento renal assume uma importância ímpar na LVC, uma vez que na literatura há vários relatos dessa alteração como a principal causa de morte dos cães infectados (Lopez et al., 1996; Torres et al., 2013; Reguera et al., 2016).

Nos achados laboratoriais indicativos de lesão renal na LVC observa-se hipoalbuminemia devido à perda renal por proteinúria como reflexo do aumento da permeabilidade capilar glomerular às proteínas plasmáticas, azotemia ou uremia relacionada à progressão de uma glomerulopatia, proteinúria como reflexo do aumento da permeabilidade capilar glomerular às proteínas plasmáticas, e no exame do sedimento urinário também podem estar presentes piúria e hematúria (Moura et al., 2002; Costa et al., 2003).

Diversos estudos atribuem à insuficiência renal IR como causa de morte dos cães com LV, porém a sua patogênese ainda é pouco esclarecida (Lopez et al., 1996; Noli, 1999; Costa et al., 2010; Rigo et al., 2013). Tanto em modelo humano, canino e murino LV há controvérsias acerca dos elementos que levam à lesão renal. A deposição de imunocomplexos, ativação de células T e moléculas de adesão são descritas como

possíveis mecanismos que levam à injúria renal (Elshafie et al., 2006; Prianti et al., 2007; Costa et al., 2010). Na LVC, estudos realizados por Costa et al. (2003) foram pioneiros na avaliação e classificação histopatológica das lesões renais em cães naturalmente infectados por *L. infantum* em área endêmica com base nos critérios utilizados pela Organização Mundial de Saúde para casos humanos. O trabalho demonstrou que em 100% dos cães com LV havia predomínio de glomerulonefrites proliferativas, e 78,2% apresentaram nefrite intersticial. Outras alterações como degeneração hialina e vacuolar, atrofia tubular e fibrose também foram evidenciadas nos cães com LVC.

Os primeiros relatos sobre os mecanismos patogênicos responsáveis pelo envolvimento renal na LVC sugeriram que a deposição de imunocomplexos causavam as glomerulopatias observadas nos cães com LV. Mancianti et al., (1989) detectaram depósitos de IgG no tecido renal de cães naturalmente infectados por *L. infantum*, sendo que essa imunoglobulina era policlonal e reconhecia antígenos de membrana de *Leishmania*. Seguindo ainda essa abordagem, Lopez et al. (1996) determinaram elevadas concentrações de complexos imunes em cães com LV associando-as a um aumento dos valores de creatinina sérica.

Outro estudo revelou por imunomarcção depósitos de IgG, IgM e C3 em áreas mesangiais como também na parede dos capilares glomerulares, reforçando essa hipótese (Poli et al., 1991). Em estudo realizado por Costa et al., (2010), foi demonstrado não haver participação clara de depósitos de imunoglobulina em cães infectados por LV, mas é possível que ocorra migração de células T CD4 + para os glomérulos, participação de moléculas de adesão e diminuição da apoptose de células contribuindo para determinar o padrão proliferativo da glomerulonefrite em LV.

Estudo realizado por Torres et al., (2013), revelou através de análise microscópica o predomínio de nefrite intersticial mononuclear de graus variados em 59,3% dos cães avaliados. Entretanto, não houve diferença entre a carga parasitária renal de sintomáticos e oligossintomáticos. As lesões renais mais frequentes foram as de ordem inflamatória e a quantidade de parasitos não influenciou na característica dessas

lesões e nem nas alterações bioquímicas, mesmo em cães com diferentes classificações clínicas.

### **1.2. Glomerulonefrites:**

As glomerulopatias são constituídas por um grupo de doenças que acometem os glomérulos, sendo a glomerulonefrite (GN) a forma mais comum caracterizada por diferentes padrões histológicos (Miguel e Rodriguez Puyol, 2007). O dano irreversível ao rim ocorre quando a lesão glomerular atinge a região túbulo intersticial comprometendo a função do órgão em toda sua extensão. As Glomerulonefrites podem ser classificadas em: GN proliferativa, GN membranoproliferativa, GN membranosa e GN esclerótica (Rigo et al., 2013).

Histologicamente, a GN proliferativa é caracterizada pelo aumento da celularidade do tufo glomerular devido à proliferação de células endoteliais, epiteliais, mesangiais e glomerulares, bem como ao influxo de células inflamatórias envolvendo o mesângio. Na GN membranosa ocorre um espessamento difuso da membrana basal do capilar glomerular, e na GN membranoproliferativa observa-se hiper celularidade com proliferação de células glomerulares e espessamento da membrana basal capilar e mesângio. Já na GN esclerótica, os glomérulos estão gravemente afetados, diminuídos de tamanho e hialinizados devido ao aumento do tecido conjuntivo fibroso e matriz mesangial com perda de capilares glomerulares (Santos e Alessi, 2010; McGavin e Zachary, 2013).

As imunidades humorais e celulares contribuem na imunopatogênese da glomerulonefrite e podem ter importante papel na determinação dos diferentes padrões histológicos (Kurts et al., 2013). Imunoglobulinas monoclonais (Ig) comprometem o rim envolvendo sua deposição no glomérulo e com menos frequência após a formação de anticorpos direcionados contra antígenos existentes na membrana basal glomerular (Karras et al., 2002; Nasr et al., 2009; Pedchenko et al., 2010).

A GN por imunocomplexos geralmente está associada a infecções persistentes que apresentam uma ação antigênica prolongada, que aumenta a formação de imunocomplexos solúveis cuja localização nos capilares glomerulares estimula a

formação de quimiotáticos para neutrófilos que liberam proteases que lesam a membrana basal. Quando esta ação persiste, a lesão glomerular é intensificada pelas moléculas biologicamente ativas a partir de infiltrações de monócitos nas fases posteriores à inflamação aguda (McGavin e Zachary, 2013). Células T também participam na imunopatogenia da GN, uma vez que foram constatados que subpopulações de células T CD4+ ativam diferentes mecanismos efetores que resultam em diferentes padrões e severidade da injúria glomerular (Wu et al., 2002; Kurts et al., 2013). Em modelo murino foi demonstrado que a transferência de células T CD4+ e T CD8+ específicas para antígenos glomerulares podem causar danos ao rim. A liberação de antígenos glomerulares inicia um ciclo vicioso envolvendo a apresentação antigênica pelas células dendríticas residentes às células T, com isso havendo produção acentuada de quimiocinas e citocinas inflamatórias, maior influxo de células T CD8+ e macrófagos e conseqüente lesão tecidual (Wu et al., 2002; Kurts et al., 2007).

Lesões glomerulares observadas em infecções parasitárias apresentam variedade de lesões, em sua maioria são proliferativas, exibindo acúmulo de células no tufo glomerular, do tipo glomerulonefrite mesangioproliferativa ou membranoproliferativa. Também são observadas lesões glomerulares com pouca ou nenhuma proliferação (Van Velthuysen e Florquin, 2000; Rigo et al.; 2013).

As presenças de doenças glomerulares são um fator de prognóstico negativo, sendo uma das principais causas de óbito na LVC. A associação de biomarcadores fisiológicos que possam contribuir com o diagnóstico precoce da IRA e no auxílio à escolha do tratamento para o paciente é de extrema importância. A elaboração de um índice quantitativo e multifatorial pode contribuir para o manejo clínico do paciente.

## **2. HIPÓTESES:**

Um índice quantitativo e multifatorial contribui para avaliar o grau de gravidade da injúria renal, contribuindo para prognóstico e determinação de conduta, em casos de cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1 OBJETIVO GERAL:

Elaboração de índice quantitativo e multifatorial, que inclua um conjunto de biomarcadores que podem contribuir para a injúria, insuficiência e doença renal para avaliação da lesão renal em cães naturalmente infectados por *L. infantum*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Elaborar índice quantitativo e multifatorial de biomarcadores para avaliação de dano renal, em cães naturalmente infectados por *L. infantum*.

Comparar os resultados obtidos utilizando índice quantitativo e multifatorial em cães naturalmente infectados por *L. infantum* com os atuais estadiamentos utilizados.

Comparar os resultados obtidos pelo índice quantitativo e multifatorial em cães naturalmente infectados por *L. infantum*, com os parâmetros clínicos e laboratoriais do paciente.

### 4 MATERIAL E MÉTODOS:

#### 4.1. ANIMAIS:

Foi realizado levantamento retrospectivo através da análise de prontuários médicos de 165 cães de idade, sexo e raças diferentes, castrados e não castrados, naturalmente infectados por *L. infantum* e em de diferentes estágios da LVC, em hospital e clínicas veterinárias particulares de Belo Horizonte - MG.

Os cães foram classificados em cinco grupos ordenados, levando em consideração seu quadro clínico:

- **GRUPO CONTROLE** (pacientes sem alterações clínicas, que realizaram apenas acompanhamento clínico);
- **GRUPO RISCO BAIXO** (pacientes que realizavam acompanhamento clínico, porém apresentavam alterações clínicas discretas);



- **GRUPO RISCO INTERMEDIÁRIO** (pacientes que necessitaram de internação para o controle de alterações clínicas discretas);
- **GRUPO RISCO ALTO** (pacientes que necessitaram de internação para o controle de alterações clínicas moderadas e importantes);
- **GRUPO ÓBITO** (pacientes que vieram a óbito em um intervalo de até 48 horas após a coleta dos exames);

Inicialmente foi realizada uma avaliação de 124 cães, divididos entre os cinco grupos. Após a elaboração do índice foi realizado um novo levantamento com 41 animais, diferentes dos 124 iniciais, para a avaliação do índice elaborado.

Como critério de inclusão no estudo o prontuário médico dos cães devia conter uma anamnese completa, além dos exames de hemograma, reticulócitos, bioquímica clínica (globulina sérica, albumina sérica, creatinina urinária, creatinina sérica, uréia sérica, fósforo sérico), dimetilarginina simétrica sérica, pressão arterial sistêmica, análise de urina e razão proteína creatinina urinária, todos realizados em um mesmo atendimento.

#### **4.2 DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA:**

Foram incluídos nos estudo cães com exames parasitológicos positivos para leishmaniose ou sorologia com titulação maior ou igual a 1:160 em exame de RIFI, valor da amostra 4 vezes maior que o ponto de corte no exame ELISA.

### **4.3. EXAMES LABORATORIAIS:**

A coleta de sangue foi realizada com seringas de 5 mL ou 10 mL e agulha 25x7mm na veia cefálica ou na jugular externa para exames, de acordo com a conveniência para o animal.

A coleta de urina foi realizada pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom utilizando-se seringa de 10 mL e agulha 25x7mm ou por sonda uretral.

Todos os exames foram executados em laboratório interno dos hospitais e clínicas veterinárias particulares de Belo Horizonte - MG.

Para realização de hemograma e leucograma foram coletados 0,5 mL de sangue venoso e acondicionado em micro tubo com EDTA. O sangue foi processado em aparelho automático (Analisador Hematológico Procyte Dx Idexx<sup>®</sup>) e aparelho semiautomático (Analisador Hematológico Hemofoco Vet). Foram confeccionados esfregaços sanguíneos para contagem celular diferencial, fixando-se a lâmina com metanol, por 5 minutos, seguido da coloração com Romanowsky.

Os exames bioquímicos foram processados a partir do soro proveniente de 3,5 mL de sangue coletado e acondicionado em tubo específico, sem anticoagulante. Os exames bioquímicos, creatinina urinária e proteína urinária, para obtenção da razão proteína creatinina urinária, foram analisados em aparelho automático (Catalist One Idexx<sup>®</sup>) no método de bioquímica seca e semiautomático (Mindray BA-88A) no método de bioquímica úmida.

A urina foi processada no prazo máximo de duas horas após a coleta, onde foi realizado o exame de análise de urina (exame físico, microscópico, e por tiras reativas).

### **4.4. MENSURAÇÃO DE PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA:**

A pressão arterial sistêmica foi aferida através da utilização de doppler vascular ou através de método oscilométrico com o animal posicionado em decúbito lateral, respeitando critérios de tamanho de manguito e mínimo estresse. Foram realizadas de 3 a 7 mensurações, sendo que a primeira medição foi descartada para se obter uma média das outras medições, considerando o valor da PA do paciente.

#### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:**

Para a elaboração do índice, realizou-se ajuste do Modelo Linear Generalizado com a distribuição de Poisson, que é adequada para modelar dados com essas características. Foram ajustados modelos com todas as combinações possíveis das variáveis preditoras candidatas até o limite de cinco variáveis preditoras (12597 modelos). A qualidade dos modelos foi quantificada através da estatística do critério de informação do Akaike (AIC), a correlação de Pearson entre os índices observados e os índices estimados pelo modelo e do Pseudo Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de McFadden. O ajuste do modelo foi avaliado a partir da construção de envelopes de probabilidade simulados (Moral et al., 2017).

Como esses modelos visam à predição de novos casos, também se utilizou a técnica da validação cruzada, visando diminuir o viés de seleção devido ao estudo ser observacional e não experimental (Heller et al., 2009). Nesta técnica, o banco de dados foi dividido igualmente em quatro partes. Três partes foram utilizadas para ajuste do modelo e a quarta parte foi utilizada apenas para predição, calculando-se a correlação de Pearson entre os índices observados e os índices estimados pelo modelo.

O procedimento foi repetido para cada uma das quatro partes e calculou-se a média das quatro correlações obtidas. O melhor modelo escolhido (modelo mais parcimonioso) foi aquele com o menor número de variáveis significativas, que fosse adequado segundo a análise dos resíduos e que tivesse o menor valor de AIC e os maiores valores da correlação de Pearson e do Pseudo Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de McFadden.

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

### **5 RESULTADOS:**

Após análise estatística foram separados os melhores modelos para a elaboração do índice. Os modelos estão descritos na tabela 7 ordenados pelo AIC, em ordem crescente.

ID	Modelo	N° de obs.	AIC	Correl.	Pseudo-R2	Correl. Valid. Cruz.
1	INDICE = UREIA + PROTTOT + HCT + RPCU	124	219,3	0,80	0,30	0,72
2	INDICE = UREIA + GLOB + HCT + RPCU	124	218,9	0,80	0,30	0,72
2	INDICE = UREIA + HCT + RPCU + PTN.UR	124	220,9	0,79	0,29	0,71
3	INDICE = UREIA + HCT + RPCU	124	223,2	0,78	0,28	0,69
4	INDICE = UREIA + PROTTOT + HEMAC + RPCU	124	224,4	0,78	0,28	0,71

Tabela 7: melhores modelos, ordenados pelo AIC do menor para o maior.

O modelo 1, com os biomarcadores fisiológicos uréia sérica, proteínas séricas totais (PROTTOT), hematócrito (HCT) e RPCU e o modelo 2 com os biomarcadores fisiológicos uréia sérica, globulina sérica (GLOB), hematócrito (HCT) e RPCU apresentaram os melhores valores dos índices de qualidade e são equivalentes entre si como modelos de predição. Sendo descritos nos seguintes modelamentos matemáticos.

*Modelo 1:*

$$\hat{\text{Índice}} = \exp(0.0078 * \text{UREIA} - 0.044 * \text{HCT} - 0.0776 * \text{RPCU} + 0.086 * \text{PROTTOT})$$

*Modelo 2:*

$$\hat{\text{Índice}} = \exp(0.0081 * \text{UREIA} - 0.041 * \text{HCT} - 0.080 * \text{RPCU} + 0.102 * \text{GLOB})$$

Todos os quatro biomarcadores utilizados nos modelos apresentaram correlação significativa. Calculando uma métrica de importância a partir da técnica de partição hierárquica (Chevan & Sutherland, 1991), observa-se que a uréia sérica possui a maior importância no modelo, seguida pelo HCT. Se retirarmos qualquer biomarcador do modelo, ele diminui significativamente a sua capacidade preditiva.

Aplicou-se a equação de predição dos modelos obtidos aos dados dos novos cães, classificados previamente nas classes: Controle (índice 0), Baixo (índice 1), Intermediário (índice 2), Alto (índice 3) e Óbito (índice 4). Os índices preditos pelos modelos foram comparados aos índices reais observados. Foram construídas tabelas de contingência e calculou-se o índice de Kappa ponderado. Sendo a tabela 8 para o modelo 1 e a tab. 9 para o modelo 2.

A tabela 8 na diagonal, em verde, descrevem-se as classificações corretas feitas pelo modelo. Oitenta e seis animais foram classificados corretamente, correspondendo a 69% de 124 animais classificados. Nas diagonais em amarelo, as classificações feitas pelo modelo que não foram exatamente iguais, mas ficaram próximas, estimando uma classe imediatamente acima ou imediatamente abaixo da classificação real. Trinta e cinco animais estiveram nessa situação, correspondendo a 28% do total. Nas diagonais em laranja, as classificações feitas pelo modelo que estimaram duas classes imediatamente acima ou imediatamente abaixo da classificação real. Apenas três animais estiveram nessa situação, correspondendo a 2% do total. Nenhum animal foi classificado com um erro de mais de duas classes para cima ou para baixo (células vermelhas). O índice Kappa ponderado, que considera as distâncias entre as classificações corretas e as estimadas com pesos quadráticos, obtém-se um valor de 0,79 (valor  $p < 0,001$ ).

		Classificação observada				
		0	1	2	3	4
Classificação predita	0	61	18	1	0	0
	1	7	18	5	1	0
	2	0	1	3	0	1
	3	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	2	3

Tabela 8: Classificação dos animais utilizando o modelo 1 quanto ao índice estimado comparado o índice real observado.

Na tabela 9, vinte e um animais foram classificados corretamente, correspondendo a 53% de 40 animais classificados. Nas diagonais em amarelo, observam-se as classificações feitas pelo modelo que não foram exatamente iguais, mas ficaram próximas, estimando uma classe imediatamente acima ou imediatamente abaixo da classificação real. Quinze animais estiveram nessa situação, correspondendo a 38% do total. Nas diagonais em laranja, as classificações feitas pelo modelo que estimaram duas classes imediatamente acima ou imediatamente abaixo da classificação real.

Apenas quatro animais estiveram nessa situação, correspondendo a 10% do total. Nenhum animal foi classificado com um erro de mais de duas classes para cima ou para baixo (células vermelhas). Se calcularmos o índice Kappa ponderado, que considera as distâncias entre as classificações corretas e as estimadas com pesos quadráticos obtemos um valor de 0,83 (valor  $p < 0,001$ ). Sendo este o modelo selecionado como índice sugerido para avaliação da lesão renal já que este apresentou valor do índice Kappa superior ao modelo 1.

		Classificação observada				
		0	1	2	3	4
Classificação predita	0	10	6	1	0	0
	1	0	4	4	2	0
	2	0	0	1	1	1
	3	0	0	1	1	1
	4	0	0	0	2	5

Tabela 9: Classificação dos animais utilizando o modelo 2 quanto ao índice estimado comparado o índice real observado.

A variação do índice nos cinco grupos que levaram em consideração o quadro clínico do paciente está ilustrada na tabela 10.

GRUPO	MENOR	MAIOR	MÉDIA	DESVIO PADRÃO
CONTROLE	0,19	0,41	0,31	0,07
RISCO BAIXO	0,19	0,85	0,45	0,23
RISCO INTERMEDIÁRIO	0,26	3,06	1,37	0,96
RISCO ALTO	1,24	11,05	3,83	3,76
ÓBITO	1,71	40,38	8,86	13,93

Tabela 10: Principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos) separados por grupos levando em consideração o quadro clínico do paciente.

Quando aplicado o índice dentro dos estadiamentos do Leishvet (2011) obtivemos os valores estatísticos demonstrados na tabela 11.

<b>ESTÁDIO LEISHVET</b>	<b>MENOR</b>	<b>MAIOR</b>	<b>MÉDIA</b>	<b>DESVIO PADRÃO</b>
IIA	0,19	0,63	0,33	0,17
IIB	0,54	1,2	0,91	0,52
III	0,25	2,38	0,60	0,62
IV	0,26	40,38	5,43	9,67

Tabela 11: Principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos) separados por estágio Leishvet (2011).

## 6 DISCUSSÃO:

Os sistemas de estadiamento são muito importantes em doenças complexas como a leishmaniose, já que eles conseguem contribuir para o prognóstico, bem como para o planejamento terapêutico dos cães acometidos. O estadiamento Leishvet (2011) possui 4 estádios e 2 subestádios e o estadiamento Brasileish (2018) possui 5 estádios e 2 subestádios, ambos considerando a creatinina sérica e a RPCU recomendadas pelo estadiamento da DRC do grupo IRIS (Solano-Galleno et al., 2011; Proverbio et al., 2016; Brasileish, 2018).

Atualmente os estadiamentos sugeridos pelos grupos de estudo sobre leishmaniose, Brasileish (2018) e Leishvet (2011) são estadiamentos qualitativos, que se baseiam principalmente na creatinina sérica, um biomarcador de insuficiência renal, para avaliação da lesão renal e utilizam a proteinúria renal, um biomarcador de injúria renal, em seu sub estadiamento para avaliação da lesão renal. Uma classificação mais abrangente da LVC exige uma avaliação em conjunto de biomarcadores de injúria e de insuficiência.

A ureia, principal componente do índice e sendo incluída como um biomarcador de insuficiência renal, é sintetizada no fígado a partir da amônia, sendo a maior parte dela de origem da quebra de aminoácidos derivados das proteínas dos tecidos ou alimentar. A amônia também é absorvida no intestino onde é formada pela ação das bactérias sobre os aminoácidos da dieta e da uréia endógena recirculante e levada para o fígado. A uréia é amplamente excretada pelos rins, embora cerca de um quarto seja excretado pelo intestino, o qual é convertido em amônia, absorvido e reconvertido em uréia. Nos rins, a

uréia é livremente filtrada pelos glomérulos e passivamente reabsorvida nos túbulos. (Bush, 2004).

As determinações sanguíneas de uréia e creatinina são componentes essenciais na avaliação do sistema urinário. Tais parâmetros sanguíneos estimam a filtração glomerular. As concentrações de uréia e creatinina não aumentam apreciavelmente acima dos valores normais, até que 75% dos néfrons estejam destruídos. (Nelson e Couto, 2001).

A uréia sérica apresentou correlação forte com os cinco grupos onde os cães foram classificados baseados na condição clínica, em relação à creatinina sérica e o fósforo sérico. Outro fator para a creatinina e o fósforo séricos não serem incluídos no índice se deve porque neste estudo, a uréia sérica apresentou correlação forte com a creatinina sérica (0.77;  $p < 0,001$ ) e com o fósforo sérico (0.56;  $p < 0,001$ ), assim, em um modelo de regressão não se pode associar duas variáveis preditoras correlacionadas, este é um problema conhecido como multicolinearidade.

O hematócrito, outro marcador de insuficiência renal e o segundo biomarcador com maior importância no índice pode apresentar variações em cães infectados por *L. infantum*. Na LVC, a anemia pode ocorrer tanto por eritropoiese diminuída em cães DRC, cronicidade da doença, hemorragias, lise de hemácias e diminuição eritrocitária por produção de auto anticorpos que levam ao sequestro esplênico (Ciaramella e Corona, 2003; Ikeda - Garcia et al., 2003).

A globulina foi utilizada no índice como um biomarcador de injúria renal. A síndrome de hiperviscosidade sanguínea causada pela hiperproteïnemia gerada pela ativação dos linfócitos B e elevada produção de anticorpos (Medeiros et al. 2008; Solano-Gallego et al., 2011). A globulina sérica apresentou correlação forte com as proteínas séricas totais (0.,90;  $p < 0,001$ ), também não sendo necessário a inclusão dos dois biomarcadores no índice devido a multicolinearidade.

A RPCU é um dos principais achados laboratoriais como demonstrado no capítulo I deste estudo, sendo assim, também utilizada no índice como um biomarcador de injúria renal.



Assim como os dados encontrados no modelamento matemático sugerido por Segev et al. (2008) o índice para avaliação de lesão renal também apresentou fator preditivo da injúria renal e como marcador de prognóstico.

O estadiamento atual dos grupos de estudo da leishmaniose, podem induzir a um sub estadiamento ou a um supra estadiamento dos pacientes, dificultando a escolha da conduta mais adequada para cada indivíduo. Comparando os índices estatísticos dos cães classificados através do estadiamento Leishvet (2011) observa-se uma variação do índice de 0,26 a 40,38 no estágio IV. Uma amplitude muito grande, e que inclui cães em bom estado clínico e sem alterações comportamentais. Também é observada uma variação do índice nos estádio IIA e IIB que podem indicar um sub estadiamento já que os pacientes apresentavam alterações clínicas e até indicações para internação para tratamento.

Observa-se uma evolução crescente do índice entre os grupos que levam em conta a condição clínica do paciente, como ilustrado no graf. 24. Resultados diferentes de quando utilizamos o índice pelos estádios da Leishvet (2011).

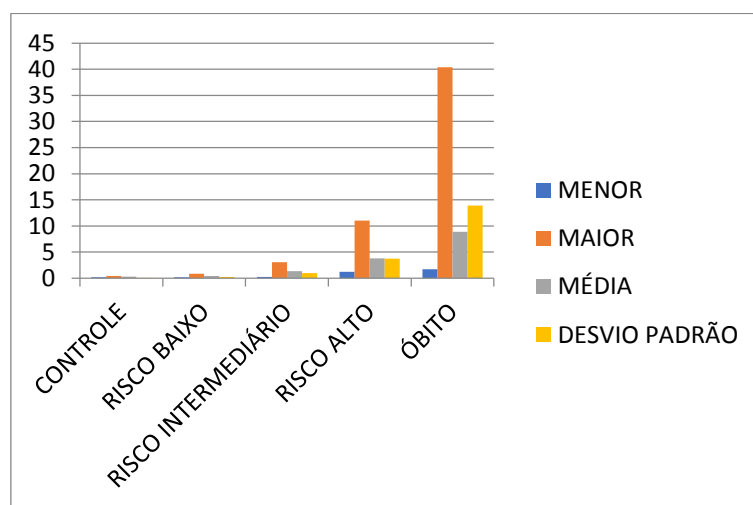


Gráfico 24: Resultados obtidos através da aplicação do índice em cada grupo.

De acordo com o ponto de vista clínico e com o índice sugerido neste estudo um cão com índice entre 0 e 0,5 apresenta baixo risco de necessitar de internação (6%), risco moderado de apresentar IRA (41%) e não apresentam risco de óbito (0%). Pacientes com índice entre 0.51 e 1.0 apresentam risco moderado de necessitarem de internação

(33%), risco importante de apresentar IRA (67%) e não apresentam risco de óbito (0%). Cães com índice entre 1.1 e 3.0 apresentam altas possibilidades de necessitar de internação e de apresentar IRA (100%) e baixo risco de óbito (10%). Pacientes com índice entre 3.1 e 5.0 apresentam altas possibilidades de necessitar de internação e de apresentar IRA (100%) e risco moderado de óbito (50%). Cães com índice superior a 5.0 apresentam risco iminente de óbito, necessitando de terapias suporte intensivas e imediatas, dados demonstrados na tab. 11. O índice também pode ser utilizado para comparar ou classificar objetivamente a gravidade da doença entre diferentes populações de pacientes.

0 - 0,5	0%	DE MORTES
0 - 0,5	6%	INTERNAÇÃO
0 - 0,5	41%	IR
0,51 - 1	0%	DE MORTES
0,51 - 1	33%	INTERNAÇÃO
0,51 - 1	67%	IR
1,1 - 3,0	10%	DE MORTES
1,1 - 3,0	100%	INTERNAÇÃO
1,1 - 3,0	100%	IR
3,1 - 5,0	50%	DE MORTES
3,1 - 5,0	100%	INTERNAÇÃO
> 5,0	100%	IR
> 5,0	100%	DE MORTES
> 5,0	100%	INTERNAÇÃO

Tabela 12: Percentual de internações, insuficiência renal (IR) e mortes em intervalos do índice obtidos no estudo.

## 7 CONCLUSÕES FINAIS:

O índice apresentado neste estudo fornece uma base para a previsão do resultado que se correlaciona altamente com o resultado real em cães naturalmente infectados por *L. Infantum* que apresentam risco de IRA, IR ou óbito. O índice sugerido é simples e pode ser aplicado com base nas informações coletadas na 1ª hora de internação. Quando usados em conjunto com outras avaliações clínicas, esse sistema de

pontuação pode fornecer uma ferramenta de prognóstico preciso para auxiliar na decisão do início e / ou escolha da terapia. Esse sistema de pontuação também pode ser usado como um parâmetro objetivo para comparar a gravidade da doença entre diferentes populações de pacientes. Com o tempo, este sistema de pontuação deve ser validado prospectivamente em cães infectados pela *L. infantum*.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

ABREU-SILVA, A.L.; LIMA, T.B.; DE MACEDO, A.A.; MORAES-JÚNIOR, F.E.J.; et al. Seroprevalence, clinical and biochemical data of dogs naturally infected by *Leishmania* and phlebotominae sandfly fauna in an endemic area in São Luis Island, Maranhão State, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.17, Suppl. 1, p.197-203, 2008.

ACIERNO, M.J.; LABATO, M.A. Hypertension in dogs and cats. *Compendium on continuing education for practicing veterinarians*, v.26, p. 336-345, 2004.

ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; RALLIS, T.S.; KOYTINAS, A.F.; TONTIS, D.; et al. Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med.*, v. 76, n. 1, p. 53-57, 2007.

AGUIAR, P. H. P.; SANTOS, S. O.; PINHEIRO, A. A.; et al. Quadro clínico de cães infectados naturalmente por *Leishmania chagasi* em uma área endêmica do estado da Bahia, Brasil. *Ver. Brás. Saúde Prod. Animal*, v.8, n.4, p. 283-294, 2007.

ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*,v. 57, p. 1-87, 2004.

ALVES, G. B. et al. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Braz J Med Biol Res*, v. 43, n. 3, p. 310- 5, 2010.

AMUSATEGUI, I.; SAINZ, A.; RODRÍGUEZ, F.; TESOURO, M.A. Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis. *European Journal of Epidemiology*, v.18, n.2, p.147-156, 2003.

ARTAN, R.; YILMAZ, A.; AKÇAM, M.; AKSOY, N.H. Liver biopsy in the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, v. 21, p.299-302, 2006.

BABITT, J.L.; LIN, H.Y. Mechanisms of anemia in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 23, p. 1631-1634, 2012.

BANETH, G. A.; KOUTINAS, A.F.; SOLANO-GALLEGO, L. *et. al.* Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis. Part one. *Trends Parasitology* v.24, p.324–330, 2008.

BANETH, G. Leishmaniasis. In: Greene, C.E. *Infectious diseases of the dog and cat*. 3.ed. Philadelphia: Elsevier, p.685-698, 2006.

BARBIÉRI, C. L. Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.*, v.28, n.7, p.329-337, 2006.

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

BRAGA, E.T.; LEITE, J.H.; ROSA, F.A. *et al.* Hypertension and its correlation with renal lesions in dogs with leishmaniosis. *Ver. Bras. Parasitol. Vet.* v.24, p.45-51, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de vigilância e controle da Leishmaniose Visceral*. Brasília, 41p, 2006.

BRASILEISH - Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal. *Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina*, 16p. 2018. Disponível em: <http://brasileish.com.br/diretrizes.html>. Acesso em 07/01/2021.

BRAUN J.P.; LEFEBVRE H.P.; WATSON A.D.J. Creatinine in the dog: A review. *Vet. Clin. Pathol.* v.32, p.162–179, 2003.

BRITES, M.G. Trombocitopenia imunomediada em cães: revisão bibliográfica e relato de casos [monografia] [Internet]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007 [citado 7 Fev 2021]. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/13361>

BRITO, C.F.P.; PEREIRA, D.P. Diagnóstico molecular da *Leishmania* spp. em flebótomos provenientes de áreas de ocorrência de leishmanioses. In Fátima Conceição, Carlos Roberto Alves. *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. p.217- 231, 2014.

BRITO, F.L.C.; ALVES, L.C.; ORTIZ, J.P.D.; MAIA, F.C.L; et al. Uveitis associated to the infection by *Leishmania chagasi* in dog from Olinda city, Pernambuco, Brazil. *Ciência Rural*, 34: 925-929, 2004.

BROWN, S.A. Symmetric dimethylarginine (SDMA): new biomarker of renal function in cats and dogs (2016). Disponível em: [http://www.iris-kidney.com/pdf/12\\_symmetric-dimethylarginine\\_track-changes.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/12_symmetric-dimethylarginine_track-changes.pdf). Acessado em 21/10/2020.

BROWN, S.E., J.; FRANCEY, T.; POLZIN, D.; VADEN, S. Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *J. Vet. Intern. Med.*v.27, p27-43, 2013.

BUSH, B.M. *Interpretação de Resultados Laboratoriais para Clínico de Pequenos animais*. São Paulo, Roca, p. 169 – 232, 2004.

CHABANNE, L.; BONNEFONT, C.; BERNAUD, J.; RIGAL, D. Clinical applications of flow cytometry and cell immunophenotyping to companion animals (dog and cat). *Meth. Cell Sci.* v.22, p.199–207, 2000.

CHEVAN, A. e SUTHERLAND, M. Hierarchical Partitioning. *The American Statistician* v.45, p.90–96, 1991.

CHEVAN, A.; SUTHERLAND, M. Hierarchical Partitioning. *The American Statistician*, v. 45,P- 90–96, 1991.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine Leishmaniasis: clinical and diagnostic aspects. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, v. 25, n.5, p.358-368, 2003.

CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; LUNA, R.; AMBROSIO, R.; et al. A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*, 141: 539-543, 1997.

CIARAMELLA, P.; PELAGALLI, A.; CORTESE, L. PERO, M.E.; et al. Altered platelet aggregation and coagulation disorders related to clinical findings in 30 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet J.* v.169, n.3, p.465-7, 2005.

COHEN, G.; HÖRL, W.H. Immune dysfunction in uremia: an update. *Toxins Journal*, v. 4, n.11, p. 962-90, 2012.

CORTADELLAS, O.; FERNANDEZ DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYON, A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 2, pp. 293–300, 2008.

CORTADELLAS, O.; FERNANDEZ-DEL PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYON, A. Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic kidney disease. *Veterinary Record*, n.164, v.16, p.487–490, 2009.

COSTA, C.H.N.; GOMES, R.B.B.; SILVA, M.R.B.; GARCEZ, L.M.; RAMOS, P.K.S.; SANTOS, R.S.; SHAW, J.J.; DAVID, J.R.; MIGUIRE, J.H. Competence of the human host as a reservoir for *Leishmania chagasi*, *Journal of Infectious Disease*, 182: 997-1000, 2000.

COSTA, D.L.; ROCHA, R.L.; DE BRITO FERREIRA CHAVES, E.; DE VASCONCELOS BATISTA, V.G.; COSTA, H.L.; NERY COSTA, C.H. Predicting death from kala-azar: Construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 728–740, 2016.

COSTA, F.A.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C.; SILVA, S.M.; SINHORINI, I.L.; *et al.* Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol.* V. 40, p. 677-84, 2003.

COSTA, F.A.; PRIANTI, M.G.; SILVA, T.C.; SILVA, S.M. *et al.* T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infect Dis*, v. 10, p. 112, 2010.

COWGILL, L. Grading of acute kidney injury. International Renal Interest Society (IRIS), 2016. Disponível em: < [http://www.iris-kidney.com/pdf/4\\_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/4_idc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf)>. Acessado em 05/01/2022.

DA COSTA-VAL, A.P.; CAVALCANTI, R.R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M.S.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P.; MELO, M.N. Canine visceral leishmaniasis: relationships between clinical status, humoral immune response,



haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. *Veterinary Journal*, v.174, n.3, p.636-43, 2007.

DAHLEM, D. P.; NEIGER, R.; SCHWEIGHAUSER, A. et al. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.31, n.3, pp.799–804, 2017.

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*. Volume 63, Issue 3, Pages 809-825. 2003.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral Leishmaniasis in Brazil: Revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, c. 48, n.3, p. 151-156. 2006

DANTAS-TORRES, F.; BRITO, M.E.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Seroepidemiological survey on canine leishmaniasis among dogs from an urban area of Brazil. *Vet Parasitol*, v. 140, p. 54-60. 2006.

DE CASTRO, I.P. Lesões hepáticas na leishmaniose visceral canina: Aspectos histopatológicos e bioquímicos. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/13074/1/Igor%20Paula.pdf>>. Acessado em: 09/01/2022.

DE LIMA, M. F.; PEIRO, J. R. VASCONCELOS, R. O. IL-6 and TNF- production during active canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 115, p. 189-193, 2007.

DE PAIVA - CAVALCANTI, M.; DE MORAIS, R.C.; PESSOA, R.S, TRAJANO, S.L.A.; ALBUQUERQUE, G.S.A.C.; TAVARES, D.E.H.; BRELAZ, M.C.; SILVA,

R.E.F.; PEREIRA, V.R. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell Biosci*, v.5, n.31, 2015.

DE SOUSA GONÇALVES, R.; ALVES DE PINHO, F.; DINIS-OLIVEIRA, R.J. *et al.* Mathematical Modelling Using Predictive Biomarkers for the Outcome of Canine Leishmaniasis upon Chemotherapy. *Microorganisms* 8, 745, 2020.

DI IORIO, B.; BELLIZZI, V.; BELLASI, A. *et al.* Phosphate attenuates the anti proteinuric effect of very low protein diet in CKD patients. *Nephrol Dial Transplant*. v. 28, p.632-640. 2013.

DUTRA, M.S.; FREITAS, M.M.; XAVIER JÚNIOR F.A.F. *et al.* Diagnóstico precoce de doença renal crônica. *Ciência Animal*, v.29, n.1, p.121-128, 2019.

ELSHAFIE, A. I. *et al.* Cystatin C as a marker of immune complex-associated renal impairment in a Sudanese population with visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, v. 75, n. 5, p. 864-8, 2006.

FARIA, A.R.; ANDRADE, H.M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amaz Saúde, Ananindeua*, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FEITOSA, M. M. Avaliação Clínica de Animais Naturalmente Infectados. In: 1º FÓRUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais.. São Paulo: Funep*, p.9-14, 2006.

FERRARI, H.F; RIBEIRO, D.; LUVIZOTTO, M.C.R. Miocardite Associada a *Leishmania sp* em cão - Relato de caso. In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, 2006, Jaboticabal. *Anais do Forum de Leishmaniose Visceral canina*, p.48, 2006.

FIACCADORI, E.; MAGGIORE, U.; LOMBARDI M. *et al.* Predicting patient outcome from acute renal failure comparing three general severity of illness scoring systems. *Kidney Int.*; 58:283–292, 2000.

FIOCCHI, E.H.; COWGILL, L.D.; BROWN, D.C.; MARKOVICH, J.E.; *et al.* The Use of Darbepoetin to Stimulate Erythropoiesis in the Treatment of Anemia of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, v. 31, p.476–485, 2017.

FLORA, R.; AGHAZADEH-DIBAVAR, S. ; BANDYOPADHYAY, M.; DASGUPTA, S. Immunosuppression during *Leishmania donovani* infection: a potential target for the development of therapy. *Annals of Parasitology*, v. 60, n. 4, p. 239-245, 2014.

FRAZILIO, F.; BORGES, F.; SOUZA, A.; ISA, M.; *et al.* Biomarkers and renal arterial resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitology Research*, v. 117, p. 3399-340, 2018.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J.D.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A. *et al.* Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Res Vet Sci* n. 99, p. 204–207, 2015.

GIANNUZZI, A.P., RICCIARDI, M., DE SIMONE, A. AND GERNONE, F. Neurological manifestations in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*: descriptions of 10 cases and a review of the literature. *J Small Anim Pract*, v.58, p.125-138, 2017.

GIAPITZOGLOU, S.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; LEONTIDES, L.S.; KASABALIS, D.; *et al.* Evaluation of serum symmetric dimethylarginine as a biomarker of kidney disease in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, v. 277, 2020.

GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; CARNEIRO, C.M.; CORRÊA-OLIVEIRA, et al. Histopathological and immunohistochemical investigations of the hepatic compartment associated with parasitism and serum biochemical changes in canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, v.84, n.2, p.26-77, 2008.

GOMES, Y.M.; CAVALCANTI, M.P.; LIRA, R.A.; ABATH, F.G.; ALVES, L.C. Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: Biotechnological advances. *The Veterinary Journal*. V.175, p.45–52, 2008.

GONÇALVES, A.A.M.; LEITE, J.C.; RESENDE, L.A.; MARIANO, R.M.S; et al. An Overview of Immunotherapeutic Approaches Against Canine Visceral Leishmaniasis: What Has Been Tested on Dogs and a New Perspective on Improving Treatment Efficacy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 9, 2019.

GRAUER, G.F. Proteinuria. IRIS (International Renal Interest Society), 2016. Disponível em < <http://iris-kidney.com/education/proteinuria.html>>. Acesso em: 03 dezembro de 2020.

GRIMA, M. Z. La Leishmaniosis canina. 1ª Parte. Panorâmica general de la enfermedad. *Inf. Vet. Revista oficial del consejo general de colégios veterinários de España*, p.14-18, 2005.

HALL, J.A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; JEWELL, D. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.28, p.1676–1683, 2014.

HARRISON, D.; MARVAR, P.J.; TITZE, J.M.; LEY, K.; et al. Vascular inflammatory cells in hypertension. *Frontiers in physiology*, v. 3, n. 128, 2012.

HELLER, R., ROSENBAUM, P.R., SMALL, D.S. Split samples and design sensitivity in observational studies. *Journal of the American Statistical Association*, v.104, n.487, p.1090–1101, 2009.

HELLER, R.; ROSENBAUM, P.R.; SMALL, D.S. Split samples and design sensitivity in observational studies. *Journal of the American Statistical Association*. V.104, p.1090–1101, 2009.

IBBA, F.; MANGIAGALLI, G.; PALTRINIERI, S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *The Veterinary Journal*. Volume 210, Pages 89-91. 2016.

IKEDA - GARCIA, F.A.; CIARLINI, P.C.; FEITOSA, M.M.; GONÇALVES, M.E. et al. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba, São Paulo: estudo retrospectivo de 191 casos. *Clínica Veterinária*, v. 47, p. 42 - 47, 2003.

KARRAS, A.; NOËL, L.H.; DROZ, D.; DELANSORNE, D. et al. Renal involvement in monoclonal (type I) cryoglobulinemia: two cases associated with IgG3 kappa cryoglobulin. *Am J Kidney Dis*, v. 40, n. 5, p. 1091- 6, 2002.

KLOSTERMAN, E.S.; MOORE, G.E.; DE BRITO GALVÃO, J.F.; DI BARTOLA, S.P. et al. Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *J. Vet. Int. Med.*, v. 25, p. 206-2014, 2011.

KOUTINASAND, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine Leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*, *Veterinary Pathology*,v.51,n.2, pp. 527–538, 2014.

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

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ROBINS, E. *COTRAN: Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 9ª ed. São Paulo: Elsevier, 2016.

KURTS, C.; PANZER, U.; ANDERS, H.J.; REES, A.J. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol*, v. 13, n. 10, p. 738-53, 2013.

LEES, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 34, p. 867–885, 2004.

LEFEBVRE, H.P.; CRAIG, A.J.; BRAUN, J.P. GFR in the dog: breed effect. In: *Proceedings of the 16th ECVIM-CA Congress*. Amsterdam (Holland): European College of Veterinary Internal Medicine–Companion Animals; p. 261, 2006.

LEWIS, D.C.; MEYERS, K.M. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *J. Vet. Intern. Med.* v.10, p.207–218, 1996.

LEWIS, D.C.; MEYERS, K.M.; CALLAN, B.; BUCHELER, J.; GIGER, U. Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs. *JAVMA* v.206, p.47–52, 1995.

LIMA, V.M.F.; GONCALVES, M.E.; ILKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; FEITOSA, M.M. Anti-leishmania antibodies in cerebrospinal fluid from dogs with visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medicine and Biological Research*, 36: 485-489, 2003.

LIMA, W.G.; MICHALICK, M.S.M.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of lymph nodes. *Acta tropica*, 92: 43-53, 2004.

LINDSAY, D.S.; ZAJAC, A.M. Leishmaniasis in American Foxhounds: An Emerging Zoonosis? *Revista Compendium*. Blacksburg, Virginia. V. 24, n° 4, p. 304. 2002.

LIPPI, I.; PERONDI, F.; LUBAS, G.; GORI, E.; et al. Erythrogram Patterns in Dogs with Chronic Kidney Disease. *Vet Sci*, v. 8, n.123, 2021.

LOMBARDO, G.; PENNISI, M.G.; LUPO, T.; CHICHARRO, C.; SOLANO-GALLEGO, L. Papular dermatitis due to *Leishmania infantum* infection in seventeen dogs: diagnostic features, extent of the infection and treatment outcome. *Parasites & Vectors*.7: 120, 2014.

LOOR, J.D.; DAMINET, S.; SMETS, P. *et al.* Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.27, p.998–1010, 2013.

LOPEZ, R.; LUCENA, R.; NOVALES, M.; GINEL, P.J.; MARTIN, E.; MOLLEDA, J.M. Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentralbl Veterinarmed B*, v. 43, n. 8, p. 469-74, 1996.

LUVIZOTTO, M.C.R. Alterações patológicas em animais naturalmente infectados. In: 10 FORUM SOBRE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, Jaboticabal. *Anais do Fórum de Leishmaniose Visceral canina 2006*. p.15-22. 2006.

MAIA, C e CAMPINO, L. Biomarkers associated with *Leishmania infantum* exposure, infection and disease in dogs. *Cellular and Infection Microbiology*, v. 8, article 302, 2018.

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

MARCONDES, M.; DAY, M.J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. *Research in Veterinary Science*, v. 123, p. 261–272, 2019.

MARCONDES, M.; ROSSI, C.N. Leishmaniose visceral no Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 50, n.5, p.342–351, 2013.

MATTOS JR., D.G. Aspectos clínicos e de laboratório de cães soropositivos para leishmaniose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. v.56, n.1, p.119-122, 2004.

MCCARTHY, J.T. Prognosis of patients with acute renal failure in the intensive-care unit: A tale of two eras. *Mayo Clin Proc*; 71:117–126, 1996.

MCGAVIN, M. D., ZACHARY, J. F.; Bases da patologia em veterinária. Elsevier, p. 1324, 2013.

MEDEIROS, C.M.O. Perfil hematológico de cães com leishmaniose visceral no município de Fortaleza, Ceará. *Ciência Animal*, v.18, n.1, p.43-50, 2008.

MENDES, R.S.; GURJÃO, T.A.; OLIVEIRA, L.M. *et al.* Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: aspectos clínicos e patológicos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 66, n. 1, p. 79-84, 2014.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. (Ed) *Parasitologia humana*. 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, p. 56-72. 2005.



MIGUEL, P.; RODRIGUEZ PUYOL, D. R. Glomerulopatías. concepto, clasificación, etiopatogenia. *Medicine*, v. 80, p. 5125-5130, 2007.

MINNAGANTI, V.R.; CUNHA, B.A. Infections associated with uremia and dialysis. *Infectious disease clinics of North America*, v.15, n.2, p:385-406. 2001.

MORAL, R.A., HINDE, J.; DEMÉTRIO, C.G.B. Half-normal plots and overdispersed models in R: the hnp package. *Journal of Statistical Software*, v. 81, n.10, p.1-23, 2017.

MOREIRA, P. R. R. Apoptose em linfonodos de cães com Leishmaniose Visceral. 2010. xiv, 54 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/95937>>. Acessado em 12/01/2022.

MOSER, B.; ROTH, G.; BRUNNER, M.; LILAJ, T. et al. Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, hemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochemical and biophysical research communications*, v.308, n.3, p:581-5, 2003.

MOURA, R. O. D.; PAULA, V. V.; SOARES, M. J. V. Alterações renais em cães (*Canis familiaris*) soropositivos para leishmaniose: aspectos clínicos, laboratoriais e histopatológicos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 4, p. 61-64, 2002.

MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. Hipertensão arterial. In: BELERENIAN, G.C.; MUCHA, C.J.; CAMACHO, A.A. *Afecções Cardiovasculares em Pequenos Animais*. Interbook, São Caetano do Sul – SP, p. 212 – 217, 2003.

MUKHERJEE, A.; BARIK, S.; SAR, P.; SARKAR, A. Role of thrombopoiesis in leishmaniasis. *Cytokine*, 155310. 2020.

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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v.29, p.1036–1044, 2015.

NASR, S. H. *et al.* Proliferative glomerulonephritis with monoclonal IgG deposits. *J Am Soc Nephrol*, v. 20, n. 9, p. 2055-64, 2009.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. Insuficiência Renal. In. *Medicina interna de pequenos animais*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 487- 499, 2001.

NERY, G.; BECERRA, D.R.D.; BORJA, L.S.; MAGALHÃES-JUNIOR, J.T., *et al.* Avaliação da infectividade parasitária a *Lutzomyia longipalpis* por xenodiagnóstico em cães tratados para leishmaniose visceral naturalmente adquirida. *Pesqui Vet Bras.*, V. 37, p. 701-7, 2017.

NICOLATO, R.E.C.; DE ABREU, R.T.; ROATT, B.M.; AGUIAR-SOARES, R.D.; *et al.* Clinical forms of canine visceral Leishmaniasis in naturally Leishmania infantum-infected dogs and related myelogram and hemogram changes, *Public Library of Science*, v.8, n.12 , p.1-8, 2003.

NOGUEIRA, F.; Avino, V.C.; Galvis-Ovallos, F.; Pereira-Chioccola, V.; *et al.* Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil. *Parasites and Vectors*, v. 12, n. 1, 2019.

NOLI, C. Leishmaniosis canine. *Waltham Focus*, v. 9, p. 16-24, 1999.

OLIVEIRA, H.S. Avaliação ultrassonográfica hepática de cães naturalmente infectados com leishmanios e visceral canina. Botucatu. 2015. 45p. Dissertação (Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu), Universidade Estadual Paulista, 2015.

PAHL, M.V.; GOLLAPUDI, S.; SEPASSI, L.; GOLLAPUDI, P.; et al. Effect of end-stage renal disease on B- lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.25, n.1, p:205- 12, 2010.

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

PARDO-MARÍN, L.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; PASTOR, J. *et al.* Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniosis treatment. *BMC Veterinary Research*. p.13:31, 2017.

PEDCHENKO, V. et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in antiGBM nephritis. *N Engl J Med*, v. 363, n. 4, p. 343-54, 2010.

PIERANTOZZI, M.; ROURA, X.; PALTRINIERI, S.; POGGI, M.; ZATELLI, A. Variation of Proteinuria in Dogs with Leishmaniasis Treated with Meglumine Antimoniate and Allopurinol: A Retrospective Study. *J Am Anim Hosp Assoc*, v. 49, n.4, p. 231–236, 2013.

PINTO, A.J.W. ; RIBEIRO, V. M. ; TAFURI, W. L. . Análise do diagnóstico da leishmaniose visceral canina no Brasil, com ênfase no uso dos métodos sorológicos: teste imunocromatográfico, ELISA e reação de imunofluorescência indireta - revisão de literatura. *Clínica Veterinária (São Paulo)*, v. 123, p. 80, 2016.

PLEVRAKI, K.; KOUTINAS, A. F.; KALDRYMIDOU, H. et al. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.20, n.2, pp.228–233, 2006.

POLI, A. et al. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*, v. 57, n. 4, p. 444-52, 1991.

POLZIN, D.J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet. Clin. Small Anim.* v. 41, p. 15–30, 2011.

POLZIN, D.J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *Clinical Practice Review*. v.23, Issue 2, Special Issue: Advances in Renal Physiology and Therapy. p.205-215, 2013.

PORTELLA, M.F. Diagnóstico Diferencial e Comparativo Através de Métodos Sorológicos e Moleculares da Infecção por *Leishmania* spp. em Cães Residentes na Região Oceânica de Itaipu, Município de Niterói, Rio de Janeiro. 61p, 2018.

PRIANTI, M. G.; YOKOO, M.; SALDANHA, L.C.B; COSTA, F.A.L; GOTO, H. *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*-infected mice as a model for the study of glomerular lesions in visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res*, v. 40, n. 6, p. 819-23, 2007.

PROVERBIO, D.; SPADA, E.; DE GIORGI, G.B.; PEREGO, A.R. Proteinuria reduction after treatment with miltefosine and allopurinol in dogs naturally infected with leishmaniasis. *Veterinary world*, vol. 9, P. 904-8. 2016.

QUINNEL, R.J.; COURTENAY, O.; SHAW, M.A. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*. v.18, n.3, p.1421 1424, 2001.

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

RALLIS, T.; DAY, M.J.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; ADAMAMA-MORAITOU, K.K.; PAPAZOGLU, L.; FYTIANOU, A.; KOUTINAS, A.F. Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *Journal of Comparative Pathology*, v.132, n.2, p.145-52, 2005.

REGUERA, R.M.; MORÁN, M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; GARCÍA-ESTRADA, C. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v. 227, p. 98-114, 2016.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R.C. et al. Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 128, n. 1-3, p. 87-95, 2009.

RIGO, R.S.; CARVALHO, C.M.E.; HONER, M.; DE ANDRADE, G.B.; et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.55, n. 2, p. 113-116, 2013.

SALES, T.E; ALMEIDA, G.K.G; OLIVEIRA, A.R.F; FERREIRA, T.M.V et al. Neutrofilia e hipoalbuminemia em sangue periférico de cães naturalmente infectados por *leishmania infantum*. *Ciência Animal*, v. 27, p. 64 – 74, 2017.

SANTOS, J.P.A. Histological changes and immunolabeling of *Leishmania infantum* in kidneys and urinary bladder of dogs. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.22, n.3, p.420-423, 2013.

SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. Patologia Veterinária. In: SERAKIDES, R. Sistema urinário. ROCA (Ed.), p. 291-336, 2010.

SARIDOMICHELAKIS, M.N. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Veterinary Dermatology*, v.20, n.5, p.471-489, 2009.

SCHIFFRIN, E.L.; LIPMAN, M.L.; MANN, J.F.E. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Journal of The American Heart Association*, v. 116, p. 85-97, 2007.

SEGEV, G.; KASS, P.H.; FRANCEY, T.; COWGILL, L.D. A novel clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 22, p. 301-308. 2008.

SILVA, M.C.J.; MONTEIRO, L.B.C. Aspectos clínicos, laboratoriais e ultrassonográficos de cães naturalmente infectados com leishmania spp. *Ciência Animal*, v.29, n4, p. 84-100, 2019.

SOLANO-GALLEGO, L.; KOUTINAS, A.; MIRÓ, G.; CARDOSO, L.; PENNISI, M.G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, v.165, n.1-2, p.1-18, 2009.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, v. 4, n.1, 2011.

SOUZA, A.I.; JULIANO, R.S.; GOMES, T.S.; DINIZ, S.A.; BORGES, A.M.; TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L. Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog. *Veterinary parasitology*, 129: 51-54, 2005.

STAGING of CKD (modified 2019). International Renal Interest Society (IRIS). Novartis animal health, n. modified, p.1–8, 2019. Disponível em: < [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf)>. Acessado em 12/01/2022.

TAFURI, W. L.; DE OLIVEIRA, M. R.; MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Vet Parasitol*, v. 96, n. 3, p. 203-12, 2001.

TAFURI, W.G., L.; TAFURI, W.L.; BARBOSA, A.J.A.; MICHALICK, M.S.M.; GENARO, O.; FRANCA-SILVA, J.C.; MAYRINCK, W.; NASCIMENTO, E. Histopathology and immunocytochemical study of type 3 and 4 complement receptors in the liver and spleen of dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38: 81-89, 1996.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.E.; GONÇALVES, R.; MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.M.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v.292, n.1-2, p.17-23, 2004.

THEUER, J.; DECHEND, R.; MULLER, D.N.; PARK, J.K.; et al. Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats. *BMC Cardiovasc. Disord* v.2, p.3, 2002.

TORRENT, E.; PLANELLAS, M.; ORDEIX, L.; PASTOR, J.; ET al. Serum Symmetric Dimethylarginine as an Early Marker of Excretory Dysfunction in Canine Leishmaniosis (*L. infantum*) Induced Nephropathy. *Veterinary Medicine International*, 2018.

TORRES, M.M.; ALMEIDA, A.B.P.F.; DA CRUZ BOA SORTE, E.; DE PAULA, D.A.J.P.; et al. Associação da carga parasitária renal com achados laboratoriais em cães com leishmaniose visceral. *Ciência Rural*, v.43, n. 5, p. 894-896, 2013.

TOURINHO, B.D.; AMÂNCIO, F.F.; FERRAZ, M.L.; CARNEIRO, M. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in patients treated with liposomal amphotericin B in an endemic state in Brazil. *Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg.*, 111, 163–171, 2017.

TRAVI, B. L.; OSORIO, E. Y.; SALDARRIAGA, O. A.; et al. Clinical, Parasitologic, and Immunologic Evolution in Dogs Experimentally Infected with Sand Fly-Derived *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 81, n. 6, p. 994-1008, 2009.

TRAVI, B.; MIRÓ, G. Use of domperidone in canine visceral leishmaniasis: gaps in veterinary knowledge and epidemiological implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, n.11, 2018.

RIBEIRO, V. M.. Atualização em leishmanioses. *Promevet: Pequenos Animais: Programa de Atualização em Medicina Veterinária*. Porto Alegre: Artmed Panamericana, Porto Alegre, p. 75 - 109, 29 jun. 2020.

VAN VELTHUYSEN, M. L.; FLORQUIN, S. Glomerulopathy associated with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev*, v. 13, n. 1, p. 55-66, 2000.



VIEIRA, S.; MARCONDES, N.A.; SPINDLER, B.M.; OLIVO, L.D.; FERNANDES, F.B. Diagnóstico de leishmaniose visceral em medula óssea a partir de suspeita de neoplasia maligna: relato de caso, *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 43, n.1, p. 425, 2021.

VINUELAS, J.; GARCIA-ALONSO, M.; FERRANDO, L.; NAVARRETE, I.; MOLANO, I.; MIRON, C.; CARCELEN, J.; ALONSO, C.; NIETO, C.G. Menigial leishmaniasis induced by *Leishmania infantum* in naturally infected dogs. *Veterinary Parasitology*, 101: 23-27, 2001.

WU, J.; HICKS, J.; BORILLO, J; GLASS, W.F.; LOU, Y.H. CD4(+) T cells specific to a glomerular basement membrane antigen mediate glomerulonephritis. *J Clin Invest*, v. 109, n. 4, p. 517-24, 2002.

XAVIER, S.C.; CHARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONCALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, p.994-1000, 2006.

YASUR-LANDAU, D.; JAFFE, C.; DAVID, L.; BANETH, G. Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. *Neglected Tropical Diseases*, 2016.

YERRAMILI, M.; OBARE, E. Symmetric dimethylarginine (SDMA) increases earlier than serum creatinine in cats with chronic kidney disease (CKD). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 28, p. 1084, 2014.

**ANEXOS:****Anexo I:** Tabela referente aos índices de estatística descritiva para cada estádio.

Analitos	GRUPO	Média	Desv. Pad.	Min.	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máx.	Coef. Var.
SDMA	GERAL	16,55	18,84	5	9	12	15	140	114%
SDMA	IIA	10,90	3,06	6	10	11	12	17	28%
SDMA	IIB	12,78	6,67	5	8	11,5	14	32	52%
SDMA	III	16,59	14,03	8	9	12	16	69	85%
SDMA	IV	78,33	54,85	35	35	60	140	140	70%
UREIA	GERAL	85,46	124,09	17,12	27,82	40,6	81,32	701,92	145%
UREIA	IIA	96,46	182,47	17,12	23,54	29,96	49,22	701,92	189%
UREIA	IIB	64,32	81,38	19,26	28,88	34,24	73,83	385,2	127%
UREIA	III	75,49	79,42	17,12	29,96	48,15	81,32	363,8	105%
UREIA	IV	243,96	52,07	184,04	184,04	269,64	278,2	278,2	21%
CREATININA	GERAL	2,04	2,83	0,5	0,9	1,2	1,8	19,1	139%
CREATININA	IIA	2,22	3,87	0,6	0,8	0,9	1,3	19,1	175%
CREATININA	IIB	1,68	2,21	0,7	0,9	1,15	1,5	11,3	131%
CREATININA	III	1,61	0,93	0,5	1	1,3	2	4,6	58%
CREATININA	IV	8,53	4,72	3,6	3,6	9	13	13	55%
FÓSFORO	GERAL	5,14	3,63	1,3	3,3	4,1	5,2	21,1	71%
FÓSFORO	IIA	5,09	4,31	1,3	2,9	3,65	4,4	21,1	85%
FÓSFORO	IIB	4,51	3,52	2,4	3	3,85	4,55	18,9	78%
FÓSFORO	III	4,87	2,06	2,6	3,8	4,4	5,3	13,6	42%
FÓSFORO	IV	12,87	5,21	7,5	7,5	13,2	17,9	17,9	40%
GLOBULINA	GERAL	4,48	1,83	2,2	3,3	3,9	5,3	14,8	41%
GLOBULINA	IIA	4,03	1,07	2,2	3,3	3,8	4,8	6,6	27%
GLOBULINA	IIB	4,47	1,93	3	3,2	3,55	5,1	9,2	43%
GLOBULINA	III	4,87	2,20	2,8	3,5	4,3	5,6	14,8	45%
GLOBULINA	IV	3,93	1,51	2,2	2,2	4,6	5	5	39%
ALBUMINA	GERAL	2,89	0,53	0,8	2,6	2,9	3,2	4,5	18%
ALBUMINA	IIA	2,88	0,48	1,6	2,8	2,95	3,2	3,6	17%
ALBUMINA	IIB	2,85	0,62	0,8	2,65	2,9	3,1	3,9	22%
ALBUMINA	III	2,90	0,46	1,3	2,6	2,85	3,3	3,7	16%
ALBUMINA	IV	3,23	1,10	2,5	2,5	2,7	4,5	4,5	34%
PROTÉINAS SÉRICAS TOTAIS	GERAL	7,37	1,80	4	6,3	7,1	8,2	17,3	24%

Analitos	GRUPO	Média	Desv. Pad.	Min.	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	Máx.	Coef. Var.
PROTÉINAS SÉRICAS TOTAIS	IIA	6,92	1,32	4	6,5	6,85	7,4	9,9	19%
PROTÉINAS SÉRICAS TOTAIS	IIB	7,32	1,89	4,9	6,1	6,5	8,05	11,9	26%
PROTÉINAS SÉRICAS TOTAIS	III	7,78	2,09	5,5	6,4	7,35	8,4	17,3	27%
PROTÉINAS SÉRICAS TOTAIS	IV	7,17	0,42	6,7	6,7	7,3	7,5	7,5	6%
HEMÁCIAS	GERAL	6,25	1,64	1,3	5,29	6,42	7,44	9,44	26%
HEMÁCIAS	IIA	6,71	1,60	2,53	6,26	7,14	7,82	8,96	24%
HEMÁCIAS	IIB	6,42	1,27	2,84	5,755	6,365	7,3	8,53	20%
HEMÁCIAS	III	5,91	1,79	1,3	4,86	6,12	7	9,44	30%
HEMÁCIAS	IV	4,86	1,42	3,31	3,31	5,2	6,08	6,08	29%
HEMATÓCRITO	GERAL	40,60	11,20	16,4	34,4	40,8	50	63,3	28%
HEMATÓCRITO	IIA	42,48	11,71	16,4	38,3	45,45	51,1	60,6	28%
HEMATÓCRITO	IIB	41,67	8,27	21,2	36,7	41	47,9	54,3	20%
HEMATÓCRITO	III	39,83	11,79	17,6	29,1	38,6	50,5	63,3	30%
HEMATÓCRITO	IV	25,80	9,37	19,8	19,8	21	36,6	36,6	36%
PLAQUETAS	GERAL	307,70	156,46	19	198	293	390	853	51%
PLAQUETAS	IIA	297,54	142,46	19	202	302	382	565	48%
PLAQUETAS	IIB	317,05	155,01	30	211,5	348,5	399	565	49%
PLAQUETAS	III	310,82	171,27	30	185	271,5	390	853	55%
PLAQUETAS	IV	298,00	187,65	120	120	280	494	494	63%
RETICULÓCITOS	GERAL	58,52	36,37	2,5	26,3	51,7	85,3	157,2	62%
RETICULÓCITOS	IIA	61,58	37,15	15,8	28,9	54,2	91,8	149,4	60%
RETICULÓCITOS	IIB	60,33	34,64	9,8	30,6	49,05	88,5	133,3	57%
RETICULÓCITOS	III	58,30	37,67	2,5	26,3	51,35	78,3	157,2	65%
RETICULÓCITOS	IV	22,30	7,02	18	18	18,5	30,4	30,4	31%
LEUCÓCITOS	GERAL	12101,57	5520,88	2420	8310	10950	14000	30600	46%
LEUCÓCITOS	IIA	12325,00	6220,62	2420	8120	11100	15690	30600	50%
LEUCÓCITOS	IIB	10949,00	6093,63	3610	7250	8905	12255	25300	56%
LEUCÓCITOS	III	12343,82	4795,95	5580	9000	11520	14980	26370	39%
LEUCÓCITOS	IV	15103,33	2293,52	13570	13570	14000	17740	17740	15%

Análitos	GRUPO	Média	Desv. Pad.	Min.	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máx.	Coef. Var.
DENSIDADE URINÁRIA	GERAL	1,03	0,01	1,005	1,017	1,025	1,04	1,054	1%
DENSIDADE URINÁRIA	IIA	1,04	0,01	1,018	1,026	1,038	1,046	1,054	1%
DENSIDADE URINÁRIA	IIB	1,02	0,01	1,006	1,014	1,018	1,034	1,045	1%
DENSIDADE URINÁRIA	III	1,03	0,01	1,006	1,018	1,025	1,036	1,05	1%
DENSIDADE URINÁRIA	IV	1,01	0,00	1,005	1,005	1,005	1,008	1,008	0%
RPCU	GERAL	1,29	1,68	0	0,29	0,66	1,47	9,8	130%
RPCU	IIA	0,37	0,79	0	0,05	0,14	0,32	3,69	213%
RPCU	IIB	0,94	0,99	0,51	0,56	0,715	0,865	4,6	104%
RPCU	III	1,70	1,35	0,03	0,605	1,34	2,64	4,61	80%
RPCU	IV	6,11	3,20	4,23	4,23	4,29	9,8	9,8	52%
PA	GERAL	152,16	23,05	110	135	150	170	210	15%
PA	IIA	153,95	25,64	115	135	145	170	210	17%
PA	IIB	149,38	18,79	130	130	150	157,5	190	13%
PA	III	150,58	24,78	110	130	147,5	165	200	16%
PA	IV	168,33	7,64	160	160	170	175	175	5%
CREATININA URINÁRIA	GERAL	153,59	92,82	32	87	118	230	346	60%
CREATININA URINÁRIA	IIA	200,64	92,76	32	111	208	269	346	46%
CREATININA URINÁRIA	IIB	113,50	57,87	37	65,5	104,5	144	236	51%
CREATININA URINÁRIA	III	149,57	96,57	35	82	108,5	242,5	337	65%
CREATININA URINÁRIA	IV	60,00	31,22	35	35	50	95	95	52%
PROTÉINA URINÁRIA	GERAL	130,10	135,62	5	31	76	171	400	104%
PROTÉINA URINÁRIA	IIA	34,00	41,75	5	5	21	37	143	123%
PROTÉINA URINÁRIA	IIB	86,13	35,97	23	56,5	85	106	171	42%
PROTÉINA URINÁRIA	III	210,61	155,94	5	55,5	212	365	400	74%
PROTÉINA URINÁRIA	IV	318,00	91,06	220	220	334	400	400	29%

**Anexo II:** Critérios de classificação da DRC em cães de acordo com a concentração sérica de creatinina e SDMA, segundo a International Renal Interest Society (IRIS, 2019).

<u>Estágio 1</u>	<u>Creatinina sérica</u>	Paciente não azotêmico, mas com alguma
------------------	--------------------------	--

	<u>&lt; 1,4 mg/dL e SDMA &lt; 18µg/dL</u>	anormalidade renal como por exemplo: inabilidade de concentração da urina na ausência de causa extrarrenal identificável, palpação ou imagem renal alterada, proteinúria de origem renal, anormalidades histopatológicas nos rins, aumento na concentração de creatinina sérica, ainda dentro do valor de referência, em amostras seriadas.
<u>Estágio 2</u>	<b><u>Creatinina sérica de 1,4 a 2,8 mg/dL e SDMA entre 18 e 35 µg/dL</u></b>	Paciente com discreta azotemia renal (animais com valores de creatinina próximos do limite superior da faixa de referência já podem possuir algum grau de falha na excreção). Sinais clínicos geralmente são ausentes ou discretos.
<u>Estágio 3</u>	<b><u>Creatinina sérica de 2,9 a 5 mg/dL e SDMA entre 36 e 54 µg/dL</u></b>	Paciente com moderada azotemia renal. Vários sinais clínicos extra-renais podem estar presentes.
<u>Estágio 4</u>	<b><u>Creatinina sérica &gt;5 mg/dL e SDMA &gt; 55 µg/dL</u></b>	Paciente azotêmico e com maior risco de apresentar sinais clínicos sistêmicos e crise urêmica.