

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

ESTUDO FUNCIONAL RENAL POR MEIO DE BIOMARCADORES
E ÍNDICE DE RESISTIVIDADE DA ARTÉRIA RENAL EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum*

FABIANO DE OLIVEIRA FRAZILIO

CAMPO GRANDE, MS
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

**ESTUDO FUNCIONAL RENAL POR MEIO DE BIOMARCADORES
E ÍNDICE DE RESISTIVIDADE DA ARTÉRIA RENAL EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS POR *Leishmania infantum***

*Kidney function study using biomarkers and renal arterial resistance index in naturally infected
dogs with Leishmania infantum*

FABIANO DE OLIVEIRA FRAZILIO

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor
em Ciências Veterinárias.
Orientador: Prof. Dr. Fernando de
Almeida Borges

CAMPO GRANDE, MS
2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Doutorado

Aos trinta e um dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezessete, às oito horas, na Sala F da Pós-Graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Fernando de Almeida Borges (UFMS), Cassia Rejane Brito Leal (UFMS), Thiago Leite Fraga (UNIGRAN), Alda Izabel de Souza (UFMS) e André Luiz Baptista Galvão (UNIRP), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **FABIANO DE OLIVEIRA FRAZILIO**, CPF 69674248153, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ESTUDO FUNCIONAL RENAL POR MEIO DE BIOMARCADORES E ÍNDICE DE RESISTIVIDADE DA ARTÉRIA RENAL EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR Leishmania infantum**" e orientação de Fernando de Almeida Borges. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Fernando de Almeida Borges
Dra. Cassia Rejane Brito Leal
Dr. Thiago Leite Fraga
Dra. Alda Izabel de Souza
Dr. André Luiz Baptista Galvão
Dra. Larissa Correa Herneto (Suplente)

ASSINATURA

Alda Izabel de Souza
Cassia Rejane Brito Leal
Thiago Leite Fraga
André Luiz Baptista Galvão

AValiação

Aprovado
Aprovado
Aprovado
Aprovado

RESULTADO FINAL:

☒ Aprovação

☐ Aprovação com revisão

☐ Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, o Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Fernando de Almeida Borges
Presidente da Banca Examinadora

Fabiano de Oliveira Frazilio
Aluno

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, José Carlos e Ivete que são exemplos de vida, força e caráter, que me ensinaram a ser forte, dedicado e perseverante.

A minha esposa Fernanda e filhos, Isadora e Guilherme, pelo amor e compreensão nos momentos de ausência e ansiedade.

Ao meu irmão Fabrício, pelo companheirismo e amizade.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Fernando Borges por ter aceitado ser meu orientador, pelos excelentes ensinamentos, comentários, dedicação e disponibilidade demonstrada ao longo de toda a realização deste trabalho.

A minha coorientadora, Professora Mariana Isa Palumbo, pelo apoio na revisão da redação final da tese, que muito contribuiu para melhorar a apresentação final desta.

A Professora Alda Izabel, sempre me ensinando desde a graduação, estágios e até nos dias de hoje e por ter permitido a utilização do Laboratório Clínico.

Ao Professor Carlos Alberto, pela boa vontade e disponibilidade na execução deste projeto e também por ter cedido o Laboratório Biologia molecular.

Um especial agradecimento ao médico veterinário e amigo Diogo Freire, pela sua constante disponibilidade e imprescindível ajuda na execução do exame de ultrassonografia Doppler.

As alunas de iniciação científica: Mariana Green e Fernanda Battistotti, pela paciência e cuidado que tiveram na contenção de todos os cães, foi uma ótima experiência.

Aos servidores técnicos administrativos Franciela Cristina e Herbert Patrick, pela cooperação indispensável para a realização desse projeto.

A divisão de clínica da faculdade de medicina veterinária e zootecnia (FAMEZ) da UFMS, que autorizaram a realização desse projeto e disponibilizaram as instalações e equipamentos para realização da parte experimental.

Aos proprietários que confiaram seus animais às nossas mãos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Leishmaniose visceral canina.....	17
3.2 Patogenia da doença renal na leishmaniose visceral canina.....	23
3.3 Cistatina C	26
3.4 Enzimúria	29
3.5 Índices de resistividade da artéria renal	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 Seleção dos animais.....	34
4.2 Grupos experimentais	34
4.3 Sangue periférico	35
4.4 Urina	35
4.5 Bioquímica sérica e urinária	36
4.6 Aferição da pressão arterial sistólica.....	37
4.7 Ultrassonografia	38
4.8 Reações em cadeia polimerase (PCR)	39
4.9 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS	41
5.1 Cistatina C	41
5.2 GGT Urinária.....	41
5.3 Razão Gama Glutamil Transferase / Creatinina Urinária	42
5.4 Índice de Resistividade da artéria renal	42
5.5 Índice Kappa e Coeficiente de correlação de Spearman	44
6 DISCUSSÃO	45
7 CONCLUSÕES	50
8 REFERÊNCIAS	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores da Cistatina C sérica dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).....	41
Tabela 2. Valores da GGT urinária dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).....	41
Tabela 3. Valores da R-GGT/CU dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).....	42
Tabela 4. Valores do Índice de resistividade da artéria renal direita e esquerda dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).....	43
Tabela 5. Coeficiente de correlação de postos de Spearman entre os biomarcadores.....	44
Tabela 6. Índices de concordância Kappa entre os biomarcadores.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Avaliação ultrassonográfica em modo Doppler espectral para mensuração do Índice de Resistividade (IR) das artérias renais do rim esquerdo. (A) Animal do G4 com IRARE aumentado (0,82); (B) Cão do G1 com IRARE normal (0,69)	43
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C. Grau Celsius

C. Complemento

CEUA. Comissão de Ética no Uso de Animais

CV. Coeficiente de Variação

dl. Decilitro

DNA. Ácido Desoxirribonucleico

DV. Desvio Padrão

EDTA. Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

ELISA. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FAMEZ. Faculdade de medicina Veterinária

g. Gravidade

G. Grupo

GGT. Gama Glutamil Transferase

HAS. Hipertensão Arterial Sistêmica

Hg. Mercúrio

IFN. Interferon

IgM. Imunoglobulina M

IL. Interleucina

IR. Índice de resistividade

IRAR. Índice de resistividade da Artéria Renal

IRARD. Índice de resistividade da Artéria Renal Direita

IRARE. Índice de resistividade da Artéria Renal Esquerda

IRIS. International Renal Interest Society

KDa. Quilodalton

Kg. Quilograma

L. litro

LV. Leishmaniose Visceral

LVC. Leishmaniose Visceral Canina

mg. Miligrama

MHz. Megahertz

mm. Milímetro

mmHg milímetro de mercúrio

PAS. Pressão Arterial Sistólica

PCR. Reação de polimerase em Cadeia

R-GGT/C. Razão Gama Glutamil Transferase e Creatinina

SES. Secretaria de Estado e Saúde

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TNF. Fator de necrose Tumoral

UFMS. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

UI. Unidades Internacionais

UP/C. Razão Proteína e Creatinina Urinária

VDF. Velocidade Diastólica Final

VPS. Velocidade de pico Sistólico

AUTORIZAÇÕES DE COMITÊS



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto intitulado "Estudo Morfofuncional Renal por meio de Biomarcadores e Ultrassonografia Doppler em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*", Protocolo nº 679/2015 sob a responsabilidade de **Fernando de Almeida Borges** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/UFMS, em reunião ordinária do dia 26 de maio de 2015.

Vigência do Projeto	15/06/2015 a 02/03/2017
Espécie/Linhagem ou Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> / Diversas
Números de Animais	60
Peso/Idade	1 a 30 kg / Variáveis
Sexo	Macho e Fêmea
Origem (fornecedor)	Ambulatório do Hospital Veterinário da FAMEZ/UFMS


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 27 de maio de 2015.

RESUMO

FRAZILIO, F.O. Estudo funcional renal por meio de biomarcadores e índice de resistividade da artéria renal em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*. 2017. 62p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) frequentemente causa glomerulonefrites e nefrites túbulo-intersticiais, nefropatias cujo diagnóstico precoce é limitado pela baixa sensibilidade dos exames tradicionais. O uso de biomarcadores séricos, urinários e o índice de resistividade da artéria renal podem permitir o diagnóstico precoce de lesões glomerulares e tubulares. O objetivo do estudo foi avaliar a cistatina C sérica, a concentração da Gama Glutamil Transferase urinária (GGT urinária), a razão Gama Glutamil Transferase e creatinina urinária (R-GGT/C urinária), e determinar o índice de resistividade da artéria renal (IRAR) em cães com leishmaniose em diferentes estágios da doença renal. Os animais foram classificados em quatro grupos com base nos resultados da razão proteína e creatinina urinária (UP/C) e creatinina sérica. O Grupo 1 (n=15) incluiu cães com creatinina < 1,4 mg/dL e UP/C < 0,5; Grupo 2 (n=13) cães apresentando creatinina < 1,4 mg/dL e UP/C entre 0,5 e 1,0; Grupo 3 (n=16) cães com creatinina < 1,4 mg/dL e UP/C > 1,0; Grupo 4 (n=15) cães com creatinina > 1,4 mg/dL. Um quinto grupo (n=10) com animais não infectados por *Leishmania infantum* foi utilizado como controle. As médias da GGT urinária do G3 e G4 foram superiores aos do G1 e controle (p<0,05), enquanto o G2 apresentou média superior ao grupo controle (p<0,05). Os cães do G2, G3 e G4 apresentaram médias da R-GGT/C estatisticamente superiores aos do G1 e controle (p<0,05). Aumentos significativos dos IRAR direita (IRARD) e esquerda (IRARE) só foram observados entre os grupos G4 e controle (p<0,05). Os cães do G4 apresentaram valores médios da cistatina C superiores aos demais grupos (p<0,05) e também houve diferença entre o G3 e grupo controle (p<0,05). Encontramos correlações positivas e significativas, entre a GGT urinária e a R-GGT/C urinária com a UP/C e um bom índice de concordância entre o IRAR com a GGT urinária e a R-GGT/C urinária, ainda encontramos correlações positivas e significativas entre a cistatina C e UP/C, e entre GGT urinária e R-GGT/C urinária. Conclui-se que a GGT urinária e a R-GGT/C urinária, podem ser ferramentas úteis para detectar e avaliar lesões renais associadas à enfermidade e que a mensuração da cistatina C sérica e IRAR não permite a identificação precoce da doença renal. Porém, verificou-se que a cistatina C pode ser útil quando se deseja monitorar a progressão da doença renal.

Palavras-chave: cistatina C, enzimúria, leishmaniose, índice de resistividade, proteinúria.

ABSTRACT

FRAZILIO, F.O. Kidney function study using biomarkers and renal arterial resistance index in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*. 2017. 62p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2017.

Canine Visceral Leishmaniasis frequently causes glomerulonephritis and tubulo-interstitial nephritis, nephropathies of which diagnosis is limited by the low sensitivity of traditional tests. The use of serum and urinary biomarkers and renal arterial resistance index may provide an early diagnosis of glomerular and tubular damages. The goal of this study was to assess serum C cystatin, urinary Gamma glutamyl transferase (urinary GGT), urinary Gamma glutamyl transferase-to-creatinine ratio (urinary GGT/C-R) and to ascertain the renal arterial resistance index (RARI) in dogs with leishmaniasis in different stages of kidney disease. The dogs were grouped into four groups according to the results of the urine protein-to- creatinine ratio (UP/C) and serum creatinine levels. Group 1 (n=15): dogs with creatinine levels lower than 1,4 mg/dl and UP/C lower than 0,5; Group 2 (n=13): dogs with creatinine levels lower than 1,4 mg/dl and UP/C between 0,5 and 1,0; Group 3 (n=16): dogs with creatinine levels lower than 1,4 and UP/C higher than 1,0; Group 4 (n=15): dogs with creatinine levels higher than 1,4. A fifth group of healthy dogs (n=10) was the Control group. The mean levels of urinary GGT of G3 and G4 were higher than those presented by G1 and Control group ($p < 0,05$), we also found that G2 presented a mean superior to the control group ($p < 0,05$). G2, G3 and G4 dogs presented means of urinary GGT/C-R statistically higher than G1 and Control group ($p < 0,05$). Significant increases in RARI of both left and right kidneys were found only between Control group and G4 ($p < 0,05$). G3 and G4 dogs showed left RARI higher than the reference values, while right RARI was higher than the reference values only in G4 dogs. The G4 dogs presented mean values of cystatin C higher than the other groups ($p < 0,05$), significant difference was also observed between G3 and Control group ($p < 0,05$). We found positive and significant correlations between urinary GGT and urinary RGGT / C with UP / C and a good agreement index between IRAR and urinary GGT and urinary RGGT / C, we still found positive correlations and between Cystatin C and UP / C, and between urinary GGT and urinary RGGT / C. In conclusion, Urinary GGT and Urinary GGT/C-R may be useful tools in detecting and evaluating leishmaniasis-related renal damages but the serum C cystatin and RARI assessment does not help the early diagnose of kidney disease. However, we have found that cystatin C may be useful when monitoring the progression of renal disease.

Keywords: cystatin C, enzymuria, leishmaniasis, resistance index, proteinuria.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral canina (LVC) é uma doença zoonótica, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, que no Brasil é transmitida pela picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. Os cães são os principais hospedeiros reservatórios deste parasita na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e América do Sul. O número de cães infectados na América do Sul é estimado em milhões, com elevadas taxas de infecção em diversas áreas no Brasil, onde a alta prevalência da infecção canina encontra-se associada ao risco da enfermidade nos seres humanos (ABRANCHES et al., 1991; BANETH et al., 2008). Em Campo Grande-MS, a situação epidemiológica desta zoonose é preocupante, pois o número de casos caninos e humanos é elevado (SINAN/SES, 2012).

Na LVC, a formação e deposição de imunocomplexos nos glomérulos e região túbulo-intersticial causam glomerulonefrite e lesões túbulo-intersticiais acarretando comprometimento da função renal. Estas alterações são responsáveis pelo aparecimento de proteinúria, alterações do sedimento urinário e perda da função renal (MARTINELLI et al., 1986).

Dentre as diversas manifestações clínicas que caracterizam a enfermidade, as nefropatias e suas consequências são pouco conhecidas e estudadas. Existem poucas informações sobre o envolvimento glomerular, tubular e sobre os aspectos hemodinâmicos da artéria renal nesses pacientes, suscitando a necessidade de mais estudos a respeito. O diagnóstico das lesões teciduais nos rins causados pela LVC pode ser realizado por meio da histopatologia de amostras obtidas a partir da biópsia renal. Entretanto, pelo risco de complicações clínicas e custos com o procedimento, não é uma prática comum na rotina clínica diária, especialmente em cães que não manifestam sinais clínicos de doença renal, mesmo que apresentem proteinúria. O *clearance* da creatinina endógena é um teste considerado padrão ouro para a determinação da taxa de filtração glomerular, porém pouco usado na rotina

clínica, pela falta de disponibilidade de tempo do proprietário e o comportamento do paciente. Por isso, a identificação de biomarcadores séricos e urinários de fácil acesso e aplicação podem facilitar a identificação de dano renal e auxiliar na determinação do grau de dano ao órgão.

A detecção precoce da lesão renal permite a intervenção rápida, retardando a progressão da doença e, por conseguinte, melhorando a expectativa de vida do animal com doença renal. Nos últimos anos, a LVC é usada como modelo de lesão renal para identificar novos biomarcadores mais precoces do que a creatinina para o diagnóstico da doença renal crônica (PALACIO et al., 1997; GARCIA-MARTINEZ et al., 2015).

O uso de diferentes biomarcadores séricos e urinários para a detecção precoce de nefropatias favorece a otimização dos recursos diagnósticos para a investigação da LVC em seus diferentes estágios clínicos e diagnóstico de nefropatias antes do desenvolvimento da insuficiência renal. No presente estudo, foi avaliada a função renal por meio da mensuração sérica da cistatina C, a integridade das células dos túbulos contorcidos proximais renais por meio da GGT urinária e R-GGT/C urinária e as alterações vasculares dos rins pelo método dopplersonográfico em cães com leishmaniose visceral (LV). Desse modo, o estudo pode trazer contribuições importantes sobre o diagnóstico de nefropatias em cães com LV, com o uso de biomarcadores séricos e urinários e da ultrassonografia em modo Doppler dos rins, metodologias que poderão ser validadas para outras espécies, inclusive o homem, tendo em vista a semelhança do problema no homem e no cão.

2. OBJETIVOS

- Avaliar a precocidade dos biomarcadores séricos e urinários (cistatina C, GGT urinária e R-GGT/C urinária) e índice de resistividade da artéria renal em cães com LV e com diversos graus de lesão renal.
- Determinar a concordância e a correlação entre a cistatina C, GGT urinária, R-GGT/C urinária e índice de resistividade da artéria renal, com os marcadores renais tradicionais - UP/C, concentrações séricas da creatinina e pressão arterial sistólica (PAS) em cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum*.
- Comparar os parâmetros relacionados direta ou indiretamente à função renal - UP/C e concentrações séricas da creatinina e PAS, com a GGT urinária, R-GGT/C urinária cistatina C sérica e índice de resistividade da artéria renal nos diferentes grupos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose Visceral Canina

As leishmanioses são enfermidades causadas por protozoários pertencentes à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, a qual reúne espécies de organismos unicelulares, digenéticos (heteroxenos). São observadas duas formas, as amastigotas, parasitas intracelulares obrigatórios, encontrados nos macrófagos, monócitos, células de Langerhans, células de Kupffer e células apresentadoras de antígenos de hospedeiros vertebrados, enquanto que as formas promastigotas são extracelulares, flageladas e são observadas no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados (MAURÍCIO et al., 2000; BANETH & SOLANO-GALLEGO, 2012).

São reconhecidas três espécies de *Leishmania* envolvidas na ocorrência da LV: *Leishmania donnovani*, *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*. Epidemiologicamente, a espécie *Leishmania infantum* é considerada uma doença zoonótica, sendo os cães os principais reservatórios domésticos e a LV causada por *Leishmania donnovani* é considerada como antroponose (SANTA ROSA et al., 1997).

Estudos bioquímicos e moleculares demonstraram não haver diferenças fenotípicas e genotípicas significativas entre as espécies de *Leishmania infantum* e *Leishmania chagasi*, baseados em pesquisas usando diferentes técnicas, como a PCR RFLP, sequenciamento de DNA da glicoproteína de superfície (gp63) e hibridização com sondas de DNA. Como ainda não foram completamente explicadas a origem e a epidemiologia do parasita, alguns pesquisadores sugerem que seja usada a denominação *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, considerando-a uma subespécie. Atualmente, o modelo mais aceito para avaliação taxonômica é fundamentado na identificação de isoenzimas pela técnica de eletroforese, de modo que é possível identificar um determinado grupo de isoenzimas (zimodemes)

específico de uma determinada espécie (SHAW, 1994, MAURÍCIO et al., 2000).

As formas amastigotas são encontradas em vacúolos das células do Sistema Fagocítico Mononuclear, denominados de vacúolos parasitóforos. Em seu interior replicam-se por divisão binária, até que ocorra a ruptura da célula e disseminação para vários tecidos e órgãos, desencadeando a patogenia nos hospedeiros susceptíveis e aparecimento dos sinais clínicos (PINELLE et al., 1994, REY, 2001). Em cães, a sintomatologia clínica é semelhante a dos pacientes humanos, entretanto o desenvolvimento e a manifestação dos sinais clínicos dependem da influência da resposta imune do hospedeiro e da cepa infectante do parasita (MANNA et al., 2009, OLIVA et al., 2006).

A capacidade do hospedeiro debelar ou controlar a infecção está diretamente relacionada ao padrão genético do hospedeiro, que por sua vez determinará o tipo de resposta imune. Outros fatores, como a forma de apresentação do antígeno, a virulência do parasita, a nutrição e saúde do hospedeiro também são determinantes na eficácia da resposta imune. A variabilidade destes fatores determinará a susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, no que tange ao estabelecimento da doença (FERRER, 2002; CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006).

A resposta imune inata é formada por fagócitos (neutrófilos, monócitos/macrófagos, “Natural Killer- NK”, células dendríticas), sistema do complemento, receptores de reconhecimento (“Toll-like Receptors”) e citocinas, a imunidade inata constitui a primeira linha de defesa do hospedeiro quando o flebotomíneo inocula as formas promastigotas na derme do cão. Os neutrófilos são as primeiras células que tentam controlar a infecção, através da fagocitose dos parasitas, uma vez fagocitados, os parasitas são destruídos por enzimas proteolíticas e por espécies reativas de oxigênio (STOBIE et al., 2000, MURRAY et al., 2005). Durante este processo, os neutrófilos secretam interleucina-8 (IL-8), que é essencial para a quimiotaxia de mais neutrófilos. De maneira semelhante os macrófagos infiltram no local, estas células além da

elevada capacidades de fagocitose, também apresentam os antígenos do protozoário. As principais citocinas secretas pelos macrófagos são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), IL-6, IL-18 e IL-12, além dos metabólitos tóxicos derivados do oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, importantes na eliminação e controle da multiplicação dos parasitas. As interleucinas IL-12, IL-18 e TNF- α , secretadas pelos macrófagos, aumentam a atividade dos linfócitos citotóxicos e a capacidade de outras células fagocitárias (BOGDAN & ROLLINGHOFF, 1998, STAFFORD et al., 2002, BARBIÉRI, 2006).

Outro tipo celular importante são as células dendríticas, presentes em diversos órgãos e tecidos e que possuem como funções principais, a apresentação de antígenos e a produção de IL-12. Estas atribuições são fundamentais para a manutenção de um número satisfatório de células Th1 efectoras ou de memória para mediar uma proteção prolongada contra o protozoário (STOBIE et al., 2000).

Os antígenos do parasita são apresentados aos linfócitos T auxiliares CD4+ por células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e as células de Langherans), em resposta são produzidas interleucinas, que resultarão na sua diferenciação em linfócitos efetores Th1 ou Th2 (FEITOSA et al., 2000; STOBIE et al., 2000).

O envolvimento dos linfócitos Th1 ou Th2 na resistência ou suscetibilidade da enfermidade, respectivamente, foi evidenciado em um modelo murino de leishmaniose tegumentar e visceral (HEINZEL et al., 1989, RHEE et al., 2002). Os linfócitos Th1, quando ativados pela IL-12, secretam IL-2, fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN- γ), que por sua vez incrementam a eficácia dos linfócitos citotóxicos e a eficiência fagocítica das células fagocitárias, aumentando a resistência contra à infecção (FERRER, 2002; BARBIÉRI, 2006). Trabalhos realizados por Barbiéri (2006) e Bueno (2006) demonstraram a participação dos linfócitos T citotóxicos CD8+, na resistência contra a enfermidade, neste estudo foi sugerido que estas células

são responsáveis pela destruição dos macrófagos infectados e pelo aumento da produção de TNF- α e IFN- γ .

Nos animais susceptíveis, o aumento na secreção de IL-4 pelos linfócitos T, desencadeia aumentos da subpopulação de linfócitos efetores Th2, que por sua vez produzem as interleucinas, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que induzem a proliferação e ativação de células B policlonais, resultando em hipergamaglobulinemia. Esta diferença imunológica contribui para a formação de complexos imunes circulantes, que são os responsáveis por acarretar lesões em vários órgãos em pacientes com LV (KHARAZMI et al., 1999).

As interleucinas IL-4, IL-10 e a IL-13 são citocinas associadas com a resposta imune do tipo Th2, são secretadas pelos linfócitos efetores Th2, citocinas que diminuem a expressão dos receptores para a IL-12 e inibem a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, favorecendo a infecção. Além disso, a co-estimulação inadequada dos macrófagos parasitados não permite uma ligação estável entre o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) com o receptor de célula T (TCR), prejudicando a apresentação dos antígenos do parasita. Desta maneira, a evolução desfavorável da enfermidade está associada com a resposta imune do tipo Th2, enquanto que a resposta imune do tipo Th1 está correlacionada ao controle da enfermidade (CIARAMELLA & CORONA, 2003; BARBIÉRI, 2006). Murray et al. (2002) verificaram maior ativação da resposta imune tipo Th1, na ausência da IL-10.

A resposta imune adquirida é estimulada quando a imunidade inata não consegue debelar o protozoário. Neste tipo de imunidade são formuladas estratégias defensivas particulares contra o parasita, há o envolvimento dos linfócitos B e T, citocinas e imunoglobulinas. Outra particularidade da imunidade adquirida é a ocorrência da memória imunológica (SANTOS-GOMES et al., 2002).

As avaliações hematológicas, urinárias e bioquímicas séricas são de grande valia, quando se deseja avaliar o quadro clínico e grau de

comprometimento dos órgãos de um cão com LV. As alterações laboratoriais são muito variáveis em sua apresentação e intensidade (IKEDA et al., 2003, REIS et al., 2006).

Um dos principais achados hematológicos na LVC é a anemia, desencadeada geralmente por hemorragia, doença renal crônica, aplasia medular e destruição imunomediada dos eritrócitos (KOUTINAS et al., 1999, CIARAMELLA & CORONA, 2003, REIS et al., 2006, DANESHVAR et al., 2009). Cães infectados frequentemente apresentam anemia do tipo normocítica, consequência do processo inflamatório. A inflamação crônica reduz a meia vida das hemácias, por influenciar a produção de ferritina e alterar os receptores de transferrina, levando a diminuição dos estoques de ferro no organismo. Citocinas, como a interleucina-1 (IL-1), TNF e IFN- γ liberadas durante a inflamação inibem os precursores da eritropoietina e assim a eritropoiese (STOCKHAM & SCOTT, 2011; CAMINHA & SOTO-BLANCO, 2008).

As alterações observadas no leucograma são variáveis, não sendo possível observar padrão específico para a doença (SILVA, 2007). A leucocitose e neutropenia foram as alterações mais relatadas por Freitas et al. (2011), porém nos estudos realizados por Reis et al. (2006) a leucopenia com eosinopenia, linfopenia e monocitopenia, foram os achados mais ressaltados. A leucopenia ocorre devido ao decréscimo da hematopoiese, em virtude da presença do protozoário na medula óssea e/ou pelo sequestro de leucócitos nos tecidos (CAMPILLO et al., 1999). Em pesquisa realizada por Da Costa-Val et al. (2007) não foi encontrada correlação positiva entre as manifestações clínicas e o leucograma. Quanto à plaquetometria, também não existe um padrão, apesar da maioria dos autores relatar a trombocitopenia como sendo o achado mais frequente (PALUDO et al., 2007), porém autores relataram a presença de trombocitose em cães naturalmente infectados (SILVA, 2007).

A hiperproteinemia, associada à hiperglobulinemia e a hipoalbuminemia é uma das alterações bioquímicas mais frequentes na LVC. A

hiperglobulinemia presente em 80% dos cães com LV é resultante das elevações das beta-globulinas e das gamaglobulinas, como resultado da estimulação antigênica mediada pelo parasita, induzindo os plasmócitos a secretarem anticorpos não específicos (NOLI & AUXILIA, 2005). A hipoalbuminemia pode ocorrer devido à disorexia, que culmina na redução da ingestão de alimentos pelo cão enfermo, a inflamação crônica, as hepatopatias resultam em diminuição da síntese de albumina e a proteinúria intensa, como resultado da doença renal, também contribui para a redução da albumina sérica (RALLIS et al., 2005). Cães com vários sinais clínicos tendem a apresentar mais hiperproteinemia do que aqueles que apresentam pouco ou nenhum sinal clínico. Outro achado frequente é a alteração da razão albumina/globulina que na maioria das vezes está abaixo do intervalo normal considerado para a espécie (PALUDO et al., 2007; CASTRO et al., 2012; FREITAS et al., 2012).

A deposição de imunocomplexos nos glomérulos renais, nos pacientes com LVC resulta em perda progressiva dos néfrons e redução da filtração glomerular, que resultam em elevações de diversas substâncias que normalmente seriam excretadas, como a amônia, aminoácidos, peptídeos, fósforo, creatinina, ureia, gastrina, hormônio do crescimento, entre outros. A mensuração das concentrações da ureia e creatinina séricas é amplamente utilizada para a avaliação da taxa de filtração glomerular, a elevação das concentrações séricas de ureia e creatinina é denominada de azotemia. A azotemia e concentrações plasmáticas crescentes destas substâncias são responsáveis pelo aparecimento dos sinais clínicos característicos da doença renal (NELSON & COUTO, 2015; BANETH & SOLANO-GALLEGÓ, 2006).

A quantificação da ureia e creatinina séricas é largamente utilizada na rotina clínica, quando se pretende avaliar a taxa de filtração glomerular, no entanto, estes parâmetros são influenciados por diversos fatores não relacionados à taxa de filtração glomerular, como massa muscular, faixa etária e dieta, o que pode dificultar a interpretação dos resultados. Além disso, muitos

pacientes humanos e cães com leishmaniose encontram-se caquéticos, o que poderia diminuir as concentrações séricas da creatinina, acarretando resultados falsos negativos (RANDERS & ERLANDSEN 1999; ELSHAFIE et al., 2006).

3.2 Patogenia da Doença Renal na Leishmaniose Visceral

O acometimento renal na LVC é atribuído especialmente ao processo inflamatório decorrente do parasitismo, as nefropatias na enfermidade ocorrem devido a deposição de imunocomplexos, especialmente a imunoglobulina M (IgM) e complemento (C3) na parede capilar e mesângio, por nefrite intersticial e secundárias à hipovolemia. A doença renal pode ser a única manifestação clínica, em um cão infectado. O quadro clínico renal pode variar e evoluir desde proteinúria discreta para um quadro de doença renal crônica e/ou síndrome nefrótica. Por isso é importante avaliar a função renal e estagiar a doença renal, seguindo as recomendações de International Renal Interest Society (IRIS), sendo que a doença renal apresenta elevada prevalência e é principal causa de óbito em cães com LV (BANETH et al., 2008; KOUTINAS & KOUTINAS, 2014).

Os imunocomplexos, quando chegam ao glomérulo, depositam-se na membrana basal após passarem pelos poros endoteliais. Os complexos imunes menores passam por entre a membrana basal e são excretados na urina. Os imunocomplexos presentes no glomérulo renal causam inflamação e expansão da membrana basal, resultando em perda de proteínas e hemácias (MIMS et al., 2001). Os antígenos, imunocomplexos de massa molecular elevada e os componentes do complemento permanecem no espaço subendotelial e na membrana basal. A contínua deposição de complexos imunes resulta em grandes aglomerados que se deslocam para o espaço mesangial. A conspícua deposição de imunocomplexos resulta em aumento de tamanho e intensa proliferação das células mesangiais, promovendo alterações na estrutura da membrana basal. Como resultado final ocorre um bloqueio do

espaço de filtração e diminuição da formação do filtrado glomerular, culminando em proteinúria, alterações do sedimento urinário e perda progressiva da função renal (MIMS et al., 2001). Localmente, são produzidas várias citocinas pró – inflamatórias, proteases, fatores de crescimento e substâncias vasodilatadoras, que agravam a doença renal. A ativação do sistema renina – angiotensina – aldosterona resulta em vasoconstrição da arteríola eferente, levando ao aumento da pressão intraglomerular, contribuindo para a inflamação e fibrose renal. A hipertensão glomerular contribui para o agravamento da proteinúria. Outros fatores que também colaboram para o agravamento da glomerulopatia são a ativação do sistema complemento, da cascata de coagulação e a deposição de fibrina.

A persistência da lesão no glomérulo induz hialinização e esclerose, tornando-o irreversivelmente lesado, a partir deste momento o néfron não é mais funcional, e os néfrons funcionais remanescentes aumentam a taxa de filtração glomerular na tentativa de manter a capacidade funcional renal. A hiperfiltração presente nos glomérulos viáveis associada à hipertensão arterial sistêmica, quando presente, contribui para hialinização e esclerose do mesmo (ELLIOTT & GRAUER, 2007).

A nefrite túbulo-intersticial é comum nos pacientes com LV, entretanto o mecanismo patogênico não é completamente entendido, apesar de modelos experimentais sugerirem os processos imunomediados. O epitélio tubular é comprometido na medida em que a glomerulonefrite progride, resultando em degeneração, perda das microvilosidades e necrose das células tubulares. A acidose tubular renal e a redução da capacidade de concentração da urina ocorrem como resultado da disfunção túbulo-intersticial (CAMPILLO et al., 1999; DAHER et al., 2011).

A proteinúria persistente resulta em danos no epitélio tubular renal, contribuindo para o aparecimento da inflamação intersticial, fibrose e morte celular, resultando em lesão progressiva e irreversível dos néfrons. De acordo com trabalho realizado por Bohle et al. (1987) as nefrites túbulo-intersticial

foram mais prevalentes que as glomerulopatias nos pacientes com LV. Em outro estudo realizado por Gomes (2007), verificou-se a presença de lesões túbulo-intersticiais em 60 cães com LV, destes 45 (75,0%) tinham nefrite intersticial e 51 (85%) apresentaram lesões tubulares. Nefrite túbulo-intersticiais foi observada em 49 (81,7%) animais e apenas dois (3,3%) cães enfermos não apresentaram alterações histopatológicas. Neste mesmo trabalho foi observada uma maior correlação entre insuficiência renal com as alterações túbulo-intersticiais, do que entre as glomerulopatias e comprometimento da função renal. A nefrite intersticial difusa na LVC é mais relevante no córtex renal do que na região medular (COSTA et al., 2003).

O estadiamento da doença renal crônica é realizado de acordo com as concentrações séricas da creatinina em quatro estágios. No estágio I, os cães possuem creatinina $< 1,4$ mg/dL, não apresentam manifestações clínicas, porém podem ser observadas alterações na morfologia renal nos exames de imagem, além da proteinúria persistente de origem renal e diminuição da capacidade de concentração urinária. Já no estágio II, os cães apresentam azotemia leve, com valores da creatinina entre 1,4 e 2,0 mg/dL, a poliúria e a polidipsia podem ser o único sinal clínico observado nesta fase. No estágio III, os valores séricos da creatinina estão entre 2,0 – 5,0 mg/dL, nesta fase estão presentes sinais clínicos sistêmicos, devido ao acentuado declínio da filtração glomerular. Valores séricos da creatinina $> 5,0$ mg/dL caracterizam o estágio IV de IRIS, nesta fase são observados sinais clínicos sistêmicos relacionados a síndrome urêmica (IRIS, 2015). Segundo Cortadellas et al. (2006), a prevalência de doença renal crônica em cães com LV, baseado nos critérios de classificação da IRIS é de 49,5%.

Os doentes renais crônicos ainda são subestagiados de acordo com a magnitude da proteinúria e PAS. É sempre recomendável a avaliação destes dois parâmetros, uma vez que a HAS e a proteinúria podem ocorrer em qualquer estágio da doença renal crônica, desta forma a avaliação conjunta permite determinar fatores de risco, independentemente da progressão da

lesão renal, inferindo de forma mais precisa o prognóstico e terapêutica da doença renal (IRIS, 2015; WAKI et al., 2010).

3.3 Cistatina C

A cistatina C é uma proteína não glicosilada, que pertence à superfamília de cisteína, está envolvida no catabolismo de proteínas intracelulares e tem como função principal, inibir as proteases endógenas, que são secretadas ou liberadas dos lisossomos, evitando que os tecidos sejam lesados e, por conseguinte, resguarda o hospedeiro contra a proteólise destrutiva (BOBEK & LEVINE, 1992; LATERZA et al., 2002; FILLER et al., 2005). Outras funções descritas são a modulação da resposta imune, ação antiviral e antibacteriana (MUSSAP & PLEBANI, 2004).

A cistatina C foi descoberta em 1961 e, posteriormente, o primeiro imunoensaio para sua determinação foi em 1979. A correlação com a taxa de filtração glomerular (TFG) foi observada em 1985, e partir desta data, houve um gradual interesse como a possível substituta da creatinina sérica (PRATES, 2005). Jensen et al. (2001) realizaram o primeiro estudo de validação para mensurar a cistatina C sérica de cães.

Estruturalmente é composta por 120 aminoácidos, carregada positivamente, apresenta baixo peso molecular, cerca de 13,3 KDa, o que permite a livre filtração nos glomérulos. A estrutura do gene que a codifica parece ser do tipo *housekeeping*, sendo responsável pela estabilidade e ritmo constante de sua síntese e secreção, este gene é expresso em todas as células nucleadas (PRATES et al., 2007). A homologia da cistatina C de cães e seres humanos está entre 46% a 79% (BRAUN et al., 2002).

A cistatina C é estável no sangue devido à presença de substâncias estabilizadoras e as altas concentrações de proteases inibidoras, como por exemplo, a transferrina, que permite a estocagem do soro e/ou plasma por semanas ou meses, sem que ocorra a desnaturação da mesma (WILLEMS et al., 2003). A estabilidade no soro em temperatura ambiente é de sete dias, se

congelado resiste por vários meses (a -20°C, de um a dois meses; - 80°C por seis meses), além de resistir por vários ciclos de congelamento e descongelamento (GABRIEL et al., 2011).

No rim, a cistatina C é filtrada livremente através do glomérulo, reabsorvida nos tubos contorcidos proximais por endocitose (cerca de 99%) e catabolizada principalmente pelas células tubulares, não existindo secreção tubular. Praticamente não é excretada na urina, portanto, na ausência de lesão tubular sua concentração na urina é muito baixa (RANDERS & ERLANDSEN 1999; ANTOGNONI et al., 2005; ROYAKKERS et al., 2011). A contínua secreção em todos os tipos de tecidos e por não ser influenciada por fatores extra-renais como a idade, massa corporal, sexo, infecção, inflamação e dieta, tornam a cistatina C um biomarcador sérico fidedigno para avaliar a taxa de filtração glomerular (FANOS et al., 1999).

Alguns fatores extra-renais foram relacionados a variações das medidas séricas da cistatina C, independente da função renal. Pacientes com hipertireoidismo apresentaram aumentos discretos da cistatina C sérica, enquanto a diminuição foi associada ao hipotireoidismo, neste mesmo estudo todos os pacientes normalizaram as concentrações séricas do marcador após tratamento (FRICKER et al., 2003; CAMARGO, 2011). Okay (2002) verificou que doses elevadas de corticosteroides resultaram em elevações da cistatina C sérica e a ciclosporina resultou em diminuição nos pacientes com função renal normal. Elevações séricas da cistatina C também foram observadas em pacientes portadores de neoplasias malignas, sem que o doente apresentasse diminuição da filtração glomerular. Estas observações sugerem que os processos neoplásicos possam induzir a síntese desta substância (MARTINEZ et al., 2003; FILLER et al., 2005).

As concentrações séricas da cistatina C não são influenciadas pelo teor de proteínas na alimentação, diferentemente da creatinina sérica. Assim, em pacientes que apresentem baixa ingestão de proteínas, a mensuração da cistatina C poderá fornecer de forma mais precisa a taxa de filtração glomerular

(GABRIEL et al., 2011). Além disso, o peso e a massa muscular não influenciam as concentrações séricas da cistatina C, sugerindo que a mesma também seja a melhor opção para pacientes com grande massa muscular (BAXMANN et al., 2008).

Em estudo realizado por Braun et al. (2002), os cães com peso superior a 15 Kg, filhotes e animais senis tinham concentrações mais elevadas de cistatina C sérica, mas neste mesmo estudo não foram observadas diferenças entre sexos.

Os trabalhos disponíveis em medicina veterinária, especificamente na espécie canina, desmonstram que a cistatina C não é um biomarcador sensível na insuficiência renal aguda, em cães submetidos a hipovolemia (ALMY et al., 2002). No entanto, Antognoni et al. (2007) e Wehner et al. (2008) afirmaram que a cistatina C é um bom marcador para a triagem na doença renal crônica e que também é útil quando se deseja monitorar as mudanças na taxa de filtração glomerular. Entretanto, em virtude dos achados conflitantes e dada a maior especificidade da creatinina sérica, é sugerida a mensuração simultânea de ambos os marcadores a fim de aumentar a eficiência no diagnóstico (WEHNER et al., 2008).

Segundo Antognoni et al. (2005), o reagente comercial de uso humano pode ser usado em cães quando se deseja mensurar a cistatina C sérica pela técnica de nefelometria automatizada.

Trabalhos realizados em cães para avaliar a eficácia da cistatina C sérica demonstraram similaridade com as pesquisas realizadas em humanos. As informações aqui citadas sugerem que a cistatina C é um marcador mais preciso para a avaliação da função glomerular quando comparado à ureia e creatinina séricas, fato esse admitido por vários autores. Porém, outros estudos não verificaram diferenças significantes entre os valores de cistatina C e creatinina séricas. Portanto, mais pesquisas são necessárias em cães e em outras espécies animais, para estabelecer as possíveis interferências extra-renais nas mensurações séricas da cistatina C (FINNEY et al., 1999; BRAUN et

al., 2002; DHARNIDHARKA et al., 2002; DANIEL et al., 2004; ANTOGNONI et al., 2005).

3.4 Enzimúria

O estudo das enzimas urinárias é relatado há mais de 160 anos, entretanto somente nos últimos anos, a atividade das enzimas urinárias tem sido aplicada na prática clínica. Atualmente, já foram identificadas mais de 40 enzimas na urina, mas apenas algumas apresentam aplicabilidade para fins de prognóstico e diagnóstico. A principal indicação para a determinação da atividade das enzimas urinárias é o diagnóstico precoce da doença renal aguda, como por exemplo, aqueles pacientes que estão recebendo ou receberam fármacos nefrotóxicos (RIVERS et al., 1995; CLEMO, 1998).

A GGT urinária tem sido destacada em diversos estudos, por ser considerada um marcador precoce de lesão tubular. É formada na borda em escova das células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais dos néfrons. Normalmente, aumentos de duas a três vezes indicam lesão do epitélio tubular. A quantificação da GGT urinária também fornece informações sobre a extensão e progressão da lesão tubular. A GGT de origem hepática devido ao elevado peso molecular não é filtrada no glomérulo normal, porém a presença de lesão glomerular grave permite o aumento da filtração da mesma (UECHI et al., 1994; RUDOLPH & CORVALAN, 1992). A dosagem de GGT urinária é um procedimento simples, de baixo custo e útil para o diagnóstico precoce de lesões renais, também pode ter aplicabilidade no diagnóstico e acompanhamento das nefropatias causadas pela LVC. O aumento da concentração urinária da GGT ainda ocorre em situações de septicemia, diabetes mellitus, uso de aminoglicosídeos, nefrotoxinas, intoxicação por metais pesados, anti-inflamatórios não esteroidais e anestésicos (POPPL et al., 2004).

Melchert et al. (2007) causaram danos tubulares e redução da taxa de filtração glomerular em cães, após a administração de aminoglicosídeos, e

observaram acréscimo da GGT urinária quatro dias depois da aplicação, enquanto que a azotemia foi observada apenas sete dias após a administração. Hennemann et al. (1997) estudaram cães com insuficiência renal aguda induzida por gentamicina, e neste experimento também foi demonstrada a precocidade da GGT urinária em relação aos exames convencionais utilizados na rotina para a avaliação da função renal.

Santin et al. (2006), ao avaliarem a atividade da GGT urinária em cães após o tratamento com anfotericina B, fármaco que sabidamente causa tubulopatia proximal e distal, não constataram a precocidade desta enzima, pois foi observada a diminuição da densidade urinária e cilindrúria antes das elevações da GGT urinária.

Os valores de referência para a GGT urinária de cães e gatos situam-se entre 13 a 92 UI/L (DE SCHEPPER et al., 1989). O acondicionamento e o processamento da amostra logo após a coleta são fundamentais para a obtenção de valores fidedignos. A avaliação da enzimúria deve ser interpretada com cautela, devido à possibilidade da ocorrência de resultados falsos positivos ou falsos negativos por falhas na manipulação das amostras. Os resultados falsos positivos ocorrem em situações de dano glomerular severo, que resultam em hiperfiltração das enzimas séricas, enquanto que os resultados falsos negativos geralmente ocorrem em situações de estoque prolongado da urina ou por congelamento a -20°C ou -80°C ou ainda, em situações de esgotamento das enzimas tubulares (MATTEUCI et al., 1991; GRAUER, 2005).

Palácio et al. (1997), ao estudarem a atividade da GGT urinária em cães com leishmaniose, observaram aumentos significativos ($p < 0.05$) nos animais infectados, neste mesmo estudo também foi observada uma correlação positiva entre a UP/C e GGT urinária, demonstrando a precocidade de ambos os parâmetros para diagnóstico precoce de nefropatias, antes do aparecimento de azotemia.

A mensuração da R-GGT/C urinária mimetiza a excreção da GGT urinária em um período de 24 horas, o teste ajusta as oscilações da GGT urinária que é influenciada pelo fluxo de urina (RIVERS et al, 1995; UECHI, 1994). De acordo com Grauer (2005), aumentos da R-GGT/C urinária duas a três vezes sobre o valor basal são indicativas de lesão tubular.

Heiene et al. (2001), ao avaliarem a enzimúria em cadelas com piometra, verificaram aumentos da R-GGT/C urinária, e que estes aumentos eram de acordo com a gravidade da lesão tubular, neste mesmo estudo foi constatado que a atividade da R-GGT/C urinária diminuiu após o procedimento de ovário-histerectomia. Segundo os mesmos autores, a R-GGT/C urinária é útil para o diagnóstico de lesão renal aguda, porém não é tão eficaz no diagnóstico da doença renal crônica.

Ibba et al. (2016) avaliaram a R-GGT/C urinária em 39 cães com LV por meio da eletroforese das proteínas urinárias em gel de agarose, foram observados valores medianos significativamente maiores da R-GGT/C urinária nos animais que apresentaram componentes tubulares de proteinúria. Portanto, a R-GGT/C urinária mostrou-se útil para indentificar proteinúria de origem tubular em cães com leishmaniose.

3.5 Índices de resistividade da artéria renal

A ultrassonografia em modo Doppler fornece informações em tempo real sobre a arquitetura vascular e os aspectos hemodinâmicos dos vasos sanguíneos. Esta técnica permite avaliar a velocidade de direção do fluxo sanguíneo, o pico de velocidade sistólica e diastólica final, índice de resistividade (IR) e índice de pulsatilidade (IP) (SANTOS et al., 2013).

A ultrassonografia em modo Doppler é um exame não invasivo e tem sido utilizada para o diagnóstico de nefropatias e para estimar prognósticos e monitorar tratamentos. Para a realização do exame em modo Doppler é preciso conhecer a anatomia da artéria renal, que na espécie canina surge no aspecto lateral da aorta e caudal à artéria mesentérica cranial, com diâmetro de três a

quatro milímetros. Antes de atingir o hilo renal, em aproximadamente 20% dos cães, as artérias renais dividem em ramo dorsal e ventral e cada artéria ou ramo (quando presente) dá origem às artérias interlobares, cerca de duas a sete. As artérias interlobares percorrem a medular renal e na junção corticomedular, se curvam para formar as artérias arqueadas. As veias renais estão localizadas ventralmente às suas artérias correspondentes (NYLAND et al., 2005, CARVALHO, 2009).

O exame em modo Doppler seja das artérias renais, interlobares e/ou arqueadas, avalia o fluxo sanguíneo e fornece dados sobre a resistência vascular, através da mensuração do índice de resistividade (IR). Aumento do IR renal pode ser a primeira alteração do comprometimento da função renal, este índice também pode ser utilizado para monitorar a progressão ou a regressão das nefropatias já diagnosticadas (MELO et al., 2006, NOVELLAS et al., 2007). Desta forma, é importante solicitar a avaliação ultrassonográfica em modo Doppler em pacientes com suspeita de patologias renais, aquelas que sabidamente resultam em aumento da resistência vascular das artérias renais como a nefrite intersticial, lesão tubular aguda, pielonefrite e outras nefropatias (MORROW et al., 1996, RIVERS et al., 1997).

O IR é calculado pela subtração entre as velocidades de pico sistólico (VPS) e diastólico final (VDF) sobre a velocidade de pico sistólico (VPS) (CARVALHO, 2009).

$$IR = VPS - VDF / VPS$$

Nyland et al. (1993) e Rivers et al. (1997) sugeriram que o limite do IR não deve ser superior a 0,70. As doenças renais que comumente resultam em elevações do IR são a insuficiência renal aguda, lesão tubular aguda, obstrução uretral, doença túbulo-intersticial e isquemia renal (RIVERS et al. 1997; NOVELLAS et al., 2007).

Em um estudo realizado por Assis (2012), o autor não verificou diferença do IR entre os grupos de cães com até 18 meses, cães com idade entre 19 meses a 10 anos e cães com idade superior a 10 anos, porém em outro estudo

feito por Nyland et al. (1993), verificou-se diferença do IR entre cães adultos e idosos nas artérias arqueadas e interlobares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos Animais

O projeto de pesquisa teve início após ter sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Protocolo nº679/2015).

O estudo foi conduzido no setor de clínica médica de pequenos animais do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS. Foram estudados 59 cães naturalmente infectados por *Leishmania infantum* não tratados, de ambos os sexos, adultos, sem raça definida, atendidos durante os serviços de rotina do Hospital Veterinário.

Foram incluídos no estudo, cães com diagnóstico de LV confirmado pela observação de formas amastigotas em exame citológico, obtido por punção aspirativa de linfonodos e/ou medula óssea.

Após o diagnóstico da LVC, foi realizada urinálise, UP/C e a determinação das concentrações séricas de creatinina, animais com proteinúria de origem pós-renal, caracterizada por inflamação no sistema urinário, foram excluídos do estudo. Amostras de sangue periférico de todos os cães com LV foram submetidas à avaliação por PCR para detecção de DNA de *Ehrlichia canis* e *Leptospira sp.*, para o último agente também foi realizada a PCR da urina, de modo que os animais que apresentaram resultados positivos, foram excluídos do estudo. Ainda foram excluídos do estudo, animais com histórico de doenças anteriores, procedimentos anestésicos, cirúrgicos e cães com doença renal prévia (aguda ou crônica), litíase renal e com histórico de uso prévio de diuréticos e fármacos nefrotóxicos.

4.2 Grupos Experimentais

Para avaliar a precocidade dos marcadores renais propostos no experimento, selecionamos cães com LV em estágios iniciais da doença renal, animais proteinúricos e não azotêmicos (IRIS/I), para tanto os animais foram

alocados em grupos, de acordo com o grau de proteinúria e presença ou não de azotemia. Baseando-se nas concentrações séricas de creatinina e UP/C, os cães foram classificados em grupos (G): G1 (n=15) cães com creatinina < 1,4 mg/dL e UP/C < 0,5; G2 (n=13) cães apresentando creatinina < 1,4 mg/dL e UP/C entre 0,5 e 1,0; G3 (n=16) cães com creatinina <1,4 mg/dL e UP/C > 1,0; G4 (n=15) cães com creatinina >1,4 mg/dL. Um quinto grupo formado por 10 animais com sorologia negativa no teste ELISA (ELISA/S7®, Biogene Indústria e Comércio Ltda. ME., Recife-PE) e exame parasitológico negativo na pesquisa de formas amastigotas de *Leishmania infantum* nos linfonodos e sem sinais clínicos da doença foi utilizado como controle.

4.3 Sangue Periférico

Para a realização das avaliações laboratoriais foram obtidos 10 mL de sangue periférico por venopunção jugular, sendo a alíquota dividida entre 2 e 3 mL de sangue para a realização dos testes moleculares e entre 7 a 8 mL destinados à obtenção do soro para a realização das provas bioquímicas séricas. As amostras foram alocadas em tubos sem anticoagulante, que depois da retração do coágulo foram centrifugados 415g por 15 minutos. Em seguida, o soro foi dividido em alíquotas e armazenado em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®, Alemanha) e submetido ao congelamento (-20°C) até o momento da realização dos testes bioquímicos.

4.4 Urina

As amostras de urina foram obtidas de forma asséptica por cistocentese ou cateterização transuretral, com auxílio de sonda uretral descartável estéril (Mark Med® Ltda., São Paulo-SP). Parte da urina (10 mL) foi encaminhada para a realização da urinálise e um segundo volume de aproximadamente 10 mL foi acondicionado a -20°C para análises de PCR com o objetivo de diagnosticar leptospirose.

A análise da urina foi realizada logo após a coleta, e compreendeu do exame físico, químico e microscópico do sedimento da urina. O exame físico avaliou o volume, a cor, o aspecto e a densidade urinária, sendo esta última mensurada por meio de um refratômetro de bancada (Abbe, Atago® Co. Ltda., Japão), logo após centrifugação da urina. O exame químico consistiu da avaliação do pH, proteína, glicose, cetonas, bilirrubina, hemácias, hemoglobina, urobilinogênio, nitrito e leucócitos, realizado com tiras reagentes comerciais (Biocolor, Bioeasy Diagnóstica Ltda.). O sedimento urinário foi examinado após a ressuspensão de uma gota do sobrenadante, disposto entre lâmina e lamínula e observado em microscopia óptica com objetiva de 40x. O sedimento foi avaliado quanto à presença de hemácias, leucócitos, cilindros, bactérias, leveduras, cristais, filamentos de muco e artefatos.

As amostras de urina destinadas à realização de provas bioquímicas foram centrifugadas e subdivididas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®, Alemanha). Parte da alíquota foi armazenada a -20°C para avaliação da proteinúria e creatinina urinária, exceto a alíquota destinada à mensuração da atividade urinária de GGT.

4.5 Bioquímica Sérica e Urinária

As amostras de soro foram processadas para determinar a concentração sérica da cistatina C e creatinina. As mensurações séricas da creatinina foram efetuadas em analisador bioquímico automático (Cobas® C 111 Roche Diagnóstica Ltda., Alemanha), para cada metabólito analisado, foram utilizados reagentes comerciais, seguindo os preceitos do sistema. Para o estudo foi utilizado o kit reagente para a creatinina (CREj2®, Roche Diagnóstica Ltda., Alemanha).

A determinação da GGT urinária foi realizada em analisador semiautomático (Spectrum®, Celer Biotecnologia S.A, Belo Horizonte MG) com o reagente comercial (GGT- PP Gold Analisa, Belo Horizonte MG). A

mensuração foi realizada logo após a coleta e o resultado calculado segundo a formula de Deschepper et al. (1989).

A dosagem da creatinina urinária foi realizada no analisador bioquímico automático (Cobas® C 111 Roche Diagnóstica Ltda., Alemanha). Antes da realização do teste, a urina foi diluída, nas proporções de 1:25 e os resultados da leitura foram multiplicados por 25. A determinação da concentração da proteína urinária foi realizada pelo método colorimétrico, por reação com o vermelho de pirogalol, a uma absorbância de 610 nm, em espectrofotômetro semiautomático (Spectrum®, Celer Biotecnologia S.A, Belo Horizonte MG). Para a dosagem da proteína urinária foi usado o reagente comercial (Proteinúria PP, Gold Analisa, Belo Horizonte MG).

Os valores obtidos das mensurações da proteína e creatinina na urina foram aplicados na seguinte fórmula: $UP/C = \text{Proteína total (mg/dL)} / \text{Creatinina urinária (mg/dL)}$.

Para o cálculo da R-GGT/C utilizamos a seguinte formula: $R-GGT/C \text{ urinária} = \text{GGT urinária (UI/L)} / \text{Creatinina urinária (mg/dl)}$.

Para as mensurações da cistatina C, foram utilizados 80 µl de soro, as avaliações foram realizadas por meio da técnica de nefelometria automatizada, com o kit reagente (N Látex Cystatin C, Dade Behring, Deerfield, IL, EUA).

4.6 Aferição da Pressão Arterial Sistólica

Foram aferidas as PAS na artéria da região do metacarpo no membro torácico direito, com esfigmomanômetro e aparelho de Doppler (Doppler Vascular Portátil Veterinário Modelo DV 610®, Medmega Indústria de Equipamentos Médicos Ltda., Franca, Brasil). Os manguitos utilizados tinham larguras de aproximadamente 30 a 40% da circunferência do membro, na altura do terço médio (região do rádio e ulna), sempre com o animal em decúbito lateral esquerdo ou sentado, desde que o membro torácico direito estivesse na mesma altura da válvula aórtica. A aferição sempre era realizada

após um período de habituação de 10 minutos, a fim de reduzir o estresse associado com o procedimento.

Foram realizadas no mínimo cinco aferições para cada animal. A primeira e a última aferição sempre eram rejeitadas. A média aritmética das três aferições foi considerada como o valor da pressão arterial sistólica. Foram considerados como hipertensos, cães com valores de pressão arterial sistólica iguais ou superiores a 150 mmHg (BROWN et al., 2007).

4.7 Ultrassonografia

Para a verificação do índice de resistividade das artérias renais, foram realizadas tricotomias amplas na região dos flancos direito e esquerdo, ventral aos músculos sublombares e caudal à última costela esquerda e aos dois últimos espaços intercostais direitos, permitindo a livre movimentação do transdutor para obtenção de imagens de boa qualidade de ambos os rins. Para a execução do exame os cães foram posicionados em decúbito lateral, direito ou esquerdo, de acordo com o rim e artéria renal a ser examinada. As imagens sonográficas em tempo real foram obtidas com o equipamento de ultrassonografia (Mylab 30 Vet Gold Esaote®, Biosound Esaote Inc., Indianápolis, USA), utilizando-se um transdutor multifrequencial de 5/6, 5/8 MHz, convexo de varredura setorial em modo Doppler pulsado e com mapeamento em cores.

Para a realização do exame, inicialmente foi realizado o mapeamento das artérias renais, empregando o modo Doppler colorido. O cursor foi posicionado sobre o vaso sanguíneo, na região do hilo renal em plano transversal para obtenção do traçado espectral. O índice de resistividade foi calculado conforme a fórmula de Rivers et al. (1997). Com intuito de obter medidas uniformes, foram avaliadas três ondas consecutivas de aparências similares, no traçado para cada região avaliada (MELO et al., 2006). Após a obtenção do pico da velocidade sistólica e do final da velocidade diastólica, foi mensurado o IR pelo software do aparelho de ultrassonografia (NOVELLAS et

al., 2007; BIGÉ et al., 2012). A média dos valores obtidos nas três ondas de cada região foi utilizada como dado para a avaliação estatística (figura 1).

4.8 Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todos os cães com diagnóstico de LV foram submetidos a testes moleculares, para pesquisa de *Ehrlichia canis* e *Leptospira sp.*. Para o primeiro agente foi realizada a Nested-PCR do sangue total e para o segundo agente foi realizada a PCR convencional das amostras de sangue total e urina. O sangue coletado foi acondicionado em tubo estéril contendo EDTA (Anticoagulante Universal, Doles) e dividido em alíquotas em tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL, que foram mantidas a -20°C até o momento da extração do DNA genômico. Aliquotou-se 10 mL de urina, que após ser centrifugada a 17.000 g, o sobrenadante fora descartado e o sedimento ressuspendido, para ser congelado a -20°C, para posterior extração do DNA.

Após a extração do DNA, as amostras foram examinadas pela técnica de Nested-PCR, para a pesquisa do DNA de *Ehrlichia canis* conforme a metodologia descrita por Wen et al. (1997) e para a amplificação do DNA genômico de *Leptospira sp.*, foi empregada a técnica descrita por Mérien et al., (1992). Os produtos da PCR foram observados por eletroforese em gel de agarose a 2% com o auxílio do transluminador e fotodocumentado.

4.9 Análises estatísticas

Foram calculados a média, desvio-padrão, mediana e coeficiente de variação. Para avaliar o comportamento das variáveis quanto à normalidade foi realizado o teste Lillefors. Após esta avaliação optou-se por aplicar o teste ANOVA para as variáveis paramétricas, que apresentaram distribuição normal (GGT urinária, R-GGT/C urinária e PAS) e o teste de Kruskal-Wallis para as variáveis que não apresentaram normalidade (cistatina C, IRARD e IRARE). Foram empregados os pós – testes Tukey, Bonferroni e Dunn para as

comparações múltiplas. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a relação entre as variáveis e o índice de Kappa foi empregado para avaliar a concordância entre os biomarcadores. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas por meio do programa computacional BIOESTAT 5.0 (AYRES et al., 2007).

5 RESULTADOS

5.1 Cistatina C

A concentração sérica média da Cistatina C no G4 foi superior aos demais grupos ($p < 0,05$) e os cães do G3, também apresentaram média superior aos animais do grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da Cistatina C sérica dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), Campo Grande, 2017.

	Grupos	N	Média	Mín.-Máx.	Mediana	DP	CV
Cistatina C mg/L	G1	15	0,3ab	0,18-0,42	0.3	0.06	19.85%
	G2	13	0,36ab	0,27-0,5	0.33	0.08	23.48%
	G3	16	0,49b	0,2-1,23	0.35	0.27	56.68%
	G4	15	1,34c	0,41-2,45	1.32	0.48	36.40%
	Controle	10	0,22a	0,14-0,3	0.23	0.06	28.18%

Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

5.2 Gama Glutamil Transferase Urinária

Os valores médios da GGT urinária nos animais do G4 e G3 foram estatisticamente superiores aos do G1 e controle ($p < 0,05$). Também houve diferença estatística entre os cães do G2 e grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da GGT urinária dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), Campo Grande, 2017.

	Grupos	n	Média	Mín.-Máx.	Mediana	DP	CV
GGT urinária UI/L	G1	15	38,29ab	17-39,3	30,2	21,86	57,10%
	G2	13	64,78bc	29,9-147,6	57,91	35,74	55,17%
	G3	16	100,08c	32,5-378	87,5	83,45	83,38%
	G4	15	94c	43-241	92,5	48,4	51,49%
	Controle	10	27,13a	11,6-49	24,86	10,39	38,32%

Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.3 Razão Gama Glutamil Transferase / Creatinina Urinária

Os valores médios, medianos, desvio padrão e coeficiente de variação da R-GGT/C urinária estão apresentados na Tabela 3. As médias da R-GGT/C urinária nos grupos de cães infectados azotemicos e com proteinúria estavam significativamente aumentadas em relação ao grupo de cães do G1 e controle ($p < 0,05$).

Tabela 3. Valores da R-GGT/C urinária dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), Campo Grande, 2017.

	Grupos	n	Média	Mín.-Máx.	Mediana	DP	CV
R-GGT/C Urinária	G1	15	0.3a	0,11-0,78	0.31	0.16	52.80%
	G2	13	0.99b	0,24-1,99	0.95	0.5	51.04%
	G3	16	1.05b	0,29-3,37	0.85	0.79	74.96%
	G4	15	1.5b	0,5-3,14	1.44	0.73	48.68%
	Controle	10	0.17a	0,06-0,29	0.18	0.06	34.91%

Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.4 Índice de Resistividade da Artéria Renal

Na Tabela 4 são apresentadas as medidas de tendência central do IR das artérias renais direita e esquerda de todos os grupos, no entanto a diferença estatística foi observada apenas entre os cães do G4 e controle ($p < 0,05$).

Tabela 4. Valores do Índice de resistividade da artéria renal direita e esquerda dos cães dos grupos G1, G2, G3, G4 e Controle, com valores de média, mínimo e máximo, mediana, desvio-padrão (DP) e coeficiente de variação (CV), Campo Grande, 2017.

	Grupos	n	Média	Mín.-Máx.	Mediana	DP	CV
IRARD	G1	15	0,68ab	0,54-0,85	0,69	0,09	13,65%
	G2	13	0,67ab	0,55-0,93	0,67	0,08	12,80%
	G3	16	0,7ab	0,56-0,88	0,7	0,08	12,68%
	G4	15	0,76b	0,63-0,89	0,77	0,06	9,16%
	Controle	10	0,61a	0,47-0,81	0,6	0,08	14,35%
IRARE	G1	15	0,69ab	0,55-0,85	0,7	0,09	13,65%
	G2	13	0,67ab	0,56-0,93	0,67	0,08	12,80%
	G3	16	0,71ab	0,56-0,87	0,71	0,08	12,68%
	G4	15	0,75b	0,55-0,9	0,75	0,06	9,16%
	Controle	10	0,61a	0,45-0,81	0,62	0,08	14,35%

Médias seguidas de letras diferentes, dentro da mesma coluna, diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$).

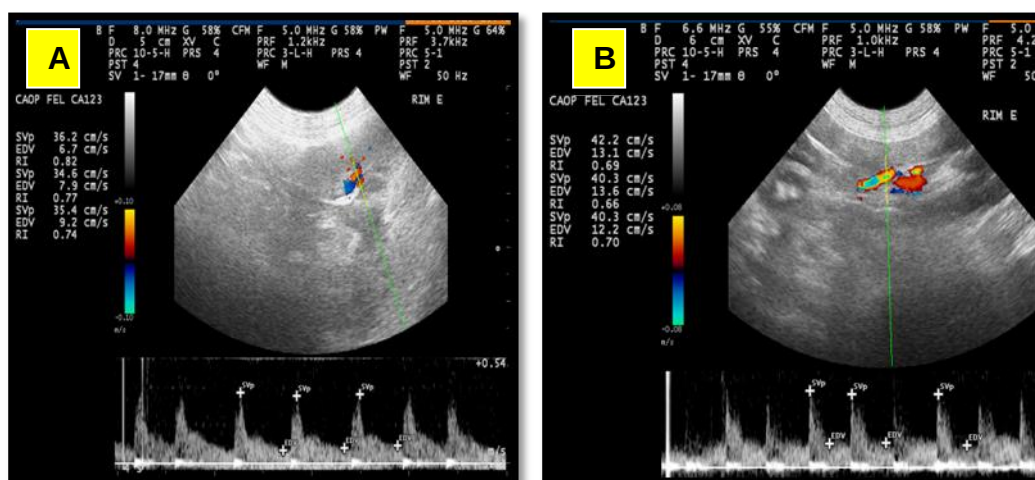


Figura 1. Avaliação ultrassonográfica em modo Doppler espectral para mensuração do Índice de Resistividade (IR) das artérias renais do rim esquerdo. (A) Animal do G4 com IRARE aumentado (0,82); (B) Cão do G1 com IRARE normal (0,69).

5.5 Índices de Concordância Kappa e Coeficiente de Correlação de Postos de Spearman

Os resultados dos índices de concordância Kappa e o Coeficiente de correlação de postos de Spearman entre os biomarcadores estão dispostos nas tabelas 5 e 6 respectivamente.

Tabela 5. Coeficiente de correlação de postos de Spearman entre os biomarcadores, Campo Grande, 2017.

	Creatinina	GGT Urínária	IRARE	IRARD	PAS	UP/C	R-GGT/C urinária	Cistatina C
Cistatina C	0,69****	0,47***	0,34*	0,37**	ns	0,67****	0,42**	
GGT urinária	ns		0,3*	0,3*	ns	0,5****		0,47***
R-GGT/C urinária	ns		0,39*	0,4*	ns	0,52****		0,42**
IRARE	0,31*	0,3*			ns	ns	0,39*	0,34**
IRARD	0,32*	0,3*			ns	ns	0,4*	0,37**
PAS	ns	ns	ns	ns		0,3*	ns	ns

ns: não significativo. *:p<0,05. **:p<0,01. ***:p<0,001. ****:p<0,0001

Tabela 6. Índices de concordância Kappa entre os biomarcadores, Campo Grande, 2017.

	Creatinina	GGT Urínária	IRARE	IRARD	PAS	UP/C	R-GGT/C urinária	Cistatina C
Cistatina C	0,63***	0,25*	ns	ns	0,18*	ns	0,13*	
GGT urinária	0,47**		ns	ns	ns	0,46*		0,25*
R-GGT/C urinária	0,47		ns	ns	ns	0,7***		0,47**
IRARE	0,21*	0,71*			ns	ns	0,69*	ns
IRARD	0,2*	0,7*			ns	ns	0,7*	ns
PAS	0,31*	ns	ns	ns		0,27*	0,7***	0,18*

ns: não significativo. *:p<0,05. **:p<0,01. ***:p<0,001. ****:p<0,0001

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, a estratificação dos grupos de cães com LV foi baseada nos valores séricos da creatinina e ocorrência ou não de proteinúria. Para estratificar os grupos de cães infectados, preferiu-se utilizar a creatinina ao invés da ureia como indicador da função renal, pois a última poderia ser influenciada por fatores de origem não renal, tais como ingestão protéica e gastroenterites (RANDERS & ERLANDSEN, 1999). Os resultados do presente estudo demonstraram aumentos da atividade da GGT urinária e da R-GGT/C urinária antes do aparecimento da azotemia e que a avaliação do IRAR e a mensuração sequencial da cistatina C sérica podem ser úteis quando se deseja monitorar a progressão da doença renal em cães com LV.

Os cães do G4 apresentaram aumentos significativos da cistatina C sérica em relação aos demais grupos, achados semelhantes aos de Antognoni et al. (2007), que também observaram concentrações significativamente mais elevadas da cistatina C sérica, somente nos cães com LV azotêmicos. Também foi verificado no estudo que o G3 apresentou média superior ao grupo controle. Desta maneira, podemos inferir que a cistatina C sérica aumentou com o agravamento da doença renal, e que este marcador pode ser útil quando se deseja verificar a diminuição da taxa de filtração glomerular. Antognoni et al. (2005) também afirmaram que os aumentos sequenciais das concentrações de cistatina C sérica em um mesmo paciente são indicativos de progressão da doença renal. Em nossa pesquisa estratificamos os grupos de cães com LV pelo grau de comprometimento renal; no entanto, não constatamos maior precocidade da cistatina C em relação à creatinina sérica para o diagnóstico de doença renal. Estes achados são semelhantes aos de Rule et al. (2006) que afirmaram que a cistatina C sérica apresenta eficácia similar à creatinina sérica; porém Wehner et al. (2008) descreveram que a melhor alternativa é associar as dosagens séricas da creatinina e cistatina C, pois em sua pesquisa, observaram maior sensibilidade da cistatina C em relação a creatinina e maior especificidade da creatinina em relação a cistatina C.

Verificou-se que a enzimúria esteve presente antes do aparecimento da azotemia nos cães com LV. Segundo Grauer (2005), aumentos de duas a três vezes da GGT urinária em relação ao valor basal indicam lesão tubular clinicamente relevante. Estes achados corroboram os do presente trabalho, em que verificou-se aumentos significantes nos grupos de cães infectados em relação ao grupo controle, e entre os doentes, conforme a gravidade da nefropatia. Ibba et al. (2016) afirmaram que presença de componentes tubulares na urina é indicativa de progressão da doença renal, concordando com os achados do presente estudo, no qual verificamos aumentos das médias da R-GGT/C urinária, conforme a doença renal progredia. Greco et al. (1994), afirmaram que a GGT urinária pode ser usada para o monitoramento clínico renal de pacientes que estejam recebendo fármacos nefrotóxicos. Considerando que a maioria dos farmacos utilizados na terapia da leishmaniose apresentam elevada nefrotoxicidade, os resultados do presente estudo sugerem que as mensurações da GGT e da R-GGT/C urinárias poderiam ser úteis para o clínico na identificação de tubulopatias e manejo da doença renal crônica proteinúrica, antes e depois da terapia leishmanicida.

Aumentos significativos do IRAR só foram observados nos cães do G4, sugerindo que o IRAR não permite o diagnóstico precoce da doença renal em cães com LV. De acordo com Ikee et al. (2005), a evolução inicial da doença renal resulta em alterações adaptativas e compensatórias que contribuem para a não elevação do IRAR, conforme observado nos animais do G2 e G3 e com a manutenção da lesão e evolução para doença renal crônica, ocorrerá a diminuição da área do vaso e fibrose intersticial que serão responsáveis pelo aumento do IRAR (IKEE et al., 2005), conforme observado no G4.

Morrow et al. (1996), ao compararem o IRAR com achados histopatológicos, verificaram que os animais com glomerulopatias apresentaram IR normais e os pacientes com lesões tubulares e intersticiais tinham IR acima de 0,7. De acordo com Platt et al. (1990), os valores do IRAR são fortemente influenciados pela localização da lesão dentro do parênquima

renal. Patologias em região túbulo – intersticial (lesão tubular aguda, nefrite intersticial) e/ou vasculite geralmente resultam em aumentos do IR. Segundo Baneth et al. (2008), a glomerulonefrite é a lesão renal mais comum na LVC, e de acordo com esta afirmativa, pode-se justificar o aumento significativo da média apenas nos animais do G4. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos G1, G2, G3 e grupo controle, estes achados permite deduzir que doenças estritamente glomerulares, evoluam e acometam o interstício, túbulos e os vasos sanguíneos resultando em aumento do IRAR. Sendo assim, pode-se dizer que o IRAR não é um bom indicador para o diagnóstico precoce de doença glomerular em cães com LV, mas pode ser utilizado para avaliação da progressão da doença renal.

Observou-se correlação positiva e significativa entre a UP/C e cistatina C sérica. Esta correlação é explicada pela lesão glomerular que resultou em proteinúria, verificada pela UP/C e diminuição da filtração glomerular que provocou as elevações da cistatina C sérica. Segundo Chew et al. (2012), o declínio da função renal e, portanto, a redução da taxa de filtração glomerular resultam em ativação de mecanismos adaptativos, que visam aumentar a filtração, e que o aumento da pressão intraglomerular favorece o aparecimento da proteinúria. Correlações positivas entre a cistatina C sérica e creatinina, e entre uréia e fósforo sérico foram encontradas por Antognoni et al. (2005). No presente estudo, também foram encontradas correlações significativas, de moderadas a fortes entre a cistatina C e creatinina sérica, e entre GGT urinária e R-GGT/C urinária. Ainda observou-se correlações positivas e significativas, entre a GGT urinária e a R-GGT/C urinária com a UP/C. Tais achados permitem especular que danos glomerulares permitem a filtração de proteínas, causando proteinúria e que estas resultariam em lesão no epitélio tubular renal, os quais foram constatados pelos aumentos da atividade da GGT urinária e da R-GGT/C urinária. As correlações verificadas na presente pesquisa demonstram que a redução da função excretora renal está relacionada ao aumento da proteinúria e ao aparecimento de tubulopatia, evidenciando a

importância da avaliação da UP/C e enzimúria em cães com LV, mesmo que apresentem a função excretora renal normal.

Foi verificada correlação positiva, porém fraca e um bom índice de concordância entre o IRAR com a GGT urinária e a R-GGT/C urinária. Estes resultados sugerem que o aumento do IRAR em cães com LV, pode ser indicativo de lesões tubulares, ressaltando a importância da avaliação da enzimúria neste pacientes. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Morrow et al. (1996), que observaram maiores IRAR em cães com lesões tubulares e intersticiais.

Constatou-se correlação positiva e fraca entre IRAR com a creatinina e cistatina C, resultados diferentes dos encontrados por Rivers et al. (1997) que não identificaram correlação entre o IRAR e a creatinina em cães e gatos com lesão renal. No entanto, estes autores averiguaram o IRAR em animais com lesão renal aguda, já na presente pesquisa, estudou-se cães com LV, que comumente apresentam glomerulonefrites e frequentemente são apresentados a consulta clínica com doença renal crônica.

Não foram observadas correlações entre IRAR com a PAS, resultados semelhantes aos encontrados por Novellas et al. (2007), que também não encontraram correlações entre PAS e IRAR. Segundo Cortadellas et al. (2006) a hipertensão é mais prevalente nas enfermidades glomerulares do que em doenças túbulo intersticiais e, de acordo com Baneth et al. (2008), a glomerulonefrite é a lesão renal mais comum na LVC. Desta maneira, pode-se deduzir que o IRAR não é uma boa ferramenta para o diagnóstico precoce de nefropatias em cães com LV.

No presente estudo encontrou-se nos cães com LV uma correlação positiva e significativa entre a PAS e UP/C, estes resultados são semelhantes aos relatados por Braga et al. (2015), que também encontraram correlações positivas e significativas entre proteinúria e PAS em pacientes com LV, nesta pesquisa foi observado que todo cão com LV e com hipertensão arterial apresentou doença glomerular severa, constatado através da histopatologia.

Cortadellas et al. (2008) também ao estudar a HAS em cães com LV, encontraram correlações positivas entre a PAS e microalbuminúria, creatinina plasmática e UP/C. Os achados Braga et al. (2015), Cortadellas et al. (2008) e os desta pesquisa e demonstram a contribuição da HAS, para o declínio da função renal em cães com LV.

Ao avaliar o índice Kappa, foi encontrada uma baixa concordância entre a cistatina C e PAS, entre creatinina e PAS e entre UP/C e PAS, segundo IRIS (2015) os valores da UP/C e da PAS, não são dependentes entre si e também não estão condicionados aos estágios da doença renal crônica, corroborando com os resultados da presente pesquisa. Os achados deste estudo sugerem a avaliação da presença de HAS e de proteinúria, mesmo que o cães com LV não estejam azotêmicos.

No entanto, quando calculou-se o índice Kappa entre a R-GGT/C urinária e a GGT urinária com a UP/C, verificou-se boa concordância. De acordo com Lees et al. (2005) as células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais, reabsorvem as proteínas presentes no filtrado glomerular, porém quando presentes em quantidades excessivas acumulam-se nos lisossomas das células tubulares, culminando em ruptura das mesmas, justificando a boa concordância entre a proteinúria e enzimúria. Os resultados do presente estudo sugerem a verificação da existência de enzimúria, em cães com LV e proteinúricos.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, nas condições do presente estudo, permitem concluir que:

- A mensuração da cistatina C sérica não permite a identificação precoce da doença renal. Porém, quando os diferentes grupos foram comparados, verificou-se que a cistatina C pode ser útil quando se deseja monitorar a progressão da doença renal em cães com LV.
- A GGT urinária e a R-GGT/C urinária são mais precoces que os analitos tradicionais para a avaliação da presença de doença renal em cães com LV.
- A mensuração do IRAR não é capaz de detectar a presença de doença renal antes do aparecimento da proteinúria e azotemia em cães com LV.

8 REFERÊNCIAS

ABRANCHES, P.; SILVA-PEREIRA, M. C. D.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. M.; SANTOS-GOMES, G. M.; JANZ, J. G. Canine leishmaniasis: pathological and ecological factors influencing transmission of infection. **The Journal of parasitology**, p. 557-561, 1991.

ALMY, F. S.; CHRISTOPHER, M. M.; KING, D. P.; BROWN, S. A. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 16, n. 1, p. 45-51, 2002.

ANTOIGNONI, M. T.; SIEPI, D.; PORCIELLO, F.; FRUGANTI, G. Use of serum cystatin C determination as a marker of renal function in the dog. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 265–267, 2005.

ANTOIGNONI, M. T.; SIEPI, D.; PORCIELLO, F.; RUECA, F.; FRUGANTI, G. Serum cystatin-C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency. **Veterinary Research Communications**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 269-271, 2007.

ASSIS, M. M. Q. Valores da dopplerfluxometria renal em cães clinicamente saudáveis de distintas faixas etárias. 2012.

AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. D. A. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. **Instituto Mamirauá, Belém**, v. 364, 2007.

BANETH, G.; KOUTINAS, A. F.; SOLANO-GALLEGÓ, L.; BOURDEAU, P.; FERRER, L. Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding Zoonosis. part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324-330, 2008.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGÓ, L. Canine Leishmaniasis. In. GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. Philadelphia. Elsevier Saunders, 2012. p.735-748.

BANETH, G.; SOLANO-GALLEGÓ, L. Leishmaniasis. Greene CE, **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Missouri; Saunders Elsevier, p. 685-698, 2006.

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

BAXMANN, A. C.; AHMED, M. S.; MARQUES, N. C.; MENON, V. B., PEREIRA, A. B.; KIRSZTAJN, G. M.; HEILBERG, I. P. Influence of muscle mass and physical activity on serum and urinary creatinine and serum cystatin C. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 2, p. 348-354, 2008.

BIGÉ, N.; LÉVY, P. P.; CALLARD, P.; FAINTUCH, J. M.; CHIGOT, V.; JOUSSELIN, V.; BOFFA, J. J. I. Renal arterial resistive index is associated with severe histological changes and poor renal outcome during chronic kidney disease. **BMC nephrology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2012.

BOBEK, L. A.; LEVINE, M. J. Cystatin-inhibitors of cysteine proteinases. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 3, n. 4, p. 307-332, 1992.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania mechanisms of parasite control and evasion. **International journal for parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121-134, 1998.

BOHLE, A.; MACKENSEN-HAEN, S.; GISE, H. V. Significance of tubulointerstitial changes in the renal cortex for the excretory function and concentration ability of the kidney a morphometric contribution. **American journal of nephrology**, v.7, p.421-33, 1987.

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

BRAUN, J. P.; PERXACHS, A.; PE, D.; DE LA FARGE, F. Plasma cystatin C in the dog. Reference values and variations with renal failure. **Comparative Clinical Pathology**, v. 11, n. 1, p. 44-49, 2002.

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

BUENO R. **Estudo do gene *NRAMP1* canino em macrófagos infectados com *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2006. 105p. Tese (Doutorado em Ciência veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte (MG).

CAMARGO, E. G. **Estimativa da taxa de filtração glomerular com equações baseadas na creatinina e cistatina C séricas em pacientes com diabetes melito tipo 2**. 2011. 90 p. Tese (Doutorado em Endocrinologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CAMINHA, A. E. Q.; SOTO-BLANCO, B. Aspectos clínicos da leishmaniose visceral canina na cidade de Fortaleza, CE. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 3, p. 218-222, 2008.

CAMPILLO, M. C.; VAZQUEZ, F. A. R.; FERNANDEZ, A. R. M.; ACEDO, M. C. S.; RODRIGUEZ, S. H.; LOPEZ-COZAR, I. N.; BAÑOS, P. D.; ROMEROM H. Q.; VARELA, M. C. **Parasitologia Veterinária**. 1ª ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana, 1999, p. 651-665.

CARVALHO, C.F. **Ultrassonografia Doppler em pequenos animais**. 1ed. São Paulo: Rocca, 2009, 288p.

CASTRO, I. P.; DE SOUSA, M. V. C.; MAGALHÃES, G. M.; MUNDIM, A. V.; NOLETO, P. G.; DE PAULA, M. B. C.; MEDEIROS, A. A. Perfil hepático e protéico em cães com leishmaniose visceral. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 5, 2012.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e do gato**. 2. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. 524p.

CIARAMELLA, P.; CORONA, M. Canine leishmaniasis. Clinical and diagnostic aspects. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian-North American Edition**, v. 25, n. 5, p. 358-369, 2003.

CLEMO, F. A. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. **Toxicologic Pathology**, Philadelphia, v. 26, n. 1, p. 29-32, 1998.

CORTADELLAS, O.; PALACIO, M. J. F.; BAYÓN, A.; ALBERT, A., TALAVERA, J. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis. Prevalence and clinical consequences. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 20, n. 4, p. 941-947, 2006.

CORTADELLAS, O.; DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 22, n. 2, p. 293-300, 2008.

COSTA, F.A.; GOTO, H.; SALDANHA, L.C.; SILVA, S.M.; SINHORINI, I.L.; GUERRA, J.L. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Pathology**. v.40, p.677-684, 2003.

DA COSTA-VAL, A. P.; CAVALCANTI, R. R.; DE FIGUEIREDO GONTIJO, N.; MICHALICK, M. S. M.; ALEXANDER, B.; WILLIAMS, P., MELO, M. N. Canine visceral leishmaniasis relationships between clinical status, humoral immune response, haematology and *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* infectivity. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 3, p. 636-643, 2007.

DAHER, E. F.; ROCHA, N. A.; OLIVEIRA, M. J.; FRANCO, L. F.; OLIVEIRA, J. L.; JUNIOR, G. B. S.; LIBÓRIO, A. B. Renal function improvement with

pentavalent antimonial agents in patients with visceral leishmaniasis. **American journal of nephrology**, v. 33, n. 4, p. 332-336, 2011.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M. M.; AFSHAR, R. M.; KAMIABI, H.; URCHMORE, R.; HAGAN, P.; PHILLIPS, R. S. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*. A clinic pathological study in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p. 28-35, 2009.

DANIEL, J. P.; CHANTREL, F.; OFFNER, M.; MOULIN, B.; HANNEDOUCHE, T. Comparison of cystatin C, creatinine and creatinine clearance vs. GFR for detection of renal failure in renal transplant patients. **Renal failure**, v. 26, n. 3, p. 253-257, 2004.

DE SCHEPPER, J.; DE COCK, I.; CAPIAU, E. Urinary gamma-glutamyl transferase and the degree of renal dysfunction in 75 bitches with pyometra. **Research in veterinary science**, v. 46, n. 3, p. 396-400, 1989.

DHARNIDHARKA, V. R.; KWON, C.; STEVENS, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function a meta-analysis. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 40, n. 2, p. 221-226, 2002.

ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. **BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology**. British Small Animal Veterinary Association, 2007.

ELSHAFIE, A. I.; ELGHAZALI, G.; RÖNNELID, J.; VENGE, P. Cystatin c as a marker of immune complex-associated renal impairment in a Sudanese population with visceral leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 5, p. 864-868, 2006.

FANOS, V.; MUSSAP, M.; PLEBANI, M.; CATALDI, L. Cystatin C in paediatric nephrology. Present situation and prospects. **Minerva pediatrica**, v. 51, n. 5, p. 167-177, 1999.

FEITOSA, M. M.; IKEDA, F. A.; LUVIZOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, v.5, n.28, p.36-44, 2000.

FERRER, L. The pathology of canine leishmaniasis. In. **Proceedings of the Second International Canine Leishmaniasis Forum**, Seville, Spain. p. 21-24.2002.

FILLER, G.; BOKENKAMP, A.; HOFMANN, W.; LE, B. T.; MARTÍNEZ-BRÚ, C.; GRUGG, A. Cystatin C as a marker of GFR - history, indications, and future research. **Clinical Biochemistry**, Toronto, v. 38, n. 1, p. 1-8, 2005.

FINNEY, H.; BATES, C. J.; PRICE, C. P. Plasma cystatin C determinations in a healthy elderly population. **Archives of gerontology and geriatrics**, v. 29, n. 1, p. 75-94, 1999.

FREITAS, J. C. C.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; ABREU, C. R. A. Perfil sócio-econômico e conhecimento sobre leishmaniose visceral de proprietários de cães da cidade de Fortaleza, Ceará, Brasil. **Ciência Animal**, v. 21, n. 1, p. 17-24, 2011.

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

FRICKER, M.; WIESLI, P.; BRÄNDLE, M.; SCHWEGLER, B.; SCHMID, C.. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. **Kidney international**, v. 63, n. 5, p. 1944-1947, 2003.

GABRIEL, I. C.; NISHIDA, S. K.; KIRSZTAJN, G. M. Cistatina C sérica: uma alternativa prática para avaliação de função renal? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 261-267, 2011.

GARCÍA-MARTÍNEZ, J. D.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.; CALDIN, M.; CERON, J. J. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. **Research in Veterinary science**, v. 99, p. 204-207, 2015.

GOMES, L. **Nefrite intersticial na leishmaniose visceral**. 2007. 74p. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Teresina: Universidade Federal do Piauí.

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America*. **Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581-596, 2005.

GRECO, D. S.; TURNWALD, G. H.; ADAMS, R. Urinary gama-glutamyl-transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 11, n.46, p. 2.332-2.335, 1994.

HEIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. **Research in Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 129-137, 2001.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L.; LOCKSLEY, R. M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. 1, p. 59-72, 1989.

HENNEMANN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU W. KOMMERS, G. D.; POLYDORO, A. S.; LEITZKE, M. R. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos em cães. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 27, n. 2, p. 237-244, 1997.

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**, v. 210, p. 89-91, 2016.

IKEE, R.; KOBAYASHI, S.; HEMMI, N.; IMAKIIRE, T.; KIKUCHI, Y.; MORIYA, H.; MIURA, S. Correlation between the resistive index by Doppler ultrasound and kidney function and histology. **American journal of kidney diseases**, v. 46, n. 4, p. 603-609, 2005.

IKEDA F. A.; LUVIZOTTO M. C. R.; GONÇALVES M. E.; FEITOSA M. M.; CIARLINI P. C.; LIMA V. M. F. Perfil hematológico de cães naturalmente infectados por *Leishmania chagasi* no município de Araçatuba-SP. Um estudo retrospectivo de 191 casos. **Clínica Veterinária**, v. 47, p. 42-8, 2003.

IRIS Staging of CKD, 2015. Disponível em http://www.iriskidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml. Acesso em. 07 abr. 2016.

JENSEN, W. A.; GRAUER, G. F.; ANDREWS, J.; SIMPSON, D. F. Prevalence of microalbuminuria in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 300, 2001.

KHARAZMI, A.; KEMP, K.; ISMAIL, A.; GASIM, S.; GAAFAR, A.; KURTZHALS, J. A. L.; KEMP, M. T-cell response in human leishmaniasis. **Immunology letters**, v. 65, n. 1, p. 105-108, 1999.

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

KOUTINAS, A. F.; POLIZOPOULOU, Z. S.; SARIDOMICHELAKIS, M. N.; ARGYRIADIS, D.; FYTIANOU, A.; PLEVRAKI, K. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece a retrospective study of 158 cases (1989 – 1996). **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 35, p. 376-383, 1999.

LATERZA, O. F.; PRICE, C. P.; SCOTT, M. G. Cystatin C. An improved estimator of glomerular filtration rate? **Clinical Chemistry, Baltimore**, v. 48, n. 1, p. 699-707, 2002.

LEES, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; VADEN, S. L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). **Journal of veterinary internal medicine** 19.3 (2005): p. 377-385.

MANNA, L.; REALE, S.; VITALE, F.; GRAVINO, A. E. Evidence for a relationship between Leishmania load and clinical manifestations. **Research in veterinary science**, v. 87, n. 1, p. 76-78, 2009.

MARTINELLI, R.; LORENÇO, R.; ROCHA, H. Absence of clinical abnormalities suggesting renal involvement during the long-term course of visceral Leishmaniasis. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 19, n. 4, p. 209-212, 1986.

MARTINEZ, I.; MATTOON, J. S.; EATON, K. A.; CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P. Polypoid cystitis in 17 dogs (1978–2001). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 17, n. 4, p. 499-509, 2003.

MATTEUCCI, E.; GREGORI, G.; PELLEGRINI, L.; NAVALES, R.; GIAMPIETRO, O. Effects of storage time and temperature on urinary enzymes. **Clinical chemistry**, v. 37, n. 8, p. 1436-1441, 1991.

MAURICIO, I. L.; STOTHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of Leishmania chagasi. **Parasitology today**, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MELCHERT, A.; LAPOSY, C. B.; MOTTA, Y. P.; GARCI, A. C. F. Z. Gama glutamil transpeptidase urinária como indicador de insuficiência renal aguda induzida por gentamicina em cães. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 111-116, 2007.

MELO, M. B.; VEADO, J. C. C.; SILVA, E. F.; MOREIRA, S. M.; PASSOS, L. M. F. Dopplerfluxometria das artérias renais: valores normais das velocidades sistólicas e diastólicas e do índice resistivo nas artérias renais principais. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p.691-693, 2006.

MERIEN, F.; AMOURIAUX, P.; PEROLAT, P.; BARANTON, G.; SAINT GIRON, I. Polymerase chain reaction for detection of *Leptospira* spp. in clinical samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2219-2224, 1992.

MIMS, C. A.; NASH, A.; STEPHEN, J. **Mims' pathogenesis of infectious disease**. Gulf Professional Publishing, 2001..

MORROW, K. L.; SALMAN, M. D.; LAPPIN, M. R.; WRIGLEY, R. Comparison of the resistive index to clinical parameters in dogs with renal disease. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 37, n. 3, p. 193-199, 1996.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MURRAY, H. W.; LU, C. M.; MAUZE, S.; FREEMAN, S.; MOREIRA, A. L.; KAPLAN, G.; COFFMAN, R. L. Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. **Infection and immunity**, v. 70, n. 11, p. 6284-6293, 2002.

MUSSAP, M.; PLEBANI, M. Biochemistry and clinical role of human cystatin C. **Critical reviews in clinical laboratory sciences**, v. 41, n. 5-6, p. 467-550, 2004.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. 1084p

NOLI, C.; AUXILIA, S. T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis a systematic review. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NOVELLAS, R.; ESPADA, Y.; DE GOPEGUI, R. R. Doppler ultrasonographic estimation of renal and ocular resistive and pulsatility indices in normal dogs and cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 48, n. 1, p. 69-73, 2007.

NYLAND T. G.; MATTON J. S.; HERRSELL E. J.; WISNER E. R. Trato urinário. In. Nyland T G, Matton JS. **Ultrassom diagnóstico em pequenos animais**. 2 ed. São Paulo. Roca, 2005, p. 161-198.

NYLAND, T. G.; FISHER, P. E.; DOVERSPIKE, M.; HORNOF, W. J.; OLANDER, H. J. Diagnosis of urinary tract obstruction in dogs using duplex Doppler ultrasonography. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 34, n. 5, p. 348-352, 1993.

OLIVA, G.; SCALONE, A.; MANZILLO, V. F.; GRAMICCIA, M.; PAGANO, A.; DI MUCCIO, T.; GRADONI, L. Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1318-1322, 2006.

OKAY, T. S. Cistatina C. um novo marcador de função renal em crianças. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 2, p. 112-113, 2002.

PALACIO, J.; LISTE, F.; GASCON, M. Enzymuria as an index of renal damage in. **The Veterinary Record**, v. 140, p. 477-480, 1997.

PALUDO, G. R.; AQUINO, L. C.; LOPES, B.; SILVA, P.; BORGES, T. S.; DIAS, C. A.; CASTRO, M. B. Laboratory Findings In Canine Visceral Leishmaniasis In Brasília, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 4, p. 397, 2007.

PINELLE, E.; KILLICK-KENDRICK, R.; WAGENAAR, J.; BERNADINA, W.; DEL REAL, G.; RUITENBERG, J. Cellular and humoral responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 229-235, 1994.

PLATT, J. F.; ELLIS, J. H.; RUBIN, J. M.; DIPIETRO, M. A.; SEDMAN, A. B. Intrarenal arterial Doppler sonography in patients with nonobstructive renal disease: correlation of resistive index with biopsy findings. **AJR. American Journal of roentgenology**, v. 154, n. 6, p. 1223-1227, 1990.

POPPL, A. G.; GONZÁLES, F. H. D.; SILVA, S. C. Alterações clínico laboratoriais em transtornos renais de cães (*Canis familiaris*). **Medicina Veterinária Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Curitiba, v. 2, n. 6, p.92-98, 2004.

PRATES, A. B.; AMARAL, F. B.; VACARO, M. Z.; GROSS, J. L.; CAMARGO, J. L.; SILVEIRO, S. P. Avaliação da filtração glomerular através da medida da cistatina C sérica. **J Bras Nefrol**, v. 29, n. 1, p. 48-55, 2007.

PRATES, A. B. **Avaliação da medida da cistatina C e das equações do estudo MDRD para estimar a taxa de filtração glomerular em indivíduos normais**. 2005. 103p. Dissertação mestrado. Porto Alegre (RS): Programa de pós-graduação em ciências médicas: endocrinologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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 clinic pathological study of 26 cases. **Journal of Comparative Pathology**, v. 132, n. 2, p. 145-152, 2005.

RANDERS, E.; ERLANDSEN, E. J. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 37, n. 4, p. 389-395, 1999.

REIS, A. B.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; CARVALHO, M. G.; MAYRINK, W.; FRANÇA-SILVA, J. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Research in Veterinary Science**, v. 81, n. 1, p. 68-75, 2006.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. In: **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**. Guanabara Koogan, 2001.

RHEE, E. G.; MENDEZ, S.; SHAH, J. A.; WU, C. Y.; KIRMAN, J. R.; TURON, T. N.; SACKS, D. L. Vaccination with heat-killed *Leishmania* antigen or recombinant leishmanial protein and oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against *Leishmania* major infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 195, n. 12, p. 1565-1573, 2002.

RIVERS, B. J.; WALTER, P. A.; O'BRIEN, T. D.; KING, V. L.; POLZIN, D. J. Evaluation of urine gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio as a diagnostic tool in an experimental model of aminoglycoside-induced acute renal failure in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, n. 4, p. 323-336, 1995.

RIVERS, B. J.; WALTER, P. A.; POLZIN, D. J.; KING, V. L. Duplex Doppler estimation of Intrarenal Pourcelot resistive index in dogs and cats with renal disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, n. 4, p. 250-260, 1997.

ROYAKKERS, A. A.; KOREVAAR, J. C.; VAN SUIJLEN, J. D.; HOFSTRA, L. S.; KUIPER, M. A.; SPRONK, P. E.; BOUMAN, C. S. Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 3, p. 493-501, 2011.

RUDOLPH, W. G.; CORVALAN, E. O. Urinary and serum gamma glutamyl transpeptidase in relation to urinary pH and proteinuria in healthy thoroughbred horses in training. **Equine Veterinary Journal**, v. 24, n. 4, p. 316-317, 1992.

RULE, A. D.; BERGSTRALH, E. J.; SLEZAK, J. M.; BERGERT, J.; LARSON, T. S. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations. **Kidney international**, v. 69, n. 2, p. 399-405, 2006.

SANTA ROSA, I. C. A.; ALVES, P. A. B.; MODENA, C. M.; DIAS, C. M. Leishmaniose Visceral Americana uma Revisão e Nova Proposta de Abordagem. **Revista OIKOS**, v.10, n. 1, p. 71-88, 1997.

SANTIN, F.; AMARAL, A. S.; TAKAHI, R. K. Acompanhamento laboratorial da função renal de cães sadios tratados experimentalmente com doses terapêuticas de anfotericina B. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 6, p. 1816-1823, 2006.

SANTOS, R. V.; MERLINI, N. B.; SOUZA, L. P.; MACHADO, V.; DE FIGUEIREDO PANTOJA, J. C.; PRESTES, N. C. Ultrassonografia Doppler na avaliação renal de cadelas diagnosticadas com piometra antes e após tratamento com ovariossalpingohisterectomia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 635-642, 2013.

SANTOS-GOMES, G. M.; ROSA, R.; LEANDRO, C.; CORTES, S.; ROMÃO, P.; SILVEIRA, H. Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, n. 88: p. 21–30, 2002.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania* present and future trends and their implications. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Rev Trop Cienc Agr Biol**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SINAN/SES. Governo do Estado de Mato Grosso do Sul. Secretaria de Estado de Saúde. Coordenadoria Estadual de Vigilância Epidemiológica. Gerência Estadual de Zoonoses. **Informe Epidemiológico das Leishmanioses nº 1/2012**. Campo Grande, jul. 2012.

STAFFORD, J.; NEUMANN, N. F.; BELOSEVIC, M.. Macrophage-mediated innate host defense against protozoan parasites. **Critical reviews in microbiology**, v. 28, n. 3, p. 187-248, 2002.

STOBIE, L.; GURUNATHAN, S.; PRUSSIN, C.; SACKS, D. L.; GLAICHENHAUS, N.; WU, C. Y.; SEDER, R. A. The role of antigen and IL-12 in sustaining Th1 memory cells in vivo: IL-12 is required to maintain memory/effector Th1 cells sufficient to mediate protection to an infectious parasite challenge. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 15, p. 8427-8432, 2000.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. Fundamentos de patologia clínica veterinária. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2011, v. 8, p. 368-375.

UECHI, M.; NOGAMI, Y.; TERUI, H.; NAKAYAMA, T.; ISHIKAWA, R.; WAKAO, Y.; TAKAHASHI, M. Evaluation of urinary enzymes in dogs with early renal disorder. **The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 56, n. 3, p. 555-556, 1994.

WAKI, M. F.; RIBAS MARTORELLI, C.; ERDMANN MOSKO, P.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência rural**, v. 40, n. 10, 2010.

WEHNER, A.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGER, J. Utility of serum cystatin c as a clinical measure of renal function in dogs. **Journal of the american animal hospital association**, v. 44, n. 3, p. 131-138, 2008.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1852-1855, 1997.

WILLEMS, H. L.; HILBRANDS, L. B.; VAN DE CALSEYDE, J. F.; MONNENS, L. A.; SWINKELS, D. W. Is serum cystatin C the marker of choice to predict glomerular filtration rate in pediatric patients?. **Annals of clinical biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 60-64, 2003.