

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

**COMPORTAMENTO DE MARCADORES LABORATORIAIS DE
ENVOLVIMENTO RENAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA

CAMPO GRANDE, MS

2019

COMPORTAMENTO DE MARCADORES LABORATORIAIS DE ENVOLVIMENTO RENAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências
Veterinárias. Área de Concentração:
Clínica Médica, cirúrgica, anestesiologia e
diagnóstico de doenças em animais de
estimação e produção.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alda Izabel de
Souza

CAMPO GRANDE, MS

2019

GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA

**COMPORTAMENTO DE MARCADORES LABORATORIAIS
DE ENVOLVIMENTO RENAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL
CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Clínica Médica, cirúrgica, anestesiologia e diagnóstico de doenças em animais de estimação e produção.

Campo Grande, 22 de janeiro de 2019

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Alda Izabel de Souza
(Presidente)

Dr^a. Kelly Cristina da Silva Godoy

Dr. Fabiano de Oliveira Frazillio

Dedico este trabalho à minha mãe Maria
Aparecida Ortiz de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Professora Alda Izabel de Souza pela paciência, orientação e ensinamentos na minha vida profissional e pessoal.

Agradeço aos amigos e colegas de laboratório Marcel, Murilo, Polyana, Andressa, Alexandre, Tamires, Cauê, Mikaelle, Camila, Renata, Simone, Bruna, Franciela e Sandro por todo apoio.

Agradeço à Kelly Cristina da Silva Godoy pela ajuda e aconselhamento sempre que necessário.

Agradeço ao Professor Fabiano de Oliveira Frazilio pelas discussões científicas e ensinamentos.

Agradeço aos amigos Silvana, Simone, Polliana Franco e Marcelo pela presença, confiança, amizade e companheirismo.

Agradeço aos meus familiares pelo apoio, confiança e companheirismo durante minha vida acadêmica.

Enfim, agradeço a todos que colaboraram para que este trabalho fosse concluído.

SUMÁRIO

Resumo.....	VII
<i>Abstract</i>.....	VIII
1.Capítulo I.....	09
1.1.Introdução.....	09
1.2.Objetivos.....	13
1.2.1.Objetivo geral	13
1.2.2.Objetivos específicos.....	13
1.3.Referências bibliográficas.....	13
2.Capítulo II.....	16
2.Artigo “Cálcio, fósforo e paratormônio em cães com leishmaniose visceral”.....	17
3.Capítulo III.....	24
3.Artigo “A densidade urinária como indicador para determinação da relação gama-glutamil transpeptidase urinária: creatinina urinária em cães com leishmaniose visceral”.....	25

Oliveira, G.G. comportamento DE MARCADORES LABORATORIAIS DE ENVOLVIMENTO RENAL NA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA. 2019. Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal Do Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. 2019.

Resumo: A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica no Brasil afetando drasticamente a população de cães do país. A doença renal crônica (DRC) é uma complicação frequente em cães acometidos pela LV influenciando de forma negativa a qualidade de vida e a sobrevida desses pacientes. Portanto, o uso de biomarcadores para o diagnóstico e avaliação da progressão da DRC se faz importante nesse grupo de animais, uma vez que a intervenção precoce é essencial para o controle e tratamento da DRC e da LV. Além da DRC os cães com LV apresentam diversos distúrbios inflamatórios como dermatites, pododermatites, blefarites, uveítes, vasculites, hepatites, glomerulonefrites e poliartrites que resultam em modificações no metabolismo do animal. Desse modo o comportamento de vários marcadores de função e lesão renal podem sofrer alterações devido ao processo inflamatório exagerado nesses pacientes. Os artigos desenvolvidos nesta dissertação possuem o objetivo de avaliar o comportamento de biomarcadores de lesão glomerulares, como a enzima Gama Glutamil transferase urinária, além de marcadores de desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal, como as concentrações de paratormônio, fósforo e cálcio ionizado em cães com LV.

Palavras-chave: Doença renal crônica, GGT, Hiperparatireoidismo secundário renal, lesão tubular, *Leishmania* sp.

Oliveira, G.G. BEHAVIOR OF LABORATORY MARKERS OF RENAL INVOLVEMENT IN LEISHMANIOSIS VISCERAL CANINA. 2019. Mestrado. Programa De Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso Do Sul, Campo Grande, Mato Grosso Do Sul. 2019.

Abstract: Visceral leishmaniasis (VL) is an endemic disease in Brazil, affecting drastically the country's population of dogs. Chronic kidney disease (CKD) is a frequent complication in dogs affected by VL, negatively influencing the quality of life and survival of these patients. Therefore, the use of biomarkers for the diagnosis and evaluation of the progression of CKD is important in this group of animals, since early intervention is essential for the control and treatment of CKD and VL. In addition to DRC, dogs with VL have several inflammatory disorders such as dermatitis, pododermatitis, blepharitis, uveitis, vasculitis, hepatitis, glomerulonephritis and polyarthritis that result in changes in the animal's metabolism. Thus, the behavior of several markers of renal function and injury may be altered due to the exaggerated inflammatory process in these patients. The articles developed in this dissertation aim to evaluate the behavior of biomarkers of injury and renal function, such as the enzyme Gamma Glutamyl Transferase urine, as well as developmental markers of secondary renal hyperparathyroidism, such as parathyroid hormone, phosphorus and ionized calcium in dogs with LV.

Key words: Chronic kidney disease, GGT, Secondary renal hyperparathyroidism, tubular lesion, *Leishmania* sp.

1.CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) ocorre com frequência em cães com leishmaniose visceral (LV), pois imunocomplexos se depositam no glomérulo causando infiltrado inflamatório, crescimento da matriz mesangial e, posteriormente, fibrose (SOARES et al., 2005; SOLANO-GALLEGO et al., 2011). Além das complicações comuns aos casos de DRC espontâneas, os pacientes com LV ainda padecem de diversos outros sinais clínicos e laboratoriais em virtude do processo inflamatório exacerbado (GREENE, 2012).

Marcadores da evolução da doença renal são importantes para monitorar e ajustar o tratamento dos pacientes, uma vez que a DRC é progressiva e irreversível (CHEW et al., 2011; RIELLA, 2014). Além da creatinina sérica e densidade urinária vários outros analitos como proteína urinária, fósforo sérico, paratormônio (PTH), fator de crescimento de fibroblastos - 23 (FGF-23), calcitriol, gama-glutamil transpeptidase urinária e cistatina C sérica são estudados como biomarcadores da DRC (CORTADELLAS et al., 2010; GALVÃO et al., 2013; GEDDES et al., 2015; IBBA et al., 2016; IRIS, 2017; FRAZILIO et al., 2018).

O hiperparatireoidismo secundário (HPs) ocorre com frequência na (DRC) e está relacionado com aumento da mortalidade nesse grupo de pacientes (KESTENBAUM et al., 2005; LEVIN et al., 2007; HAGSTRÖM et al., 2009; CORTADELLAS et al., 2010; GEDDES et al., 2015). O HPs resulta em distúrbios no metabolismo dos minerais cálcio e fósforo, com desregulação dos hormônios envolvidos na homeostasia do sistema. Essas alterações ocorrem na DRC, pois os rins exercem grande importância na excreção desses minerais, além de produzir alguns de seus hormônios regulatórios (RIELLA, 2014).

O controle do cálcio e fósforo séricos é de extrema importância uma vez que esses elementos participam de funções nobres no organismo como: sinalização celular e componentes de membranas, transmissão de impulsos nervoso, transporte energético, controle de mineralização óssea, participação no sistema de coagulação, na contração muscular, no controle ácido-base, na contração cardíaca e no controle de produção de diversos hormônios (STILLION e RITT, 2009; CHEW et al., 2011; GOLF, 2011; RIELLA, 2014).

Paratormônio (PTH), Calcitriol (Vitamina D ativada) e Calcitonina são três hormônios tradicionalmente conhecidos como responsáveis pelo controle do cálcio e fósforo no organismo (STILLION e RITT, 2009; CHEW et al., 2011).

O PTH é produzido nas glândulas paratireoides em resposta a diminuição do cálcio ionizado (Ca_i) na corrente sanguínea. Receptores localizados nas células principais da glândula paratireoide são sensíveis a variações mínimas de Ca_i e liberam o PTH no sangue de forma ágil, controlando em tempo real o Ca_i sérico (STILLION e RITT, 2009; GOLF, 2011).

A ação imediata do PTH age nos rins aumentando a reabsorção de cálcio e diminuindo a de fósforo (Fig. 1). Logo o Ca_i sofre um leve aumento, pois a quantidade de cálcio excretada pelos rins em estado de normalidade é baixa e o fósforo sérico diminui em virtude da perda pela urina. Nos casos de persistência da insuficiência de Ca_i , o PTH age estimulando a absorção intestinal de cálcio por meio da ação do calcitriol e aumentando a reabsorção de cálcio e fósforo nos ossos por meio da ativação dos osteoclastos (Fig. 1) (GOLF, 2011). Dessa maneira o PTH exerce forte influência nos níveis séricos de Ca_i , sendo o principal hormônio para correção de hipocalcemia.

O calcitriol, outro importante hormônio envolvido no metabolismo do Ca e fósforo, é formado nas células do túbulo proximal renal. Após ser filtrada pelo glomérulo a 25-hidroxivitamina D, com origem hepática, é capturada e convertida em calcitriol por ação da enzima 1 α -hidroxilase nas células do túbulo proximal e reabsorvida para a circulação. A ação da 1 α -hidroxilase é estimulada pela ação do PTH. O calcitriol age no intestino aumentando a absorção de cálcio e fósforo dietético (Fig. 1). Além disso, o calcitriol exerce função de *feedback* negativo com a geração de PTH e com sua própria produção, evitando assim hipercalcemia (RIELLA, 2014).

A calcitonina é produzida na glândula tireoide pelas células C em resposta a hipercalcemia e atua diminuindo a reabsorção óssea de cálcio e fósforo, por inibição da ação dos osteoclastos e estímulo de deposição mineral por meio da ação de osteoblastos. Sua atividade é importante em condições de crescimento corporal e lactação (STILLION e RITT, 2009; GOLF, 2011).

Embora o controle do cálcio sérico tenha sido sempre bem explicado pela ação desses hormônios, o controle do fósforo era pouco conhecido. No início deste século foi descoberto um novo hormônio o FGF-23 que atua principalmente no

controle da hiperfosfatemia. O FGF-23 é produzido nos osteócitos em resposta à elevação sérica de fósforo. Sua ação principal é diminuir a reabsorção renal de fósforo, aumentando assim a fração excretada desse elemento na urina. Além disso, o FGF-23 atua inibindo a 1 α -hidroxilase e a liberação de PTH pela glândula paratireoide (Fig. 1) (RIELLA, 2014).

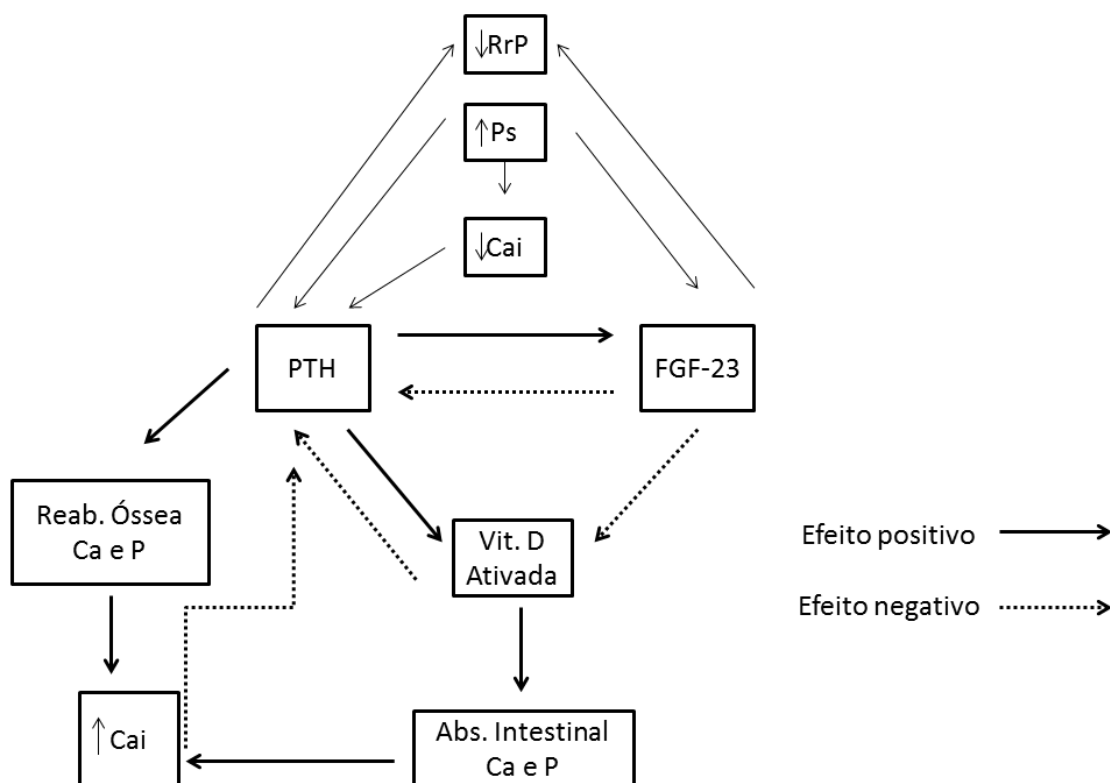


Figura 1- Metabolismo do Cálcio e fósforo e de seus principais hormônios reguladores. RrP- reabsorção renal de fósforo; Reab. – Reabsorção; Abs. – Absorção; Vti. D ativada- Vitamina D ativada ou Calcitriol, Cai – cálcio ionizado, Ps – fósforo sérico; PTH- paratormônio; FGF-23 – Fator de crescimento de fibroblastos -23.

A partir da descoberta do FGF-23 muitas lacunas na fisiologia do metabolismo do cálcio e fósforo foram preenchidas. A patogênese de diversas enfermidades, como o hiperparatireoidismo secundário, TIO (Tumor- Induced osteomalacia) e o raquitismo hereditário autossômico dominante (ADHR), foram desvendadas e novas possibilidades de terapêutica desenvolvidas (NAGARO et al., 2006; BEENKEN e MOHAMMADI, 2009; AONO et al., 2009).

Com a descoberta do FGF-23, a patogênese da HPs está melhor estabelecida. A massa renal diminui com o desenvolvimento da DRC e o fósforo sérico se eleva devido à diminuição da excreção renal. A hiperfosfatemia, por sua vez, estimula a produção de FGF-23 que atua diminuindo a produção de calcitriol

87 e aumentando a excreção do fósforo por via renal. A hiperfosfatemia também eleva
88 a produção de PTH pelas glândulas paratireoides. O PTH possui *feedback* positivo
89 com o FGF-23, sendo um importante fator para a elevação desse hormônio no HPs.
90 A diminuição do calcitriol faz com que não ocorra o efeito de *feedback* negativo com
91 o PTH que permanece aumentado. O efeito inibitório que o FGF-23 possui sobre
92 PTH é diminuído na DRC. Isso ocorre, possivelmente, por disfunção do receptor 1
93 *Klotho- fibroblast growth factor* nestes pacientes. Desta forma o PTH permanece
94 elevado juntamente com o FGF-23 levando a complicações ao organismo
95 (NAGANO et al., 2006; BEENKEN e MOHAMMADI, 2009; WOLF, 2010; SILVER e
96 NAVEH-MANY, 2013; RIELLA, 2014).

97 Recentemente diversos estudos apontam possível envolvimento da
98 inflamação no desenvolvimento do HPs em pacientes com DRC (DAVID et al.,
99 2015; KANBAY et al., 2016). Sendo assim, novas pesquisas com o foco em
100 doenças inflamatórias concomitantes a DRC devem ser realizados a fim de
101 encontrar novos alvos terapêuticos.

102 A proteinúria é outro transtorno frequente nos pacientes com LV e DRC
103 (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; IRIS, 2017). Essa proteinúria pode ser originada
104 nos glomérulos, nos túbulos contorcidos proximais dos néfrons ou de ambos. A
105 diferenciação da origem da proteinúria pode indicar a evolução da DRC e auxiliar
106 na escolha terapêutica (IBBA et al., 2016).

107 Contudo, a eletroforese, um exame laboratorial utilizado como padrão ouro
108 para identificar a origem da proteinúria (IBBA et al., 2016), não está disponível para
109 rotina clínica na maioria dos centros veterinários. Com isso a busca por outros
110 métodos de identificação da origem da proteinúria e a identificação de populações
111 de risco se torna importante.

112 A enzima Gama Glutamil transferase (GGT) possui a função de manter a
113 homeostase da glutathione, um antioxidante celular, no meio intracelular
114 (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Embora produzida em vários tecidos, é mais
115 abundante nos canalículos biliares, túbulo contorcido proximal dos néfrons e
116 endotélio dos capilares do sistema nervoso (HANIGAN e FRIERSON, 1996).

117 A GGT produzida nos túbulos contorcidos proximais é secretada para o
118 lúmen dos néfrons e então eliminada na urina. A GGT produzida por outros tecidos
119 do organismo não ultrapassa a barreira de filtração glomerular, logo a concentração
120 urinária de GGT reflete a produção apenas do túbulo proximal. Esse fato

possibilitou o uso da GGT urinária como marcador de lesão tubular em diferentes espécies (DIERICKX, 1981; HENNEMANN et al., 1997; LOR et al., 2013).

Além de reconhecida como um bom biomarcador de lesão tubular aguda (KOVARIKOVA, 2015), Ibba et al. (2016) relataram a possibilidade de utilizar a razão GGT urinária: creatinina urinária na identificação da origem da proteinúria em cães com LV, porém ainda existe escassez de informações sobre o comportamento da GGT urinária em cães com LV.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Caracterizar o comportamento dos marcadores laboratoriais de envolvimento renal na leishmaniose visceral canina.

1.2.2. Objetivos Específicos

1. Determinar o comportamento do PTH em cães com LV azotêmicos e não azotêmicos.
2. Avaliar o comportamento do cálcio ionizado em cães com LV azotêmicos e não azotêmicos.
3. Caracterizar o comportamento do fósforo em cães LV azotêmicos e não azotêmicos.
4. Avaliar a importância de realizar a mensuração da GGT urinária/Creatinina urinária (GGTu/Cru) em cães com LV, usando como indicador a determinação da densidade urinária.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AONO, Y.; YAMAZAKI, Y.; YASUTAKE, J.; KAWATA, T.; HASEGAWA, H.; URAKAWA, I. Therapeutic Effects of Anti-FGF23 Antibodies in Hypophosphatemic Rickets/Osteomalacia. **Journal of bone and mineral research**, v. 24, n. 11, p. 1879-1888, 2009.

BEENKEN, A.; MOHAMMADI, M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. **Nature Reviews drug discovery**, v. 8, p. 235-253, 2009.

CHEW, D.J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P.A. **Urologia e Nefrologia do cão e do gato**. 2 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p.554.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Calcium and Phosphorus Homeostasis in Dogs with Spontaneous Chronic

155 Kidney Disease at Different Stages of Severity. **Journal of Veterinary Internal**
156 **Medicine**, v. 24, p. 24-73, 2010.

157 DAVID, V.; MARTIN, A.; ISAKOVA, T. et al. Inflammation and functional iron
158 deficiency regulate fibroblast growth factor 23 production. **Kidney International**,
159 v.89, n.1, p.135-146, 2016.

160 DIERICKX, P.J. Urinary Gamma-Glutamyl Transferase as an Indicator of Acute
161 Nephrotoxicity in Rats. **Archives of Toxicology**. v.47, p.209-215, 1981.

162 FRAZILIO, F.O; BORGES, F.A.; SOUZA, A.I. et al. Biomarkers and renal arterial
163 resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasitology**
164 **Research**, v.117, p.3399-3045, 2018.

165 GALVÃO, J.F.B.; NAGODE, L.A.; SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Calcitriol, calcidiol,
166 parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney
167 disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.23, n.3, p.134-
168 162, 2013.

169 GEDDES, R. F.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. Relationship between Plasma Fibroblast
170 Growth Factor-23 Concentration and Survival Time in Cats with Chronic Kidney
171 Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 1494-1501, 2015.

172 GOLF, J. P. Minerais. In: **Dukes' fisiologia dos animais domésticos**. Reece, W.
173 O. 12 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 532-555, 2012.

174 GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the dog and cat**. 4 ed. St. Louis : Elsevier,
175 2012, p.1354.

176 HAGSTRÖM, E.; HELLMAN, P.; LARSSON, T. E.; INGELSSON, E.; BERGLUND,
177 L.; SUNDSTRÖM, J.; MELHUS, H.; HELD, C.; LIND, L.; MICHAËLSSON, K.;
178 ÄRNLÖV, J. Plasma Parathyroid Hormone and the Risk of Cardiovascular Mortality
179 in the Community. **Circulation**, 2009. Disponível em :< <http://circ.ahajournals.org>>
180 acesso em agot de 2017.

181 HANIGAN, M.H.; FRIERSON, H.F.J.R. Immunohistochemical detection of gamma-
182 glutamyl transpeptidase in normal human tissue. **J. Histochem Cytochem**, v. 44,
183 N. 10, 1996.

184 HENNEMANN, C.R.A; SILVA, C.F; SCHOENAU, E.; et al. Atividade da gama
185 glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de uréia e creatinina como meios
186 diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeo em cães.
187 **Ciência rural**, V. 27, N.2, p.237-244, 1997.

188 IBBA, F.; MANGIAGALLI, G.; PALTRINIERE, S. Urinary gamma-glutamyl
189 transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine
190 leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference
191 metho. **The Veterinary Journal**, v. 210, p.89-91, 2016.

192 INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). 2017. Disponível em:
193 <<http://www.iris-kidney.com/>>. Acesso em: 13 set 2018.

194 KANBAY, M.; VERVLOET, M.; COZZOLINO, M. et al. Novel faces of Growth Factor
195 23 (FGF23): Iron deficiency, Inflammation, Insulin Resistance, Left Ventricular
196 Hypertrophy, Proteinuria and Acute Injury. **Calcified Tissue International**, v.100,
197 p.217-228, 2017.

KESTENBAUM, B.; SAMPSON, J. N.; RUDSER, K. D.; PATTERSON, D. J.; SELIGER, S. L.; YOUNG, B.; SHERRARD, D. J.; ANDRESS, D. L. Serum Phosphate Levels and Mortality Risk among People with Chronic Kidney Disease. **American Society of Nephrology**, v. 16, p. 520-528, 2005.

KOVARIKOVA, S. Urinary Biomarkers of Renal Function In Dogs And Cats: a review. **Veterinarni Medicina**, v.60, n.11, p.589-602, 2015.

LEVIN, A.; G.L BAKRIS, G.L.; MOLITCH, M; SMULDERS, M.; TIAN, J.; WILLIAMS, L. A.; ANDRESS, D.L. Prevalence of abnormal serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease: Results of the study to evaluate early kidney disease. **Kidney International**, v. 71, p. 31-38, 20.

NAGANO, N; MIYATA, S.; ABE, M.; KOBAYASHI, N.; WAKITA, S.; YAMASHITA, T.; WADA, M. Effect of manipulating serum phosphorus with phosphate binder on circulating PTH and FGF23 in renal failure rats. **Kidney International**, v. 69, p. 531-537, 2006.

RIELLA, M. C. **Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos**. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014, p.1247.

SILVER, J; NAVEH-MAN, T. FGF-23 and secondary hyperparathyroidism in chronic kidney disease. **Nature reviews Nephology**, v. 9, p.641-649, 2013.

STILLION, J. R.; RITT, G. Renal Secondary Hyperparathyroidism in Dogs. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian.**, v. 31, n. 6: E8. 2009. Disponível em: http://vetfolio-vetstreet.s3.amazonaws.com/mmah/79/c1332da0b74423883f86f1d932c022/filePV0709_Stillion_0.pdf. Acesso em 26 de maio de 2017.

SOARES, M.J.V.; MORAES, J.R.E.; PALMEIRA BORGES, V. et al. Renal Involvement in Visceral Leishmaniasis Dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical**, v.11, n.4, p.579-593, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A.; CARDOSO, L.; PENNISI, M. G.; FERRER, L.; BOURDEAU, P.; OLIVA, G.; BANETH, G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. **Parasites & Vectors**, v. 86, n. 4, 2011.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011, p.760.

WOLF, M. Forging Forward with 10 Burning Questions on FGF23 in Kidney Disease. **Journals of the American Society of Nephrology**, v. 21, p.1427–1435, 2010.

2. CAPÍTULO II

Artigo a ser enviado para a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – A2

**CÁLCIO, FÓSFORO E PARATORMÔNIO EM CÃES COM
LEISHMANIOSE VISCERAL**

**CALCIUM, PHOSPHORUS AND PARATORMONE IN DOGS WITH
VISCERAL LEISHMANIOSIS**

Gustavo Gomes de Oliveira¹, Alda Izabel de Souza²

¹Discente do Programa de Pós-graduação Ciências Veterinária, FAMEZ/UFMS.

²Docente FAMEZ/UFMS

Resumo: Recentemente foi observado que a inflamação pode estimular o surgimento do hiperparatireoidismo na doença renal crônica (DRC). Na leishmaniose visceral (LV) essa associação ainda não foi bem caracterizada, embora o processo inflamatório seja exacerbado e a DRC muito frequente. Logo, o objetivo com esse trabalho foi verificar o comportamento do fósforo, cálcio ionizado (Ca_i) e paratormônio (PTH) em cães com LV. Um total de 38 cães participaram do estudo, sendo 31 animais doentes e 7 animais saudáveis utilizados como grupo controle (GC). Os animais doentes foram classificados em grupo azotêmico (GA, $n=7$) e não azotêmico (GNA, $n=24$). Os níveis séricos de fósforo e Ca_i e plasmáticos de PTH foram mensurados e comparados entre os grupos. O teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 0,05 seguido do teste Mann-Whitney, como *post hoc* teste para comparação dois a dois com nível de significância de 0,016 foram utilizados. Os níveis de fósforos foram maiores no GA, enquanto que o Ca_i não apresentou diferença entre os grupos. Já para o PTH os GNA e GA demonstraram valores elevados em comparação ao GC. Cães com LV possuem níveis elevados de PTH e hiperfosfatemia mesmo sem presença de azotemia.

Palavras-chave: PTH, metabolismo ósseo, hiperparatireoidismo secundário renal

Abstract: It has recently been observed that inflammation may stimulate the onset of hyperparathyroidism in chronic kidney disease (CKD). In visceral leishmaniasis (VL) this association has not yet been well characterized, although the inflammatory process is exacerbated and CKD is very frequent. Therefore, the objective of this work was to verify the behavior of phosphorus, ionized calcium (Ca_i) and parathyroid hormone (PTH) in dogs with VL. A total of 38 dogs participated in the study, with 31 diseased animals and 7 healthy animals used as control group (CG). The diseased animals were classified as azotemic (GA, $n=7$) and non-azotemic (GNA, $n=24$). Serum levels of phosphorus and Ca_i and plasmatic PTH were measured and compared between groups. The Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05 followed by the Mann-Whitney test as a post hoc test for a two-to-two comparison with a significance level of 0.016 were used. The levels of phosphorus were higher in GA, whereas Ca_i did not present differences between groups. For PTH, the GNA and GA showed high values in comparison to the CG. Dogs with VL have high levels of PTH and hyperphosphatemia even without the presence of azotemia

Key words: PTH, bone metabolism, secondary renal hyperparathyroidism

Introdução

Graves consequências do hiperparatireoidismo secundário à doença renal crônica (DRC) ocorrem em pacientes nos estágios avançados da insuficiência renal. Hiperfosfatemia, calcificação de tecidos moles, dilatação de ventrículo esquerdo, anemia

arregenerativa, intensificação de processos inflamatórios, progressão da DRC e aumento de mortalidade já foram descritos (Bro e Olgaard, 1997; Martin e Gonzáles, 2007; Cunningham *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2013; Riella, 2014). Contudo, alterações nos níveis séricos de paratormônio (PTH), FGF-23 (*fibroblast growth factor* – 23) e calcitriol foram observados em pacientes com DRC leve e moderada indicando que atenção nas variações no metabolismo desses hormônios e dos minerais, cálcio e fósforo, deve ocorrer em todos os estágios da doença renal (Levin *et al.*, 2007; Cortadellas *et al.*, 2009; Cortadellas *et al.*, 2010).

A Leishmaniose visceral (LV) canina é uma enfermidade que provoca processo inflamatório crônico com desenvolvimento de DRC como consequência de deposição de imunocomplexos no tecido renal (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Greene, 2014). Cortadellas *et al.* (2009) encontram cães com LV azotêmicos e não azotêmicos apresentando hiperfosfatemia e demonstraram que alterações no metabolismo desse mineral ocorre já no estabelecimento da doença, porém os hormônios envolvidos no metabolismo desse elemento não foram avaliados.

Além disso, David *et al.* (2016) observaram que processos inflamatórios podem aumentar os níveis plasmáticos de FGF-23, principalmente, em indivíduos com DRC, que dispõem de menos tecido renal, responsável pelo catabolismo desse hormônio (Kanbay *et al.*, 2017). O excesso de FGF-23 inibe o calcitriol que possui papel importante no *feedback* negativo do PTH (Cunningham *et al.*, 2011; Galvão *et al.*, 2013), o que aponta para possíveis elevações nos níveis de PTH, mesmo em estágios iniciais da DRC.

Baseado nesses achados e considerando que a LVC provoca intenso processo inflamatório e DRC, o objetivo com este estudo foi verificar o comportamento do fósforo, cálcio ionizado (Ca_i) e PTH em cães com LV azotêmicos e não azotêmicos.

Materiais e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMS) com o processo de número 897/2017.

A amostragem por conveniência totalizou a inclusão de 31 cães de ambos os sexos, com exame parasitológico para *Leishmania* sp. positivo, idade mínima de sete meses, sem histórico de tratamento prévio e livres de alterações clínicas e laboratoriais não tradicionalmente relacionadas à leishmaniose. O grupo controle (GC) foi formado por 7 cães

sem alterações clínicas e teste imunocromatografico para LV (Teste DPP® leishmaniose canina, Brasil) negativo.

Amostras de sangue e urina foram coletadas de todos os animais. As alíquotas de sangue serviram para a realização de hemograma, mensurações séricas de creatinina, fósforo, cálcio ionizado (Ca_i) e plasmáticas de paratormônio (PTH). As amostras de urina obtidas por cistocentese foram submetidas aos exames de urinálise e determinação da relação proteína: creatinina urinaria (UP/C). As coletas foram realizadas apenas no período da tarde para evitar alterações hormonais decorrentes as variações circadianas.

O hemograma e a urinálise foram realizados imediatamente após a coleta. Para as dosagens bioquímicas e hormonais as amostras de soro e plasma foram separadas, em até 30 mim, e congeladas a -80 °C até o processamento.

Os exames bioquímicos de rotina foram realizados em aparelho automatizado COBAS C111®, a proteína urinaria em aparelho semiautomático Bioplus® com kit comercial. O cálcio ionizado sérico foi obtido por método de eletrodo seletivo (COBAS 221®). A avaliação do PTH foi realizada pelo aparelho COBAS e411® com kits específicos humanos, já validados para cães por outros autores (Cortadellas *et al.*, 2010; Harjes *et al.*, 2017).

Os animais positivos para leishmaniose foram classificados em dois grupos: grupo com DRC não azotêmicos (GNA) e grupo com DRC e azotêmicos (GA). O estabelecimento da DRC foi baseado na presença de proteinúria e densidade urinaria inapropriada, enquanto que a azotemia foi definida como concentrações de creatinina sérica superiores a 1,4 mg/dL seguindo as recomendações da IRIS (2017).

Os analitos séricos e o PTH foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 0,05. O teste Mann-Whitney foi empregado como *post hoc* teste para comparação dois a dois. A fim de controlar o erro tipo I, o nível de significância utilizado no teste de Mann-Whitney foi 0,016 (0,05/3 – número de comparações dois a dois realizadas). Todos os testes estatísticos foram calculados de acordo com o descrito por Zar (1999).

Resultado e Discussão

Dos 38 cães que participaram do estudo, 21 eram machos e 17 fêmeas. A mediana da idade foi de 36 meses (mínimo de sete e máximo de 120 meses). O GNA e GA foram compostos por 24 e 7 animais, respectivamente. Na tabela 1 são apresentadas as comparações entre os grupos para os analitos séricos creatinina, fósforo e Cai e a concentração plasmática de PTH.

Tabela 1- Mediana, amplitude e diferença estatística entre cães negativos para leishmaniose visceral e cães positivos azotêmicos e não azotêmicos de diferentes analitos séricos e paratormônio plasmático.

	GC (med-amp) n=7	GNA (med-amp) n=24	GA (med-amp) n=7
Creatinina mg/dL	0,8-0,8 ^A	0,6-1,2 ^A	5,05-10,3 ^B
Fósforo mg/dL	4,04-1,58 ^A	4,52-4,95 ^A	15,7-31,9 ^B
Ca _i mmol/L	1,19-0,17 ^A	1,23-0,71 ^A	1,12-0,78 ^A
PTH pg/mL	7,71-68,98 ^A	256,55-421,8 ^B	402,4-342 ^B

GC- Grupo controle, GNA- Grupo não azotêmico, GA- Grupo azotêmico, med – mediana, amp – amplitude, PTH – Paratormônio. Diferenças entre letras na mesma linha mostra diferença estatística no teste de Mann-Whitney (p< 0,016), após teste de Kruskal – Wallis significativo (p<0,05).

A creatinina sérica não apresentou diferença significativa entre o GC e GNA (Teste de Mann-Whitney com p= 0,058). Contudo é possível notar uma diminuição numérica na mediana da creatinina sérica no GNA. Essa diminuição discreta na creatinina sérica em estágios iniciais da doença renal crônica em cães com LV também já foi observada por Cortadellas *et al.* (2008). A diminuição ou manutenção da creatinina sérica, em cães com LV em estágios iniciais ocorre devido a diminuição da massa muscular presente na maioria dos pacientes com LV, além de hiperfiltração compensatória nos néfrons remanescentes (Chew *et al.*, 2011; Riella, 2014).

Os resultados encontrados no presente trabalho corroboram os achados de Cortadellas *et al.* (2009) que encontraram diferença estatística significativa entre a concentração de fósforo sérica de cães com LV azotêmicos e não azotêmicos (tabela 1), entretanto com um índice maior de animais hiperfosfatêmicos (20,8%) no GNA que os descritos por esses autores (12%). O fósforo sérico se eleva frequentemente em estágios finais da DRC, quando aproximadamente 15% da função renal ainda está preservada (Chew *et al.*, 2011). Isso ocorre, pois, mecanismos compensatórios atuam para manter o fósforo sérico dentro de níveis normais, porém à custa de alterações nos metabolismos de hormônios como o PTH, FGF-23 (*fibroblast growth factor* – 23) e calcitriol (Galvão *et al.*, 2013; Riella, 2014).

O Ca_i não se diferenciou estatisticamente entre os grupos (tabela 1), porém 28% dos animais no GA apresentaram níveis séricos abaixo de 1mmol/L. Pacientes com DRC leve e moderada não apresentam alterações nas concentrações plasmáticas de Ca_i devido aos mesmos mecanismos compensatórios que mantem a homeostase do fósforo (Galvão *et al.*, 2013; Riella, 2014). Contudo, Chew *et al.* (2011) admite que, diferentemente do fósforo, em pacientes nos estágios avançados de DRC pode ocorrer acentuada alteração no comportamento do cálcio devido a variação individual da taxa de fixação do mineral.

Concentrações plasmáticas elevadas de PTH foram detectadas nos cães com LVC sem diferença estatística significativa entre o GA e GNA (tabela 1). Em animais com LV o processo inflamatório exagerado, em virtude da resposta humoral exacerbada, desencadeia diversas alterações metabólicas nos pacientes (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Greene, 2014). O processo inflamatório crônico e/ou agudo, estimula a produção do hormônio FGF-23, produzido pelo tecido ósseo, que reduz o calcitriol responsável pelo *feedback* negativo do PTH. A possível associação das alterações no metabolismo desses hormônios associado a redução da massa renal de pacientes com LVC pode contribuir para o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal, identificado nos animais do presente estudo, mesmo antes da presença de azotemia.

Outro fato a ser considerado em relação aos valores do PTH observados no GA do presente estudo, é a dificuldade que cães azotêmicos possuem em controlar as concentrações plasmáticas de PTH devido ao menor número de receptores de calcitriol nas glândulas paratireoides e a redução nas concentrações desse hormônio nesses pacientes, o que compromete a retroalimentação negativa desse hormônio e consequente elevação da concentração plasmática do PTH (Brow *et al.*, 1989; Gelber *et al.*, 2003; Cortadellas *et al.*, 2010).

Os resultados apresentados ressaltam a importância de mensurar as concentrações de fósforo e de PTH em cães com LVC para se necessário, realizar intervenção terapêutica mesmo em estágios iniciais da doença.

Conclusão

Cães com LV possuem níveis elevados de PTH e com frequência apresentam hiperfosfatemia mesmo sem presença de azotemia. Novos estudos com foco no metabolismo do calcitriol, FGF-23, PTH e marcadores inflamatórios a fim de encontrar alvos terapêuticos que possam parar o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal em cães com LV devem ser realizados.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos fornecidas e ao laboratório Vetanalisa® pelo apoio durante a pesquisa.

Referências bibliográficas

- BRO, S.; OLGAARD, K. Effects of Excess PTH on Nonclassical Target Organs. *Am. J. Kidney Dis.*, v.30, n.5, p.606-620, 1997.
- BROW, A.J; DUSSO, A.; LOPEZ-HILKER, S. *et al.* 1,25-(OH)₂D receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int.*, v.35, p.19-23, 1989.
- CHEW, D.J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P.A. Urologia e Nefrologia do cão e do gato. 2ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p.554.

456 CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A.
 457 Glomerular Filtration Rate in Dogs with Leishmaniasis and Chronic Kidney Disease. *J. Vet.*
 458 *Int. Med.*, v.22, p.293-300, 2008.

459
 460 CORTADELLAS, O.; M. J. FERNÁNDEZ-DEL PALACIO, J. TALAVERA, A. Bayón.
 461 Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages of chronic
 462 kidney disease. *Veterinary Record.*, v.164, p. 487-490, 2009.

463
 464 CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN,
 465 A. Calcium and Phosphorus Homeostasis in Dogs with Spontaneous Chronic Kidney
 466 Disease at Different Stages of Severity. *J. Vet. Intern. Med.*, v.24, p. 24-73, 2010.

467 CHUNNINGHAM, J.; LOCATELLI, F; RODRIGUEZ, M. Secondary
 468 Hyperparathyroidism: Pathogenesis, Disease Progression, and Therapeutic Options. *J. Am.*
 469 *Soc. Nephrol.*, v.6, p.913-921.

470 DAVID, V.; MARTIN, A.; ISAKOVA, T. *et al.* Inflammation and functional iron deficiency
 471 regulate fibroblast growth factor 23 production. *Kidney Int.*, v.89, n.1, p.135-146, 2016.

472 GALVÃO, J.F.B.; NAGODE, L.A.; SCHENCK, P.A.; CHEW, D.J. Calcitriol, calcidiol,
 473 parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease.
 474 *Vet. Emerg. Crit. Care.*, v.23, n.3, p.134-162, 2013.

475 GERBER, B.; HASSIG, M.; REUSCH, C.E. Serum concentrations of 1,25-
 476 dihydroxycholecalciferol and 25-hydroxycholecalciferol in clinically normal dogs and dogs
 477 with acute and chronic renal failure. *AJVR*, v.64, n.9, p.1161-1166, 2003.

478 GREENE, C.E. Infectious Diseases of the dog and cat. 4 ed. St. Louis : Elsevier, p.1354,
 479 2012.

480 HARJES, L. M.; PARKER, V. J.; DEMBEK, K. *et al.* Fibroblast Growth Factor-23
 481 Concentration I dogs with chronic kidney disease. *J. vet. Intern. Med.*, v.31, p.784-790,
 482 2017.

483 INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). 2017. Disponível em:
 484 <<http://www.iris-kidney.com/>>. Acesso em: 13 set 2018.

485 KANBAY, M.; VERVLOET, M.; COZZOLINO, M. *et al.* Novel faces of Growth Factor 23
 486 (FGF23): Iron deficiency, Inflammation, Insulin Resistance, Left Ventricular Hypertrophy,
 487 Proteinuria and Acute Injury. *Calcif. Tissue Int.*, v.100, p.217-228, 2017.

488 LEVIN, A.; BAKRIS, G.L.; MOLITCH, M.; SMULDERS, M. *et al.* Prevalence of abnormal
 489 serum vitamin D, PTH, calcium, and phosphorus in patients with chronic kidney disease:
 490 Results of the study to evaluate early kidney disease. *Kidney Int.*, v.71, p. 31-38, 2007.

491 MARTIN, K.J; GONZÁLEZ, E.A. Metabolic Bone Disease in Chronic Kidney Disease. *J.*
 492 *Am. Soc. Nephrol.*, v.18, p.875-885, 2007.

493 MANCINELLI, E.; SHAW, D.J.; MEREDITH, A.L. γ -Glutamyl-transferase (GGT) activity
 494 in the urine of clinically healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec*, v.10,
 495 2012.

496 RIELLA, M.C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrólíticos. 5 ed, Rio de Janeiro:
497 Guanabara Koogan, p.1247, 2014.

498 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for the
499 practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors*, v.86, n.4, 2011.

500 ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 4 ed, New Jersey: Prentice-Hall, p.663, 1999.

501

502

503

504

505

506

507

508

509

510

511

512

513

514

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

3.CAPÍTULO III

Artigo a ser enviado para a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – A2

A DENSIDADE URINÁRIA COMO INDICADOR PARA DETERMINAÇÃO DA
RAZÃO GAMA-GLUTAMIL TRANSPEPTIDASE URINÁRIA: CREATININA
URINÁRIA EM CÃES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

*URINARY DENSITY AS AN INDICATOR FOR THE DETERMINATION OF URINARY
GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE: URINARY CREATININ RASION IN DOGS
WITH VISCERAL LEISHMANIOSIS*

Gustavo Gomes de Oliveira¹, Alda Izabel de Souza²

¹Discente do Programa de Pós-graduação Ciências Veterinária, FAMEZ/UFMS.

²Docente FAMEZ/UFMS

Resumo: A razão Gama-glutamil transpeptidase urinária: Creatina urinária (GGTu/Cru) é um marcador laboratorial que pode sinalizar lesão em túbulos renais de cães com leishmaniose visceral (LV). Por isso o objetivo deste trabalho foi verificar a necessidade de realizar a mensuração da GGTu/Cru em cães com LV utilizando a densidade urinária (DU) como tomada de decisão. Vinte e oito animais diagnosticados com LV e cinco animais hígidos (grupo controle) foram incluídos na pesquisa. Os animais doentes foram classificados em azotêmicos (n=6) e não azotêmicos (n=22). A diferença entre os grupos foi testada pelo teste de Kruskal-Wallis para DU, GGTu/CRu e razão proteína urinária: creatinina urinária (UP/C), mostrando significância nos três parâmetros analisados (p<0,05). Utilizando os valores de DU de 1,030 e a GGTu/Cru de 0,81 como linha de corte, observou-se que animais com DU baixa apresentam maior frequência de indivíduos com GGTu/CRu elevada em relação a animais com DU normal (teste exato de Fisher p<0,05). O risco relativo de um cão com LV e DU inferior a 1,030 possuir GGTu/CRu elevada foi de 4,95 vezes (p<0,01, IC 95% - 1,32-18,48). Recomenda-se que animais com DU baixa tenham a GGTu/CRu mensurada a fim de verificar a presença de lesão tubular mesmo antes do aparecimento de azotemia.

Palavras-chave: lesão tubular, GGT, função tubular

Abstract: The Gama-glutamyl transpeptidase ratio: Urinary creatinine (GGTu / Cru) is a laboratory marker that may signal renal tubular injury in dogs with visceral leishmaniasis (VL). Therefore, the objective of this work was to verify the need to perform the measurement of GGTu / Cru in dogs with LV using urinary density (UD) as decision making. Twenty-eight animals diagnosed with VL and five healthy animals (control group) were included in the study. The diseased animals were classified as azotemic (n = 6) and non-azotemic (n = 22). The difference between the groups was tested by the Kruskal-Wallis test for DU, GGTu / CRu and urinary protein: urinary creatinine ratio (UP / C), showing significance in the three parameters analyzed (p <0.05). Using the values of DU of 1.030 and GGTu / Cru of 0.81 as cut line, it was observed that animals with low DU have a higher frequency of individuals with elevated GGTu / CRu in relation to animals with normal UD (exact test of Fisher p <0.05). The relative risk of a dog with LV and DU less than 1.030

having elevated GGTu / CRu was 4.95 times ($p < 0.01$, 95% CI - 1.32-18.48). It is recommended that animals with low DU have GGTu / CRu measured to verify the presence of tubular lesion even before the onset of azotemia.

Key words: tubular lesion, GGT, relative risk

Introdução

A proteinúria está frequentemente presente na maioria dos cães acometidos pela leishmaniose visceral (LV) (Cortadellas, *et al.*, 2008; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Frazilio *et al.*, 2018). Inicialmente se desenvolve devido ao acúmulo de imunocomplexos nos glomérulos resultando em glomerulonefrite com invasão de células inflamatórias, proliferação da matriz mesangial e perda parcial da permeabilidade seletiva da barreira de filtração (Soares *et al.*, 2005; Riella, 2014; Godoy *et al.*, 2017). Além disso, a proteinúria está presente em casos de hiperfiltração dos néfrons e de hipertensão sistêmica (Cortadellas, *et al.*, 2008; Chew *et al.*, 2011; Riella, 2014). Essa proteinúria, originada inicialmente da doença glomerular, sobrecarrega as células dos túbulos contorcidos proximais acarretando lesão e posterior perda de função dessa área do néfron (Riella, 2014). Conhecer os elementos dos néfrons que estão envolvidos na proteinúria pode auxiliar no estadiamento da doença nesses pacientes.

A densidade urinária (DU) se altera na doença renal crônica (DRC) devido a diminuição da resposta das células tubulares ao hormônio antidiurético (ADH) e a progressiva morte celular dos néfrons (Riella, 2014). Por isso a DU é utilizada como uma importante fonte de informação a respeito dos túbulos renais além de um parâmetro de fácil acesso e baixo custo (Hart, 2005).

Já a Gama-glutamil transpeptidase (GGT) é uma enzima sintetizada pelas células dos túbulos contorcidos proximais dos néfrons. Sua produção é aumentada em casos de lesão celular com elevação da concentração na urina, uma vez que a produção aumentada é excretada para o lúmen tubular. Diversos autores descreveram a GGT urinária como um bom biomarcador de lesão aguda tubular (Hart, 2005; Mancinelli *et al.*, 2012; Kovarikova, 2015), entretanto, na doença renal crônica sua importância ainda é discutida. Segundo Ibba *et al.* (2016) é possível utilizar a razão GGT urinária: creatinina urinária (GGTu/Cru) como meio de especificar a origem da proteinúria em cães com LV.

Como a DU está diretamente relacionada com a função tubular de reabsorção de água e a GGTu/Cru pode indicar lesão nesse segmento dos néfrons, em indivíduos que apresentam proteinúria de origem renal como nos casos de LV, o objetivo com esse estudo foi avaliar a

importância de realizar a mensuração da GGTu/Cru em cães com LV, usando como indicador a determinação da DU.

Materiais e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMS) com o processo de número 897/2017.

Caninos de ambos os sexos, com exame parasitológico para *Leishmania* sp. positivo, idade mínima de sete meses, sem histórico de tratamento prévio e livres de alterações clínicas e laboratoriais não tradicionalmente relacionadas à leishmaniose participaram da pesquisa. A amostragem foi por conveniência totalizando a inclusão de 28 animais. Cinco cães sem alterações clínicas e teste imunocromatografico para LV (Teste DPP® leishmaniose canina, Brasil) negativo formaram o grupo controle.

Amostras de urina coletadas por cistocentese de todos os animais foram obtidas e analisadas segundo Chew *et al.* (2011). Os sobrenadantes das amostras que não apresentaram sedimento ativo foram utilizados. A mensuração da GGT e creatinina urinária foram realizadas em equipamento automatizado com Kits comerciais (Roche®, USA) e a DU foi obtida por refratômetro de bancada (Atago®, Japão). A proteína urinária foi mensurada em equipamento semiautomático com kit comercial específico (Sensiprot Analisa®, Brasil).

Segundo as recomendações da IRIS (2017), os pacientes foram agrupados de acordo com presença de azotemia em grupo não azotêmico (NA) e grupo azotêmico (A). Os animais hígidos formaram o grupo controle (C). Utilizando a DU os pacientes foram reclassificados segundo Watson *et al.* (2015) em dois grupos: DU abaixo do ideal ($DU < 1,030$) e DU normal ($DU \geq 1.030$). Como critério de envolvimento tubular na geração de proteinúria foi utilizado o valor da GGTu/Cru $\geq 0,81$ (Ibba *et al.*, 2016).

A UP/C, GGTu/Cru e a DU foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis. O teste Mann-Whitney foi empregado como *post hoc* teste para comparação dois a dois. O nível de significância de 0,05 foi utilizado no teste de Kruskal-Wallis. A fim de controlar o erro tipo I, o nível de significância utilizado no teste de Mann-Whitney foi 0,016 (0,05/3 – número de comparações 2 a 2 realizadas).

A frequência de animais com envolvimento tubular foi calculada nos grupos com DU abaixo do ideal e normal. A diferença das frequências foi verificada pelo teste Exato de Fisher com nível de significância de 0,05. O Risco relativo foi considerado significativo com $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos e o Risco relativo foram calculados de acordo com o descrito por Zar (1999) e Jekel *et al.* (2001) respectivamente.

Resultado e Discussão

Dos 33 cães que participaram do trabalho 19 eram machos e 14 fêmeas. A mediana da idade foi de 36 meses (mínimo de sete e máximo de 120 meses). O grupo NA e A foram compostos por 22 e seis animais, respectivamente. Na tabela 1 são apresentadas as comparações entre os grupos para a DU, UP/C e GGTu/Cru.

Tabela 1-Mediana, amplitude e diferença estatística para densidade urinária, relação proteína: creatinina urinária e relação GGT: creatinina urinária entre cães negativos para leishmaniose visceral e cães positivos azotêmicos e não azotêmicos.

	C (med-amp) n=5	NA (med-amp) n=22	A (med-amp) n=6
DU	1,050-0,025 ^A	1,028-0,043 ^A	1,016-0,017 ^B
UP/C	0,11-0,10 ^A	1,0-4,40 ^B	2,92-6,74 ^C
GGTu/Cru	0,23-0,24 ^A	0,66-3,72 ^B	0,95-7,64 ^{AB}

C- Grupo controle, NA- Grupo não azotêmico, A- Grupo azotêmico, med – mediana, amp – amplitude, DU- densidade urinária, UP/C- razão proteína:creatinina urinária, GGTu/Cru- razão GGT: creatinina urinária. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa no teste de Mann-Whitney ($p < 0,016$), após teste de Kruskal – Wallis ($p < 0,05$).

Os valores da densidade urinária (DU) foram significativamente menores no grupo A (Tabela 1) assemelhando-se ao encontrado por Cortadellas *et al.* (2008). Com o avanço da doença, os túbulos distais e coletores dos néfrons perdem a capacidade de responder ao ADH (hormônio antidiurético), além da progressiva morte das células dos túbulos contorcidos proximais, que exercem importante papel na desidratação do ultrafiltrado (Chew, *et al.*, 2011; Riella, 2014). Com isso, a eficiência dos rins em concentrar a urina é, consideravelmente, diminuída. Embora não tenha sido identificado diferença significativa entre os grupos C e NA, 50% dos animais do grupo NA apresentaram DU menor que 1,030, enquanto que nenhum animal do grupo C apresentou DU menor que 1,040. Segundo Whatson *et al.* (2015), cães com DU abaixo de 1,030 e hidratados devem ser investigados quanto a presença de DRC mesmo sem azotemia, pois há indicativos de falha de resposta ao ADH.

A UP/C foi diferente entre os três grupos e apresentou aumento dos valores com o avanço da DRC (Tabela 1). A proteinúria pode ser consequência tanto de lesão glomerular quanto tubular ou ainda a associação de ambas (Ibba *et al.*, 2016). Em cães com LV a glomerulonefrite desencadeada pela doença sobrecarrega as células do túbulo contorcido proximal que tentam reabsorver a grande quantidade de proteínas filtradas, acarretando em

estresse e morte celular (Grauer, 2005; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2011) e pode justificar os resultados encontrados no presente trabalho.

A GGTu/Cru tem sido utilizada como marcador de lesão tubular, uma vez que a enzima GGT é secretada pelas células do túbulo contorcido proximal e liberada para o lúmen em situações de transtorno (Dierickx, 1981; Hiene *et al.*, 2001; Hart, 2005; Chew *et al.*, 2011). Frazilio *et al.* (2018) observaram diferença estatística entre a GGTu/Cru de animais sem proteinúria e com proteinúria, fato semelhante foi verificado entre o grupo C e NA do presente trabalho. Isso reforça o fato de que a presença de proteinúria se relaciona com a lesão tubular verificado pelo aumento da GGTu/Cru.

Embora nenhuma diferença estatística na GGTu/Cru entre os grupos C, A e NA tenha sido detectada, foi possível observar uma mediana maior desse marcador no grupo A. Contudo, 1/3 dos animais deste grupo apresentaram GGTu/Cru abaixo de 0,3, o que contribui para aumentar a amplitude de variação dos valores e dificultar diferenciação estatística. A GGTu/Cru baixa em animais azotêmicos pode ocorrer devido a diminuição da massa celular renal em estágios avançados da DRC, de forma que as células tubulares remanescentes não produzam enzima suficiente para demonstrar elevação na urina. Entretanto, a enzimúria está relacionada a danos tubulares e não disfunção na filtração glomerular, logo esses resultados reforçam a informação de que lesão tubular pode ocorrer independente de alteração expressivas na creatinina sérica.

Ao reclassificar os animais quanto a DU, 70% deles com valores de densidade abaixo do ideal apresentaram GGTu/Cru acima de 0,81, enquanto apenas 12% com DU considerada normal demonstraram valores semelhantes (tabela 2). O teste exato de Fisher revelou diferença significativa entre as frequências dos dois grupos ($p < 0,05$). O risco relativo de um cão com leishmaniose e DU inferior a 1,030 possuir lesão em túbulos foi de 4,95 ($p < 0,01$, IC 95% - 1,32-18,48).

Tabela 2 - Frequência de cães positivos e negativos para leishmaniose visceral com densidade urinária inadequada e adequada apresentando GGTu/Cru $> 0,81$ ou $< 0,81$.

	GGTu/Cru $> 0,81$ (%)		GGTu/Cru $< 0,81$ (%)		Total
DU $< 1,030$	12	(70,59)*	5	(29,41)	17
DU $\geq 1,030$	2	(12,5)*	14	(87,5)	16

DU- densidade urinária, GGTu/Cru- relação GGT: creatinina urinária. * mostra diferença estatística no teste exato de Fisher ($p < 0,05$).

Ibba *et al.* (2016) sugeriram que a GGTu/Cru deve ser utilizada para verificar a progressão da DRC em cães com LV, o que corroborou os resultados encontrados no

presente trabalho. Com isso amplia-se a recomendação de que animais positivos para LV e com DU inferior a 1,030 tenham a GGTu/Cru avaliada a fim de considerar a existência de possível lesão tubular e a necessidade de tratamento nefroprotetor, mesmo sem azotemia.

Conclusão

Indivíduos com leishmaniose e DU inferior a 1,030 devem ser avaliados quanto a presença de GGTu/Cru elevada por possuírem maior risco de desenvolver lesão tubular do que animais doentes com densidade urinária ideal, dessa forma a evolução da lesão tubular pode ser melhor avaliada e auxiliar na escolha da terapêutica para cada paciente.

Agradecimentos

Agradecemos a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudos fornecidas e ao laboratório Vetanalisa® pelo apoio durante a pesquisa.

Referências bibliográficas

CHEW, D.J.; DIBARTOLA, S.P.; SCHENCK, P.A. Urologia e Nefrologia do cão e do gato. 2ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p.554.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Glomerular Filtration Rate in Dogs with Leishmaniasis and Chronic Kidney Disease. *J. Vet. Int. Med.*, v.22, p.293-300, 2008.

DIERICKX, P.J. Urinary Gamma-Glutamyl Transferase as an Indicator of Acute Nephrotoxicity in Rats. *Arch Toxicol.* v.47, p.209-215, 1981.

FRAZILIO, F.O; BORGES, F.A.; SOUZA, A.I. *et al.* Biomarkers and renal arterial resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasitol Res*, v.117, p.3399-3045, 2018.

GODOY, K.C.S.; OLIVEIRA, G.G.; SILVA, P.M.P. *et al.* Comportamento dos marcadores laboratoriais de injúria renal em cães com leishmaniose visceral. In: Enisap, 2017, Cuiabá:[s.n.] 2017.

GRAUER, G.F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, v.35, n.3, p.581-596, 2005.

HART, S. G.E. Assessment of renal injury in vivo. *J Pharmacol Toxicol Methods* v.52, p.30-35, 2005.

HIENE, R.; MOE, L.; MOLMEN, G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res Vet Sci*, v.70, p.129-137, 2001.

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

773 INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). 2017. Disponível em:
774 <<http://www.iris-kidney.com/>>. Acesso em: 13 set 2018.

775 JEKEL, J.F.; KARTZ, D.L.; ELMORE, J.G. Epidemiologia, bioestatística e medicina
776 preventiva. 2 ed, Porto Alegre: Artmed, p.432, 2001.

777 KOVARIKOVA, S. Urinary biomarkers of renal function in dogs and cats: a review. *Vet*
778 *Med (Praha)*, v.60, n.11, p. 589-602, 2015.

779 MANCINELLI, E.; SHAW, D.J.; MEREDITH, A.L. γ -Glutamyl-transferase (GGT) activity
780 in the urine of clinically healthy domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet Rec*, v.10,
781 2012.

782 RIELLA, M.C. Princípios de nefrologia e distúrbios hidroeletrolíticos. 5 ed, Rio de Janeiro:
783 Guanabara Koogan, p.1247, 2014.

784 SOARES, M.J.V.; MORAES, J.R.E.; PALMEIRA BORGES; V. et al. Renal Involvement
785 in Visceral Leishmaniasis Dogs. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*, v.11, n.4, p.579-593,
786 2005.

787 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for the
788 practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors*, v.86, n.4, 2011.

789 WHATSON, A.D. J.; LEFEBVRE, H. P.; ELLIOTT, J. Using urine specific gravity. 2015.
790 Disponível em: < http://www.iris-kidney.com/education/urine_specific_gravity.html>.
791 Acesso em: 13 set 2018.

792 ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 4 ed, New Jersey: Prentice-Hall, p.663, 1999.

793

794