

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Expressão de nefrina e caracterização da medula óssea em
cães com doença renal crônica**

Mariana de Medeiros Torres

CUIABÁ-MT

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Expressão de nefrina e caracterização da medula óssea em
cães com doença renal crônica**

Autora: Mariana de Medeiros Torres

Orientadora: Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa

Co-Orientador: Prof. Dr. Luciano Nakazato

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso para a obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

CUIABÁ-MT

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M488e Medeiros Torres, Mariana de.
Expressão de nefrina e caracterização da medula óssea
em cães com doença renal crônica / Mariana de Medeiros
Torres. -- 2016
66 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientadora: Valéria Régia Franco Sousa.
Co-orientador: Luciano Nakazato.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Mato
Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,
Cuiabá, 2016.
Inclui bibliografia.

1. anemia. 2. doença renal. 3. mielograma. 4. podócitos.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



CERTIFICADO


Certificamos que o Protocolo Nº 23108.043331/12-9, sobre "Expressão de podocina e nefrina e caracterização da medula óssea em cães com doença renal crônica", sob a responsabilidade de Profª Drª VALÉRIA RÉGIA FRANCO SOUSA/MARIANA DE MEDEIROS TORRES, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de laboratório (SBCAL), tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 20/12/2012.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 23108.043331/12-9, entitled "Podocin and nephrin expression and bone marrow characterization in dogs with chronic kidney disease", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian Society of Science in Animals of Laboratory (SBCAL). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on Dec 20, 2012.

Cuiabá-MT, 21 de dezembro de 2012.


Prof. Dr. Roberto Vilela Veloso
Presidente


Profª Drª Nair Honda Kawashita
Vice-Presidente



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT
Tel : +55 65 3615-8627 - Email : cpgvet@ufmt.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Expressão de nefrina e caracterização da medula óssea em cães com doença renal crônica"

AUTOR : Doutoranda Mariana de Medeiros Torres

Tese de Doutorado defendida e aprovada em 23/08/2016.

Composição da Banca Examinadora:

Presidente Banca / Orientador Doutora Valéria Régia Franco Sousa
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutora Adriane Jorge Mendonça
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Interno Doutora Arleana do Bom Parto Ferreira de Almeida
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Examinador Externo Doutora Ana Helena Benetti Gomes
Instituição : UNIVERSIDADE DE CUIABÁ-UNIC

Examinador Externo Doutora Cristiane Divan Baldani
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO-UFRRJ

Examinador Suplente Doutora Valéria Dutra
Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Valéria Régia Franco Sousa
Adriane Jorge Mendonça

Arleana BPF Almeida
Ana Helena Benetti Gomes

Cristiane Divan Baldani

CUIABÁ, 23/08/2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar a encontrar a força e serenidade para continuar firme em meus propósitos.

À minha família, minha inspiração, pelo apoio e confiança nos momentos de dificuldade, pela compreensão nos momentos em que estive ausente.

Ao meu pai José Valmir que me ensinou a sonhar, por acreditar sempre nos meus sonhos.

À minha mãe Maria Francisca que me ensinou a persistência e dedicação, por acreditar e me ajudar a persistir.

Ao meu irmão Rodrigo meu melhor conselheiro, meu exemplo de força de vontade, agradeço por me mostrar sempre o melhor caminho e não me deixar desistir dos meus propósitos.

Ao Max, por todo o apoio e incentivo, por sempre se fazer presente e por dividir comigo o mesmo sonho.

Aos meus colegas, professores, estagiários e alunos com os quais convivi e aprendi muito.

A todos os funcionários do HOVET que me ajudaram durante esses quatro anos e contribuíram para meu crescimento profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Luciano Nakazato pela orientação e pelo incentivo.

À minha orientadora Profa. Dra. Valéria Régia Franco Sousa pela oportunidade oferecida, orientação e aprendizado proporcionado.

RESUMO

EXPRESSÃO DE NEFRINA E CARACTERIZAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) se desenvolve por longos períodos e independente da causa primária apresenta grande morbidade e mortalidade em cães, principalmente pelas complicações inerentes à sua progressão. O diagnóstico da DRC se baseia na intensidade da azotemia, proteinúria persistente, diminuição da habilidade em concentrar urina, alterações ultrassonográficas e histopatológicas. Novos métodos diagnósticos permitem a detecção precoce e localização da lesão como a relação GGT-creatinina urinária, Cistatina C, eletroforese de proteínas e expressão de proteínas associadas aos podócitos, como a nefrina. A progressão da DRC envolve fatores complexos que culminam com alterações clínicas, sendo a mais limitante a anemia crônica. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da DRC na medula óssea em cães relacionando os achados clínicos, laboratoriais e a detecção de *Ehrlichia canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* à expressão de nefrina no sedimento urinário. Sessenta e nove cães foram agrupados em estágios de DRC de acordo com as concentrações de creatinina sérica. Análises hematológicas, bioquímicas séricas e urinárias, urinálise, eritropoietina sérica e mielograma foram realizados e comparados ao grupo de cães controle, composto por nove cães hígidos. A expressão de nefrina foi quantificada no sedimento urinário pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, enquanto o DNA de *E. canis* e de *L. (L.) infantum chagasi* foram detectados em amostras de sangue e/ou medula óssea. Os cães apresentaram anemia normocítica normocrômica leve a moderada e a hipoplasia medular foi descrita em 93,65% deles. Houve correlação entre os achados hematológicos e a azotemia, bem como entre a expressão de nefrina e a densidade urinária em cães do estágio 3. Não houve correlação entre a expressão de nefrina e os agentes infecciosos estudados. Portanto, conclui-se que a anemia na DRC resulta de hipoplasia eritróide em todos os estágios e deficiência de ferro em estágios iniciais e que a expressão de nefrina diminui progressivamente com o agravo da DRC, não havendo correlação com *E. canis* e de *L. (L.) infantum chagasi*.

Palavras-chave: anemia, doença renal, mielograma, podócitos.

ABSTRACT

NEPHRIN EXPRESSION AND BONE MARROW CHARACTERIZATION IN DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

Chronic kidney disease (CKD) is developed for long periods and regardless of the primary cause has high morbidity and mortality in dogs, especially due to complications inherent in its progression. The diagnosis of CKD is based on the intensity of azotemia, persistent proteinuria, decreased ability to concentrate urine, sonographic and histopathologic changes. New diagnostic methods that allow earlier detection and location of the lesion include urinary GGT-creatinine ratio, Cystatin C, protein electrophoresis and protein expression associated with the podocytes, as nephrin. The progression of CKD involves complex factors that culminate in clinical changes, which the most limiting is chronic anaemia. Thus, the aim of this study was to assess the effects of CKD in the bone marrow in dogs relating the clinical, laboratory and detection of *Ehrlichia canis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to nephrin expression in the urinary sediment. Sixty-nine dogs were grouped into stages of CKD according to the concentrations of serum creatinine. Hematological analysis, serum and urinary biochemistry, urinalysis, serum erythropoietin and myelogram were performed and compared to the dogs of the control group, composed by nine healthy dogs. The nephrin expression was quantified in urine sediment by $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, while the DNA of *E. canis* and *L. (L.) infantum chagasi* was detected in samples of blood and / or bone marrow. The dogs showed mild to moderate normocytic normochromic anaemia and bone marrow hypoplasia was described in 93.65% of them. There was a correlation between hematological findings and azotemia, and between nephrin expression and urinary specific gravity in dogs from stage 3. There was no correlation between nephrin expression and the infectious agents studied. Therefore, it is concluded that anaemia in CKD result of erythroid hypoplasia in all stages and of iron deficiency in the early stages and that nephrin expression decreases progressively with the worsening of CKD, with no correlation with *E. canis* and *L. (L.) infantum chagasi*.

Key Words: anaemia, kidney disease, myelogram, podocytes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DRC – Doença Renal Crônica

FNT- α – Fator de Necrose Tumoral- α

GGT – Gamaglutamiltransferase

GMCSF – Fator Estimulador de Colônia de Granulócitos e Macrófagos

HOVET – Hospital Veterinário

IL – Interleucina

IRIS – *International Renal Interest Society*

NAG – N-acetil-beta-D- glicosaminidase

NGAL – Lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos

NPHS1 – Gene da Síndrome Nefrótica Congênita

RPC – Relação proteína- creatinina urinária

TFG – Taxa de Filtração Glomerular

UFC – Unidade Formadora de Colônia

UFMT – Universidade Federal de Mato Grosso

Sumário

RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	10
2 JUSTIFICATIVA	11
3 OBJETIVO GERAL	12
3.1 Objetivos Específicos	12
4 REVISÃO DE LITERATURA	13
4.1 Doença Renal Crônica	13
4.1.1 PODÓCITOS	14
4.1.2 ETIOPATOGENIA	15
4.1.3 DIAGNÓSTICO	17
4.2 Anemia na DRC	20
4.2.1 ERITROPOESE	21
4.2.2 PATOGENIA	22
4.2.3 AGENTES ESTIMULANTES DA ERITROPOESE	24
4.3 Características da Medula Óssea na DRC	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXO A	34
ANEXO B	48
ANEXO C	62

1 INTRODUÇÃO

As doenças glomerulares são a causa mais comum da falência crônica dos rins com uma alta prevalência na clínica de pequenos animais, afetando aproximadamente 1% dos cães atendidos, podendo atingir até 10% em animais idosos. O dano glomerular e aos podócitos causam proteinúria e resultam em injúria tubular e intersticial, sendo a principal causa de morte de cães e gatos (STEINBACH et al., 2010; KOBAYASHI et al., 2011; CIANCIOLO et al., 2016).

Após a injúria renal são observadas alterações compensatórias e adaptativas, alterando a taxa de filtração glomerular (TFG), que por sua vez, evoluem e são substituídas por alterações destrutivas de gravidade variável como a atrofia, a inflamação, a fibrose e a mineralização (BENALI et al., 2014).

O diagnóstico é comumente obtido a partir dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina, determinando a intensidade da azotemia e auxiliando na avaliação da atividade glomerular, já que ambas são utilizadas como marcadores de filtração glomerular. Porém, na última década a proteinúria associada a doenças crônicas vem sendo amplamente estudada, especialmente no que diz respeito às proteínas associadas aos podócitos. A presença de tais proteínas evidencia o grau de lesão glomerular que resulta em uma maior excreção de proteínas de alto peso molecular pela urina (KOBAYASHI et al., 2011; BARTGES, 2012; HOKAMP; NABITY, 2016).

Na busca de meios diagnósticos mais rápidos e precisos e de se conhecer a fisiopatologia da doença renal vários testes vêm sendo realizados, especialmente aqueles que detectam proteinúria e a habilidade em concentrar urina são os elementos chaves na investigação da doença e confirmação do diagnóstico (COBRIN et al., 2013; HOKAMP; NABITY, 2016).

A doença renal é uma condição importante na clínica de pequenos animais seja pela alta prevalência como pela gravidade na sua manifestação clínica que se dá tardiamente. Desta forma, o prognóstico está diretamente relacionado com um diagnóstico correto e precoce (POLZIN, 2011; VADEN, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

A doença renal é uma grave doença com altos índices de morbidade e mortalidade, sendo definida por uma lesão irreversível que pode se desenvolver em dias ou anos. Muitas vezes os animais acometidos apresentam sintomatologia inespecífica, resultando num diagnóstico tardio.

Em virtude da gravidade da doença, justifica-se o emprego de métodos diagnósticos rápidos para uma abordagem terapêutica mais rápida e efetiva, visto que a doença renal pode ser secundária a outras afecções, sendo a leishmaniose visceral e a leptospirose alguns exemplos de grande impacto na saúde pública. Além disso, por se tratar de uma doença com graves complicações e de alta casuística na clínica de pequenos animais, seu acompanhamento torna-se oneroso e a sobrevivência do animal diminui quando o diagnóstico é tardio.

Visando futuramente o tratamento das principais consequências da doença e o diagnóstico precoce, o estudo permitiu compreender os mecanismos que levam ao desenvolvimento da doença renal e seus efeitos sobre a medula óssea e possibilitou a publicação de dados científicos sobre a fisiopatologia da doença renal crônica, ressaltando a expressão de nefrina como um dos principais marcadores precoces de falência renal e o impacto da doença na medula óssea.

3 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos da doença renal crônica na medula óssea em cães atendidos no Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), relacionando os achados clínicos, laboratoriais e a detecção de *Ehrlichia canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* à expressão de nefrina.

3.1 Objetivos Específicos

Artigo 1:

- Descrever as alterações clínicas e laboratoriais de hemograma, mielograma, bioquímica sérica e urinária na doença renal crônica em seus diferentes estágios.
- Descrever os tipos celulares predominantes na medula óssea durante a doença renal crônica pelo mielograma.
- Relacionar os achados laboratoriais de bioquímica sérica, eritropoetina sérica e hemograma aos achados de mielograma.

Artigos 2 e 3:

- Determinar a expressão da nefrina no sedimento urinário de cães em todos os estágios da doença renal crônica.
- Associar a expressão de nefrina à proteinúria e à azotemia.
- Relacionar os achados laboratoriais de bioquímica sérica e urinária e urinálise à expressão de nefrina.
- Associar a expressão de nefrina à detecção de *Ehrlichia canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Doença Renal Crônica

Os rins estão envolvidos em muitas funções no organismo e estão intimamente envolvidos na manutenção da homeostase, mantém uma importante função endócrina com a produção de eritropoetina e no metabolismo da vitamina D e exerce papel na regulação da pressão arterial. Portanto, quando a função renal diminui, esses processos são diretamente afetados resultando em desequilíbrio e retenção de compostos tóxicos (BARTGES, 2012).

Desta forma, a doença renal deve ser classificada como crônica ou aguda devido aos diferentes prognósticos de cada quadro, levando em consideração que a doença renal crônica (DRC) é caracterizada pela presença persistente de lesões de origem funcional ou estrutural em um ou ambos os rins desenvolvidas em um período mínimo de três meses (POLZIN, 2011).

A DRC é frequentemente diagnosticada em cães e gatos, principalmente naqueles em idade avançada, e embora não exista predileção racial e etária, apresenta grande morbidade e mortalidade, sendo a principal causa de morte nesses animais (BARTGES, 2012; HOKAMP; NABITY, 2016).

Em cães as alterações patológicas que caracterizam a doença incluem glomeruloesclerose, inflamação, atrofia tubular e fibrose túbulo-intersticial, sendo que as doenças glomerulares são a principal causa de DRC nesta espécie (BENALI et al., 2014).

A progressão da doença envolve fatores complexos que resultam na fibrose do órgão e culminam com as alterações clínicas observadas nos cães, sendo a mais limitante para o prognóstico da DRC a anemia crônica, mas também resulta em proteinúria e hipertensão arterial (MACDOUGALL, 2011; BENALI et al., 2014).

Entre essas complicações, a anemia é frequente nos cães em estágios avançados da doença. Nos achados laboratoriais, a anemia evidenciada pelo

hemograma está frequentemente associada a baixos níveis séricos de ferro (MACDOUGALL, 2011).

Dentre os diversos mediadores relacionados à anemia estão a interleucina 6 e 1 (IL-6 e IL-1) e o fator de necrose tumoral- α (FNT- α). A anemia também pode resultar da diminuição da eritropoetina sérica, de alterações no metabolismo do ferro, da deficiência de folatos decorrente da poliúria e da fibrose de medula óssea secundária ao hiperparatireoidismo (RAJ, 2009; MACDOUGALL, 2011).

Em função da gravidade da doença e de seu caráter progressivo, a *International Renal Interest Society* (IRIS) propôs uma diferenciação da DRC em estágios, proporcionando melhor abordagem clínica e condutas terapêuticas, melhorando a qualidade de vida, retardando a progressão e conseqüentemente suas complicações (WAKI et al., 2010; IRIS, 2013).

4.1.1 PODÓCITOS

A DRC bem como a proteinúria tem sido atribuída à disfunção dos glomérulos e perda ou dano aos podócitos. Os podócitos são células epiteliais altamente especializadas envolvidas nos processos de filtração, manutenção da membrana basal glomerular, manutenção da forma e integridade dos capilares e na transdução de sinais (LEEJUIS et al., 2010; EEKHOFF et al., 2011).

Os podócitos possuem uma arquitetura complexa que recobre a camada externa da membrana basal glomerular, situam-se externamente à alça capilar glomerular e se ligam à membrana basal subjacente através de grandes processos interdigitais chamados processos podálicos. Entre esses processos situam-se as fendas diafragmáticas, que são estruturas altamente permeáveis à água e pequenos solutos, limitando a passagem de proteínas maiores como a albumina (JEFFERSON et al., 2011).

O podócito é uma célula polarizada negativamente e sua forma é modificável graças ao citoesqueleto de actina e miosina. Em sua fenda diafragmática, proteínas como a nefrina, que estão conectadas a este citoesqueleto permitem que os processos podálicos alterem sua forma

promovendo a filtração. Esse mecanismo se altera em processos patológicos tanto congênitos como adquiridos, quando a partir da injúria as proteínas intermediárias como vimentina e nestina são reguladas positivamente, resultando em marcada proteinúria (LEEUWIS et al., 2010; JEFFERSON et al., 2011).

Portanto, o diafragma de fenda e seu aparato contrátil subjacente são constituídos por proteínas estreitamente inter-relacionadas, como a nefrina, a podocina e a α -actina-4 que exercem uma função reguladora na filtração glomerular. Defeitos hereditários e mutações no gene NPHS1 que codifica a nefrina estão relacionados à ocorrência de síndrome nefrótica e proteinúria massiva (SZETO et al., 2005).

Os podócitos não são células renováveis, portanto uma podocitopenia apresenta importante correlação com a progressão da doença. Diversos estudos mostram que o padrão de expressão das proteínas associadas aos podócitos presentes na urina diferencia de acordo com a doença glomerular específica ou gravidade do dano glomerular (SZETO et al., 2005; ICHII et al., 2011; KOBAYASHI et al., 2011; GARG; HOLZMAN, 2012).

A nefrina foi a primeira proteína identificada na fenda diafragmática e sua deficiência resulta em uma intensa proteinúria. Trata-se de uma molécula de adesão da superfamília das imunoglobulinas, e está relacionada com a manutenção da arquitetura do podócitos, interagindo com a actina através de proteínas adaptadoras. A nefrina ainda atua como sinalizadora, fazendo o recrutamento de outras proteínas necessárias para a manutenção da estrutura dos podócitos (PATRAKKA; TRYGGVASON, 2010; KOBAYASHI et al., 2011).

A diminuição da expressão dessa proteína está mais intimamente associada à DRC em cães do que em gatos, além de ser menos expressa em estágios avançados da doença, coincidindo com a diminuição do número de podócitos (ICHII et al., 2011).

4.1.2 ETIOPATOGENIA

Devido às suas características anatômicas e fisiológicas, os rins podem sofrer lesões em graus variados se tornando suscetíveis aos efeitos de

agentes nefrotóxicos, doenças cardíacas, Diabetes *mellitus*, hepatopatias, hipotireoidismo, periodontites graves, distúrbios imunológicos, neoplasias, inflamação, infecção e obstrução do fluxo urinário. As afecções podem ainda ser de origem congênita ou familiar, sendo que todos estes distúrbios induzem a redução do número de néfrons funcionais através de alterações fisiopatológicas dos glomérulos, túbulos, vasos e interstício (STOKES; FORRESTER, 2004; PANCIERA; LEFEBVRE, 2009; GLICKMAN et al., 2011).

Como consequência dessas alterações, se inicia um processo de restauração da função que eventualmente desencadeia um ciclo patológico causando fibrose intersticial e destruição tecidual. Na tentativa de restauração da função, o processo inflamatório se instala e as células tubulares se proliferam para substituir as que foram perdidas dando origem a um mecanismo autodestrutivo e irreversível, desta forma, mesmo que o insulto inicial não esteja presente, os mecanismos desencadeados permitem que ocorra a progressão da lesão (LÓPEZ-NOVOA et al., 2011).

Agentes infecciosos como *Ehrlichia canis* e *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* também estão entre as principais causas de glomerulopatias em cães, especialmente em áreas endêmicas, resultando frequentemente em DRC associada a altas concentrações de gamaglobulinas (ASGARALI et al., 2012; KOUTINAS; KOUTINAS, 2014; SCHNEIDER et al., 2013).

O mecanismo de ativação da doença glomerular crônica se dá através do envolvimento de citocinas e fatores de crescimento produzidos pelas células residentes ou pelas células que invadem o glomérulo. Ao atingir o mesângio através dos capilares, finalmente alcançam o interstício periglomerular após atravessarem a cápsula de Bowman. No compartimento túbulo-intersticial esses fatores fazem a quimiotaxia de células inflamatórias mononucleares que por sua vez ativam as células epiteliais tubulares bem como os fibroblastos (YABUKI et al., 2010, BENALI et al., 2014).

O epitélio tubular é capaz de produzir diversos fatores de crescimento, entre eles a endotelina 1 que atua na quimiotaxia de leucócitos e contribui diretamente na ativação dos fibroblastos intersticiais residentes, enquanto o envolvimento dos glomérulos resulta na ativação e proliferação de células mesangiais e endoteliais que contribuem com a fibrose e esclerose observadas

no órgão. Com isso, observa-se a maior consequência do envolvimento glomerular, a síndrome nefrótica, caracterizada por proteinúria, redução da TFG, oligúria e hipertensão (YABUKI et al., 2010; LÓPEZ-NOVOA et al., 2011).

Em geral, a proteinúria patológica pode ocorrer pelo aumento da filtração glomerular ou disfunção tubular causando falha na reabsorção de proteínas que normalmente são filtradas (SMETS et al., 2010).

Durante a filtração, os podócitos, que são células epiteliais do glomérulo, exercem uma função determinante na barreira de filtração impedindo a passagem de macromoléculas e proteínas de alto peso molecular. Essas células possuem uma variedade de proteínas interligadas, como a nefrina, podocina e a α -actina, que atuam como marcadores de doença renal e de sua progressão (SZETO et al., 2005; ICHII et al., 2011).

A primeira proteína associada ao podócito a ser estudada foi a nefrina, uma proteína de transmembrana, pertencente à família das imunoglobulinas que possui capacidade de sinalização. A podocina pertence à família das estomatinas, e atua na interação com outras proteínas do podócitos, incluindo a nefrina, formando um complexo de sinalização entre elas (AALTONEN; HOLTHÖFER, 2007).

4.1.3 DIAGNÓSTICO

Em virtude da extensa reserva funcional dos rins, os cães apresentam sinais clínicos inespecíficos, por isso, o diagnóstico da DRC se baseia pela presença de azotemia de origem renal, proteinúria persistente ou ambos, frequentemente em conjunto com a diminuição da habilidade em concentrar urina, achados anormais no sedimento urinário (cilindros) e rins anormais ao exame ultrassonográfico. No entanto, os métodos não invasivos de diagnóstico disponíveis possuem baixa sensibilidade, especificidade ou ambos quando se trata de diagnóstico precoce da doença e sua causa. (LEES, 2004; HOKAMP; NABITY, 2016).

Apesar da importância e gravidade da doença renal, seu diagnóstico precoce pode ser desafiador. A mensuração da TFG é considerada o melhor método de diagnóstico da DRC, entretanto sua realização exige equipamento

específico. A dosagem de creatinina sérica é um método indireto frequentemente utilizado para avaliar a TFG, no entanto é um marcador com baixa sensibilidade nos estágios iniciais (COBRIN et al., 2013).

A mensuração da concentração de albumina na urina permite diferenciar a macro da microalbuminúria, que em cães é definida na concentração de 10-30 mg/L em urina com densidade específica de 1.010, tais concentrações não são detectáveis em tiras de urinálise (MURGIER et al., 2009).

As dosagens de microalbuminúria podem ser estimadas por meio da relação albumina-creatinina urinária, de tiras urinárias específicas e dosadas com o uso de técnicas de ELISA (DUROCHER et al., 2006; LIEN et al., 2010).

Novos métodos de detecção da DRC vêm sendo estudados, não só para detecção precoce, mas também para diferenciação entre a doença crônica e a aguda. Essa diferenciação muitas vezes é difícil pelos métodos convencionais empregados e deve ser realizada com critério, pois apresentam tratamentos e prognósticos diferentes (STEINBACH et al., 2014).

Nesse sentido, novos biomarcadores que empregam soro e urina vêm sendo amplamente estudados para melhorar o diagnóstico da DRC e diferenciá-la da doença aguda, mas apesar de sua proposta promissora, sua precisão varia conforme o estágio da doença e o local de lesão, por isso, no diagnóstico da DRC consideram-se múltiplos testes (COBRIN et al., 2013; STEINBACH et al., 2014).

São considerados biomarcadores, além da microalbuminúria, a relação GGT-creatinina urinária que é um sensível marcador de lesão tubular, a Cistatina C, é um inibidor endógeno de proteinases que aumenta conforme a TFG diminui, e a interleucina 18 que aumenta na presença de doença glomerular (PRESSLER, 2013).

A lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL) é um biomarcador renal promissor, pois permite a diferenciação entre a DRC e a doença renal aguda, no entanto mais estudos são necessários para determinar seu uso como fator prognóstico (STEINBACH et al., 2014).

A enzima N-acetil-beta-D- glicosaminidase (NAG) presente em células tubulares é considerada uma ferramenta útil na detecção precoce de injúria

renal. Em cães o aumento da relação NAG-creatinina urinária pode ser observado em diferentes estágios da DRC, essa característica o define como importante biomarcador não invasivo para o diagnóstico da doença crônica (SMETS et al., 2010).

Os biomarcadores associados aos testes de rotina permitem determinar a localização e a extensão da lesão renal, seu emprego pode prever a presença de lesão antes do surgimento de anormalidades clínicas, quando o tratamento é mais responsivo e a prevenção da progressão é possível (SMETS et al., 2010; SEGEV et al., 2013).

A proteinúria renal persistente, quantificada pela relação proteína-creatinina urinária (RPC) pode ser um indicador precoce de DRC em cães, e é um indicador prognóstico desfavorável em cães com DRC. Porém, quando levemente aumentada, a RPC não permite diferenciação entre dano glomerular e tubular. A biópsia é considerada o padrão ouro para determinação do tipo de dano renal, mas é um procedimento invasivo e não aplicável em todos os casos seja pelos custos ou pela condição clínica do animal (HOKAMP; NABITY, 2016).

Sendo assim, o emprego da eletroforese de proteínas é uma alternativa de menor custo e menor risco para o paciente, visto que a urina pode ser facilmente adquirida, e ainda possui uma alta sensibilidade em prever a localização da lesão renal (LAVOUÉ et al., 2015).

Com a eletroforese o diagnóstico da lesão se dá pela diferença entre os pesos moleculares das proteínas excretadas, ou seja, na proteinúria de origem glomerular prevalecem proteínas de médio (60-80 kDa) a alto (>80 kDa) peso molecular como a albumina e IgG, respectivamente. Enquanto a proteinúria tubular é caracterizada por proteínas de baixo peso molecular (<60 kDa) como a proteína ligante do retinol (SCHAEFER et al., 2011).

A proteinúria associada a doenças crônicas também vem sendo amplamente estudada, especialmente no que diz respeito às proteínas expressas e estruturas associadas ao glomérulo, como os podócitos, a nefrina, a podocina e a α -actinina-4. A presença de tais proteínas evidencia o grau de lesão glomerular que resulta em uma maior excreção de proteína pela urina (KOBAYASHI et al., 2011).

Na histopatologia renal, os efeitos da alteração na TFG variam de severa atrofia a hipertrofia dos néfrons e num quadro avançado da doença pode resultar em calcificação do órgão em consequência ao desequilíbrio de cálcio e fósforo. Portanto, a detecção da injúria aos podócitos, células epiteliais do glomérulo, é importante para prevenir a perda progressiva da função renal em cães, visto que esse dano resulta na substituição dos néfrons por tecido fibroso (KOBAYASHI et al., 2011; SATIRAPOJ et al., 2012).

4.2 Anemia na DRC

O desenvolvimento de anemia é comum em cães em estágios avançados de DRC e resulta principalmente da diminuição da síntese de eritropoetina pelos rins, perdas sanguíneas, nutrição deficiente e redução da meia-vida dos eritrócitos. Por ser um fator que contribui para a mortalidade de cães com DRC, a resposta à terapia depende do reconhecimento das causas que contribuem para a anemia (POLZIN, 2011).

Os cães geralmente apresentam anemia do tipo normocítica normocrômica não regenerativa, com volume globular em torno de 20% a 30%, contudo em animais que sobrevivem por vários meses, a anemia é progressiva e o volume globular diminui abaixo de 10%, com aspirados medulares hipoproliferativos (JAIN, 1993; MACDOUGALL, 2011).

A contagem de reticulócitos é diminuída apesar do grau da anemia que costuma ser leve a moderada na maioria das vezes (BONOMINI; SIROLLI, 2003; MACDOUGALL, 2011).

As toxinas urêmicas retidas no organismo dos animais contribuem para a patogênese da anemia, pois a uremia induz a hemorragias gastrointestinais que conseqüentemente levam à deficiência de ferro e rápida redução do hematócrito (MACDOUGALL, 2011; POLZIN, 2011).

O hiperparatireoidismo secundário em pacientes graves também constitui uma complicação importante da DRC e pode exacerbar a anemia por resultar em fibrose da medula óssea (MACDOUGALL, 2011; GEDDES et al., 2013).

4.2.1 ERITROPOESE

A formação de células sanguíneas tem início na fase embrionária, mais precisamente no saco vitelino, de onde as células pluripotentes embrionárias migram para o fígado, baço, medula óssea e timo nos fetos. No animal adulto estas células passam a ser produzidas principalmente na medula óssea, num processo contínuo durante toda a vida dos mamíferos em função da vida útil relativamente curta das células sanguíneas (FRAME et al., 2013; PALIS, 2014).

As células do sangue possuem uma vida útil que varia de algumas horas até várias semanas, justificando a necessidade de reposição em todas as linhagens, processo este que ocorre de forma hierárquica a partir de uma célula-tronco pluripotente hematopoética (FIEDLER; BRUNNER, 2012).

Durante o curso da hematopoese as células mais primitivas são as células-tronco multipotentes, que são capazes de reproduzir duas réplicas: uma igual a si própria e outra unidade formadora de colônia (UFC) que dará origem às linhagens eritrocitária, megacariocítica e mielomonocítica, num processo dependente de eritropoetina. Neste processo de diferenciação as células perdem seu potencial proliferativo, bem como sua capacidade de diferenciação e progressivamente adquirem as características de células maduras diferenciadas (HARVEY, 2001; PALIS, 2014).

Sob condições homeostáticas, a maioria das células-tronco permanece em estado de repouso e a minoria se encontra em constante diferenciação para suprir as necessidades periféricas, portanto, essa porção de células-tronco tem a função de não só se auto renovar, mas também de produzir uma descendência diferenciada. Esse processo é regulado por fatores intrínsecos como fatores de transcrição e sua regulação genética, bem como por fatores extrínsecos como citocinas (FIEDLER; BRUNNER, 2012).

Entre os fatores de que estimulam a eritropoese, estão as interleucinas, dentre elas a interleucina 3 (IL-3), a interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11), fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), fator de crescimento de hepatócitos, trombopoetina e testosterona. Esses fatores atuam em sinergia com a eritropoetina, cujo principal estímulo para sua produção é a

hipóxia tecidual, levando a um aumento na concentração plasmática (RAJ, 2009).

Um segundo compartimento eritróide é composto por células morfológicamente identificáveis, os precursores nucleados. No processo de maturação esses precursores se mantêm unidos ao macrófago por meio de moléculas de adesão, como a caderina, o colágeno do tipo I e IV e fibronectina, conforme essas células vão maturando, elas se distanciam do macrófago e se unem às células endoteliais dos sinusóides alcançando a circulação sanguínea (CAR, 2000; CAMASCHELLA; NAI, 2015).

Durante a diferenciação terminal, que consiste no terceiro compartimento, a síntese de globina e de heme é coordenada para permitir a produção de hemoglobina. Nesta fase ocorre um aumento no consumo de ferro, sendo que a maior parte do ferro necessário para a produção das células vermelhas é reciclado por macrófagos, portanto esse processo é estritamente dependente do metabolismo hepcidina- ferro (CAMASCHELLA; NAI 2015).

O resultado final da eritropoese é a enucleação das células que envolvem várias etapas complexas que incluem o estabelecimento de polaridade celular pela ação de microtúbulos, formação de um anel contrátil de actomiosina e coalescência da ligação lipídica entre reticulócitos e pirenócitos (PALIS, 2014).

Por fim, os níveis sanguíneos são mantidos por meio da produção contínua de reticulócitos e sua liberação na circulação para equilibrar a remoção de eritrócitos senescentes por macrófagos no baço (PALIS, 2014).

4.2.2 PATOGENIA

As causas de anemia são multifatoriais, mas a inflamação exerce o primeiro impacto sobre o metabolismo do ferro resultando na limitação da eritropoese. Essas alterações são induzidas por proteínas de fase aguda e citocinas (WEISS, 2015).

A hepcidina, peptídeo derivado do fígado, é o principal envolvido no metabolismo do ferro, e é estimulada a partir da inflamação mediada por citocinas como interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6). Esse peptídeo

controla a homeostase celular do ferro se ligando à ferroportina causando sua degradação e o bloqueio da sua entrada na célula. Isso resulta da diminuição da ingestão dietética de ferro e também pela falha na reciclagem pelos macrófagos (RAJ, 2009; MACDOUGALL, 2011; RISHI et al., 2015).

É possível mensurar os níveis de hepcidina, o que pode ser muito útil no diagnóstico de doenças associadas a alterações hematológicas (ROCHETTE et al., 2015).

A inflamação também afeta o principal hormônio envolvido na maturação de células vermelhas do sangue, a eritropoetina (MACDOUGALL, 2011). Citocinas inibidoras como fator de necrose tumoral e IL-1 reduzem a síntese da eritropoetina, além disso, seu efeito sobre a medula fica comprometido devido à diminuição da expressão dos receptores de eritropoetina nas células progenitoras eritróides e pela disponibilidade limitada de ferro (WEISS, 2015).

Adicionalmente, os interferons do tipo I e II e os radicais livres atuam inibindo a proliferação e diferenciação das células eritróides, todos esses mecanismos resultam em anemia normocítica normocrômica (FLEISCHMAN, 2012).

A anemia está associada à progressão da DRC devido à hipóxia, diminuição do fluxo sanguíneo e estresse oxidativo de hemácias como resultado das altas concentrações das citocinas inflamatórias (BARTGES, 2012; KOGIKA et al., 2015).

A principal causa da anemia na DRC é a deficiência de eritropoetina, resultante da perda de células peritubulares nos rins. Associado à deficiência, também ocorre a perda da habilidade das células progenitoras em responder à ação da eritropoetina (MACDOUGALL, 2011; FLEISCHMAN, 2012).

A liberação da eritropoetina ocorre como resultado da hipóxia que a anemia provoca nos doentes, em seguida fatores indutores de hipóxia são ativados. Esses fatores além de estimularem a síntese da eritropoetina, promovem um aumento da absorção intestinal de ferro pela indução da expressão de ferroportina e afeta negativamente a formação da hepcidina (WEISS, 2015).

O sistema renina-angiotensina possui efeito regulador da eritropoese através de mecanismos complexos via receptores de angiotensinogênio. O processo tem início com a elevação plasmática da eritropoetina que ativa o sistema e restaura a eritrocitose normal, por isso, a inibição do sistema renina-angiotensina com o uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina tem sido incriminado na falha da eritropoese (KATO et al., 2015).

Em estágios avançados da DRC os cães comumente desenvolvem hiperparatiroidismo secundário renal que em casos extremos resulta em osteodistrofia fibrosa que pode acometer a medula óssea e comprometer a eritropoese, principalmente nos pacientes cuja DRC é de origem genética (BARTGES, 2012).

4.2.3 AGENTES ESTIMULANTES DA ERITROPOESE

A anemia por DRC é resultante principalmente da deficiência de eritropoetina, e, portanto, a terapia padrão consiste na administração de agentes estimulantes da eritropoese, no entanto a terapia deve ser direcionada também para as causas primárias tratáveis da doença renal (POLZIN, 2013; KUWAHARA et al., 2015).

As opções de tratamento incluem a reposição de eritropoetina, esteroides anabólicos e a correção de fatores que contribuem para a perda de sangue ou falha na sua produção (POLZIN, 2013).

A terapia com reposição de eritropoetina a base de eritropoetina recombinante humana e a darbopoetina alfa geralmente é efetiva em cães, entretanto, apesar do aumento dose-dependente do hematócrito, o desenvolvimento de anticorpos direcionados à eritropoetina torna o tratamento ineficaz (BARTGES, 2012).

A eritropoetina recombinante tem sido amplamente empregada no tratamento da anemia por DRC, além dos seus efeitos na eritropoese, apresenta respostas citoprotetoras em diversos tecidos não hematopoiéticos, inibe a indução de genes proinflamatórios. Em ratos esses efeitos citoprotetores se mostraram efetivos contra a falência renal aguda induzida por rabiomiólise (YANG et al., 2012).

Seu uso é recomendado em cães de estágio avançado, geralmente estágios três e quatro da DRC, quando o hematócrito está abaixo de 22%, mas o uso contínuo e a indução de anticorpos podem tornar o paciente dependente de transfusões sanguíneas (POLZIN, 2011). Apesar desses efeitos, o tratamento quando efetivo, induz a resposta de reticulócitos em três a quatro dias após a administração parenteral e a concentração de hemoglobina se eleva após duas semanas do início da terapia (MACDOUGALL, 2011).

A darbopoetina é um agente eritropoiético de segunda geração cuja ação é aproximadamente três vezes maior que a da eritropoetina, além de reduzir substancialmente a produção de anticorpos anti-eritropoetina. O seu uso implica em uma fase de indução, que corrige a anemia, e uma fase de manutenção, que sustenta o volume celular normal (POLZIN, 2013).

Esse agente difere da eritropoetina recombinante humana pela substituição de cinco aminoácidos e adição de dois carboidratos, conferindo à darbopoetina a estabilidade *in vivo* responsável por sua prolongada meia vida. Um aumento no volume celular ocorre em duas a três semanas, e em função do seu forte efeito eritropoiético, a suplementação parenteral de ferro é recomendada no início do tratamento (MACDOUGALL, 2011; POLZIN, 2013).

A frequência de administração é reduzida quando o volume celular atinge 25 a 35%, para isso, o volume celular deve ser mensurado semanalmente na fase de indução e a cada duas semanas na fase de manutenção (POLZIN, 2013).

O uso de agentes eritropoiéticos exige um monitoramento do *status* de ferro pela mensuração de ferritina sérica, saturação de transferrina e observação de células hipocrômicas no sangue, além disso, os efeitos adversos associados à terapia incluem aumento da pressão arterial e trombose (BARTGES, 2012). A resposta ao tratamento vai depender do estado nutricional, concentração de ferro, inflamação, desordens minerais e ósseas, proteinúria e do uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina (KUWAHARA et al., 2015).

A deficiência de ferro é comum na DRC, como resultado a suplementação é instituída, mas a absorção intestinal de ferro está prejudicada nesses animais pela ação da hepcidina. Por isso, a suplementação via oral

deve ser evitada. Preparações incluem carboximaltose férrica, sacarose e gluconato de ferro, no entanto a administração parenteral apresenta o risco de reações anafiláticas (MACDOUGALL, 2011).

4.3 Características da Medula Óssea na DRC

A avaliação da medula óssea é indicada quando anormalidades hematológicas são observadas nos exames de rotina, a indicação mais comum é quando uma ou mais citopenias estão presentes ou quando todas as três linhagens hematopoiéticas estão alteradas (RASKIN, 2012).

O aspirado de medula óssea é realizado com mais frequência do que a biópsia, devido à facilidade de obtenção e processamento, apesar da biópsia oferecer resultados mais acurados quanto à celularidade e diferenciação entre aplasia medular e mielofibrose (MORAES; TAKAHIRA, 2010). O aspirado obtido por meio de punção do Esterno em cães é uma ferramenta útil e bem tolerada para complementar a avaliação hematopoiética de cães com anemia por DRC (BORIN-CRIVELLENTI et al., 2014)

Nos cães com DRC, a anemia progressiva observada nos animais que sobrevivem por vários meses constitui uma consequência comum que frequentemente resulta em aspirados medulares hipoproliferativos (MACDOUGALL, 2011).

Dentre os achados medulares comuns à DRC, os mais frequentes são a pan hipoplasia e a hipoplasia eritróide (WEISS, 2006). A aplasia medular quando observada nos cães com doença renal geralmente está associada à uma causa infecciosa como a erliquiose (MORAES; TAKAHIRA, 2010).

A análise dos estoques de ferro na medula óssea por meio da coloração com Azul da Prússia auxilia no diagnóstico da anemia por deficiência de ferro, uma consequência comum na DRC. O diagnóstico da deficiência é concluído quando os estoques estão totalmente esgotados. No entanto, apesar de ser considerado padrão ouro no diagnóstico, erros de coleta e avaliação podem induzir a resultados pouco confiáveis, devendo ser realizados na rotina clínica por investigadores experientes (HARVEY, 2001; COOK, 2005; MACDOUGALL, 2011).

REFERÊNCIAS

ASGARALI, Z.; PARGASS, I.; ADAM, J.; MUTANI, A.; EZEOKOLI, C. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, n. 3, p. 207–211, 2012.

AALTONEN, P.; HOLTHÖFER, H. Nephrin and related proteins in the pathogenesis of nephropathy. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, n. 1, p. 21-27, 2007.

BARTGES, J.W. Chronic kidney disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of Small Animal**, n. 42, p. 669–692, 2012.

BENALI, S.L.; LEES, G.E.; CASTAGNARO, M.; ARESU, L. Epithelial mesenchymal transition in the progression of renal disease in dogs. **Histology and Histopathology**, n. 29, p. 1409-1414-000, 2014.

BONOMINI, M.; SIROLLI, V. Uremic toxicity and anemia. **Journal of Nephrology**, n. 16, p. 21-28, 2003.

BORIN-CRIVELLENTI, S.; CRIVELLENTI, L.Z.; CARVALHO, M.B.; SANTANA, A.E. Bone marrow cytological evaluation in dogs with chronic kidney disease **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 6, p. 1751-1756, 2014.

CAMASCHELLA, C.; NAI, A. Ineffective erythropoiesis and regulation of iron status in iron loading anaemias. **British Journal of Haematology**, v. 172, n. 4, p. 512-523, 2015.

CAR, B. D. Erythropoiesis and erythrokinetics. *In*: FELDMAN, B. F., ZINKL, J. G., JAIN N. C. Schalm's Veterinary Hematology, 5 ed., Philadelphia: **Willians & Wilkins**, cap. 18, p. 105-109, 2000.

CIANCIOLO, R.E.; MOHR, F.C.; ARESU, L.; BROWN, C.A.; JAMOS, C.; JANSEN, J.H.; SPANGLER, W.L.; VAN DER LUGT, J.J.; KASS, P.H.; BROVIDA, C.; COWGILL, L.D.; HEIENE, R.; POLZIN, D.J.; SYME, H.; VADEN, S.L.; VAN DONGEN, A.M.; LEES, G.E.. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of glomerular diseases in dogs. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 1, p. 113-135, 2016.

COBRIN, A.R.; BLOIS, S.L.; KRUTH, S.A.; ABRAMS-OGG, A.C.G.; DEWEY, C. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, n. 54, p. 647–655, 2013.

COOK, J.D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 319–332, 2005.

DUROCHER, L.; HINCHCLIFF, K.; WILLIAMSON, K.; MCKENZIE, E.; HOLBROOK, T.; WILLARD, M.; ROYER, C.; DAVIS, M. Lack of microalbuminuria in sled dogs following exercise. **Equine and Comparative Exercise Physiology**, v. 3, n. 1, p. 1–2, 2006.

ECKHOFF, A.; BONAKDAR, N.; ALONSO, J.L.; HOFFMANN, B.; GOLDMAN, W.H. Glomerular podocytes: A study of mechanical properties and mechanochemical signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 406, p. 229–233, 2011.

FIEDLER, K.; BRUNNER, C. Mechanisms controlling hematopoiesis. **Hematology- Science and Practice**, n. 3, p. 47, 2012.

FLEISCHMAN, W. Anemia: Determining the cause. **Compendium**, p. E01-E09, 2012.

FRAME, J.M.; McGRATH, K.E.; PALIS, J. Erythro-myeloid progenitors: “Definitive” hematopoiesis in the conceptus prior to the emergence of hematopoietic stem cells. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, n. 51, p. 220-225, 2013.

GARG, P.; HOLZMAN, L.B. Podocytes: Gaining a foothold. **Experimental Cell Research**, n. 318, p. 955-963, 2012.

GEDDES R.F.; FINCH, N.C.; SYME, H.M.; ELLIOT, J. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. **Journal of veterinary Emergency Critical Care**, n. 23, p. 122-33, 2013.

GLICKMAN, L.T.; GLICKMAN, N.W.; MOORE, G.E.; LUND, E.M.; LANTZ, G.C.; PRESSLER, B.M. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 99, p. 193–200, 2011.

HARVEY, J.W. Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia: **W. B. Saunders Company**, 2001.

HOKAMP, J.A.; CIANCIOLO, R.E.; BOGGESS, M.; LEES, G.E.; BENALI, S.L.; KOVARSKY, M.; NABITY, M.B. Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 30, p. 591–601, 2016.

HOKAMP, J.A.; NABITY, M.B. Renal biomarkers in domestic species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 28–56, 2016.

ICHII, O.; YABUKI, A.; SASAKI, N.; OTSUKA, S.; OHTA, H.; YAMASAKI, M.; TAKIGUCHI, M.; NAMI, Y.; HASHIMOTO, Y.; ENDOH, D.; KON, Y. Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. **Histology and Histopathology**, n. 26, p. 1243-1255, 2011.

IRIS: IRIS staging of CKD. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.shtml>. Acesso em: 04 de Fevereiro de 2016.

LEES, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, n. 34, p. 867-885, 2004.

JAIN, N. C. Essentials of veterinary hematology. Philadelphia: **Lea & Febiger**, p. 417, 1993.

JEFFERSON, J.A.; ALPERS, C.E.; SHANKLAND, S.J. Podocyte biology for the bedside. **American Journal of Kidney Disease**, v. 58, n. 5, p. 835-845, 2011.

KATO, H.; ISHIDA, J.; MATSUSAKA, T.; ISHIMARU, T.; TANIMOTO, K.; SUGIYAMA, F.; YAGAMI, K.; NANGAKU, M.; FUKAMIZU, A. Erythropoiesis and blood pressure are regulated via AT1 receptor by distinctive pathways. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-15, 2015.

KOBAYASHI, R.; KAMIIE, J.; YASUNO, K.; OGIHARA, K.; SHIROTA, K. Expression of Nephritin, Podocin, α -Actinin-4 and α 3-Integrin in canine renal glomeruli. **Journal of Comparative Pathology**, n. 145, p. 220-225, 2011.

KOGIKA, M.M.; LUSTOZA, M.D.; HAGIWARA, M.K.; CARAGELASCO, D.S.; MARTORELLI, C.R.; MORI, C.S. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, n. 44, p. 70-78, 2015.

KOUTINAS, A.F.; KOUTINAS, C.K. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. **Veterinary Pathology**, n. 51, v. 2, p. 527-38, 2014.

KUWAHARA, M.; ARAI, Y.; TAKEHARA, E.; SASAKI, Y.; YOSHIMINE, T.; KUSAKA, K.; SHIKUMA, S.; AKITA, W.; USHIDA, S. Early response to erythropoiesis-stimulating agents in non-dialysis chronic kidney disease patients. **Clinical and Experimental Nephrology**, 2015.

LAVOUÉ, R.; TRUMEL, C.; SMETS, P.M.Y.; BRAUN, JP.; ARESU, L.; DAMINET, S.; CONCORDET, D.; PALANCHÉ, F.; PEETERS, D. Characterization of proteinuria in Dogue de Bordeaux dogs, a breed predisposed to a familial glomerulonephropathy: A retrospective study. **PLoS One**, n. 10, v. 7, p.16, 2015.

LEEuwIS, J.W.; NGUYEN, T.Q.; DENDOOVEN, A.; KOK, R.J.; GOLDSCHMEDING, R. Targeting podocyte-associated diseases. **Advanced Drug Delivery Reviews**, n. 62, p.1325–1336, 2010.

LIEN, Y.; HSIANG, T.; HUANG, H. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. **Acta Veterinaria Scandinavica**, n. 52, p. 61, 2010.

LÓPEZ-NOVOA, J.M.; RODRÍGUEZ-PEÑA, A.B.; ORTIZ, A.; MARTÍNEZ-SALGADO, C.; HERNÁNDEZ, F.J.L. Etiopathology of chronic tubular, glomerular and renovascular nephropathies: Clinical implications. **Journal of Translational Medicine**, n.13, p. 2-26, 2011.

MACDOUGALL, I.C. Anaemia and chronic renal failure. **Medicine**, n. 39, p. 425-429, 2011.

MORAES, L.F.; TAKAHIRA, R.K. Aplasia medular em cães. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 9, n. 1, p. 99-108, 2010.

MURGIER, P.; JAKINS, A.; BEXFIELD, N.; ARCHER, J. Comparison of semiquantitative test strips, urine protein electrophoresis, and an immunoturbidimetric assay for measuring microalbuminuria in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 485–492, 2009.

PALIS, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. **Frontiers in Physiology**, n. 5, p. 1-9, 2014.

PANCIERA, D.L.; LEFEBVRE, H.P. Effect of experimental hypothyroidism on glomerular filtration rate and plasma creatinine concentration in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 23, p. 1045–1050, 2009.

PATRAKKA, J.; TRYGGVASON, K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, n. 396, p. 164–169, 2010.

POLZIN, D.J. Chronic kidney disease in small animals. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, n. 41, p. 15–30, 2011.

POLZIN, D.J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, n. 23, p. 205–215, 2013.

PRESSLER, B.M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, n. 43, p. 1193–1208, 2013.

RAJ, D.S.C. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 38, n. 5, p. 382-388, 2009.

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

RISHI, G.; WALLACE, D.F.; SUBRAMANIAM, V.N. Heparin: regulation of the master iron regulator. **Bioscience Reports**, n. 35, v. 3, p1-12, 2015.

ROCHETTE, L.; GUDJONCIK, A.; GUENANCIA, C.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target? **Pharmacology & Therapeutics**, n. 146, p. 35–52, 2015.

SATIRAPOJ, B.; NAST, C.C.; ADLER, S.G. Novel insights into the relationship between glomerular pathology and progressive kidney disease. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 19, n. 2, p. 93-100, 2012.

SCHAEFER, H.; KOHN, B.; SCHWEIGERT, F.J.; RAILA, J. Quantitative and Qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 25, p. 1292–1297, 2011.

SCHNEIDER, S.M.; CIANCIOLO, S.E.; NABITY, M.B.; CLUBB Jr, F.J.; BROWN, C.A.; LEES, G.E. Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007–2012). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 27, p. S67–S75, 2013.

SEGEV, G.; PALM, C; LEROY, B.; COWGILL, L.D.; WESTROPP, J.L. Evaluation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 27, p. 1362–1367, 2013.

SMETS, P.M.Y.; MEYER, E., MADDENS, B.E.J., DUCHATEAU, L.; DAMINET, S. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 24, p. 65–72, 2010.

STEINBACH, S.; BINKERT, B.; SCHWEIGHAUSER, A.; REYNOLDS, B.; SE´GUE´, J.; LEFEBVRE, H.; FRANCEY, T. Quantitative assessment of urea generation and elimination in healthy dogs and in dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 24, p. 1283–1289, 2010.

STEINBACH, S.; WEIS, J.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T.; NEIGER, R. Plasma and urine neutrophil gelatinase–associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 28, p. 264–269, 2014.

STOKES, J.E.; FORRESTER, S.D. New and unusual causes of acute renal failure in dogs and cats. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, n. 34, p. 909-922, 2004.

SZETO, C.C.; LAI, K.B.; CHOW, K.M.; SZETO, C.Y.K.; YIP, T.W.C.; WOO, K.S.; LI, P.K.T.; LAI, F.M.M. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. **Clinica Chimica Acta**, n. 361, p. 182–190, 2005.

VADEN, S.L. Glomerular disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 128-134, 2011.

WAKI, M.F.; MARTORELLI, C.R.; MOSKO, P.E.; KOGIKA, M.M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, n. 40, p. 2226-2234, 2010.

WEISS, D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n. 20, p. 955–961, 2006.

WEISS, G. Anemia of chronic disorders: new diagnostic tools and new treatment strategies. **Seminars in Hematology**, v. 52, n. 4, p. 313–320, 2015.

YANG, F.; SUBEQ, Y.; CHIU, Y.; LEE, R.; LEE, C.; HSU, B. Recombinant human erythropoietin reduces rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats. **Injury**, n. 43, p. 367-373, 2012.

YABUKI, A.; MITANI, S.; FUJIKI, M.; MISUMI, K.; ENDO, Y.; MIYOSHI, N.; YAMATO, O. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. **Research in Veterinary Science**, n. 88, p. 294–299, 2010.

ANEXO A

ARTIGO 1: Relation between anaemia and bone marrow features and serum erythropoietin in dogs with chronic kidney disease.

Artigo submetido à Pesquisa Veterinária Brasileira (Qualis A2).

Qualis 2014

Área de Avaliação
 MEDICINA VETERINÁRIA

ISSN:

Título:
 Pesquisa Veterinária Brasileira

Classificação:
 A2

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0100-736X	Pesquisa Veterinária Brasileira (Impresso)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2
1678-5150	Pesquisa Veterinária Brasileira (Online)	MEDICINA VETERINÁRIA	A2

Relation between anaemia and bone marrow features and serum erythropoietin in dogs with chronic kidney disease

Mariana M. Torres^{1*}, Felipe A.C.S. Cruz¹, Érica P. Silva¹, Daiane Poletto¹, Mayara A.A. Cayuela¹, Adriane J. Mendonça¹, Arleana B.P.F. Almeida¹, Valéria R.F. Sousa¹

ABSTRACT

Chronic anaemia is one of the most severe complications of chronic kidney disease, contributing to the morbidity and mortality caused by the disease; therefore, bone marrow cytological evaluations are needed to monitor the progression of anaemia. Thus, this study aimed to correlate the anaemia in dogs at different stages of chronic kidney disease to their serum biochemistry, myelogram results and serum erythropoietin findings. Sixty-three dogs were grouped according to International Renal Interest Society (IRIS) classification in stages 1, 2, 3 and 4. Haematologic, serum and urinary biochemistry and serum erythropoietin were performed for comparison with the findings of the bone marrow cytology obtained by aspiration of the manubrium. Cytological findings for erythroid hypoplasia were described in 93.65% of dogs, and the anaemia was observed in 84.1% of dogs. The haematological findings were correlated with azotaemia ($p < 0, 05$). It was concluded that the erythroid hypoplasia has correlation with persistent anaemia in dogs at all stages of chronic kidney disease, with iron deficiency in dogs in the early stages and with the peripheral destruction of erythrocytes caused by azotaemia.

INDEX TERMS: Renal, erythrocytes, myelogram, iron metabolism, cytology.

RESUMO

[Relação entre anemia e achados de medula óssea e eritropoetina sérica em cães com doença renal crônica]

A anemia crônica é umas das complicações mais graves da doença renal crônica, contribuindo para a morbidade e mortalidade causada pela doença; Portanto, a avaliação citológica da medula óssea é necessária para monitorar a progressão da anemia. Assim, esse estudo objetivou correlacionar a anemia em cães em diferentes estágios da doença renal crônica aos achados de bioquímica sérica, mielograma e concentração sérica de eritropoietina. Sessenta e três cães foram agrupados de acordo com a classificação da International Renal Interest Society (IRIS) em estágios 1, 2, 3 e 4. Foram realizadas análises hematológicas, bioquímicas séricas e urinárias, e dosagem sérica de

eritropoetina para comparação com os achados medulares obtidos por citologia aspirativa do manúbrio. Os achados citológicos de hipoplasia eritróide foram descritos em 93,65% dos cães, e a anemia foi observada em 84,1% dos cães. Os resultados hematológicos foram correlacionados com azotemia ($p < 0,05$). Concluiu-se que a hipoplasia eritróide teve associação com a anemia persistente em cães em todas as fases de doença renal crônica, com deficiência de ferro em cães em fases iniciais e com a destruição periférica dos eritrócitos causada pela azotemia.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Renal, eritrócitos, mielograma, metabolismo do ferro, citologia.

INTRODUCTION

Chronic anaemia, usually of the normocytic normochromic nonregenerative type, is a common and invariable complication of chronic kidney disease (CKD), resulting from decreased erythrocyte half-life, iron and folic acid deficiency, the action of uremic toxins and, especially, erythropoietin deficiency (Waki et al. 2010, Macdougall 2011, Polzin 2011, Zadrazil & Horak 2014).

In humans, CKD anaemia is correlated with cardiovascular disturbances and other comorbidities (Palmer et al. 2010). Similarly, in dogs, the production of erythropoietin is markedly reduced in CKD, leading to anaemia that is difficult to treat. With any of the several treatments proposed to treat anaemia associated with CKD, regardless of the adopted therapy, the mensuration of erythropoietin serum concentration as a part of therapeutic monitoring is fundamental (Giampaoli et al. 2003)..

The cytological evaluation of bone marrow allows for the analysis of a patient's response to the progression of the anaemia, acting as another important tool for monitoring the development of the CKD. The anaemia becomes more evident in advanced stages of CKD, compromising the quality of life and contributing to the high morbidity and mortality of the dogs (IRIS 2013, Zadrazil & Horak 2014, Kogika et al. 2015).

Therefore, this study aimed to correlate the anaemia in dogs at different stages of CKD with their serum biochemistry, myelogram results and erythropoietin serum concentration.

MATERIAL AND METHODS

Animals

This study was approved and conducted in accordance with the recommendations of the Animal Care and Use Ethics Committee of the University of Mato Grosso (protocol # 23108.043331/12-9 CEUA).

The prospective study included dogs of different breeds and both sexes with CKD. As inclusion criteria, were selected dogs with or without anaemia, presenting azotaemia and hyposthenuria and which have not undergone to any treatment for this condition, as well as for high blood pressure. They were grouped according to the International Renal Interest Society (IRIS 2013) criteria, based on the creatinine serum concentration in: stage 1 (< 1.4 mg/dl), stage 2 (1.4 - 2.0 mg/dl), stage 3 (2.1 - 5 mg/dl) and stage 4 (\geq 5 mg/dl). The substaging was determined through the assessment of the systolic blood pressure, measured in triplicate in all dogs by oscillometry (Pet Map[®], Rio de Janeiro, Brazil), and of the presence of proteinuria by urine protein-to-creatinine (UPC) ratio.

Blood, urine and bone marrow samples were obtained from dogs for the following diagnostic tests: Complete blood count (CBC), serum and urinary biochemistry, urinalysis, dosage of serum erythropoietin and myelogram.

Another group comprising healthy dogs of different breeds and both sexes was used to obtain reference parameters, with those dogs presenting haematological, biochemical and urinary disorders being excluded.

Complete Blood Count and Biochemistry

For the CBC, the haematocrit, haemoglobin, red blood count, mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), mean corpuscular volume (MCV) and platelet count were assessed with an automatic analyser (Sysmex poch- 100iV, São Paulo, Brazil).

The serum biochemistry were assessed with a semiautomatic analyser (Celm SB-190[®], São Paulo, Brazil) and commercial kits (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, Brazil) to determine levels of urea, creatinine, iron, total iron binding capacity (TIBC), calcium and phosphorus. The UPC ratio was obtained by calculating the ratio of the amount of urinary protein and urinary creatinine determined with a semiautomatic analyser (Celm SB-190[®], São Paulo, Brazil) and commercial kits (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, Brazil), according to Castro et al. (2009).

Myelogram

Marrow aspirates were obtained from the manubrium of each dog, with EDTA (3%) being used as the anticoagulant. Then, the smears containing bone spicules were submitted to Romanowsky staining.

The evaluation was based on cellular identification according to the morphotinctorial features of the cells. A total of 500 cells were counted and the percentages of erythroid and myeloid cells and the myeloid/erythroid ratio were calculated, and the cytological findings were described. The cellularity of bone marrow was estimated by examining the proportion of cells versus fat, considering as a hypocellular marrow when the particles were composed of more than 75% of fat (Harvey 2001).

Reference values were those previously described (Harvey 2001, Weiss & Smith 2002).

Serum Erythropoietin

The serum erythropoietin in dogs was determined with an ELISA sandwich approach using a canine-specific commercial kit (Cloud-Clone Corp.[®], Houston, TX, USA).

Statistical Analysis

The normality of the data was determined using the Kolmogorov-Smirnov test. An analysis of variance was employed for comparisons among the CKD stages, and the Pearson's correlation coefficient was applied to the data on the bone marrow findings. The statistical analyses were performed with GraphPad Prism 4 software.

RESULTS

Sixty-three dogs, including 29 females and 34 males, with a mean age of 6.7 years (ranging from one to 16 years) and of varied breeds, composed the CKD group. Nine healthy dogs of different breeds, six males and three females with an average age of three years (one to five years), comprised the control group.

Among the CKD dogs, 11 were classified as being in stage 1, eight were classified as being in stage 2, 22 were classified as being in stage 3 and 22 were classified as being in stage 4. Sub-staging was determined by systolic blood pressure and by the UPC ratio, with all dogs showing proteinuria (> 0.5) and hyposthenuria, along with a specific urinary gravity ranging from 1008 to 1018.

A high systolic blood pressure (≥ 180 mmHg) was observed in 34% of the dogs, with a predominance occurring in stage 4 in comparison with the other stages ($p = 0.02$).

Clinical signs observed in CKD dogs ranged in severity from occasional vomiting (47.6%) and inappetence (93.6%) to severe anorexia (19%), frequent vomiting (52.4%), tongue necrosis (1.6%) and pale mucosa (62.26%).

Regarding the erythrogram, all the assessed parameters, except MCV and MCHC, declined as the CKD progressed, which characterizes the normocytic normochromic anaemia observed in 84.1% of the dogs. Of these, 37.5% had severe anaemia (haematocrit \leq 20%) with reticulocytosis indexes ranging from zero to 13.2% (mean 2.7%), and 11.1% presented normocytic hypochromic anaemia.

The red blood count, haematocrit and haemoglobin levels showed statistically significant differences only compared to those of the control dogs ($p \leq 0.05$). Thrombocytopenia occurred in 39.6% of the anaemic dogs; however, there was no significant difference ($p = 0.81$) among the CKD stages.

No significant difference ($p = 0.37$) between stages was observed for the myeloid/erythroid ratio, as determined from the myelogram. The marrow findings (Figure 1) of the CKD dogs are described in Table 1.

Table 1. Cytologic features of the bone marrow in dogs with chronic kidney disease.

Parameters	N°	%
Normal cellularity	38	60.31
Myeloid hyperplasia	20	31.74
Megakaryocytic hyperplasia	05	7.93
Erythroid hypoplasia	59	93.65
Myeloid hypoplasia	04	6.35
Lymphocytosis	06	9.52
Plasmocytic hyperplasia	07	11.11
Dysgranulopoiesis	05	7.93
Myelodysplastic syndrome	02	3.17

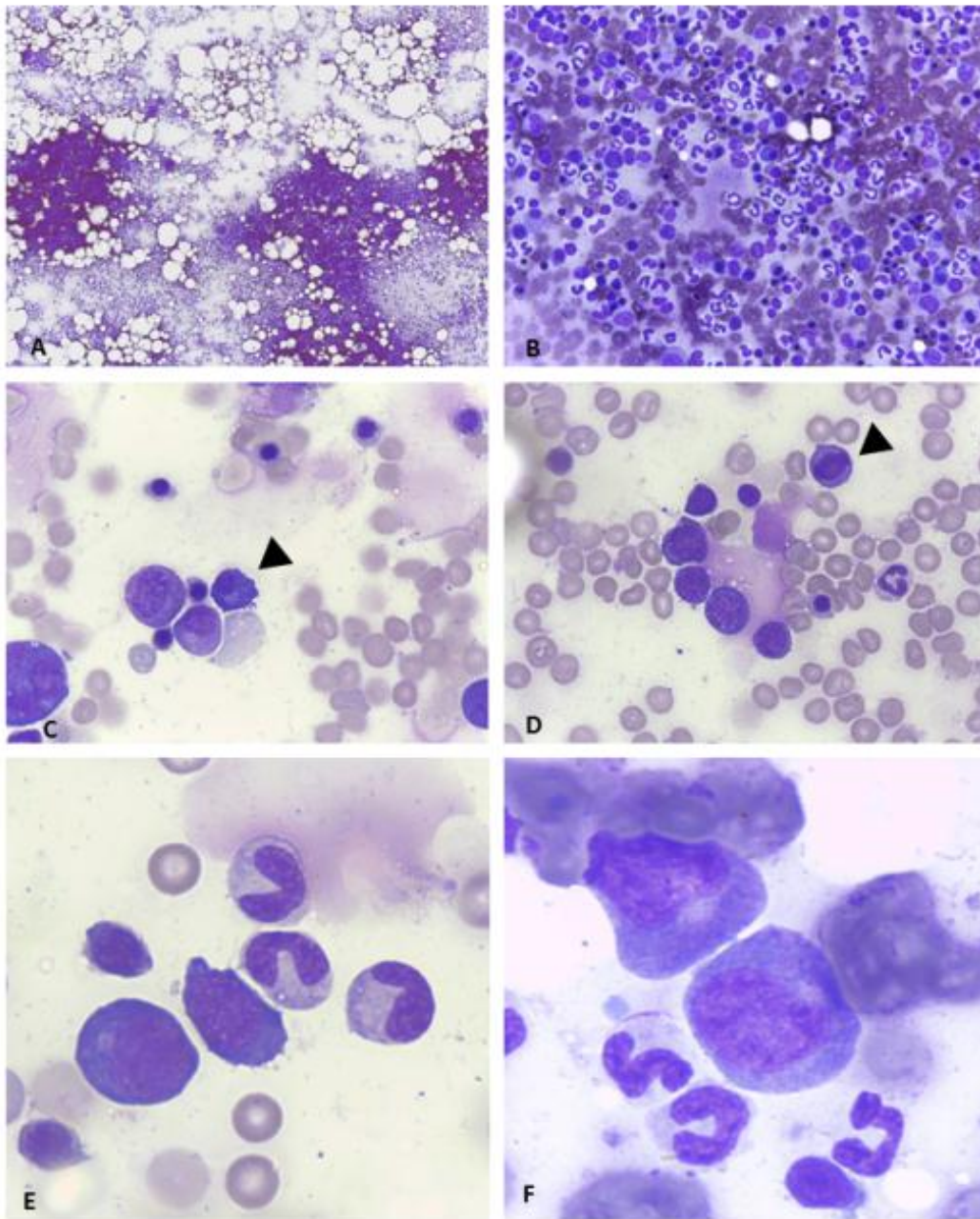


Figure 1. Bone marrow aspirate in a dog with chronic kidney disease in stage 4 (Romanowsky stain). A. The normal marrow cellularity (x10). B. Myeloid cells in higher proportion than erythroid, presence of several plasmocytes (x40). C. Plasmocyte (arrow head; x100). D. Dyserythropoiesis (arrow head) and prorubricytes (x100). E. Two band cells and metamyelocyte (x100) F. Myeloblasts and band cells (x100).

In the serum biochemistry, the calcium, phosphorus, total iron binding capacity and iron concentrations did not show significant differences among the CKD stages, except for the serum phosphorus, which showed a significant difference in dogs at stage 4 in comparison to the control group (Table 2).

The concentration of erythropoietin was determined in 44 of the 63 dogs in the study. The values obtained were not correlated with the bone marrow or erythrogram findings.

Table 2. Summary of the serum concentration statistics for calcium (Ca), phosphorus (P), iron, iron binding capacity (TIBC) and erythropoietin (EPO) in the diseased and control groups

Parameters	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Control
	n= 11	n= 08	n= 22	n= 22	n= 09
Ca (mg/dl)					
Mean	11.44	10.45	11.18	11.78	12.52
Median	11.57	10.53	11.50	11.40	12.54
Standard deviation	1.66	0.96	3.33	2.38	0.51
p-value*	0.7				
P (mg/dl)					
Mean	2.08	1.75	2.97	3.58a	1.1a
Median	1.45	1.60	2.20	3.20	1.1
Standard deviation	1.75	0.88	1.95	1.95	0.12
p-value*	0.04				
Iron (µg/dl)					
Mean	195.8	145.8	146.4	109.0	233.8
Median	193.0	115.0	128.5	83.00	230.0
Standard deviation	89.93	85.48	108.1	112.3	113.0
p-value*	0.07				
TIBC (µg/dl)					
Mean	565.6	599.8	556.7	572.1	478.8
Median	584.0	590.5	487.0	528.0	506.0
Standard deviation	92.19	65.22	204.7	200.2	139.8
p-value*	0.83				
EPO**					

Mean	1421	-	1474	1461	1499
Median	1469	-	1480	1484	1501
Standard deviation	112.1	-	51.61	80.23	18.09
p- value*	0.27				

*Analysis of variance (Ca, P, Iron, TIBC, EPO: control vs stages); **a** (means followed by the same letter in the same row differ at the 5% level of significance)

** Evaluated in 44 dogs (39 CKD; 5 controls)

Among the dogs diagnosed with erythroid hypoplasia, 19 presented with haematocrit $\leq 20\%$, and nine of them did not present reticulocytosis. Additionally, whereas megakaryocytic hyperplasia was present in five dogs; two of these also presented with thrombocytopenia.

Myelodysplastic syndrome was described in two dogs based on the presence of dysmyelopoiesis and rubriblasts observed in 7 to 18% of the nucleated cells.

Serum iron levels were correlated with erythroid precursors, with a significant correlation with the myeloid/erythroid ratio ($r = -0.95$) and the percentage of rubriblasts ($r = -0.89$), rubricytes ($r = 0.89$) and metarubricytes ($r = 0.91$) being observed in stage 2 dogs, whereas in stage 4 dogs, a correlation was observed only with the myeloid/erythroid ratio ($r = 0.66$).

The haematocrit of all dogs was correlated with the serum biochemistry, serum levels of erythropoietin and the myeloid/erythroid ratio, as shown in Table 3.

Table 3. Spearman's rank correlation between the haematocrit and the myeloid/erythroid ratio (MER), serum iron, total iron binding capacity (TIBC), calcium, phosphorus, urea, creatinine and erythropoietin (EPO) in diseased dogs.

Variables	r	p-value
Haematocrit and MER	0.13	0.49
Haematocrit and Iron	0.10	0.39
Haematocrit and TIBC	-0.13	0.35
Haematocrit and Calcium	-0.02	0.86
Haematocrit and Phosphorus	0.09	0.45
Haematocrit and Urea	-0.33	0.003
Haematocrit and Creatinine	-0.27	0.01
Haematocrit and EPO	0.0006	0.99

Bold, significant difference.

DISCUSSION

According to the IRIS (2013) classification for CKD, the initial stages of 1 and 2 tend to be subclinical, explaining why most of the dogs in this study belong to stages 3 and 4. These dogs were also classified as proteinurics and hypertensives in all CKD stages, with systolic blood pressure higher than 180 mmHg observed predominantly in stage 4. Proteinuric and/or hypertensive patients can present clinical manifestations in the early stages of CKD; therefore, the classification and sub-staging proposed by IRIS (2013) allows the assessment of renal damage and associated complications, which can serve as a prognostic factor (Waki et al. 2010, Polzin 2011).

Although there is no breed or age predilection (Polzin 2011), the morbidity and mortality occur predominately in elderly patients (Lees 2004), as demonstrated by the dogs in this study.

In humans with kidney disease, a strong correlation exists between the degree of anaemia and a risk of morbidity and mortality from cardiovascular diseases (Locatelli et al. 2003). Although this correlation was not significant in our study, the fact that 34% of the CKD dogs were hypertensive (systolic blood pressure \geq 180 mmHg), exhibited increased azotaemia, and were in the advanced stages classifies these dogs as critically ill.

In CKD dogs, the azotaemia, acting mainly on the haematocrit, proved to be a major factor in the persistence of anaemia ($p < 0.05$) due to the progressive deterioration in renal function, culminating with decreased haemoglobin concentration, which becomes evident when the glomerular filtration rate declines (Macdougall 2011).

The effects of uremia on the oxidative stress in erythrocytes in anaemic dogs with CKD was previously studied, and although no correlation was demonstrated, anaemia is associated with reduced erythrocyte lifespan (Kogika et al. 2015). Although the oxidative stress assessment has not been performed in our study, the uremia described could be one of the factors involved in chronic anaemia and a possible cause for the described peripheral alterations due to the significant correlation among the haematocrit and azotaemia observed in our study.

Furthermore, hyperphosphatemia contributes to this process, mainly in the advanced stages of CKD, as observed in the dogs in stage 4. Serum phosphorus level elevation, in association with normal calcium levels, were also reported in a majority of dogs in a previous study (Kogika et al. 2006). In CKD, such an imbalance can be

observed from the earliest stages of the disease (Cortadellas et al. 2010) and may result in renal secondary hyperparathyroidism, which implies a lower survival for these dogs (Geddes et al. 2013).

Regarding the serum iron concentrations, although no differences were observed among the stages, the effect of these concentrations on erythroid cells, primarily in stages 2 and 4, show that iron acts on mature cell lines in one way and, curiously, in an inverse way on immature cell lines. This mild anaemia may be the result of inflammatory disease and, additionally, it reduces the erythrocyte lifespan and its responsiveness to the anaemia due to low erythropoietin synthesis and iron deficiency, thereby culminating in limited erythropoiesis (Almeida et al. 2009).

Iron serum dosage is one of the confirmation methods of this deficiency when the haematological findings suggest hypochromic microcytic anaemia, this diagnosis can be affirmed based on our results which prove that in CKD, the occurrence of hyposideremia has lower relation with anaemia. Furthermore, microcytosis is a good indicator of iron deficiency only when MCV values are extremely low, and this situation, which was not reported in our study, is related to blood loss (Paltrinieri et al. 2010).

As previously shown, differences between the means of the serum levels of erythropoietin and iron in the different CKD stages were not observed and did not correlate with the myelogram and CBC findings; however, the normal values of the myeloid/ erythroid ratio in anaemic dogs and the low reticulocytosis indexes in 47.3% of the dogs with erythroid hypoplasia indicate erythropoiesis suppression. Macdougall (2011) suggests that in addition to the observed decrease in erythropoietin production, decreased erythropoietin activity on bone marrow may also occur. This mechanism could explain our erythropoietin findings.

The most frequent anaemia in CKD is normocytic normochromic anaemia (Macdougall 2011), as reported in 84.1% of the dogs in this study. This form of anaemia is described as frequent and recurrent (Weiss 2006, Raskin & Messik 2012).

In conclusion, the erythroid hypoplasia observed in CKD dogs is preponderant in the persistence of anaemia from the early stages of this disease. This erythroid hypoplasia was associated with iron deficiency in the initial stages and with peripheral erythrocyte destruction caused by the progression of the azotaemia. The cytological examination of bone marrow enabled a determination of the erythropoiesis suppression

occurring in the CKD dogs, primarily against mature erythroid progenitors, which emphasizes the usefulness of this method as a prognostic tool in anaemic CKD patients.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for the scholarship during the study.

REFERENCES

- Almeida R.K., Vasconcelos A.C., Carneiro R.A., Paes P.R.O. & Moro L. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. 2009. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 61: 1255-1260.
- Castro M.C.N., Marcello G.C.G., Alencar N.X. & Ferreira A.M.R. Avaliação da relação proteína-creatinina urinária em gatos com doença renal crônica. 2009. *Pesqui. Vet. Bras.* 29: 605-609.
- Cortadellas O., Fernández del Palacio M.J., Talavera J. & Bayón A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. 2010. *J. Vet. Intern. Med.* 24:73–79.
- Geddes R.F., Finch N.C., Syme H.M. & Elliot J. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. 2013. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 23:122-33.
- Giampaoli S., Facciabene A. & Mennuni C. A protocol to guide development of a sensitive ELISA for canine erythropoietin. 2003. *Vet. Clin. Pathol.* 32: 199-201.
- Harvey J.W. 2001. *Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals.* Philadelphia: W. B. Saunders Company. 92-184.
- IRIS: IRIS staging of CKD. 2013. <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.shtml>. Accessed 14 August 2014.
- Kogika M.M., Lustoza M.D., Notomi N.K., Wirthl V.A.B.F., Mirandola R.M.S. & Hagiwara M.K. 2006. Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Vet. Clin. Pathol.* 35: 441-445.
- Kogika M.M., Lustoza M.D., Hagiwara M.K., Caragelasco D.S., Martorelli C.R. & Mori C.S. 2015. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Vet. Clin. Pathol.* 44: 70-78.
- Lees G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. 2004. *Vet. Clin. Small An. Pract.* 34: 867-885.

- Locatelli F., Canaud B., Eckardt K-U., Stenvinkel P., Wanner C. & Zoccali C. Oxidative stress in endstage renal disease: an emerging threat to patient outcome. 2003. *Nephrol. Dial Transplant.* 18: 1272–1280.
- Macdougall I.C. 2011. Anemia and chronic renal failure. *Med.* 39: 425-429.
- Palmer S.C., Navaneethan S.D., Craig J.C., Johnson D.W., Tonelli M., Garg A.X., Pellegrini F., Ravani P., Jardine M., Perkovic V., Graziano G., McGee R., Nicolucci A., Tognoni G. & Strippoli G.F.M. 2010. Meta-analysis: Erythropoiesis-stimulating agents in patients with chronic kidney disease. *Ann. Intern. Med.* 153:23-33.
- Paltrinieri S., Preatoni M. & Rossi S. Microcytosis does not predict serum iron concentrations in anaemic dogs. 2010. *Vet. J.* 185: 341–343.
- Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. 2011. *Vet. Clin. Small Anim.* 41: 15–30.
- Raskin R.E. & Messick J.B. 2012. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. *Vet. Clin. Small Anim.* 42: 23–42.
- Waki M.F., Martorelli C.R., Mosko P.E. & Kogika M.M. 2010. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos - abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. *Cienc. Rural.* 40: 2226-2234.
- Weiss D. & Smith S.A. 2002. Collection and assessment of canine bone marrow. *Compendium.* 24: 670-678.
- Weiss D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996–2004). 2006. *J. Vet. Intern. Med.* 20: 955–961.
- Zadrazil J. & Horak P. Pathophysiology of anemia in chronic kidney diseases. A review. 2014. *Biomed Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 159: 197-202.

List of figure captions and tables:

Figure 1. Bone marrow aspirate in a dog with chronic kidney disease in stage 4 (Romanowsky stain). A. The normal marrow cellularity (x10). B. Myeloid cells in higher proportion than erythroid, presence of several plasmocytes (x40). C. Plasmocyte (arrow head; x100). D. Dyserythropoiesis (arrow head) and prorubricytes (x100). E. Two band cells and metamyelocyte (x100) F. Myeloblasts and band cells (x100).

Table 1. Cytologic features of the bone marrow in dogs with chronic kidney disease.

Table 2. Summary of the serum concentration statistics for calcium (Ca), phosphorus (P), iron, iron binding capacity (TIBC) and erythropoietin (EPO) in the diseased and control groups

Table 3. Spearman's rank correlation between the haematocrit and the myeloid/erythroid ratio (MER), serum iron, total iron binding capacity (TIBC), calcium, phosphorus, urea, creatinine and erythropoietin (EPO) in diseased dogs.

ANEXO B

ARTIGO 2: Nephrin gene expression and relation with renal function in chronic kidney disease in dogs with *Ehrlichia canis*.

Artigo submetido ao Journal of Veterinary Internal Medicine (Qualis B1).

*Evento de Classificação:
Qualis 2014

Área de Avaliação
 MEDICINA VETERINÁRIA

ISSN:

Título:
 Journal of Veterinary Internal Medicine

Classificação:
 B1

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0891-6640	Journal of Veterinary Internal Medicine	MEDICINA VETERINÁRIA	B1

Nephrin gene expression and relation with renal function in chronic kidney disease

in dogs with *Ehrlichia canis*. M.M. Torres¹, C.S. Chitarra, M.A.A. Cayuela,

F.A.C.S. Cuz, A.J. Mendonça, L. Nakazato, A.B.P.F. Almeida, V.R.F. Sousa

Nephrin gene expression in dogs

Department of Veterinary Clinical Medicine, School of Veterinary Medicine, Federal University of Mato Grosso, Cuiabá-MT, Brazil

1 Correspondence: Mariana M. Torres, Department of Veterinary Clinical Medicine, Veterinary Hospital of Federal University of Mato Grosso, Fernando Correa, s/n,

Cuiabá-MT, Brazil. E-mail: marys_torres@hotmail.com

Abbreviations:

RT-qPCR: Reverse transcription quantitative PCR

CKD: Chronic kidney disease

IRIS: International Renal Interest Society

USG: Urinary specific gravity

UPC: urine protein-to-creatinine ratio

NPSH1: gene nephrosis 1, congenital, Finnish type

mRNA: messenger RNA

Background: The ehrlichiosis is one of the leading causes of chronic kidney disease in dogs and the consequences of this disease on nephrin gene expression have not been described.

Objectives: To correlate the expression of nephrin gene in urinary sediment with kidney function in dogs suffering from chronic kidney disease, with and without *Ehrlichia*

canis infection. Animals: Sixty-nine dogs were grouped according to the stages of the disease, and the nephrin expression of 47 dogs was quantified, while 49 dogs were tested for *E. canis*.

Methods: Prospective study, whereby nephrin gene expression was quantified by RT-qPCR in urinary sediment of dogs with chronic kidney disease and correlated with serum biochemistry, proteinuria, urine specific gravity and presence of *E. canis* detected through PCR.

Results: Nephrin expression was positively correlated with urine specific gravity in dogs from stage 3 ($r= 0.74$), and the expression by group revealed a tendency for increased proteinuria and azotemia in response to reduced expression of nephrin a tendency to decrease with the progression of the disease and the deterioration of renal function. No association or correlation was found between nephrin gene expression and the presence of *E. canis*. Conclusion and clinical importance: The presence of *E. canis* does not alter nephrin gene expression in urinary sediment, regardless of the stage of chronic kidney disease. The expression of nephrin in the urine of dogs decreases progressively as the disease progresses, presenting a higher correlation with urine specific gravity in dogs at stage 3 of chronic kidney disease.

Keywords: ehrlichiosis, RT-qPCR, urine sediment, proteinuria

One of the main goals of public health is the prevention and/or reversal of human renal disease, given that more than one third of those who survive acute kidney injury develop the chronic form. Hence, the number of people with chronic kidney disease (CKD) who reach the end stage of the disease increases worldwide. Similarly, in dogs, the disease reaches high prevalence rates and constitutes the major cause of death, and glomerulopathy is the main factor implicated in its progression. Whatever the cause, CKD is irreversible and invariably progresses to the end stage.^{1,2}

Infectious diseases, such as canine monocytic ehrlichiosis caused by the rickettsial bacterium *Ehrlichia canis*, are among the main causes of glomerulopathy in the chronic phase of infection, especially in endemic areas, but kidney damage

associated with the infection is rarely reported.⁴⁻⁶ Glomerular injury induces podocyte damage, resulting in proteinuria and causing tubular and interstitial injury. Many studies have therefore focused on podocytes and their proteins, such as nephrin and podocin, in humans and dogs, in order to elucidate the pathogenesis of CKD and follow its progression.⁶⁻⁸

Given the above, the aim of this study was to correlate nephrin gene expression in urinary sediment with renal function in different stages of CKD in dogs with and without *E. canis* infection.

This study was approved by and conducted according to the guidelines of the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Mato Grosso (Protocol # 23108.043331/12-9 CEUA).

The prospective study included 69 dogs of different breeds and both sexes suffering from CKD. The diagnostic criteria included the animals' medical history, a physical examination, and laboratory findings including azotemia and/or isosthenuria. Dogs with a history of previous treatment with corticosteroids and antihypertensives were excluded. The dogs showing no renal impairment and that were clinically healthy were set apart as a control group for reference of the evaluated parameters.

Following the staging system for CKD proposed by the International Renal Interest Society (IRIS) (<http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.aspx>) based on serum creatinine concentration, the dogs were then grouped as follows: Stage 1 (up to 1.4 mg/dL) – 12 dogs, Stage 2 (1.4 to 2.0 mg/dL) – 10 dogs, Stage 3 (2.1 to 5 mg/dL) – 23 dogs, and Stage 4 (higher than 5 mg/dl) – 24 dogs.

Blood and urine samples were obtained from the dogs for biochemical analysis of serum and urine, which was performed in a semi-automatic analyzer^a using commercial kits^b of urea, creatinine, calcium, phosphorus and proteinuria. Urine

samples were collected by cystocentesis or urethral catheterization and were subjected to molecular analysis and complete urinalysis, including urine specific gravity (USG) measured by refractometry. Animals showing evidence of bacteriuria or pyuria were excluded, and aliquots of the supernatant were frozen at -86°C to determine the urine protein-to-creatinine ratio (UPC).⁹

mRNA isolation was conducted according to a previously described method.¹⁰ The extraction was carried out using a commercial^c kit, following the manufacturer's instructions, and was immediately followed by reverse transcription with 10 μl of mRNA.

The nephrin primer sequences (NPSH1) (NCBI database, accession number: XM_541685), were the same as those used in an earlier study, i.e., forward, TGGTCCGACTTGTTGTCAGATT; reverse, CAGTGGAGAGTGGCAGAACTTG, which amplify 104 pb.⁷ The reference gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) used for normalization was designed using Oligo Explorer version 1.1 software. The primer sequences were: forward, TGGTGAAGGTCGGAGTCAAC; reverse, GGGATCTCGCTCCTGGAAGA, which amplify 206 pb.

The RT-qPCR was analyzed in duplicate, using a detection system^d in a reaction containing SYBR Green^e, 5 pmol of each primer and 5 μl of sample to a final volume of 25 μl . The amplification conditions were as follows: 5 min at 95°C ; followed by 40 cycles of 15 s at 95°C and 60°C for 30 sec. The specificity of the amplifications was confirmed from an analysis of the melting curve and the relative gene expression was quantified by the comparative method of $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$.

Blood and bone marrow samples were collected by sternal puncture and subjected to DNA extraction and detection of *E. canis* based on partial sequences of

16SrRNA gene. The oligonucleotides used for the first amplification stage of *Ehrlichia* were ECC (5'-AGA ACG AAC GCT GGC GGC AAG CC - 3') and ECB (5'-CGT ATT ACC GCG GCT GCT GGC - 3'), and those for the nested-PCR of the *E. canis* species were ECAN and HE3, which amplify 458 and 398 pb, respectively.^{11,12}

The results are expressed as mean and standard deviation and were analyzed by ANOVA, Tukey's test and Pearson's correlation ($p \leq 0.05$). The Fischer exact test was used to evaluate the association between the presence of *E. canis* and expression of the nephrin gene.

Among the 69 dogs with CKD, 49 were tested for the presence of *E. canis* and nephrin gene expression was detected in the urinary sediment of 47 dogs.

Serum urea, creatinine and phosphorus levels, as well as UPC and USG, were altered in the CKD stages compared to those of the control group. Table 1 describes the means and standard deviations of the quantification of gene expression and biochemical parameters.

Compared with the control group, the relative quantification of nephrin expression in the urine sediment was 1.4-fold higher in dogs from stage 1, 2.8-fold higher in dogs from stage 2, and 0.6-fold and 0.2-fold higher in dogs from stages 3 and 4, respectively.

Nephrin expression was correlated with the biochemical parameters of serum urea, creatinine, calcium and phosphorus, in addition to UPC and USG for each biological group, indicating a direct correlation only between nephrin expression and USG in dogs from stage 3 ($r = 0.74$). The expression per biological group showed no significant difference, but the correlation revealed a tendency for increased proteinuria and azotemia in response to reduced expression of nephrin (Table 2).

With regard to *E. canis* detection, no correlation was found between nephrin expression in positive and negative dogs ($r = -0.50$). The association between the presence of *E. canis* and nephrin gene expression was evaluated, but no association was found between the tests ($p = 0.75$).

The quantification of nephrin expression per CKD stage and its association with an infectious agent has not been reported previously. The findings indicate differences in the development of CKD in dogs, a fact that had already been suggested in a similar study.⁶

Nephrin expression in different human glomerular diseases has been described for years. However, in dogs, this association is still uncommon, especially with regard to infectious diseases that are endemic in many countries and often result in glomerulopathy. Despite the scanty reports of kidney disease associated with *E. canis*, and although its detection does not determine the clinical manifestation of the disease, ehrlichiosis frequently presents with kidney damage, because it is associated with gamma globulin concentrations that emerge in the acute phase and can increase and persist in all the phases of the disease.^{5,13,14}

The lack of renal histopathology prevented the type of injury from being determined, as was proposed in a recent study, and the non-use of different ehrlichiosis diagnostic techniques also prevented CKD from being associated with the manifestation of the infection.^{5,13,15} However, an earlier study found that kidney injuries caused by ehrlichiosis occur independently of the occurrence of clinical manifestation.¹⁶ Moreover, there was no difference in nephrin expression between the stages of CKD, indicating that the kidney is affected in the same way, regardless of the stage of the disease.

On the other hand, the RT-qPCR approach enabled the quantitation of nephrin expression in the urine of 47 of the 69 dogs of this study, representing a greater sample in each CKD stage than those studied to date in dogs.^{6,7}

Azotemia showed a statistically significant increase with the evolution of CKD, but when correlated with nephrin expression, no difference was found between the different stages. The UPC also showed a statistically significant increase, although nephrin expression tended to decrease with increasing azotemia and proteinuria levels. Both the azotemia and proteinuria levels described here are expected in dogs with CKD and help determine the degree of kidney impairment.¹

The correlation between nephrin expression and USG in stage 3 dogs points to the relationship between reduced glomerular filtration rate, indirectly measured by serum creatinine, and the loss or damage to podocytes. Recently, it was demonstrated that hypoxia leads to decreased podocyte count while simultaneously reducing the expression of proteins associated with podocytes and vascular endothelial growth factor (VEGF).¹⁷ A similar effect associated with sustained proteinuria in mice resulted in the evolution to end stage kidney disease.¹⁴

Immune complex deposition can cause kidney injury in canine ehrlichiosis and one of the main findings suggestive of glomerulopathy is the presence of proteinuria, which coincides with the fact that most glomerular diseases are of immune-mediated origin, regardless of the cause. However, it is not possible to state that all proteinuria is of glomerular origin. Immunohistochemistry tests or electron microscopy analysis of renal tissue enable one to determine the location of immune complexes and thus confirm the origin of proteinuria, but the assessment of individual cases makes it difficult to use these techniques.^{4,16}

Several proteins associated with podocytes can be detected in the urine of humans and animals, and nephrin levels tend to increase in the acute phase and decrease in the chronic phase of the disease.^{6,14} This effect was also observed in the regulation of nephrin gene expression in our study. However, regardless of the stage of CKD, nephrin expression was not correlated with the presence or absence of *E. canis*, suggesting that the presence only of rickettsia would not influence the progression of CKD.

It is possible that what determines the severity of the injury is associated with the location of deposits of immune complexes and the individual inflammatory response it triggers would thus also influence the expression of nephrin.⁴

The detection of different mRNAs in urinary sediment as a potential diagnostic tool has been proposed,⁶ but the fragility of the sample and the costs of this technique still limit its use in practice, restricting it to research on the treatment and pathogenesis of the various etiologies that lead to CKD.

Nephrin gene expression in the urine of dogs therefore gradually declines as the disease progresses, presenting the highest correlation with USG in dogs in stage 3 of CKD, coinciding with the onset of the aggravation of azotemia. The low detection rate of mRNA, particularly in dogs in stage 1 and 2, limits the use of RT-qPCR as an early CKD diagnostic tool, but is useful for monitoring the progression of the disease. In addition, the presence of *E. canis* does not alter nephrin gene expression in urinary sediment, regardless of the stage of CKD. Studies of the different proteins expressed by podocytes and of the kidney's inflammatory response induced by canine ehrlichiosis may help elucidate the mechanisms involved in the development of CKD.

FOOTNOTES

^a SB-190, Celm, São Caetano do Sul, SP, Brazil.

^b Ureia-UV-PP, Creatinina-PP, Proteinúria, Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brazil.

^c Cells-to-cDNA II, Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.

^d StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Foster City, CA.

^e SYBR Green qPCR Mastermix, Invitrogen, Carlsbad, CA.

ACKNOWLEDGMENT

The authors gratefully acknowledge CAPES (Brazil's Federal Agency for the Support and Improvement of Higher Education) for granting a scholarship.

REFERENCES

1. Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Emerg Crit Care* 2013;23(2): 205–215.
2. Zafrani L, Ince C. Microcirculation in acute and chronic kidney diseases. *Am J Kidney Dis* 2015;66(6):1083-1094.
3. Little SE. Ehrlichiosis and anaplasmosis in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim* 2010;40:1121–1140.
4. Schneider SM, Cianciolo SE, Nabity MB, et al. Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 Cases (2007–2012). *Vet Intern Med* 2013;27:S67–S75.
5. Vaden SL. Glomerular disease. *Top Companion Anim Med* 2011;26(3):128-134.
6. Icii O, Yabuki A, Sasaki N, et al. Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. *Histol Histopathol* 2011;26:1243-1255.
7. Kobayashi R, Kamiie J, Yasuno K, et al. Expression of nephrin, podocin, a-actinin-4 and a3-Integrin in canine renal glomeruli. *J Comp Path* 2011;145:220-225.

8. Mariana M, Park JK, Sharma S, et al. Expressions of notch pathway proteins correlate with albuminuria, glomerulosclerosis and renal function. *Kidney Int* 2010;78(5): 514–522.
9. Castro MCN, Marcello GCG, Alencar NX, et al. Avaliação da relação proteína-creatinina urinária em gatos com doença renal crônica [Urinary protein/creatinine ratio measurement in cats with chronic renal failure]. *Pesq Vet Bras* 2009;29(8):605-609. Portuguese.
10. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 2001;344(13):947-954.
11. Murphy GL, Ewing SA, Whitworth LC, et al. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. *Vet Parasitol* 1998;79(4):325-339.
12. Wen B, Rikihisa Y, Mott JM, et al. Comparison of nested PCR with immunofluorescent-antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. *J Clin Microbiol* 1997;35(7):1852-1855, 1997.
13. Asgarali Z, Pargass I, Adam J, et al. Haematological parameters in stray dogs seropositive and seronegative to *Ehrlichia canis* in North Trinidad. *Ticks Tick-Borne Dis* 2012; 3:207– 211.
14. Szeto CC, Lai KB, Chow KM, et al. Messenger RNA expression of glomerular podocyte markers in the urinary sediment of acquired proteinuric diseases. *Clin Chim Acta* 2005;361:182-190.
15. Cianciolo RE, Mohr FC, Aresu L, et al. World Small Animal Veterinary Association Renal Pathology Initiative: Classification of Glomerular Diseases in Dogs. *Vet Pathol* 2016;53(1):113-135.

16. Crivellenti LZ, Silva GEB, Borin-Crivellenti S, et al. Glomerulopathies in dogs with ehrlichiosis- Preliminary results. Proceedings Book 40th World Small Animal Veterinary Association Congress; January 2015; Bangkok, Thailand.
17. Novelli R, Benigni A. Life and death of podocytes: not only a matter of vascular endothelial growth factor. *Am J Nephrol* 2016;43:71–73.

Table 1. Biochemistry, proteinuria, urine specific gravity (USG) parameters and nephrin gene expression in urine of dogs with chronic kidney disease.

Parameters/ Groups	Creatinine	Urea	Calcium	Phosphorus	UPC	USG	ΔCt^*	Fold- change
Control	1,2 a $\pm 0,17$	34,11 a $\pm 7,68$	12,11 $\pm 1,03$	5,02 a $\pm 4,94$	0,14 a $\pm 0,05$	1035 a $\pm 12,21$	-	-
Stage 1	1,03 b $\pm 0,38$	51,67 b $\pm 25,98$	10,83 $\pm 1,75$	2,08 $\pm 1,75$	1,84 $\pm 2,08$	1013 a $\pm 3,59$	15,88 $\pm 28,86$	1,4
Stage 2	1,81 c $\pm 0,09$	136,0 c $\pm 83,44$	9,86 $\pm 1,69$	1,68 a $\pm 0,85$	1,99 $\pm 0,57$	1014 a $\pm 3,04$	-	2,8
Stage 3	3,21 d $\pm 0,85$	190,8 abd $\pm 98,95$	10,52 $\pm 3,38$	2,97 $\pm 1,95$	2,70 $\pm 2,55$	1014 a $\pm 2,89$	3,63 $\pm 4,56$	0,6
Stage 4	9,64 abcd $\pm 4,79$	303,3 abcd $\pm 118,0$	10,79 $\pm 2,92$	3,58 $\pm 1,95$	3,29 a $\pm 2,60$	1013 a $\pm 3,00$	6,46 $\pm 6,04$	0,2

Bold, Means followed by same letter in the same column differ at 5% significance.

* Stage 1 and Stage 2 were grouped for calculation of mean.

Table 2. Correlation between nephrin gene expression in urine and kidney function in dogs with chronic kidney disease.

Parameters	r*	p-value
Nephrin vs UPC	-0,73	0,15
Nephrin vs Creatinine	-0,70	0,15
Nephrin vs Urea	-0,73	0,15
Nephrin vs Calcium	0,09	0,88
Nephrin vs Phosphorus	-0,05	0,93
Nephrin vs USG	0,51	0,37

* Pearson correlation

ANEXO C

ARTIGO 3: Nephrin gene expression in chronic kidney disease of dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

Artigo aceito pela The Brazilian Journal of Infectious Diseases (Qualis B1), <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.07.008>.

BJID 6221-2

ARTICLE IN PRESS

BRAZ J INFECT DIS 2016; x xx(xx):xxx-xxx

 The Brazilian Journal of
INFECTIOUS DISEASES
www.elsevier.com/locate/bjid



1 **Letter to the editor**

2 **Nephrin gene expression in chronic kidney disease**
3 **of dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum***
4 ***chagasi***
5

Nephrin gene expression in chronic kidney disease of dogs with *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*

Dear Editor,

Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* is the most severe form of the disease. In Brazil, this disease is transmitted through the bite of sand flies of the genus *Lutzomyia*.¹ The clinical signs of the disease in canines, which are similar to those in humans, depend on the individual's humoral and cellular response, and kidney disease is the main cause of death.² In visceral leishmaniasis, nephropathies caused by glomerular diseases are a common cause of chronic renal failure.²⁻⁴ Glomerular podocyte injury causes proteinuria and results in tubular and interstitial injury.⁵ Thus, the aim of the study was to quantify nephrin gene expression in dogs suffering from chronic kidney disease associated with visceral leishmaniasis.

Sixty-nine dogs with chronic kidney disease (CKD) were diagnosed based on their history, the presence of azotemia and isosthenuria, and were grouped according to classification proposed by the International Renal Interest Society (IRIS). Urine, blood and bone marrow samples were collected by jugular venipuncture, cystocentesis and/or urethral catheter, and sternal puncture, respectively.

This study was approved by and conducted according to the guidelines of the Ethics Committee on Animal Use of the Federal University of Mato Grosso (Protocol # 23108.043331/12-9). The DNA extracted from blood and bone marrow was subjected to PCR detection of *L. (L.) infantum chagasi*. Cell pellets were obtained by centrifuging 10 ml of urine for RNA extraction, followed by RT-qPCR to quantify nephrin gene expression. Supernatant from centrifuged urine was used for the biochemical determination of proteinuria.

Nephrin was quantified in the urinary sediment of 47 dogs and *L. (L.) infantum chagasi* was detected in the bone marrow and/or blood of 11 dogs. The relative quantitation of nephrin was lower in dogs in advanced stages of renal disease than in the initial stages, and those positive for *L. (L.) infantum chagasi* showed no correlation with the presence of the parasite ($r = -0.35$).

The quantitation of nephrin expression according to the stage of CKD and its association with *L. (L.) infantum chagasi* have not been reported previously. Kidney disease is an important condition in the clinical assessment of small animals, in view of the high prevalence and severity of its subsequent clinical manifestations. Moreover, owing to the zoonotic potential of visceral leishmaniasis associated with the presence of asymptomaticity in dogs, the early detection of kidney disease enables the evolution of the disease to be monitored.

Visceral leishmaniasis impairs the immune system and interferes with the inflammatory response, resulting in several changes that culminate in death from renal failure. Knowing that canine cases precede the occurrence of the disease in humans, it is important to identify the changes that may occur in both species. Therefore, dogs also serve as a study model of this disease, assisting in the establishment of a more accurate prognosis for humans, and is a control measure that requires fast and accurate diagnostic tools. Hence, the quantitation of nephrin gene expression in urinary sediment is a practical and non-invasive tool for monitoring the development of kidney disease.

References

1. Latrofa MS, Dantas-Torres F, Caprariis D, et al. Vertical transmission of *Anaplasma platys* and *Leishmania infantum* in dogs during the first half of gestation. *Parasit Vectors*. 2016; 9:269.

2. Koutinas AF, Koutinas CK. Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Path.* 2014; 51(2):527-38.
3. Patrakka J, Tryggvason K. Molecular make-up of the glomerular filtration barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 396:164–69.
4. Rigo RS, Carvalho CME, Honer MR, et al. Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Rev Inst Med Trop.* 2013; 55(2):113-16.
5. Kobayashi R, Kamiie J, Yasuno K, Ogihara K, Shirota K. Expression of Nephrin, Podocin, α -Actinin-4 and α 3-Integrin in canine renal glomeruli. *J Comp Path.* 2011; 145:220-5.