

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Campus de Botucatu

BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL NO DIAGNOSTICO PRECOCE E
MONITORAÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA NA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA
CANINA

ANDRÉ NANNY LE SUEUR VIEIRA

Botucatu - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Campus de Botucatu

BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL NO DIAGNOSTICO PRECOCE E
MONITORAÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA NA ERLIQUIOSE MONOCÍTICA
CANINA

ANDRÉ NANNY LE SUEUR VIEIRA

Tese apresentada junto ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade
de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista para obtenção do
título de Doutor em Medicina Veterinária.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Priscylla Tatiana C. Guimarães Okamoto

Co-Orientador: Prof. Adj. Dr. Antônio Carlos Paes

Botucatu - SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Vieira, André Nanny Le Sueur.

Biomarcadores de lesão renal no diagnóstico precoce e monitoração da lesão renal aguda na erliquiose monocítica canina / André Nanny Le Sueur Vieira. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto

Coorientador: Antônio Carlos Paes

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Injúria Renal Aguda. 3.
Cistatinas. 4. Clusterina. 5. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Cistatina B urinária; Clusterina urinária;
Ehrlichia canis; Lesão renal aguda; SDMA.

Nome do autor: André Nanny Le Sueur Vieira

Título: BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL NO DIAGNOSTICO PRECOCE E MONITORAÇÃO DA LESÃO RENAL AGUDA NA ERLQUIOSE MONOCÍTICA CANINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª. Ass. Drª. Priscylla Tatiana C. Guimarães Okamoto
Presidente e Orientadora
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Júlio Cambraia Veado
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG

Profª. Ass. Drª Alessandra Melchert
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP – Botucatu

Profª. Dr. Rogério Giuffrida
Membro
Departamento de Clínica Médica e Saúde Única
Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE

Profª. Ass. Drª Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal
FMVZ - UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 27 de Janeiro de 2022

DEDICATÓRIA

A todos os cães participantes deste estudo clínico.

Que a saúde única possa avançar para uma nova era médica pela graça dos animais, os quais nos ensinam muito e além da nossa capacidade de compreensão.

AGRADECIMENTOS

Após quatorze anos vividos na academia médica veterinária; como eterno aprendiz, tenho a convicção de que meu maior aprendizado ao longo destes anos não foi a pesada bagagem científica adquirida, tão pouco dos certificados, artigos e demais trabalhos produzidos, mas sim do exercício diário e constante de ser grato a tudo e aquilo que de certa forma me proporciona a viver o meu presente repleto de realizações.

Desta forma, na oportunidade de agradecer, dedico esta página de agradecimentos em primeira instância ao Grande Mestre deste universo, escriba das linhas de nossas vidas e grande arquiteto de tudo o que vemos e do que não podemos ver. Sou grato a esta “força” a qual despertou o aprendizado da resiliência e do perdão pelo caminho do seu Amor.

Em segundo, agradeço aos meus familiares que investiram em minha educação até onde puderam e seus ensinamentos sobre a sabedoria e a humildade, são verdadeiramente os valores mais nobres dos homens de bem. Agradeço a toda a minha família e a todos os meus leais amigos, responsáveis por me proporcionar a felicidade de viver pelo amor e companheirismo, e de eu poder retribuir-los estas virtudes na mesma intensidade.

Agradeço aos meus orientadores de graduação Rosangela, Alan e Karina pela oportunidade de me tornar Médico Veterinário e pelo privilégio de aprender e dividir o aprendizado em prol da saúde e do bem-estar animal. Agradeço em especial a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu e a todos os docentes, alunos, residentes, funcionários e tutores que confiaram e confiam na qualidade do meu trabalho e, em especial, a minha orientadora Priscylla Tatiana a qual contribuiu na lapidação e polimento de meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo destes últimos 9 anos.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio e fomento ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ, UNESP Botucatu, e em especial à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela confiança em nosso trabalho neste estudo inédito vigente pelo Processo FAPESP 2018/13427-6, ainda que em tempos difíceis pela pandemia a qual passamos, esta pesquisa foi concluída com êxito e sem muitas intercorrências.

Na oportunidade, também de agradeço por todo o amparo a mim quando ainda era bolsista da graduação pelo fomento referente ao processo 2009/52799-7. Foi graças a esta Fundação a qual pude conquistar meu diploma e inspirar os mais novos sobre as belezas da pesquisa e pelo progresso da educação brasileira. Por fim, também agradeço ao laboratório parceiro IDEXX Laboratories Inc. pela confiança depositada durante meu aprendizado no mestrado e doutorado, por todos os insumos das pesquisas realizadas e pelas oportunidades de apresentar ao mundo mais um fruto de qualidade da pesquisa brasileira.

“As freiras nos ensinaram que existem dois caminhos na vida, o caminho da natureza e o caminho da graça. Você precisa escolher qual deles irá seguir.

A graça não procura satisfazer a si própria, ela aceita que a desprezem, que a esqueçam, que não gostem dela, ela aceita ser insultada e ser ferida.

A natureza só quer satisfazer a si mesma e fazer com que os outros a satisfaçam. Ela gosta de ser livre e que façam a sua vontade. Ela procura razões para ser infeliz quando o mundo todo está feliz a seu redor e o amor está sorrindo através de todas as coisas.

As freiras nos ensinaram que quem ama o caminho da graça, jamais terá um fim triste. Eu serei leal a você, aconteça o que tiver que acontecer.”

(MALICK, A árvore da vida, 2011)

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 – Consequências da lesão e reparo das células tubulares durante a lesão renal aguda. As células deixam de apresentar polaridade e a integridade de suas junções intercelulares é perdida, devido as alterações na actínia e redes de microtúbulos do citoesqueleto, o que acarreta o extravasamento retrógrado do filtrado. Além disso, também ocorre a redistribuição de Na^+/K^+ - ATPase e das integrinas para a superfície apical da membrana basal e as células mortas e vivas destacam-se escoando para o lúmen tubular. Traduzido e adaptado de Okusa, M. D.; Portilla, D. 2020.....14

Figura 2 – Recuperação adaptativa e regeneração das células tubulares em lesão renal aguda. Após a lesão, algumas células tubulares morrem pela via necrose ou apoptose e separam-se da membrana, outras perdem sua borda escovada e sua integridade de ancoragem proteica propiciando na inibição mitocondrial e depleção de ATP. Como resposta, as células lesadas ativam o processo de reparo adaptativo, enquanto, por outro lado, células progenitoras tubulares (mais resistentes a morte), sobrevivem, se proliferam e diferenciam-se a fim de substituir as células tubulares perdidas. MEC = Matriz Extracelular. Traduzido e adaptado de Angelotti et al., 2019.....15

Figura 3- Reparo mal adaptativo das células tubulares na lesão renal aguda leva à doença renal crônica. A importância da parada do ciclo celular G2/M em resposta a agressões renais graves, repetidas e genotóxicas. Na fase inicial de reparo após a lesão, as células podem ficar presas na fase G2/M e liberar citocinas e fatores de crescimento que promovem a retenção de células inflamatórias no rim e a inflamação contínua. Lesões e estímulos pró-inflamatórios levam à dissociação dos pericitos do endotélio, resultando em rarefação microvascular e deposição progressiva de colágeno pelos miofibroblastos originados dos pericitos ativados. Consequentemente, o envelhecimento sensibiliza as células tubulares à parada G2/M em resposta ao estresse celular e danos ao DNA, fornecendo uma explicação potencial para o aumento do risco de progressão da DRC após a LRA. Abreviaturas: LRA= Lesão renal aguda; DRC= Doença renal crônica. Traduzido e adaptado de Ferenbach, D. A.; Bonventre J. V. 2015.....16

Figura 4 - Variações da creatinina plasmática de acordo com a taxa de filtração glomerular em cães saudáveis e com doença renal crônica. Nos pontos maiores a estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) foi realizada pelo *clearance* de inulina ou ioidina; nos pontos menores, TFG estimada pelo *clearance* de creatinina exógena. Traduzido e adaptado de Braun et al., 2003.....33

Figura 5 - Representação esquemática da metilação da arginina pelas enzimas proteína arginina metiltransferases (PRMTs) e sua atividade catalítica, formando Dimetilarginina assimétrica (ADMA) e Dimetilarginina simétrica (SDMA). Traduzido e adaptado de Schwedhelm, E.; Böger, R. H., 2011.....37

Figura 6 - Superfamília da cistatina. Abreviaturas: GPHR= Glicoproteínas ricas em hidroxiprolina. Traduzido e adaptado de Yerramilli et al., 2016.....38

CAPÍTULO II

Seção I

Figura 1 - Intervalo das coletas de sangue e urina dos grupos controle e Ehrlichia respectivamente.....67

Figura 2 - Gráfico de linha dos biomarcadores CRP, RPC, sCr, Globulina e Proteína Total pelo tempo de acompanhamento entre os grupos estudados.....68

Figura 3 - Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo tempo de acompanhamento. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de CRP durante o tempo de acompanhamento para o GC e GE respectivamente. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de CRP estimado.....69

Figura 4 - Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor sCr. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor de sCr do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo

de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.....70

Figura 5 - Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor de globulina. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor de globulina do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor estimado de proteína-C reativa.....71

Figura 6 - Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor de proteína total. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de de proteína-C reativa para cada valor de proteína total do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.....72

Figura 7 - Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa por valor da razão proteína: creatinina urinária. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor RPC do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.....73

Seção II

Figura 1. Diagrama de consorte da população estudada.....98

Figura 2. Monitoração e intervalo dos momentos de coletas de sangue e urina dos grupos controle e *Ehrlichia* respectivamente.....99

Figura 3. Distribuição de categorias, escore de condição corporal entre grupos e momentos.....100

Figura 4. Comparação entre as concentrações de creatinina, globulina, albumina e RPC entre os grupos controle e *Ehrlichia*.....101

Figura 5. Concentração dos biomarcadores urinários de lesão entre os grupos durante o momento de inclusão.....102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Classe de agentes nefrotóxicos promotores da azotemia renal intrínseca.....	10
---	----

CAPÍTULO II

Seção I

Tabela 1 – Perfil amostral dos grupos	74
--	----

Tabela 2 - Mediana e amplitude interquartil dos biomarcadores avaliados nos grupos controle e Ehrlichia durante o delineamento do estudo.....	75
--	----

Seção II

Tabela 1. Mediana e amplitude interquartil dos dados demográficos e biomarcadores séricos avaliados nos grupos controle e erlíquia durante o delineamento do estudo....	103
--	-----

Tabela 2. Mediana e amplitude interquartil dos dados demográficos e biomarcadores urinários avaliados nos grupos controle e erlíquia durante o delineamento do estudo.....	104
---	-----

Tabela 3. Correlação entre idade, biomarcadores séricos e urinários e RPC de 16 cães infectados por erliquiose e 20 cães saudáveis.....	105
--	-----

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AC	–	Anticorpos
ADMA	–	Dimetilarginina assimétrica
ADP	–	Adenosina difosfato
ALT	–	Alanina aminotransferase
AMP	–	Monofosfato de adenosina
ARI	–	Azotemia renal intrínseca
AINES	–	Anti-inflamatórios não-esteroidais
AKIN	-	<i>Acute Kidney Injury Network</i>
ATP	–	Adenosina trifosfato
CID	–	Coagulação intravascular disseminada
CRP	–	Proteína C reativa
DDAH	–	Dimetilarginina dimetilamonohidrolase
DRC	–	Doença renal crônica
ELISA	–	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMC	–	Erliquiose monocítica canina
FA	–	Fosfatase alcalina
FSR	–	Fluxo sanguíneo renal
iECA	–	Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IFA	–	Ensaio de imunofluorescência indireta
KDIGO	-	<i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>
IC	-	Imunocomplexos
IRIS	–	Sociedade Internacional de Interesse Renal
LRA	–	Lesão renal aguda
NPP/T	–	Nutrição parenteral parcial/ total
PAS	–	Pressão arterial sistólica
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
PRMTs	-	Enzimas proteína-arginina metiltransferases tipos 1 e 2
RIFLE	-	<i>Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage renal disease</i>
RPC	–	Razão Proteína: Creatinina urinária
sCr	–	Creatinina sérica
SDMA	–	Dimetilarginina simétrica
SIRS	–	Síndrome inflamatória responsiva sistêmica

SNC – Sistema nervoso central
SRL – Solução ringer com lactato
SRRA – Sistema renina angiotensina aldosterona
TC – Tomografia computadorizada
TFG – Taxa de filtração glomerular
TGI – Trato gastrointestinal
TSR – Terapia de substituição renal
uClust – Clusterina urinária
uCRP/c – Razão proteína c reativa: creatinina urinaria
uCysB – Cistatina B urinária

SUMÁRIO	
CAPÍTULO I	03
INTRODUÇÃO	05
REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1 Lesão Renal Aguda	07
2.1.1 Definição, epidemiologia e terminologia	07
2.1.2 Etiologias	08
2.1.2.1 Azotemia hemodinâmica	08
2.1.2.2 Azotemia renal intrínseca	09
2.1.2.3 Azotemia pós-renal	11
2.1.3 Fisiopatologia da LRA	12
2.1.4 Tratamento	17
2.1.4.1 Tratamento de outras doenças específicas	17
2.1.5 Monitoração e prognóstico	18
2.2 Ehrlichiose monocítica canina	18
2.2.1 Etiopatogenia	19
2.2.2 Manifestações clínicas e hematológicas	21
2.2.3 Diagnóstico	24
2.2.4 Tratamento	26
2.2.5 Erliquiose e os rins	27
2.3 Biomarcadores e a função renal	29
2.3.1 Creatinina sérica	31
2.3.2 Dimetilarginina simétrica	34
2.3.4 Cistatina B	37
2.3.5 Clusterina	39
2.3.6 Proteína-C reativa	40
3. OBJETIVOS	42
3.1 Objetivos gerais	42
3.2 Objetivos específicos	42
CAPÍTULO II – ARTIGOS CIENTÍFICOS	43
Seção 1. “Proteína C- reativa e erliquiose monocítica canina: uma nova perspectiva clínica.”	46
Seção 2. “Novas concepções renais em cães com erliquiose: A era dos biomarcadores de lesão renal.”	78
CONCLUSÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS	108
NORMAS DAS REVISTAS	127

LE SUEUR, A.N.V. Biomarcadores de lesão renal no diagnostico precoce e monitoração da lesão renal aguda na erliquiose monocítica canina. Botucatu, 2021. 130p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

RESUMO

A Erliquiose monocítica canina (EMC) é uma doença bacteriana intracelular, altamente infecciosa e procedente do agente etiológico *Ehrlichia canis*. *Ehrlichia* é considerada um potencial agente etiológico para doença renal. No entanto, a Lesão Renal Aguda (LRA), uma síndrome heterogênea definida pela súbita diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), ainda não foi compreendida nesta enfermidade devido ao uso do biomarcador insensível creatinina sérica (sCr). Este estudo avaliou novos biomarcadores de lesão renal como a Cistatina B e Clusterina urinárias (uCysB e uClust) e o desempenho da Proteína-C reativa (CRP) como biomarcador de inflamação durante o diagnóstico, tratamento e monitoramento de cães naturalmente infectados com *E. canis*. Vinte cães saudáveis foram incluídos no grupo controle (GC) e 16 cães naturalmente infectados com *E. canis* foram incluídos no Grupo *Ehrlichia* (GE). Cães do GE demonstraram um aumento significativo nas concentrações de uCysB, uClust e Proteína C-reativa comparados ao GC no momento de inclusão ($P = 0,0004$, $P = 0,0001$, $P < 0,0001$, respectivamente), embora os valores de sCr do GC foram mais altos que o do GE ($P = 0,001$), a SDMA não demonstrou alterações entre ambos os grupos ($P = 0,462$). Durante o tratamento do GE, além da melhora dos sinais clínicos ($P_{\text{Peso}} = < 0,0001$), observou-se uma significativa redução de todos os biomarcadores urinários ($P_{\text{uCysB}} = < 0,0001$; $P_{\text{uClust}} = < 0,0001$; $P_{\text{RPC}} = < 0,0001$); séricos ($P_{\text{sCr}} = < 0,0001$; $P_{\text{SDMA}} = < 0,0001$). Desta forma podemos concluir que cães naturalmente infectados por *E. canis* apresentam uma importante inflamação sistêmica e lesão renal intrínseca pelo aumento das concentrações de CRP, uCysB e uClust; porém subclínica quando avaliada pela sCr, justificando o provável mecanismo da predisposição da doença renal crônica nestes animais.

Palavras-chave: SDMA, Ehrlichia, Cistatina B urinária, Clusterina urinária, Lesão Renal Aguda.

LE SUEUR, A.N.V. Kidney injury biomarkers in the early diagnosis and monitoring of acute kidney injury in canine monocytic ehrlichiosis. Botucatu, 2021. 130p. Thesis (Philosophic Doctorate degree) - School of Veterinary Medicine and Animal Science, Botucatu Campus, São Paulo State University (Unesp).

ABSTRACT

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) is an intracellular, highly infectious bacterial disease caused by the etiological agent *Ehrlichia canis*. *Ehrlichia* is considered a potential etiologic agent for kidney disease. However, Acute Kidney Injury (AKI), a heterogeneous syndrome defined by the sudden decrease in glomerular filtration rate (GFR), has not yet been understood in this disease due to the use of the insensitive biomarker, serum creatinine (sCr). This study evaluated new biomarkers of kidney injury such as urinary Cystatin B and Clusterin (uCysB and uClust) and the performance of C-reactive Protein (CRP) as a biomarker of inflammation during the diagnosis, treatment and monitoring of dogs naturally infected with *E. canis*. Twenty healthy dogs were included in the control group (CG) and 16 dogs naturally infected with *E. canis* were included in the Ehrlichia group (EG). EG dogs demonstrated a significant increase in uCysB, uClust and C-reactive protein concentrations compared to GC at the time of inclusion ($P = 0.0004$, $P = 0.0001$, $P < 0.0001$, respectively), although sCr values CG were higher than EG ($P = 0.001$), and SDMA concentrations showed no changes between both groups ($P = 0.462$). During the treatment of the EG, in addition to the improvement in clinical signs ($P_{\text{Weight}} = <0.0001$), there was a significant reduction in all urinary biomarkers ($P_{\text{uCysB}} = <0.0001$; $P_{\text{uClust}} = <0.0001$; $P_{\text{UPC}} = <0.0001$); serum ($P_{\text{sCr}} = <0.0001$; $P_{\text{SDMA}} = <0.0001$). Thus, we can conclude that dogs naturally infected by *E. canis* are prone to significant systemic inflammation and acute kidney injury due to increased concentrations of CRP, uCysB and uClust; nonetheless a subclinical AKI by sCr, and a possible mechanism for the observed predisposition to chronic kidney disease in dogs with ehrlichiosis.

Key words: SDMA, ehrlichia, cystatin B, urinary clusterin, acute kidney injury.

CAPÍTULO I
REVISÃO DE LITERATURA E OBJETIVOS

Para Lygia
(In Memoriam)

*A Mulher a qual me ensinou o Amor
pela Fé, Humildade e Generosidade.*

INTRODUÇÃO

A lesão renal aguda (LRA) é uma doença multifatorial e multimodal caracterizada pela súbita redução da função do néfron e consequente diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG), e quando estendida, propicia em sinais laboratoriais de azotemia, distúrbios de hidratação, eletrolítico e acidobásico (MUGFORD *et al.*, 2013).

Na presença da isquemia esta TFG comprometida leva a degradação da adenosina trifosfato (ATP) intracelular, a qual é responsável pelas diversas alterações metabólicas e pelo dano celular e estrutural do néfron (CARVALHO, 2015). Estas alterações, quando não corrigidas, são passíveis de evoluir para necrose, apoptose e descamação, obstruindo o segmento tubular e intensificando repetidamente o estresse oxidativo inicial de um novo néfron até a falência do órgão por completo (ROSS, 2011).

Por definição pela Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), a LRA é diagnosticada pelo aumento súbito dos valores de creatinina sérica (sCr) entre 48 horas, em animais não azotêmicos, associados ou não à redução do débito urinário e ao histórico clínico do animal (IRIS, 2016). No entanto, sabe-se que a sCr é um biomarcador indireto da TFG e de pobre valor diagnóstico nos insultos agudos por ser influenciada por fatores de origem extra renal, e por ser secretada pelos túbulos renais (HOKAMP; NABITY, 2016).

A Erliquiose Monocítica Canina (EMC) é uma doença infecciosa oriunda do agente etiológico *Erlichia canis*, bactéria pleomórfica intracelular obrigatória, Gram-negativa, da família das riquetsias, o qual é transmitido pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato da família Ixodidae, amplamente disperso no mundo e principalmente relatado durante o ano todo globalmente nas regiões tropicais e subtropicais (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; DANTAS-TORRES, 2008).

Esta doença pode ser classificada em três diferentes fases: aguda, subclínica e crônica (HARRUS *et al.*, 2015). A fase aguda cursa entre duas e quatro semanas, na qual o animal apresenta sinais clínicos inespecíficos como anorexia, apatia, febre, secreção nasal e ocular, perda de peso, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia (VIEIRA *et al.*, 2011). A fase subclínica inicia-se entre seis e nove semanas após a infecção (HARRUS *et al.*, 2015). Como resultado, devido a intensa disfunção plaquetária associada a distúrbios de coagulação presentes nesta fase, sangramentos superficiais como epistaxe e petéquias podem ser achados clínicos (WARNER; HARRUS, 2013). Em contraste, na fase crônica, estes animais demonstram-se imunodeficientes, capazes de vir a óbito tanto

por infecções graves quanto por hemorragias secundárias e trombocitopatias avançadas (WARNER, 2008).

Estudos sugerem que a EMC também é responsável pela glomerulonefrite e nefropatia com perda de proteína (CODNER; MASLIN, 1992). Um mecanismo imunológico é desencadeado pelo agente *E. canis* pela deposição de IgM, IgG e C3 anti-canino nos tufo glomerulares e no mesângio, suscitando uma glomerulonefrite de caráter membranoproliferativa (CASTER *et al.*, 2014).

Atualmente, pesquisas voltadas a biologia celular focam na descoberta e validação de novos biomarcadores que possam predizer o cenário do curso clínico da LRA, permitindo o emprego de várias estratégias em um tratamento precoce e responsivo a fim de diminuir os custos com insumos e internações e prevenir a saúde renal do indivíduo, bem como ampliar sobrevida (LOMBI *et al.*, 2016; HOKAMP; NABITY, 2016).

Apesar de poucos estudos veterinários, certos marcadores tubulares como a Clusterina urinária e Cistatina B urinária demonstraram correlação positiva de diagnóstico precoce de lesão renal quando comparados a creatinina sérica em ensaios clínicos de cães com leishmaniose e em animais induzidos com doses nefrotóxicas de gentamicina, e mais recentemente, em animais envenenados por víboras na Europa (YERRAMILI *et al.*, 2016; GORDIN *et al.*, 2021).

Desta forma, este estudo visa avaliar e correlacionar as concentrações séricas dos biomarcadores Dimetilarginina simétrica (SDMA), Cistatina B e Clusterina urinária, Razão proteína-creatinina urinária e Proteína-C reativa em cães clinicamente infectados com EMC a fim de elucidar o comportamento da LRA nesta população.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lesão Renal Aguda

2.1.1 Definição, epidemiologia e terminologia

Ainda nos estágios iniciais da fase de indução, a LRA é denominada uma síndrome silenciosa das demais, onde posteriormente, envolve inúmeros processos fisiopatológicos de diversas etiologias, e consequentemente, de diferentes severidades e prognósticos (LAMEIRE, 2005). Esta síndrome também se define pelo início súbito da lesão do parênquima renal associado a diminuição abrupta da TFG, que consequentemente, propicia na falha do controle excretório, metabólico, eletrolítico, hídrico, acidobásico e endócrino de humanos e pequenos animais (LAMEIRE *et al.*, 2005; COWGILL, 2016).

A epidemiologia da LRA em humanos foi revisada e reconstruída nas últimas décadas pelo estabelecimento de diferentes consensos como o *Acute Kidney Injury Network* (AKIN), *Risk, Injury, Failure, Loss, and End-stage Renal disease* (RIFLE), e *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) (LAMAIRE *et al.*, 2013; COWGILL, 2016; THOMAS *et al.*, 2015). Estes empenhos na padronização da definição de LRA são substanciais para o diagnóstico e tratamento precoce, além de um prognóstico favorável e de menores custos de internação, no entanto, ainda existem áreas de incertezas e falta de padronização entre os pesquisadores (THOMAS *et al.*, 2015; SIEW; DAVENPORT, 2015).

Ademais, devido a duração da LRA ser relativamente curta comparada a Doença Renal Crônica (DRC), os consensos apenas validam como métrica epidemiológica a sua incidência, pois a prevalência é um parâmetro não muito significativo, além de não haver dados confiáveis sobre esta população (HSU; HSU, 2016). No entanto, apesar de ser desconhecido em pequenos animais (THOEN; KERL, 2011; HARISON *et al.*, 2012), uma meta-análise demonstrou que a incidência de mortalidade em pequenos animais com base na etiologia (Infecciosa/Não-infecciosa) e estratégia terapêutica (Tratamento conservador/Terapia dialítica) foi maior em cães e gatos de etiologia não-infecciosa e sem diferença significativa entre tratamentos (LEGATI *et al.*, 2018).

Desta forma, a LRA sustenta-se como uma enfermidade de alta mortalidade em humanos e animais, nos quais aproximadamente 50% desta população correrá risco de

morte iminente dependendo da etiologia e das opções disponíveis para intervenção e tratamento (PALM *et al.*, 2016; LEGATI *et al.*, 2018).

Quanto a sua terminologia, o termo “Lesão Renal Aguda”, adaptado do inglês *Acute Kidney Injury*, suplantou amplamente a terminologia mais antiga de “Insuficiência Renal Aguda” ou “Falência Renal Aguda” (COWGILL, 2016). Esta mudança reflete o reconhecimento de graves deficiências com as terminologias antigas. A terminologia “Insuficiência Renal Aguda” enquadra-se a um quadro limitado e dicotômico; ora em relação entre a função renal normal, ora ao órgão insuficiente; em contraste, o termo LRA captura o crescente corpo de dados, associado a decréscimos agudos e/ou transitórios, de pequenos a moderados, na função renal com resultados adversos graves (METHA *et al.*, 2007; OSTERMAN *et al.*, 2020). Apesar de a terminologia LRA enfatizar o aspecto graduado de doença renal aguda, deve-se reconhecer que esta terminologia também é imperfeita (LEVEY *et al.*, 2020).

O termo *Lesão* sugere a interpretação da presença de uma lesão intrínseca de órgão parenquimatoso, no entanto, esta pode estar ausente em uma variedade de cenários associados a um quadro agudo de declínio da função renal tais como: doença obstrutiva precoce, ruptura do trato urinário superior e inferior, além das influências negativas pela azotemia pré-renal como à depleção de volume (COWGILL, 2016).

Embora o termo “disfunção renal aguda” possa ser melhor caracterizar todo o espectro da síndrome, LRA é o termo adotado por consenso comum entre líderes globais de opinião e empregado na literatura médica (WEISBORD; PALEVSKY, 2020).

2.1.2 Etiologias

A LRA permanece subdivida em três classificações etiológicas como a forma hemodinâmica (antiga pré-renal), renal intrínseca, e pós-renal. Por conceito, cada uma destas classificações é distinta entre si, no entanto, elas podem se sobrepor em um indivíduo e dificultar o diagnóstico da origem de sua causa de base, isto é; uma injúria persistente extrínseca pode levar a uma lesão renal intrínseca por serem diferentes pontos em uma continuidade (ROSS, 2011).

2.1.2.1 Azotemia hemodinâmica

Também chamada de azotemia transitória ou azotemia responsiva a volume (UCHINO, 2010); a azotemia hemodinâmica está correlacionada com a baixa perfusão de volume de sangue para os rins, o qual impossibilita a manutenção fisiológica da

purificação sanguínea, e contribui para o acúmulo de solutos, metabólitos e toxinas nitrogenadas (LANGSTON, 2017). No entanto, embora o fluxo sanguíneo renal reduzido e a isquemia tenham sido considerados os principais contribuintes para a patogênese da LRA, a hipoperfusão renal por si só (redução de 80% do fluxo sanguíneo renal por 2 horas) não induziu uma LRA sustentada, possivelmente pelos efeitos da autorregulação mediado pelo sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (SAOTOME *et al.*, 2010).

A azotemia hemodinâmica é caracterizada pelo aumento das concentrações séricas de ureia e creatinina associados a uma densidade urinária aumentada, e sua reversão somente será corrigida de forma rápida quando a causa de base seja corretamente diagnosticada (LANGSTON, 2008). Este tipo de azotemia é identificado em animais com qualquer histórico de diminuição do fluxo sanguíneo renal, tais como: hipotensão, desidratação, hipovolemia, trauma, choque, anestésicos, cirurgias, oclusões da artéria renal por estenose, trombos e massas; doenças como hipoadrenocorticism, hipertermia maligna, cardiopatias, cirrose hepática, síndrome nefrótica e fármacos que comprometem a hemodinâmica renal como anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), inibidores da enzima conversora de angiotensina (iECA) e bloqueadores dos receptores de angiotensina (BRA) (HIMMELFARB *et al.*, 2008; HOSTE; KELLUM, 2010).

No entanto, enquanto muitos animais respondem rapidamente a hipoperfusão renal com fluidoterapia endovenosa, outros não. Animais em hipoproteïnemia por hipoalbuminemia, ou em síndrome nefrótica avançada, bem como de animais com cardiopatia congestiva e em sepse; estes sofrerão de forma negativa os efeitos da sobrecarga de volume a evoluir para edema pulmonar cardiogênico ou não-cardiogênico (HIMMELFARB *et al.*, 2008; KEIR; KELLUM, 2015).

2.1.2.2 Azotemia renal intrínseca

A azotemia renal intrínseca (ARI) corresponde a lesão em qualquer segmento do rim, seja nos glomérulos, túbulos, interstício ou vasos (LANGSTON, 2008). Dentre as causas intrínsecas mais comuns estão as lesões por exposição a agentes nefrotóxicos, doenças infecciosas e isquemia em vasos maiores e na microvasculatura glomerular, ou por doença tubulointersticial aguda (LAMAIRE *et al.*, 2005).

É importante ressaltar que na ARI são múltiplos os fatores os quais possam estar presentes, o qual torna-se difícil de determinar a contribuição relativa de cada um. Da mesma forma, são diversas as variedades de doenças infecciosas que culminam no desenvolvimento da ARI tais como; leptospirose, piometra, infecções do trato urinário,

em especial, pielonefrite; doenças transmitidas por vetores, endocardite bacteriana e discoespondilite (BARSANTI, 2006; ROSS 2011; KEIR; KELLUM, 2015).

Outras doenças não-infecciosas como as glomerulonefrites por doenças autoimunes e linfoma renal também são consideradas como doenças primárias de uma ARI (ROSS, 2011). Por outro lado, devido o rim ser um órgão integrado aos demais pela sua responsabilidade de filtração, secreção e excreção de metabolitos, diversas doenças como a síndrome inflamatória responsiva sistêmica (SIRS), coagulopatia intravascular disseminada (CID), síndrome hepatorenal, hipertensão maligna e pancreatite também manifestam uma ARI secundária aos rins (GORI *et al.*, 2019; COLE *et al.*, 2020; MARTINEZ *et al.*, 2020;

Por último, existe uma ampla variedade de agentes nefrotóxicos pelos quais pequenos animais possam desenvolver uma ARI, seja uma toxina endógena como a mioglobina ou hemoglobina; ou exógena como pesticidas e herbicidas (ROSS, 2011). De maneira peculiar, muitas referências relatadas em estudos veterinários apresentam agentes nefrotóxicos diferentes de acordo com sua localização geográfica no mundo; como por exemplo, a intoxicação por etilenoglicol, um composto químico muito utilizado como anticongelante automotivo nos países onde há temperaturas negativas. No entanto, de maneira global, fármacos como aminoglicosídeos, AINES, iECA's e BRA's além de uma vasta miscelânea de agentes (Tabela 1) são comumente relatados em literaturas veterinárias (RUMBEIHA; MURPHY, 2013).

Tabela 1 – Classe de agentes nefrotóxicos promotores da azotemia renal intrínseca

Classe de Agentes	Exemplos
Antibióticos	Aminoglicosídeos, Cefalosporinas, Penicilinas, Sulfonamidas, Fluorquinolonas, Tetraciclina, Vancomicina, Carbapenems, Rifampicina, Polimixinas, Aztreonam, Nafcilina
Antiprotozoários	Sulfametoxazol-Trimetoprim, Sulfadiazidas, Pentamidina, Dapsona, Tiacetarsamida
Antifúngicos	Anfotericina B
Antivirais	Aciclovir, Foscavir
Quimioterápicos	Cis/carboplatina, Doxorubicina, Azatioprina, Metotrexato
Imunossupressores	Ciclosporina, Interleucina-2

AINES / BRA	Todos
Diuréticos	Todos
Toxinas Endógenas	Hemoglobina, Mioglobina
Outras drogas	Aluporinol, Cimetidina, Apomorfina, Dextran, Penicilamida, Estreptoquinases, EDTA, Metoxifurano, Amitripitilina, Estatinas, Antagonistas de Cálcio, Análogos de Vit D ₃ , Lítio, Acidificantes urinários a base de fósforo
Metais Pesados	Mercúrio, Urânio, Bismuto, Arsênico, Ouro, Chumbo, Cádmio, Prata, Bronze, Níquel, Antimônio, Tálho
Miscelâneas	Nitratos, Bifosfonados, cogumelos, uvas, uva passa, venenos de cobra, lírios, toxinas de abelhas, rodenticidas, fluoroacetatos, fertilizantes
Compostos orgânicos	Etilenoglicol, clorofórmio, pesticidas, herbicidas e solventes

Abreviações: EDTA= ácido etilenodiamino tetra-acético.

Fonte: traduzido e adaptado de Mugford et al., 2013.

2.1.2.3 Azotemia pós renal

A azotemia pós-renal ocorre pela obstrução dos ureteres, vesícula urinária ou uretra, além do vazamento de urina por estes tecidos (LANGSTON, 2008). A obstrução urinária diminui a filtração renal por uma combinação de eventos neuro-humorais e aumento da contrapressão no rim (KYLES *et al.*, 2005).

Do mesmo modo, a azotemia secundária à ruptura é rapidamente revertida ao efeito de drenagem do líquido da cavidade abdominal, seja a implantação de um cateter peritoneal para uroabdomen ou derivação urinária com o auxílio de uma sonda uretral ou *stent* estendendo-se acima e abaixo do local de ruptura (ROSS, 2011).

Como a urina é cáustica e inflamatória, esta pode desenvolver peritonite estéril. No entanto, o vazamento de urina para o abdômen em um animal com infecções do trato urinário poderá levar a uma peritonite séptica, sendo esta, uma emergência cirúrgica (MUSTONEN *et al.*, 2001).

Portanto, o diagnóstico precoce e o alívio imediato da obstrução continuam sendo objetivos principais na prevenção de danos ao parênquima de longo prazo, pois quanto mais curto o período de obstrução, melhores as chances de recuperação e resultados favoráveis em longo prazo (MUSTONEN *et al.*, 2001; KYLES *et al.*, 2005).

2.1.3 Fisiopatologia da LRA

A diminuição da função renal na LRA é multifatorial, do mesmo modo, o tempo necessário para ver as mudanças é variável, dependendo da natureza e da gravidade do insulto, o qual propiciará a diminuição do fluxo sanguíneo intrarrenal (FSR), hipóxia e danos celulares. (KELLUM *et al.*, 2017; MEHTA, 2020).

A isquemia provoca uma rápida degradação intracelular de adenosina trifosfato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e monofosfato de adenosina (AMP); O AMP por sua vez, pode ser ainda degradado para outros nucleotídeos de adenina que se difundem para fora das células, impedindo sua re-síntese intracelular (PADANILAM, 2003; DEVARAJAN, 2006; OKUSA; PORTILLA, 2020).

Consequentemente, esta hipóxia intracelular leva a diversas alterações metabólicas e estruturais dentro das células tubulares renais, o qual propicia no aumento das concentrações de cálcio intracelular, e ativando proteases e fosfolipases com danos celulares subsequentes (SUTTON *et al.*, 2001; ROSS, 2011). Associado a este evento, ocorre uma redução da atividade de Na/K-ATPase, a qual altera o gradiente de concentração intracelular e arrasta água para dentro das células, desenvolvendo edema celular, o qual contribui para obstrução tubular (ABUELO, 2007; KELLUM *et al.*, 2017).

A LRA pode ser classificada em quatro fases fisiopatológicas: a fase de iniciação, a fase de extensão, a fase de manutenção e recuperação (ROSS, 2011; COWGILL, 2016). A fase de iniciação ocorre com o insulto renal como por exemplo, a própria isquemia citada acima, uso de agentes nefrotóxicos e, a forma obstrutiva (HIMMELFARB *et al.*, 2008). Sua persistência, se não corrigida, levará a uma alteração da função renal, tais como a diminuição de produção de urina e azotemia (MUGFORD *et al.*, 2013).

Nesta fase inicial, a intervenção terapêutica precoce é de extrema importância, a fim de evitar a progressão e gravidade da lesão renal (OKUSA; PORTILLA, 2020). Porém, os sinais clínicos são muitas vezes inaparentes e, requerem uma minuciosa anamnese pelo clínico; uma alternativa, é o emprego de biomarcadores de lesão glomerular e tubular, ainda que limitados por questões de custo e de acesso para fins de pesquisa (PRESSLER, 2013; YERRAMILI *et al.*, 2016).

Adiante, a fase de extensão é o estágio onde a presença de hipóxia, isquemia e inflamação, intensificam os danos renais independentemente da injúria inicial (SUTTON *et al.*, 2002). No glomérulo, a constrição arteriolar aferente leva à diminuição da TFG além de contribuir para a oligúria, a isquemia também induz uma rápida perda de

interação entre as proteínas juncionais na fenda do diafragma, levando a dano podocitário, apoptose e proteinúria (PADANILAM, 2003).

Os túbulos proximais presentes na região medular, além do ramo ascendente espesso da alça de Henle são estruturas predispostas a injúrias tóxicas e isquêmicas, pois estes recebem 90% do fluxo sanguíneo renal e, conseqüentemente, as células perdem sua polaridade, resultando em alterações do transporte eletrolítico (DEVARAJAN, 2006). Por conseqüência, a dissociação das bombas de Na^+K^+ -ATPase leva a alteração do transporte de sódio tubular proximal e resultando em um aumento da fração de sódio filtrado atingindo assim a mácula densa (ROSS, 2011).

Igualmente, as integrinas são glicoproteínas que dividem a adesão célula-célula, assim, em processos isquêmicos, perdem a função de ancoragem das células tubulares para a membrana basal e, conseqüentemente, favorecendo a descamação celular e obstrução tubular (Figura 1). Esta perda de ancoragem afeta também a "porta" e as funções de "cerca" dos túbulos, a qual contribui para o fenômeno *backleak*, ou extravasamento retrógrado do filtrado glomerular para o interstício (MOLITORIS *et al.*, 2004).

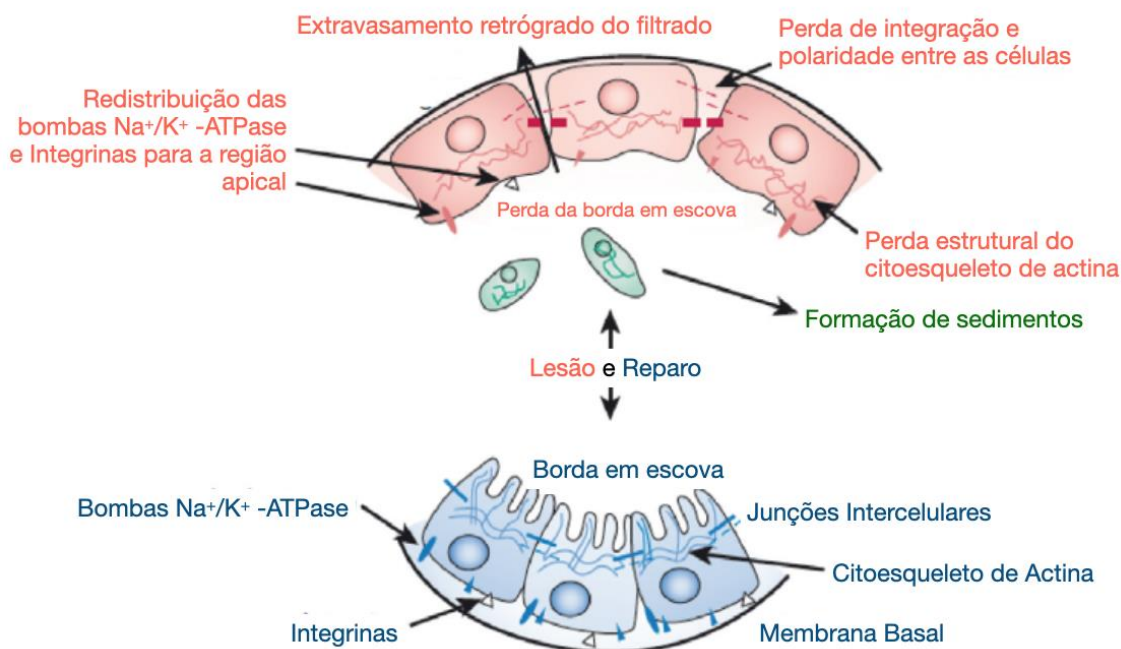
Posteriormente, a terceira fase, ou fase de manutenção, é caracterizada pela persistência da extensão com a presença de sais clínicos e laboratoriais como azotemia, uremia, ou ambas podendo durar dias ou semanas (MUGFORD *et al.*, 2013). Ainda, embora que o débito urinário seja altamente variável, mesmo em um animal adequadamente hidratado, a presença de oligúria é representada por valores inferiores a 1 mL do débito, dividido pelo peso corpóreo (Kg) por hora mensurada, ou por anúria, representada pela ausência de produção de urina em 6 horas de avaliação do débito (ROSS, 2011; COWGILL, 2016).

Devido ao limitado acesso de biomarcadores de lesão renal, a IRIS orienta aos clínicos veterinários que a monitoração da sCr em animais suspeitos de LRA deve ser contínua (entre 48 horas) a fim de diagnóstico precoce naqueles animais ainda sem azotemia (COWGILL, 2016). Portanto, assim como em referências humanas pelo AKIN, a IRIS também valida que, aumentos superiores de 0,3 mg/dL de creatinina sérica em

animais não azotêmicos em um intervalo de 48 horas é sugestivo de LRA (MEHTA *et al.*, 2007; COWGILL, 2016; MEHTA, 2020)

Figura 1 – Consequências da lesão e reparo das células tubulares durante a lesão renal aguda.

As células deixam de apresentar polaridade e a integridade de suas junções intercelulares é perdida, devido

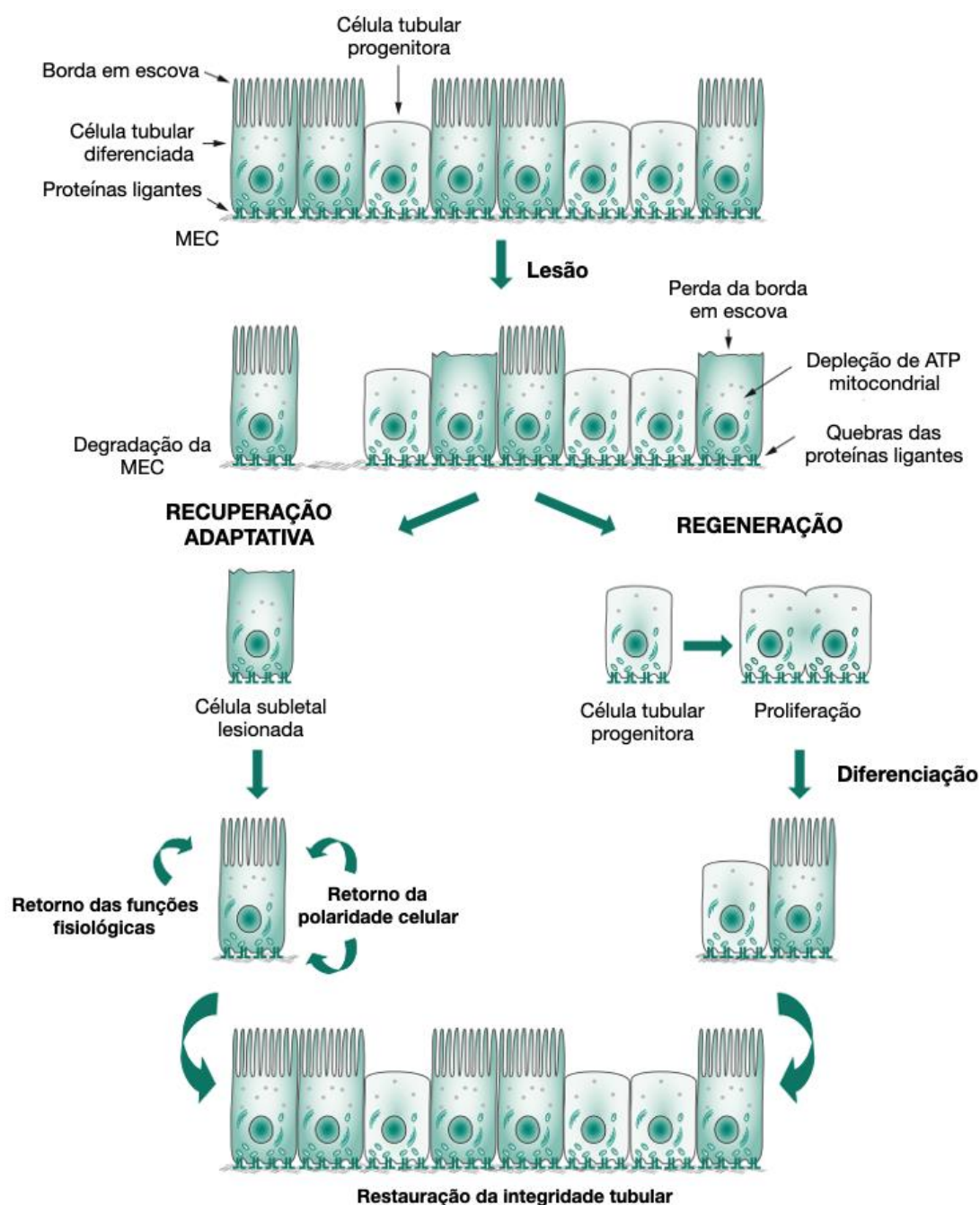


as alterações na actínia e redes de microtúbulos do citoesqueleto, o que acarreta o extravasamento retrógrado do filtrado. Além disso, também ocorre a redistribuição de Na^+/K^+ - ATPase e das integrinas para a superfície apical da membrana basal e as células mortas e vivas destacam-se escoando para o lúmen tubular. Traduzido e adaptado de Okusa, M. D.; Portilla, D. 2020.

Por conseguinte, a quarta fase, caracterizada como a fase de recuperação, consistem no reparo do parênquima renal (ROSS, 2011; MUGFORD *et al.*, 2013; IRIS, 2016). Por muitos anos, foi aceito que a LRA era totalmente reversível, em particular, após lesão tubular leve. Na presença de lesão, as células tubulares sobreviventes geram respostas adaptativas em se diferenciar, proliferar, migrar para áreas desnudas e, consequentemente, se rediferenciar para reconstruir túbulos funcionais e restaurar a homeostase renal (BONVENTRE, 2003; HUMPHREYS *et al.*, 2008; HUMPHREYS *et al.*, 2011).

No entanto, estudos recentes questionaram a capacidade de todas as células tubulares em se dividir e substituir células perdidas, além disso, demonstraram também que existe uma população de células progenitoras tubulares nos rins humanos (ANGELOTTI *et al.*, 2019). Estas células têm um fenótipo mais robusto e uma maior resistência à morte (Figura 2). Em virtude de sua resistência à morte; estas células progenitoras dispersas sobrevivem aos danos renais, proliferam-se e substituem células

288 tubulares perdidas; desta forma, os processos de reparo adaptativo e regeneração tubular
 289 trabalham juntos para restaurar a função renal do néfron danificado (ANGELOTTI *et al.*,
 290 2019).

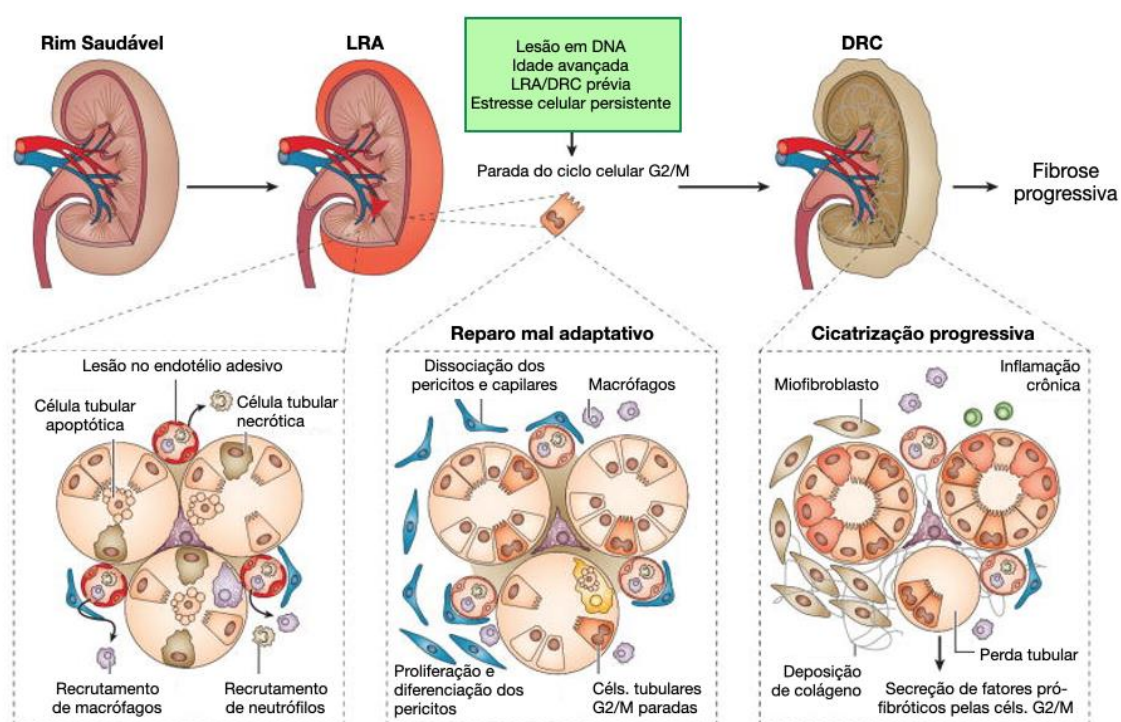


291

292 **Figura 2 – Recuperação adaptativa e regeneração das células tubulares em lesão renal aguda.**

293 Após a lesão, algumas células tubulares morrem pela via necrose ou apoptose e separam-se da membrana,
 294 outras perdem sua borda escovada e sua integridade de ancoragem proteica propiciando na inibição
 295 mitocondrial e depleção de ATP. Como resposta, as células lesionadas ativam o processo de reparo adaptativo,
 296 enquanto, por outro lado, células progenitoras tubulares (mais resistentes a morte), sobrevivem, se
 297 proliferam e diferenciam-se a fim de substituir as células tubulares perdidas. MEC = Matriz Extracelular.
 298 Traduzido e adaptado de Angelotti et al., 2019.

299 No entanto, quando a lesão é grave ou prolongada, o equilíbrio se inclina para
 300 respostas mal adaptativas (Figura 3) das quais levam ao mau funcionamento das células
 301 e tecidos (VENKATACHALAM *et al.*, 2015). Em um cenário de lesão aguda grave ou
 302 lesão aguda menos grave no contexto de lesão aguda na DRC, especialmente no rim em
 303 envelhecimento, a inflamação e a fibrose são mal-adaptativas e são centrais para a
 304 progressão da DRC (FERENBACH; BONVENTRE, 2015). Desta forma, fatores de
 305 sinalização pró-fibróticos e pró-inflamatórios elaborados por células de crescimento
 306 interrompido (*growth arrest cells*) e os epitélios tubulares indiferenciados amplificam a
 307 cascata fibrótica/inflamatória interrompendo as interações celulares no espaço intersticial
 308 e, propiciando a fibrose tubular intersticial (BARNES; GLASS LI, 2011).
 309



310 **Figura 3 – Reparo mal adaptativo das células tubulares na lesão renal aguda leva à doença renal**
 311 **crônica.**

312 A importância da parada do ciclo celular G2/M em resposta a agressões renais graves, repetidas e
 313 genotóxicas. Na fase inicial de reparo após a lesão, as células podem ficar presas na fase G2/M e liberar
 314 citocinas e fatores de crescimento que promovem a retenção de células inflamatórias no rim e a inflamação
 315 contínua. Lesões e estímulos pró-inflamatórios levam à dissociação dos pericitos do endotélio, resultando
 316 em rarefação microvascular e deposição progressiva de colágeno pelos miofibroblastos originados dos
 317 pericitos ativados. Consequentemente, o envelhecimento sensibiliza as células tubulares à parada G2/M em
 318 resposta ao estresse celular e danos ao DNA, fornecendo uma explicação potencial para o aumento do risco
 319 de progressão da DRC após a LRA. Abreviaturas: LRA= Lesão renal aguda; DRC= Doença renal crônica.
 320 Traduzido e adaptado de Ferenbach, D. A.; Bonventre J. V. 2015.

321
 322 Portanto, nos animais oligúricos ou anúricos, esta fase é caracterizada pela
 323 recuperação e aumento do débito urinário, associado ao aumento variável na concentração

324 de sódio urinária. Neste cenário, a natriurese pode ser elevada levando o animal à
325 desidratação e, consequentemente atrasar ou interromper o reparo renal, ou piorar a
326 injúria renal (LIU; BRAKEMAN, 2008; MEHTA, 2020).

327 No entanto, naqueles sem oligúria clínica, o débito urinário não se torna um
328 indicador útil de recuperação. Porém, a diminuição das concentrações séricas de ureia e
329 creatinina, e a diminuição da excreção de sódio urinário, são parâmetros alternativos para
330 o resgate da função renal (MUGFORD *et al.*, 2013; PRESSLER, 2013; COWGILL,
331 2016).

332

333 **2.1.4 Tratamento**

334 O tratamento da LRA consiste na terapia específica para a causa de base, bem
335 como de terapia suporte baseada no estágio da lesão e de acordo com o estado
336 hidroeletrólítico e acidobásico do animal (LI *et al.*, 2013; LANGSTON, 2017). É
337 desejável que haja estratégias para melhorar a oferta renal de oxigênio, reduzir a demanda
338 metabólica e manter o débito urinário (sem sobrecarga de volume), além de limitar as
339 respostas citotóxicas e inflamatórias e promover a regeneração das células tubulares
340 (PRUCHNICKI; DASTA, 2002; PALEVSKY *et al.*, 2013; LANGSTON; GORDON,
341 2021).

342

343 **2.1.4.1 Tratamento de outras doenças específicas**

344 A obstrução ureteral é uma causa relativamente frequente de LRA em pequenos
345 animais. Alguns cálculos ureterais passam para a bexiga dentro de horas ou dias, mas se
346 não, o alívio da obstrução é necessário para recuperar a função renal (OKUSA;
347 PORTILLA, 2020).

348 Animais que foram expostos a toxinas deverão receber um antídoto, se disponível,
349 ou receber carvão ativado como adsorvente por via oral; onde houver centros de diálise
350 na proximidade, hemodiálise intermitente e hemoperfusão também são terapias
351 extracorpóreas indicadas para àqueles expostos a toxinas dialisáveis (FOSTER, 2020).

352 Em áreas geográficas onde ocorra leptospirose, todos os cães com LRA presumida
353 devem receber antibióticos eficazes contra leptospiras (penicilinas, amoxicilina ou
354 doxiciclina) (SYKES *et al.*, 2011; ZAMAGNI *et al.*, 2020). A terapia empírica com
355 fluorquinolonas (excretado principalmente pelos rins) é indicada até que a pielonefrite
356 seja descartada e, os aminoglicosídeos devem ser evitados devido ao potencial de necrose
357 tubular aguda (WEESE *et al.*, 2019).

2.1.5 Monitoração e prognóstico

O prognóstico para cães e gatos com LRA está altamente correlacionado com a causa (ROSS, 2011). No geral, a taxa de mortalidade relatada em cães com LRA é de aproximadamente 53% a 60% e em gatos, 50% (LEGATTI *et al.*, 2018). Os cães com leptospirose têm um bom prognóstico, com sobrevida relatada de 85% (SYKES *et al.*, 2011). Por outro lado, cães com toxicidade de etilenoglicol que já são azotêmicos quando diagnosticados demonstraram ter um prognóstico ruim a grave, mesmo com terapia (VADEN *et al.*, 1997).

Outros critérios que mostraram conferir um prognóstico ruim para cães com LRA incluem azotemia grave (sCr >10 mg/dL), hipocalcemia, anemia, oligúria/anúria, hiperfosfatemia, ausência de melhora ou piora da azotemia com fluido apropriado e terapia de suporte e comorbidades como pancreatite ou sepse (VADEN *et al.*, 1997; COWGILL, 2016; SEGEV *et al.*, 2016).

Em uma metanálise por Legatti e colaboradores (2018), os autores sugerem que as taxas mais altas de mortalidade geral em cães e gatos com LRA, foi devido a etiologias não-infecciosas em relação às etiologias infecciosas e, sem diferença significativa quanto àqueles em terapia dialítica em comparação ao manejo clínico conservador. Diferente dos felinos, o grau de azotemia e as concentrações séricas de fosfato e cálcio não predizem sobrevida em cães (SEGEV *et al.*, 2016).

Portanto, o tratamento suporte e específico deve ser continuado até que ocorra uma das seguintes situações: (1) a normalização da função renal; (2) a melhora e estabilização da função renal, embora não aos níveis normais e, o animal esteja bem clinicamente; (3) a piora da função renal, ou esta não melhora o suficiente para que o animal seja tratado clinicamente em casa devido à falência do órgão (ROSS, 2011; LI *et al.*, 2013).

Nos 2 primeiros cenários, a fluidoterapia deverá ser reduzida gradualmente e, os medicamentos suporte ajustados em resposta aos sinais clínicos do animal (LANGSTON, 2017). No terceiro cenário, a terapia dialítica deverá ser considerada a fim de aliviar a sobrecarga renal intrínseca e recuperação do órgão (FOSTER, 2020). Se a diálise não for uma opção, a eutanásia pode ser indicada neste momento (ROSS, 2011)

2.2 Erliquiose Monocítica Canina

391 *Ehrlichia canis* é reconhecida como a principal causa de Erliquiose monocítica
392 canina (EMC) (NEER *et al.*, 2002; SAINZ *et al.*, 2015). Esta doença riquetsial transmitida
393 por carrapatos, potencialmente fatal, é globalmente distribuída em cães, endêmica em
394 todos os continentes, exceto na Austrália (DUMLER *et al.*, 2001; SYKES, 2013).

395 Ainda, a *E. canis* têm voltado para os olhos da saúde única pela possível infecção
396 de uma mulher Venezuelana, e mais recentemente, presente em evidência sorológica de
397 brasileiros residentes no estado do Mato Grosso, tornando assim uma doença potencial
398 zoonótica (PEREZ *et al.*, 2006; BEZERRA *et al.*, 2017).

399 O gênero *Ehrlichia* pertence à família *Anaplasmataceae* da ordem *Rickettsiales*
400 (DUMLER *et al.*, 2001). Estas bactérias dentro do grupo das α -proteobactérias são gram-
401 negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias que infectam uma ampla gama de
402 mamíferos. O gênero inicialmente incluiu 10 espécies classificadas com base na célula
403 hospedeira infectada: monócitos (*E. canis*, *E. risticii*, *E. sennetsu*), granulócitos (*E.*
404 *ewingii*, *E. equi*, *E. phagocytophila*, agente de erliquiose granulocítica humana [HGE]) e
405 trombócitos (*E. platys*) (VIEIRA *et al.*, 2011).

406 Com base em sequências de RNA ribossômico 16S (rRNA) e outros testes
407 genéticos, o gênero *Ehrlichia* foi reorganizado e atualmente consiste em cinco espécies:
408 *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (anteriormente *Cowdria*
409 *ruminantium*); portanto, os organismos restantes foram reclassificados no gênero
410 *Anaplasma* e no gênero *Neorickettsia* (HARRUS *et al.*, 2015).

411 Este organismo foi descrito por Donatien e Letosquard (1935) na Argélia pela
412 primeira vez como *Rickettsia canis* em cães. Posteriormente, após uma grande epizootia
413 nos anos 60, durante a Guerra do Vietnã em cães militares da raça pastor alemão que
414 adoeceram por uma síndrome hemorrágica, a erliquiose foi caracterizada como uma
415 doença canina (HUXSOLL *et al.*, 1970; SANTARÉM; AGUIAR, 2016). No Brasil, *E.*
416 *canis* foi relatado pela primeira vez em cães da cidade de Belo Horizonte, Estado de
417 Minas Gerais, sudeste do Brasil (COSTA *et al.*, 1973).

418

419 **2.2.1 Etiopatogenia**

420 A *Ehrlichia* é transmitida pela picada de um carrapato infectado, principalmente
421 pelo *Rhipicephalus sanguineus* (DANTAS-TORRES, 2008). Isto explica sua maior
422 prevalência no Brasil e em regiões tropicais e subtropicais devido à distribuição
423 geográfica dos vetores (ANDEREG; PASSOS, 1999; MORAES-FILHO *et al.*, 2011).

424 Apesar das evidências sorológicas de infecções generalizadas por *E. canis* no
425 Brasil, pouco se sabe sobre as características moleculares do *E. canis* brasileiro.
426 (AGUIAR *et al.*, 2013). Isto posto, dois estudos dos quais avaliaram a caracterização
427 molecular genética da cepa de *E. canis*, uma oriunda de São Paulo e outra de Uberlândia,
428 ambas apresentam o sequenciamento do gene 16S rRNA, o qual valida como teste
429 positivo para EMC. No entanto, por apresentarem diferenças em suas titulações finais,
430 estas devem ser utilizadas com restrições para qualquer que seja sua finalidade.
431 (AGUIAR *et al.*, 2008; RIECK, 2011).

432 Ainda, vários estudos em diferentes estados do Brasil relataram que 5,7-38,9%
433 dos cães atendidos em hospitais veterinários para fins múltiplos (populações hospitalares)
434 foram infectados por *E. canis* (TANIKAWA *et al.*, 2013). Portanto, a presença e
435 conhecimento dos vetores competentes, bem como de hospedeiros reservatórios,
436 determinará em grande parte onde a erliquiose é encontrada (HARRUS *et al.*, 2015).

437 Outros carrapatos, como os do gênero *Amblyomma* também podem ser vetores de
438 *Ehrlichia* de acordo com o hospedeiro, como por exemplo *E. ruminantium* no gado, *E.*
439 *chaffeensis* no veado e, *E. ewingii* em humanos e cães por *A. americanum* e *Dermacentor*
440 *variabilis* (DUMLER *et al.*, 2001; YABSLEY, 2010). Suspeita-se que outras espécies de
441 carrapatos, como *A. cajennense*, atuem como vetores de *E. canis* em áreas rurais (COSTA
442 JR *et al.*, 2007).

443 A EMC pode se manifestar em cães de qualquer raça, sexo ou idade. Alguns
444 estudos citam uma maior soroprevalência em cães machos, pastores, huskies e retrievers
445 e de idade avançada (SAINZ *et al.*, 2015). Com efeito, a *E. canis* é transmitida de maneira
446 transtadial pelo *R. sanguineus*; isto é, a transmissão da bactéria presente nas larvas, para
447 as fases de ninfa e adulto, o que permite que o carrapato fique infectado por toda a sua
448 vida e por várias gerações (BREMER *et al.*, 2005).

449 Ainda, alguns estudos em cães com *Ehrlichia spp.* indicam que o tempo de
450 transmissão pode ser inferior a 24 horas (KATAVOLOS *et al.*, 1998; de VIGNES *et al.*,
451 2001; HEILI *et al.*, 2007; FOURIE *et al.*, 2013), no entanto, o *R. sanguineus* transmitiu
452 *E. canis* aos cães dentro de 3 horas da fixação do carrapato (FOURIE *et al.*, 2013).

453 Geralmente, os dados sobre a patogênese da EMC são escassos quanto aos
454 aspectos imunopatológicos da doença. Após a inoculação da α -proteobactéria, os
455 microrganismos multiplicam-se nos macrófagos e, mais recentemente em neutrófilos do
456 sistema mononuclear fagocitário por divisão binária e, disseminam-se por todo o corpo
457 do hospedeiro (AGUIAR *et al.*, 2020).

458 A disseminação intracelular da infecção ocorre pela saída da bactéria (por meio
459 de ruptura da membrana celular do hospedeiro) durante o estágio de formação das
460 mórulas e, na captação por projeções citoplasmáticas adjacentes (THOMAS *et al.*, 2010).
461 Ainda, durante a fase aguda, ocorre uma atividade hiperplásica dos linfócitos T e B, assim
462 como da necessidade de interação das respostas imunes humorais e celulares a fim de
463 destruir a bactéria circulante (KAKOMA *et al.*, 1977; LEWIS JR; RISTIC, 1978).

464 Desta forma, acredita-se que a imunidade celular desempenha um papel
465 importante na patogênese da EMC (NYINDO *et al.*, 1980). Page (1995) também
466 enfatizou a importância da identificação de linfócitos para um melhor entendimento da
467 maioria das doenças caninas e demonstrou um alto número de células CD8⁺ no sangue
468 periférico de cães com EMC.

469 Weiser *et al.* (1991) afirmou que o aumento do número de células T citotóxicas
470 (*killer* e *natural killer*), ocorre durante a infecção levando a um aumento na citotoxicidade
471 celular. Os achados microscópicos de cães naturalmente infectados por EMC incluem
472 infiltrações de células linforreticulares e células plasmáticas em muitos órgãos e tecidos,
473 incluindo sistema nervoso, rins, pulmões, fígado e tecidos linfóides. Essa infiltração
474 celular e proliferação de linfócitos modifica a arquitetura microscópica dos gânglios
475 linfáticos e do baço (REARDON; PIERCE, 1981a,b; VALLI, 1993).

476 Da mesma forma, as células B se diferenciam em plasmócitos que se segregam
477 em γ -globulinas policlonais, propiciando assim a hipergamaglobulinemia, um achado
478 laboratorial comumente observado nos cães infectados indicativa de uma resposta
479 humoral exacerbada associada à patogênese aguda da enfermidade (WANER; HARRUS,
480 2013). Consequentemente, os títulos médios de anticorpos (Ac's) permanecem elevados
481 por meses a anos mesmo após a eliminação total do organismo (HARRUS *et al.*, 2015).

482 Similarmente, acredita-se que a *Ehrlichia* tenha uma afinidade com o tecido
483 esplênico por certas particularidades: (1) a presença de esplenomegalia (não-congestiva)
484 na fase aguda associado a proliferação de linfócitos e plasmócitos e, (2) a manifestação
485 de sinais clínicos discretos naqueles previamente infectados que foram
486 esplenectomizados (3) presença de mórulas com rt-PCR positivo além da expressiva
487 contagem de CD4⁺ e CD8⁺ no baço (HARRUS *et al.*, 1998; FARIA *et al.*, 2010; MCGILL
488 *et al.*, 2018)

489

490 2.2.2 Manifestações clínicas e hematológicas

O curso da EMC é dividido entre as fases aguda, subclínica e crônica; embora estas nem sempre sejam clinicamente distinguíveis (HARRUS *et al.*, 2015). A transmissão pode ocorrer em até três horas após a fixação do carrapato e, sinais agudos de doença ocorrem de 8 a 20 dias durante seu período de incubação (FOURIE *et al.*, 2013). Nesta fase, os sinais clínicos inespecíficos incluem a letargia, inapetência, febre e perda de peso (HARRUS; WANER, 2011).

Logo após a incubação, durante a replicação do organismo nos tecidos reticuloendoteliais, a fase aguda se inicia e permanece durante 2 a 4 semanas com sinais clínicos associados a febre, linfadenopatia generalizada e esplenomegalia (SANTARÉM; AGUIAR, 2016). Também pode ocorrer secreção ocular e nasal, edema periférico e, menos comumente, hemorragias petequiais e equimóticas (HARRUS; WANER, 2011).

Devido a intensa inflamação na meninge associado ou não a eventos hemorrágicos, sinais neurológicos como espasmos, ataxia, convulsões, sinais vestibulares, hiperestesia e déficits de nervos cranianos (SANTARÉM; AGUIAR, 2016). A trombocitopenia e, às vezes, leucopenia leve e anemia ocorrem 1 a 4 semanas após a infecção. Também foi relatada proteinúria transitória, que remite em 6 semanas após a infecção. (CODNER; MASLIN, 1992). Os cães podem se recuperar da fase aguda após 2 a 4 semanas sem tratamento (HARRUS; WANER, 2011).

No entanto, após a fase aguda, alguns cães permanecem infectados na forma subclínica persistindo por meses a anos (HARRUS *et al.*, 2015). Estes podem ter trombocitopenia persistente leve. Os organismos podem tornar-se latentes no baço e escapar do sistema imunológico do hospedeiro por meio da variação antigênica (MAVROMATIS *et al.*, 2006).

Ainda permanece obscura até que ponto os cães naturalmente infectados eliminam imunologicamente a infecção ou permanecem subclínicamente infectados após infecção. Claramente, no entanto, durante a fase aguda ou subclínica de EMC, os cães imunocompetentes podem eliminar a infecção ou, alternativamente, diminuir a “erliquiaemia” e suas cargas bacterianas nos tecidos para níveis não passíveis de detecção molecular por amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR) (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998; EDDLESTONE *et al.*, 2007).

Conforme a doença avança, a gravidade da erliquiose crônica pode variar de leve a fatal, com sinais que incluem inapetência de letargia, tendências a sangramento, palidez, febre, hipotermia em cães profundamente pancitopênicos, perda de peso, linfadenopatia,

524 esplenomegalia, uveíte anterior, hemorragia retinal, descolamento de retina, edema,
525 poliúria e polidipsia (HARRUS; WERNER, 2011; SANTARÉM; AGUIAR, 2016).

526 As tendências de sangramento resultam de trombocitopenia e disfunção
527 plaquetária que são explicadas por vários mecanismos, como o aumento do consumo
528 plaquetário e a diminuição do tempo de meia-vida das plaquetas, que resultam no
529 esplenomegalia (BRANDÃO *et al.*, 2006). Sinais como hemorragias cutâneas, mucosas
530 com petéquias ou equimóticas, epistaxe, melena, hematoquezia, hematúria e sangramento
531 prolongado de locais por venopunção (MYLONAKIS *et al.*, 2004).

532 A trombocitopenia e a anemia arregenerativa também são comuns. Pode ocorrer
533 linfocitose granular moderada a acentuada (até 17.000 / mcL) e plasmocitose da medula
534 óssea; consequentemente, cães com linfocitose bem diferenciada ou com gamopatia
535 monoclonal inexplicada deverão ser testados para infecção por *E. canis* (NEER, *et al.*,
536 2002; MYLONAKIS *et al.*, 2003). Polimiosite pode se desenvolver, com atrofia muscular
537 e tetraparesia (HARRUS *et al.*, 2015).

538 A pancitopenia decorrente da hipoplasia celular generalizada da medula óssea,
539 pode ser encontrada no hemograma, a qual caracteriza a forma crônica e grave da
540 erliquiose, predispondo à alta mortalidade devido a septicemia e/ou sangramento grave
541 (HARRUS *et al.*, 1997; MYLONAKIS *et al.*, 2004; SHIPOV *et al.*, 2008; MYLONAKIS
542 *et al.*, 2011).

543 Ocasionalmente, a mielossupressão pode se desenvolver sem quaisquer sinais
544 indicativos das fases aguda e subclínica do EMC (MYLONAKIS *et al.*, 2004). Portanto,
545 os termos “não-mielossupressor” e “mielossupressor” na EMC podem refletir melhor a
546 gravidade da doença em um contexto clínico, independentemente do início da doença ou
547 de sua fase presumida (HARRUS; WERNER, 2011).

548 Ainda, dependendo da imunidade do hospedeiro, poderão surgir infecções
549 oportunistas secundárias, como papilomatose viral, infecções por protozoários e
550 bacteriúria, embora seu mecanismo subjacente de supressão imunológica e como ele se
551 relaciona com a persistência de *E. canis*, ainda não foi elucidado (SHIPOV *et al.*, 2008;
552 HARRUS *et al.*, 2015).

553 Anormalidades bioquímicas na EMC crônica incluem a hipoalbuminemia,
554 hiperglobulinemia e atividades elevadas de alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase
555 alcalina (FA) (SANTARÉM; AGUIAR, 2016). Também já explicada, a
556 hiperglobulinemia geralmente se deve a uma gamopatia policlonal (HARRUS *et al.*,
557 1997). Cães com envolvimento do SNC podem ter concentrações aumentadas de

558 proteínas no líquido cefalorraquidiano e altas contagens de celulares (HARRUS;
559 WERNER, 2011).

560 E, por fim, a presença de nefropatias decorrente de uma glomerulonefrite de
561 caráter membranoproliferativa por imunocomplexos com presença de proteinúria e,
562 associada ou não à azotemia também poderá ser diagnosticado em cães com EMC
563 (CASTER *et al.*, 2014).

564

565 2.2.3 Diagnóstico

566 Vários métodos com vários graus de sensibilidade e especificidade podem ser
567 usados para detectar organismos *Ehrlichia*. No passado, as espécies de *Ehrlichia* eram
568 identificadas usando microscopia de luz na pesquisa de corpos elementares, corpos
569 iniciais ou mórulas no citoplasma da célula hospedeira de esfregaços de sangue corados
570 pela técnica de Romanowsky. No entanto, essa técnica carece de sensibilidade e
571 especificidade. (HILDEBRANDT *et al.*, 1973).

572 O ensaio de imunofluorescência indireta (IFA) foi o teste tradicional para
573 diagnosticar erliquiose monocítica humana e canina (RISTIC *et al.*, 1972; WANER *et al.*,
574 2001; AGUIAR *et al.*, 2007; DUMLER *et al.*, 2007; SAITO *et al.*, 2008). Após a
575 infecção, os anticorpos podem ser detectados entre 7 e 28 dias; portanto, cães com
576 erliquiose aguda podem ter resultados falso negativos se a produção de anticorpos ainda
577 não tiver ocorrido, em especial, os testes *point of care* (HARRUS *et al.*, 2015).

578 Como consequência, um novo teste deverá ser realizado após 2 a 3 semanas para
579 detectar a soroconversão. No entanto, um título positivo de anticorpos séricos para *E.*
580 *canis* pode ocorrer com a exposição anterior e não equivale ao diagnóstico. Desta forma,
581 os resultados da sorologia devem ser interpretados baseados nos sinais clínicos e
582 resultados de testes para outras enfermidades (HARRUS *et al.*, 2015). Cães com infecção
583 crônica por *E. canis* geralmente têm títulos de IFA extremamente altos, às vezes > 1:
584 600.000. Os anticorpos podem persistir apesar do tratamento, sugerindo persistência do
585 organismo (MYLONAKIS *et al.*, 2004).

586 Embora essa técnica ainda seja amplamente utilizada, um número significativo de
587 falsos positivos pode ocorrer devido à reatividade cruzada com outros organismos dos
588 gêneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* (RISTIC *et al.*, 1981; HARRUS *et al.*,
589 2002; OLANO; WALKER, 2002; PADDOCK; CHILDS, 2003).

590 Uma variedade de ensaios como o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*
591 (ELISA), detectam Ac's para diagnosticar erliquiose (por exemplo, *immunoblot*, *Enzyme*
592 *Linked Immunosorbent Assay* (cELISA) competitivo) (SANTARÉM; AGUIAR, 2016).

593 Um dispositivo ELISA de fluxo lateral de ponto de atendimento (*point of care*)
594 detecta antígeno de dirofilariose canina, Ac's para *E. canis* ou *E. ewingii*, Ac's para
595 *Borrelia burgdorferi* e Ac's para *A. phagocytophilum* em soro canino, plasma ou sangue
596 total (SNAP 4Dx Plus, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME.). Este teste inclui proteínas
597 de superfície recombinantes de *E. canis* e *E. ewingii* (STILLMAN *et al.*, 2014).

598 Os antígenos de *E. canis* e *E. ewingii* são combinados em um único ponto,
599 portanto, um resultado positivo reflete a sororreatividade para *E. canis*, *E. ewingii* ou
600 ambos. A sensibilidade desse ensaio para detecção de anticorpos para *E. canis* quando
601 comparado com IFA foi de 131/134 (97,8%) e a especificidade foi de 217/235 (92,3%)
602 (STILLMAN *et al.*, 2014). Todavia, recomenda-se que os cães avaliados por ELISA e
603 identificados com sororreatividade cruzada para *E. canis* e outras doenças, deverá ser
604 realizado a IFA para determinar os níveis de Ac's e, se necessário associar ao PCR. Neste
605 estudo, 40% da população de cães apresentavam altos títulos de Ac's após 1 ano de
606 diagnóstico e tratamento da EMC (BARTSCH; GREENE, 1996).

607 O cultivo celular é também é um exame considerado sensível e específico para o
608 diagnóstico definitivo da EMC. No entanto, seus resultados são muito tardios (após 14 a
609 34 dias); desta forma, este exame se restringe em especial para pesquisas científicas
610 (AGUIAR *et al.*, 2008; HARRUS *et al.*, 2015).

611 A precisão do diagnóstico foi muito melhorada com a introdução de técnicas de
612 cultura e moleculares. No Brasil, *E. canis* foi cultivada pela primeira vez em 2002 usando
613 células DH82 (TORRES *et al.*, 2002) e uma cepa brasileira foi caracterizada
614 molecularmente em 2008 usando os genes *dsb*, 16S rRNA e *p28* (AGUIAR *et al.*, 2008).
615 Todos esses organismos podem ser cultivados em cultura de células, com exceção de *E.*
616 *ewingii*. No entanto, esta é uma técnica demorada, não disponível em muitos laboratórios.
617 As culturas também requerem instalações laboratoriais especializadas e pessoal altamente
618 treinado (SANTARÉM; AGUIAR, 2016).

619 A detecção molecular do gênero *Ehrlichia* por PCR, nested-PCR e PCR em tempo
620 real (rt-PCR) tem sido usada para identificar indivíduos infectados experimentalmente ou
621 naturalmente nas fases aguda e crônica (SANTARÉM; AGUIAR, 2016). A PCR é um
622 teste mais sensível e específico em comparação com outros métodos (IQBAL *et al.*, 1994)
623 embora resultados falso-positivos ainda possam ocorrer (APFALTER *et al.*, 2005).

O DNA de *E. canis* pode ser detectado usando PCR em sangue, aspirados de linfonodos, aspirados esplênicos ou medula óssea. No entanto, a sensibilidade da PCR da medula óssea para o diagnóstico de erliquiose crônica pode ser tão baixa quanto 25% (MYLONAKIS *et al.*, 2004). Assim, a PCR sozinha não é adequada para rastrear potenciais doadores de sangue para infecção, mas pode ser útil para confirmar a infecção na primeira semana da doença quando os testes sorológicos costumam ser negativos (HARRUS; WERNER, 2011).

Apesar de normalmente não serem exames solicitados nos casos de suspeita de EMC, aspirados ou biópsias medulares podem auxiliar no diagnóstico e principalmente no prognóstico de cães acometidos pela EMC. O mielograma assiste na identificação de mórulas de *E. canis*, exclusão de outras causas de pancitopenia ou desordens hematológicas e avalia precursores hematopoiéticos; além disso, a punção medular é necessária na determinação da fase da doença com o intuito de se eleger o melhor tratamento para os animais doentes (CAXITO, *et al.* 2018).

638

2.2.4 Tratamento

O tratamento recomendado para EMC é doxiciclina (10 mg / kg PO q 24 h) por 28 dias (NEER *et al.*, 2002). Períodos mais curtos de tratamento (por exemplo, 16 dias) podem ser eficazes para cães em EMC aguda (HARRUS *et al.*, 2004). A maioria dos cães demonstra uma melhora clínica dentro de 24 a 48 horas, mas aqueles com doença crônica grave podem não responder à terapia ou, suas “citopenias” podem remitir gradualmente ao longo de vários meses (WANER, 2008).

A contagem de plaquetas geralmente aumenta e normaliza dentro de 2 semanas do início da terapia. Após a terapia, os títulos podem diminuir e se tornar negativos em 6 a 9 meses, enquanto alguns retêm títulos altos por anos (WANER, 2008). Desta forma, o clínico deverá direcionar seu tratamento para um PCR negativo ao invés de buscar a soronegatividade do paciente (SAINZ *et al.*, 2015).

A hiperglobulinemia pode levar meses para desaparecer após a interrupção do tratamento. A contagem de plaquetas deve ser reavaliada 1 e 3 meses após a descontinuação da terapia devido ao potencial de recidiva ou reinfeção. Outras causas de doença devem ser consideradas em cães que não respondem ao tratamento (SANTARÉM; AGUIAR, 2016).

Drogas alternativas, usadas com sucesso variável, incluem cloranfenicol, dipropionato de imidocarbe e enrofloxacin (NEER *et al.*, 2002). No entanto, membros

do genogrupo de *E. canis* parecem ter resistência intrínseca às fluoroquinolonas mediada por girasse (MAURIN *et al.*, 2001). Embora a terapia com enrofloxacin possa levar à melhora clínica, seu uso não é recomendado (SAINZ *et al.*, 2015).

A eficácia do dipropionato de imidocarbe tem sido controversa, sendo este utilizado apenas em animais com co-infecção por *Babesia canis* ou *Hepatozoon canis* (EDDLESTONE *et al.*, 2006; SAINZ *et al.*, 2015). Para cães desidratados ou anêmicos, fluidos intravenosos ou hemoderivados também podem ser necessários. O uso de darbepoetina ou fator estimulador de colônia de granulócitos pode ser considerado para cães com erliquiose crônica grave (AROCH; HARRUS, 2001). Se a trombocitopenia não responder à administração de doxiciclina, pode ser benéfico adicionar um ciclo curto (até uma semana) de doses imunossupressoras de glicocorticoides (SATO *et al.*, 2020).

2.2.5 Erliquiose e os rins

Os médicos veterinários devem estar cientes de que a infecção por *E. canis* é uma doença multissistêmica que pode causar uma grande variedade de diferentes manifestações clínicas (WANER; HARRUS, 2013). A patogênese da doença envolve efeitos diretos do patógeno e mecanismos imunomediados secundários indiretos (REARDON; PRICE 1981a; HARRUS, 2015).

Os mecanismos intrínsecos entre a EMC e a lesão renal não são completamente esclarecidos, no entanto, cães diagnosticados com erliquiose apresentam um risco 112% maior de desenvolver DRC em comparação com animais que não desenvolvem a infecção (BURTON *et al.*, 2020).

Em 1992, Codner e colaboradores reportaram alterações patológicas tanto nos elementos tubulares renais quanto nos glomerulares de cães infectados artificialmente com *E. canis* (CODNER *et al.*, 1992). A proteinúria transitória foi demonstrada durante a fase aguda após infecção artificial e o pico de perda de albumina na urina foi observado 2,5 a 3,5 semanas após a infecção (CODNER; MASLIN, 1992). O exame histopatológico durante a fase aguda revelou infiltrados perivenulares e linfocitários e plasmocitários, especialmente no córtex renal (CODNER *et al.*, 1992).

Em um estudo indiano que avaliou o perfil clínico-laboratorial de 18 cães com erliquiose, demonstrou que o grupo com a doença apresentou valores com médias superiores de ureia e creatinina sérica em miligramas por decilitro (40.20 ± 5.86 ; 2.25 ± 0.89) comparados ao grupo controle (28.93 ± 4.52 ; 1.81 ± 1.16) respectivamente (BAI *et al.*, 2017). No entanto, este estudo não demonstrou critérios de exclusão referente a idade

692 dos animais bem como da exclusão de animais com histórico prévio de doença renal; o
693 que reflete na presença de azotemia similarmente em alguns animais do grupo controle
694 de acordo com as diretrizes da IRIS (IRIS, 2019).

695 Em outro estudo retrospectivo norte-americano que avaliou 41 animais
696 naturalmente infectados por *Ehrlichia ewingii* relatou que estes apresentaram valores
697 superiores de 32% em SDMA, 31% em ureia nitrogenada, e 17% em creatinina sérica,
698 associados a presença de proteinúria, avaliadas pelo exame de fita de urina e apenas em
699 10 cães pelo exame RPC (QUROLLO *et al.*, 2019). Porém, este estudo retrospectivo
700 também incluiu animais com comorbidades agudas e crônicas, das quais também
701 influenciam negativamente a avaliação específica entre o eixo *Ehrlichia* e a saúde renal.

702 Um recente estudo brasileiro investigou as alterações histopatológicas dos rins de
703 cães com erliquiose subclínica, este demonstrou que apesar da ausência de azotemia nos
704 cães com a doença, apresentaram aspectos hispatológicos sugestivos de nefropatia
705 membranoproliferativa devido a expansão e proliferação mesangial, bem como de
706 nefropatia membranosa devido a intensa deposição de imunocomplexos nos glomérulos
707 associados a degeneração e atrofia tubular (CRIVELLENTI *et al.*, 2021).

708 Em um relato de caso alemão, uma Pastora inglesa de 8 anos foi diagnosticada
709 com amiloidose renal do tipo proteína amiloide A sérica (AA) em associação a EMC
710 crônica com base em febre recorrente, linfadenopatia periférica leve, trombocitopenia
711 leve, hiperglobulinemia monoclonal com títulos de anticorpos positivo para *E. canis*, a
712 qual desenvolveu proteinúria e azotemia renal (LUCKSCHANDER *et al.*, 2003).

713 A EMC é uma doença geradora de imunocomplexos como imunoglobulinas,
714 células CD3+ e CD8+ (HARRUS *et al.*, 2001; de CASTRO *et al.*, 2003). No entanto, o
715 diagnóstico de amiloidose renal, especificamente, por proteínas amiloides A, são
716 característicos de doenças familiares como em Shar-pei's, Beagles e Foxhound-ingleses
717 (IRIS, 2013).

718 Outro estudo de coorte retrospectivo comparou as manifestações clínicas e
719 patológicas da amiloidose renal entre cães Shar-Pei's e não-Shar-Pei. Este demonstrou
720 que a amiloidose reativa, composta por depósitos de proteína amiloide A frequentemente
721 é idiopática, no entanto, também esta também pode estar associada em animais com
722 histórico de inflamação crônica, infecção ou neoplasias (SEGEV *et al.*, 2012).

723 Desta forma, devido a ausência de sinais de infecções crônicas, ausência de sinais
724 clínicos e laboratoriais de doença renal antes dos seis anos, além do histórico de doenças
725 inflamatórias ou neoplasias, fora infecção crônica por *Ehrlichia canis*, este relato

726 demonstrou-se que a amiloidose AA renal também se manifesta em animais com EMC
727 crônica (LUCKSCHANDER *et al.*, 2003).

728 Portanto, até o momento, cães infectados por *E. canis* desenvolvem
729 hiperglobulinemia devido a alta circulação de imunoglobulinas e citotoxinas, bem como
730 de proteinúria transitória, pela com deposição glomerular de imunocomplexos associados
731 a alta proliferação mesangial (WANER; HARRUS, 2013; CRIVELLENTI *et al.*, 2021).
732 Não obstante, na persistência da doença com evolução consequente da fase aguda para
733 crônica, estes apresentam amiloidose renal do tipo A (LUCKSCHANDER *et al.*, 2003).

734 A presença ou ausência da azotemia dependerá significativamente do momento
735 da infecção em que o animal se encontra, ainda, na presença ou ausência de comorbidades
736 agudas ou crônicas, como a própria DRC (LUCKSCHANDER *et al.*, 2003; BAI *et al.*,
737 2017; QUROLLO *et al.*, 2019; BURTON *et al.*, 2020; CRIVELLENTI *et al.*, 2021).

738

739 **2.3 Biomarcadores**

740 Apesar dos avanços no manejo das doenças renais, incluindo a introdução de TSR,
741 a taxa de mortalidade entre pacientes humanos e animais ainda permanece alta (PALM *et al.*,
742 2016). Um dos motivos especulados para a alta mortalidade é o reconhecimento
743 tardio da doença e, consequentemente, a estreita janela de oportunidade para terapia
744 (PRESSLER, 2013). Portanto, o reconhecimento precoce da doença, antes que a LRA
745 seja evidente, é crucial para permitir uma terapia oportuna e, portanto, potencialmente
746 mais eficaz (YERRAMILI *et al.*, 2016).

747 Nos últimos anos, esforços crescentes de pesquisa têm sido realizados para
748 identificar biomarcadores renais sensíveis e específicos pois a necessidade de diagnóstico
749 precoce é ainda mais enfatizada na medicina veterinária, porque as terapias de
750 substituição renal não estão prontamente disponíveis (PRESSLER, 2013; HOKAMP;
751 NABITY, 2016).

752 Um biomarcador deve atender a vários requisitos para ser considerado um
753 marcador ideal, deve: 1) ser detectável na urina e / ou sangue, 2) ser detectável usando
754 métodos que estão prontamente disponíveis e de baixo custo, 3) ser altamente preditivo
755 de lesão renal (com alta sensibilidade e especificidade), 4) fornecer informações sobre a
756 etiologia, 5) fornecer informações sobre a localização da lesão (ou seja, glomérulos e / ou
757 túbulos), 6) refletir a gravidade da lesão, 7) indicar lesão renal e / ou processos de reparo,
758 8) prever a probabilidade de recuperação (YERRAMILI *et al.*, 2016).

759 Ainda não foi determinado quando e se os biomarcadores podem atender a todos
760 esses requisitos, mas é improvável que um único forneça todas essas informações; desta
761 forma, é mais provável que seja necessária uma série de biomarcadores, onde cada um
762 forneça uma peça do quebra-cabeça (COWGILL *et al.*, 2016). Um painel completo de
763 biomarcadores pode ter um custo proibitivo; desta forma, um subconjunto de
764 biomarcadores deverá ser selecionado, cada um fornecendo informações exclusivas e
765 específicas que complementam os outros (MEHTA, 2007).

766 Os biomarcadores renais apresentam várias vantagens potenciais, sendo o
767 diagnóstico precoce da DRC como maior delas (YERRAMILI *et al.*, 2016). Palm e
768 colaboradores demonstraram que a lesão renal pode ser identificada usando
769 biomarcadores sensíveis dias antes de qualquer aumento de sCr seja documentado,
770 portanto, o emprego dos biomarcadores pode direcionar a atenção do médico para o dano
771 renal em curso antes que haja redução mensurável na TFG (PALM *et al.*, 2016).

772 Por exemplo, se um medicamento nefrotóxico está sendo administrado, seria mais
773 racional monitorar o paciente usando biomarcadores capazes de indicar lesão renal, em
774 vez de marcadores que só podem indicar função renal diminuída (MÅRTENSSON *et al.*,
775 2012). Uma vez identificada a lesão renal, o medicamento pode ser descontinuado antes
776 que ocorra a insuficiência renal (PRESSLER, 2013).

777 Biomarcadores de lesão renal ativa são provavelmente mais sensíveis do que
778 marcadores que indicam *função* diminuída (ou seja, substitutos da TFG); portanto, o
779 primeiro deve ser usado para triagem de pacientes com alto risco de lesão renal
780 (MÅRTENSSON *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a prevalência de LRA em cães
781 hospitalizados é relativamente alta quando se usam critérios humanos para LRA
782 (THOEN; KERL, 2011). Os critérios humanos e as diretrizes da IRIS dependem de
783 mudanças na concentração de sCr (ou no débito urinário) para definir a LRA e, portanto,
784 provavelmente subestimam a verdadeira prevalência de LRA em cães e gatos
785 hospitalizados (COWGILL, 2016).

786 Apesar da limitação atual ser de pouca disponibilidade de ensaios comerciais para
787 avaliação de candidatos a biomarcadores, o reconhecimento precoce da lesão renal em
788 pacientes hospitalizados pode permitir a identificação e, potencialmente, a eliminação da
789 causa, além de permitir que o tratamento seja iniciado antes que a lesão progrida para
790 falha, aumentando a chance de um resultado favorável (HOKAMP; NABITY, 2016).

791

2.3.1 Creatinina sérica

A creatinina sérica (sCr) é um biomarcador indireto da TFG de pequenos animais e humanos (BRAUN *et al.*, 2003). Este subproduto do metabolismo muscular endógeno é filtrado pelo glomérulo e, em menores concentrações, também secretado pelos túbulos proximais em cães machos saudáveis (FINCO *et al.*, 1991; LINNETZ; GRAVES 2010). No entanto, seu emprego como marcador substituto da TFG possui diversas limitações; duas das mais clinicamente relevantes são as influências extra renais e sua baixa sensibilidade à doença precoce (PRESSLER, 2013).

Este biomarcador também sofre de uma má interpretação na comunidade acadêmica veterinária. Postula-se que pelo menos 75% da massa do néfron deve ser perdida antes que as concentrações de sCr aumentem acima de seu limite de referência. (BRAUN *et al.*, 2003). No entanto, esta afirmação mal interpretada, é oriunda dos estudos de análises de TFG baseados pelo *clearance* de inulina em cães parcialmente nefrectomizados dos quais perderam 75% de sua *massa* renal ao invés da *função* renal (BRICKER *et al.*, 1964; BOVEÉ *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1990).

Ainda, neste estudo, os autores concluíram que 3/4 de perda da massa renal (nefrectomizada) corresponderam a uma diminuição de aproximadamente 50-60% de função renal após o procedimento cirúrgico e, conseqüentemente, de 35-45% de função renal 13 meses após a cirurgia, devido a hipertrofia renal compensatória (hiperfiltração glomerular) (BRICKER *et al.*, 1964; BOVEÉ *et al.*, 1979; BROWN *et al.*, 1990)

Igualmente, em outro estudo por Nabity *et al.* (2015) concluíram que uma vez que aplicado o limite de referência específico para idade e raça (sCr $\geq$ 106 mmol/L ou 1,2 mg/dL) associado do frequente monitoramento, cães adolescentes com nefropatia hereditária *Xlinked* (XLHN) demonstraram o aumento da sCr após a TFG ter diminuído em média 48% (intervalo de 39–68%). Desta forma, a sCr pode ser mais sensível na detecção da diminuição da função renal do que se supõe historicamente (HOKAMP; NABITY, 2016).

No geral, das influências extra renais mais comuns, a hidratação e o estado do volume sanguíneo, bem como as obstruções ou rupturas do trato urinário podem influenciar as concentrações de sCr. Particularmente no estágio inicial, estas alterações não necessariamente refletem sua função renal inerente, reduzindo sua sensibilidade e especificidade para a doença renal (HOKAMP; NABITY, 2016).

A creatinina circulante é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo e, portanto, sua concentração dependerá da massa muscular do indivíduo, assim sendo

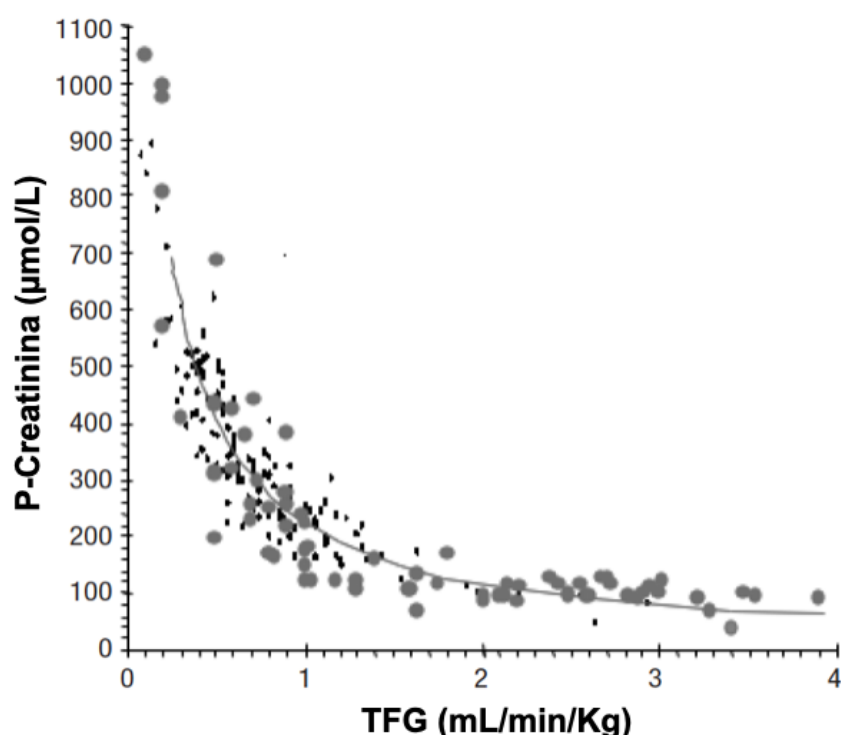
826 significativamente diminuída em animais com baixa massa muscular, como em
827 indivíduos geriátricos, imaturos, em sarcopenia e/ou caquexia, e aumentada em animais
828 fortemente musculosos, como os cães galgos (BRAUN *et al.*, 2003).

829 Adicionalmente, a creatinina também pode ser influenciada pela dieta; em três
830 estudos onde cães foram recentemente alimentados relatou-se que os valores de sCr
831 aumentaram em até 0,4mg/dL, bem como, estes valores podem perdurar por até 10 horas
832 (EVANS, 1987; MÉDAILLE *et al.*, 2004; PREISS *et al.*, 2007). Consequentemente,
833 recomenda-se que a sCr seja sempre avaliada de um animal em jejum e hidratado, e
834 interpretada considerando a raça, massa muscular e idade do animal (HOKAMP;
835 NABITY, 2016).

836 Outra exceção são os distúrbios da tireoide, como no hipotireoidismo canino, o
837 qual leva a uma diminuição substancial na TFG sem alterar as concentrações de creatinina
838 plasmática, desta forma, requerendo uma avaliação alternativa da TFG para identificar
839 disfunções renais nesta população (PANCIERA; LEFEBVRE, 2009). Inversamente, em
840 felinos com hipertireoidismo, o estado hipermetabólico causado pela doença leva ao
841 aumento da TFG e à redução da massa muscular, confundindo frequentemente o
842 diagnóstico de DRC (PETERSON *et al.*, 2016; VASKE *et al.*, 2016).

843 Talvez, a limitação mais amplamente reportada na utilização de um biomarcador
844 de TFG para avaliar a função renal, é sua íngreme relação curvilínea entre a sCr e a TFG,
845 a qual torna desafiador para o clínico, o diagnóstico inicial da DRC (BRAUN *et al.*, 2003)
846 (Figura 4). Isto posto, a sensibilidade da sCr para o diagnóstico precoce da doença renal
847 pode ser melhorada por meio da sua avaliação seriada no respectivo indivíduo, a fim de
848 detectar discretos aumentos dos quais reflitam a piora da função renal (HOKAMP;
849 NABITY, 2016). Este conceito na detecção de pequenos aumentos na concentração de
850 creatinina sérica (aumento superior ou igual a 0.3 mg/dL em um intervalo de 48 horas),
851 também foram adaptados da medicina e relevantemente aplicados nos cenários de
852 diagnóstico precoce e graduação da LRA em pequenos animais ilustrado pela IRIS
853 (COWGILL, 2016).

854 A sCr é um biomarcador de alta individualidade em cães e gatos (RUAX *et al.*,
 855 2012; BARAL *et al.*, 2014), o que significa que a variabilidade entre os indivíduos é
 856 muito maior do que a variabilidade observada dentro de um único animal. Este
 857 biomarcador é influenciado pela idade (RØRTVEIT *et al.*, 2015) e particularmente pela
 858 raça em cães e, em menor grau, nas raças de gatos (MIYAGAWA *et al.*, 2010;
 859 REYNOLDS *et al.*, 2010; DUNLOP *et al.*, 2011; MISBACH *et al.*, 2014). Ela também
 860 pode ser influenciada pelo sexo e pelos analisadores bioquímicos nas clínicas veterinária
 861 (CONCORDET *et al.*, 2008).



862 **Figura 4 - Variações da creatinina plasmática de acordo com a taxa de filtração glomerular em**
 863 **cães saudáveis e com doença renal crônica.**

864 Nos pontos maiores a estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) foi realizada pelo *clearance* de
 865 inulina ou ioidina; nos pontos menores a TFG foi estimada pelo *clearance* de creatinina exógena.
 866 Traduzido e adaptado de Braun *et al.*, 2003

868 Em humanos, foram reconhecidas as implicações clínicas das inconsistências
 869 entre os aparelhos e laboratórios de análises, assim, a padronização dos resultados de sCr
 870 entre os laboratórios é uma prioridade, baseados no consenso padronizado pela
 871 *International Organization for Standardization* (ISO) (PEAKE; WHITING, 2006).
 872 Contudo, esta padronização não foi implementada na veterinária. Em um estudo realizado
 873 nos laboratórios do norte europeu, estes demonstraram bons aparelhos, no entanto, uma
 874 grande variação de valores de referência entre si. (ULLEBERG *et al.*, 2011).

875

2.3.2 Dimetilarginina simétrica

As dimetilargininas foram descobertas há mais de 50 anos como constituintes naturais do plasma e urina de humanos. Estas, tais como outros derivados de aminoácidos metilados, são excretadas na urina como produtos de degradação proteica e, portanto, suas concentrações aumentarão em condições clínicas associadas a decomposição, hipóxia e doenças neurodegenerativas (SCHWEDHELM; BÖGER, 2011).

A metilação da arginina, um aminoácido essencial, é um mecanismo comum pós-traducional da modificação proteica. As enzimas proteína-arginina metiltransferases tipos 1 e 2 (PRMTs) são responsáveis pela atividade catalítica da arginina em dimetilarginina assimétrica (ADMA) e em dimetilarginina simétrica (SDMA), das quais ambas são eliminadas pela urina (Figura 2) (FLECK *et al.*, 2003; KIELSTEIN *et al.*, 2006; BEDFORD; CLARKE, 2009).

Em humanos, A ADMA é metabolizada principalmente no tecido pela enzima dimetilarginina-dimetilaminohidrolase, no entanto, seu clearance renal é estimado em apenas 20% (SCHWEDHELM; BÖGER, 2011). Desta forma, as concentrações séricas de ADMA tornaram-se de grande utilidade como um marcador preditivo de todas as causas de mortalidade, em especial para acidentes vasculares cardíacos e encefálicos, bem como, em menor parte, na progressão da doença renal (FLECK *et al.*, 2003)

Paralelamente, a SDMA, observada a princípio como uma molécula mais inerte que sua análoga, foi aceita como um biomarcador endógeno de função renal, onde seus níveis estão intimamente relacionados com a TFG de humanos, cães, gatos e camundongos por correlacionar-se fortemente com a função renal com base no clearance da inulina, e mais recentemente, no clearance de ioexol (KIELSTEIN *et al.*, 2006; KIELSTEIN *et al.*, 2011; DIXON *et al.*, 2013; HALL *et al.*, 2015; NABITY *et al.*, 2015; HALL *et al.*, 2016b; McKENNA *et al.*, 2020).

Devido os rins serem a principal fonte de excreção da SDMA, e da ausência de sua reabsorção tubular aparente (KAKIMOTO *et al.*, 1970); as diretrizes da IRIS foram modificadas pela primeira vez em 2015 para incluir seus valores de concentração sérica e, atualizadas de acordo com as pesquisas atuais em 2019. Estas recomendações incluem de como o clínico deverá interpretar a SDMA, no diagnóstico e monitoração, em todos os estágios da DRC (IRIS, 2019).

Baseado no conceito de que a SDMA não é influenciada pela massa muscular, diferente da sCr, ela proporcionará um reflexo mais preciso de TFG em pacientes com baixa ou pobre condição muscular (HALL *et al.* 2015; RELFORD *et al.*, 2016). Desta

910 forma, o uso da SDMA fornece informações úteis, particularmente onde os clínicos se
911 sentem menos confortáveis extrapolando as implicações negativas da sarcopenia da DRC
912 sobre as concentrações de sCr relatadas (HALL *et al.*, 2016a; YERRAMILI *et al.*,
913 2016).

914 Um estudo recentemente publicado relatou que a SDMA também apresenta uma
915 variabilidade interindividual e biológica ao longo do dia, no entanto, menores em
916 comparação aos valores sCr; desta forma, para o diagnóstico e monitoração da DRC
917 recomenda-se a avaliação contínua e seriada da SDMA para que não haja falsos valores,
918 em especial, naqueles que são avaliados apenas pontualmente (KOPKE *et al.*, 2018;
919 2019).

920 No geral, a SDMA é considerada um analito muito estável, sua dosagem poderá
921 ser realizada até 4 dias em temperatura ambiente, 14 dias a 4 °C ou a longo prazo quando
922 congelado, as amostras de soro (preferencialmente) e plasma não sofrem interferência na
923 quantificação pela lipemia ou icterícia, embora a hemólise grave possa causar uma
924 diminuição em seus resultados (NABITY *et al.*, 2015). Mesmo que não influenciada pela
925 ingestão de proteínas, recomenda-se que os pacientes estejam em jejum antes da avaliação
926 bioquímica (HALL *et al.*, 2016b).

927 Ainda, são limitados os estudos relacionados aos efeitos entre raça e sexo em cães
928 e gatos e as concentrações de SDMA. Um estudo sugeriu que o SDMA pode ser um
929 reflexo mais preciso da função renal em gatos da Birmânia do que a concentração de sCr,
930 (PALTRINIERI *et al.*, 2018). Outro estudo recente comparando as concentrações séricas
931 de SDMA em cães galgos clinicamente saudáveis com as de outras raças, concluiu que
932 os galgos apresentam concentrações médias de SDMA séricas significativamente mais
933 altas em comparação com cães de outras raças (LIFFMAN *et al.*, 2018).

934 É um dever do clínico de compreender as possíveis influências não renais e, de
935 doença(s) concomitante(s), além da administração de drogas nas concentrações de SDMA
936 circulante. Estudos relataram que a hora do dia, o efeito do avental branco e a
937 administração de curto prazo de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA)
938 influenciaram na circulação de SDMA (PEDERSEN *et al.* 2006; MOESGAARD *et al.*,
939 2005; 2007).

940 Ainda, em estudos ligados ao efeito potencial de doenças neoplásicas como
941 linfoma sobre valores de SDMA, foi levantada a preocupação de que, dado que a SDMA
942 se origina de todas as células nucleadas, portanto, uma grande carga tumoral poderia
943 resultar em uma concentração elevada de SDMA ao invés da redução da TFG; no entanto,

maiores estudos são necessários para estabelecer qualquer relação potencial entre as concentrações de SDMA e neoplasias (ABRAMS-OGG *et al.*, 2017).

Do mesmo modo, Savarese e colaboradores (2018) demonstraram que cães com presença ou ausência de doença da válvula mitral mixomatosa, ou com os sintomas, ou em terapia farmacológica para insuficiência cardíaca congestiva não mostrou correlação direta com as concentrações séricas de SDMA. Similarmente, nenhuma correlação também foi encontrada entre o biomarcador cardíaco N-terminal pró-peptídeo natriurético cerebral, ou entre as enzimas hepáticas fosfatase alcalina, alanina transaminase ou aspartato aminotransferase e as concentrações de SDMA em cães, fornecendo evidência preliminar, embora não completa, de que doença cardíaca incluindo cardiomiopatia hipertrófica em gatos e doença hepática têm efeito limitado sobre SDMA (RELFORD *et al.*, 2016; LANGHORN *et al.*, 2018).

A preciosidade da SDMA é seu diagnóstico precoce da DRC em animais não azotêmicos (NABITY *et al.*, 2015; RELFORD *et al.*, 2016; McKENNA *et al.*, 2020). As diretrizes da IRIS sugerem que um aumento leve persistente de SDMA acima do intervalo de referência (ou seja, > 14 e < 18 $\mu\text{g/dL}$ em pelo menos duas ocasiões) com uma creatinina de menos de 1,4 mg/dL (125 $\mu\text{mol/L}$) em cães e 1,6 mg/dL (140 $\mu\text{mol/L}$) em gatos, pode indicar função renal reduzida sendo então o paciente estadiado como IRIS-DRC estágio 1 (IRIS, 2019). Aqueles com um aumento grave de SDMA (persistentemente > 18 $\mu\text{g/dL}$) podem ser considerados IRIS estágio 2 (IRIS, 2019).

A SDMA é uma ferramenta de triagem útil para a detecção precoce da função renal, no entanto, seu uso como uma ferramenta de monitoramento para a progressão da DRC não está bem estabelecido (McKENNA *et al.*, 2020). Em um estudo comparativo entre animais com DRC e LRA, as concentrações da SDMA foram aumentadas em ambos os cenários; portanto, o aumento do marcador (classificado como de função) reforça sua relação íntima com a TFG e, enfatiza que o clínico necessitará de mais informações diagnósticas a fim de diferenciar uma LRA da DRC (DAHLEM *et al.*, 2017).

Até o momento, não há estudos que avaliaram especificamente se a SDMA é um marcador superior para monitorar a mudança na função renal ou progressão da doença em pacientes com DRC, embora possa ser hipotetizado que esse possa ser o caso, particularmente naqueles com perda de peso e musculatura ao longo do avanço da doença e, naqueles em tratamento por hemodiálise intermitente (HALL *et al.*, 2016a; RELFORD *et al.*, 2016; LE SUEUR *et al.*, 2019; McKENNA *et al.*, 2020)

Outras condições que foram submetidas a investigações preliminares incluem nefrolitíases e *diabetes mellitus*. Há evidências de que as concentrações de SDMA podem ser aumentadas em gatos com nefrolitíase, embora que, possivelmente seja um reflexo precoce da função renal, ao invés de uma influência extra renal na SDMA (HALL *et al.*, 2017). No entanto, concentrações significativamente mais baixas de SDMA foram observadas em gatos com *diabetes mellitus* em comparação aos animais saudáveis (LANGHORN *et al.*, 2018); achado este, também relatado em humanos com diabetes tipo 2 mal controlado em comparação com o controle (CAN *et al.*, 2011; DIMITROULAS *et al.*, 2015).

Por fim, ainda que haja alguns estudos controversos entre as concentrações da SDMA e sCr em felinos com hipertireoidismo, Szlosek e colaboradores (2020) concluíram que durante o tratamento para a endocrinopatia, a sCr continuou a aumentar à medida que os gatos ganhavam peso; em contraste, a SDMA permaneceu estável durante o tratamento. Portanto, o SDMA pode ser um biomarcador mais confiável da função renal do que a creatinina em gatos hipertireoideanos antes e durante o tratamento endócrino (SZLOSEK *et al.*, 2020).

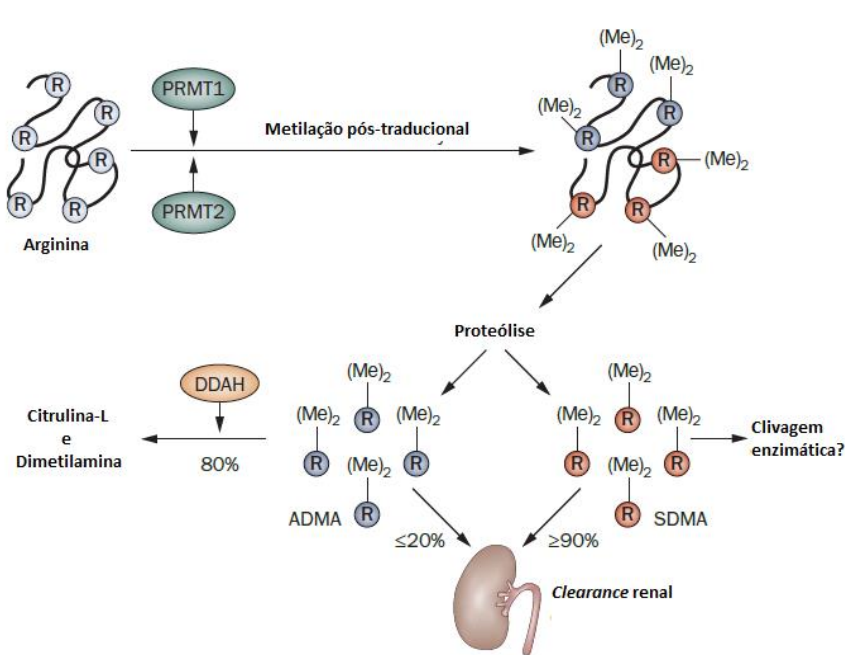


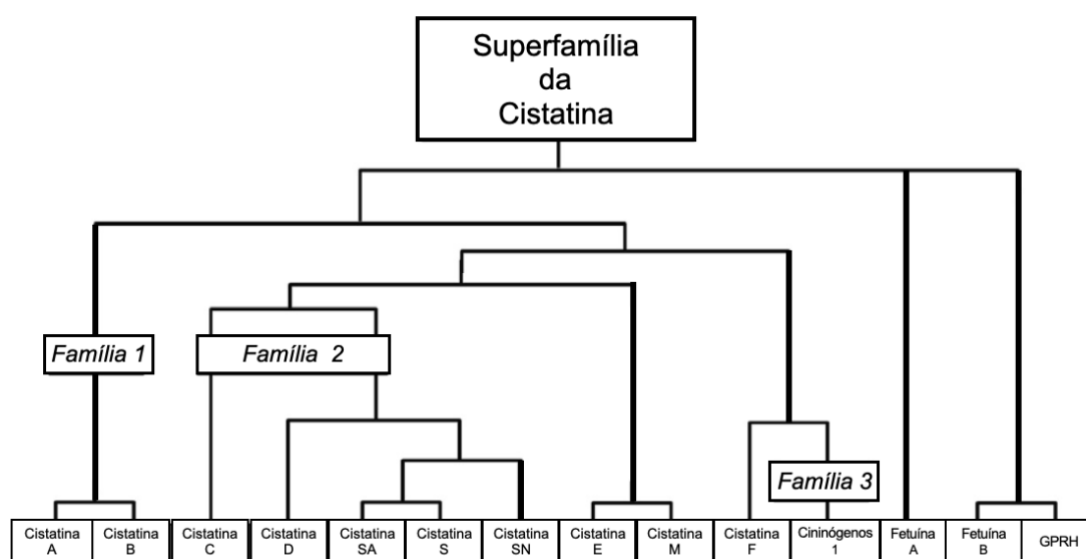
Figura 5. Representação esquemática da metilação da arginina pelas enzimas proteína arginina metiltransferases (PRMTs) e sua atividade catalítica, formando Dimetilarginina assimétrica (ADMA) e Dimetilarginina simétrica (SDMA). Traduzido e adaptado de Schwedhelm, E.; Böger, R. H., 2011.

2.3.4. Cistatina B

As cistatinas são uma família de inibidores proteicos de proteases de cisteína, são compostos de três principais famílias individuais, sendo que as cistatinas A e B são

1001 membros da família 1 (Figura 6), pequenas proteínas monoméricas de peso molecular em
 1002 cerca de 11 kDa, diferentemente da cistatina C, amplamente investigado em pesquisas
 1003 humanas, pertencentes a família 2 (OCHIENG; CHAUDHURI, 2010).

1004 A cistatina B não é glicosilada e não possui pontes de dissulfeto vistas nas
 1005 proteínas maiores da família 2 e da família 3. Ela também não possui sequência de
 1006 sinalização, portanto, são geralmente proteínas intracelulares e confinadas dentro da
 1007 célula, o que a torna um marcador menos influenciável por outros processos
 1008 extracelulares, como a cistatina C previamente revisada em estudos veterinários
 1009 (ABRAHAMSON *et al.*, 1986; GHYS, *et al* 2014). A cistatina B também participa na
 1010 inibição das proteinases de cisteína lisossomal, família catepsina, especificamente
 1011 catepsinas B, H e L. Este marcador também está presente nos fluidos extracelulares onde
 1012 foi purificada a partir da urina humana (ABRAHAMSON *et al.*, 1986).



1014
 1015 **Figura 6.** Superfamília da cistatina. Abreviaturas: GPHR= Glicoproteínas ricas em
 1016 hidroxiprolina. Traduzido e adaptado de Yerramilli *et al.*, 2016.

1018 Apesar de não haver publicações correlacionando a cistatina B e doenças renais
 1019 em animais de companhia, a cistatina B é uma proteína intracelular e geralmente não
 1020 circula livremente em grandes concentrações. Este achado foi ainda confirmado quando
 1021 nenhuma proteína foi encontrada no sobrenadante coletado de células renais caninas
 1022 estressadas e este marcador foi purificado a partir de células renais caninas rompidas e a
 1023 sequência completa foi determinada por digestão trípica seguida por LCMS
 1024 (YERRAMILI, 2016).

Portanto, qualquer cistatina B detectada no soro ou na urina deve resultar da ruptura e morte de células epiteliais tubulares. Na lesão renal ativa, é provável que apoptose e necrose de células epiteliais no túbulo proximal resultem em aumento dos níveis séricos e urinários de cistatina B como descrito por Yerramilli e colaboradores (2016) em cães em LRA induzidos por alta dose gentamicina.

2.3.5. Clusterina

A clusterina, também conhecida como apolipoproteína J, é um capilar extracelular altamente glicosilado (WYATT *et al.*, 2009). Ela é expressa a partir de um amplo espectro de tecidos e faz parte de muitos processos fisiológicos, incluindo maturação de espermatozóides, transporte lipídico, inibição do sistema complemento, do remodelamento, reciclagem de membrana e estabilização de proteínas lesionadas, e é um inibidor de apoptose (LESKOV *et al.*, 2003). A clusterina apresenta-se de duas formas: uma forma secretada, responsável pela inibição da apoptose e a forma nuclear, responsável pelo desencadeamento da morte celular (CHOI-MIURA *et al.*, 1992).

Hidaka e colaboradores (2002) descobriram que os níveis de clusterina urinária poderiam servir como um valioso biomarcador para a gravidade do dano tubular e sugeriram que a clusterina pode ajudar a diferenciar entre as formas tubular e glomerular de proteinúria. Recentemente, outras investigações também caracterizaram a clusterina como um biomarcador de lesão tubular proximal, apesar da observação de que a clusterina não é exclusivamente expressa nos túbulos proximais (DIETERLE *et al.*, 2010).

Como previamente relatado, embora as concentrações de clusterina urinária estejam aumentadas no dano tubular renal, as concentrações de clusterina sérica são afetadas em vários processos fisiopatológicos, incluindo em um estudo onde avaliada como marcador de lesão renal em uma população de cães com leishmaniose, na qual foi observado-se um aumento estatisticamente significativo em suas concentrações (ZHOU *et al.*, 2014). Em outro estudo onde avaliou-se os níveis de clusterina em beagles com LRA induzida por gentamicina, seus resultados também demonstraram um aumento significativo nas concentrações do cluster após a lesão induzida por drogas (GARCIA-MARTINEZ *et al.*, 2015).

As concentrações séricas de clusterina (60-100 mg / mL) são 1000 vezes maiores do que as concentrações urinárias (<100 ng / mL) em humanos e cães saudáveis. A contaminação de uma amostra de urina com sangue a níveis tão baixos como 0,2% (v / v) pode levar a falsos positivos (YERRAMILI *et al.*, 2016). Esse problema é mais agudo

na medicina veterinária, devido a infecção, trauma, neoplasia, inflamação e contaminação acidental durante cateterismo e cistocentese por contaminação do sangue, esta contaminação traz isoformas inespecíficas da clusterina para a urina e, portanto, é importante garantir que apenas a clusterina específica do rim seja mensurada (QUINN *et al.*, 2015; YERRAMILLI *et al.*, 2016).

2.3.6. Proteína-C reativa

A proteína-C reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda positiva originada primariamente nos hepatócitos de cães e sua síntese está eficientemente aumentada na presença de qualquer doença inflamatória (aumento até de 1000 vezes) e por seu peso molecular ser entre 110 e 144 kDa, quando encontrado na urina, este pode indicar presença de insulto nos glomérulos (HOKAMP; NABITY, 2016). Vários estudos em cães com LRA ou DRC por leishmaniose, babesiose, acidente ofídico, piometra, linfoma, leptospirose, pneumonia, pancreatite apresentaram valores de CRP/creatinina urinária (uCRP/c) extremamente altos (ECKERSALL; BELL, 2010).

A CRP é produzida pelo fígado como parte da resposta de fase aguda que pode ocorrer após qualquer tipo de lesão, sua liberação é desencadeada por várias citocinas produzidas por monócitos e macrófagos no local da lesão tecidual e quando presente na corrente sanguínea, a CRP modula a resposta inata-imune do corpo à lesão tecidual (mecanismo ainda desconhecido) (CERÓN *et al.*, 2005; NAKAMURA *et al.*, 2008). Portanto, a CRP é um marcador da inflamação sistêmica de alta especificidade e sensibilidade, porém limitante em demonstrar o órgão específico em insulto (ECKERSALL; BELL, 2010).

A CRP é uma proteína de fase aguda, que apresenta uma rápida produção na presença de um insulto inflamatório (6 horas) e, da mesma forma, uma rápida eliminação ou *clearance* na fase de remissão clínica. Em um estudo em cadelas com piometra tratadas por ovariohisterectomia, estas apresentaram uma diminuição de seus valores de uCRP /c após o tratamento, para valores não significativamente diferentes de cães saudáveis (MADDENS *et al.*, 2010; MADDENS *et al.*, 2011).

Em contraste, em outro estudo, não foi encontrada uma diferença significativa na uCRP /c entre cães saudáveis e aqueles com DRC, embora o uCRP/c tenha sido indetetável nos cães saudáveis, enquanto aumentada em 3 dos 10 cães com DRC (SMETS *et al.*, 2010). Todavia, Raila e colaboradores (2011) avaliaram as concentrações séricas de CRP em cães com nefropatias adquiridas de forma natural, a correlação entre CRP e a TFG

1093 foram inversamente significativas sugerindo que a presença do estímulo inflamatório pode
1094 implicar na patogenia da nefropatia crônica.

1095 Desta maneira, CRP é um marcador pelo qual oferece detecção, grau de
1096 severidade, monitoração e prognóstico em qualquer cenário clínico com presença de
1097 inflamação mesmo quando os níveis de leucócitos ou a contagem de neutrófilos de banda
1098 estiverem normais (CERÓN *et al.*, 2005; ECKERSALL; BELL, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste projeto consiste em correlacionar diferentes biomarcadores renais, além do uso da proteína de fase aguda no cenário clínico da lesão renal aguda em cães naturalmente infectados com Erliquiose monocítica canina. Este estudo visa também a monitoração da doença clínica e, em especial, da função renal; bem como de seu prognóstico ao longo do tratamento.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o comportamento e a estabilidade da SDMA em cães com Erliquiose monocítica canina comparada ao grupo controle

Validar a aplicabilidade do emprego dos novos biomarcadores urinários de lesão renal, tais como clusterina e cistatina B, em cães naturalmente infectados e tratados para Erliquiose monocítica canina.

Avaliar a utilização da Proteína-C reativa como marcador inflamatório durante o diagnóstico, tratamento e monitoração de cães naturalmente infectados por Erliquiose monocítica canina.

CAPÍTULO II

ARTIGOS CIENTÍFICOS

SEÇÃO I

PROTEÍNA-C REATIVA E ERLQUIOSE MONOCÍTICA CANINA: UMA NOVA PERSPECTIVA CLÍNICA

Para Rita

(In memoriam)

*A Mulher a qual me ensinou o Amor
pela Resiliência, Devoção e Tenacidade.*

ARTIGO CIENTÍFICO I

Normas da Revista: Veterinary Record

<https://onlinelibrary.wiley.com/pb->

[assets/assets/20526121/Style%20guide%20for%20BVA%20veterinary%20journals-1607340780507.pdf](https://onlinelibrary.wiley.com/pb-assets/assets/20526121/Style%20guide%20for%20BVA%20veterinary%20journals-1607340780507.pdf)

Título: Proteína C- reativa e erliquiose monocítica canina: uma nova perspectiva clínica.

Autores:

1) André Nanny Vieira Le Sueur, MV, MSc. - Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: le.sueur@unesp.br

2) Maria Cristina Reis Castiglioni, MV, Ph.D. - Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: m.castiglioni@unesp.br

3) Maria Rosa Santos Breda, MV, MSc. - Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: mariarosabreda0@gmail.com

4) Alessandra Melchert, MV, Ph.D. - Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: alessandra.melchert@unesp.br

5) Fabiana Ferreira de Souza, MV, Ph.D. - Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: fabiana.f.souza@unesp.br

6) Michael Coyne, VMD, Ph.D. – Clinical Studies Design Specialist - IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA. E-mail: michael-coyne@idexx.com

7) Rachel Murphy – Clinical Research/Sample Coordinator II - IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA. E-mail: rachel-murphy@idexx.com

8) Donald Szlosek, M.Sc. – Biostatistician – IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, ME, USA. Email: donald-szlosek@idexx.com

9) Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto, MV, Ph.D. - Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, São Paulo, Brazil. E-mail: tatiana.okamoto@unesp.br

Título corrido: CRP and CME: A new clinical perspective.

Palavras-chave: canine, acute phase protein, ehrlichiosis, biomarker, inflammation

Lista completa de abreviações:

- 49 AAG - α 1-glicoproteína ácida
50 CRP – Proteína C reativa
51 EMC – erliquiose monocítica canina
52 GC – grupo controle
53 GE – grupo *ehrlichia*
54 IQR – variação interquartil
55 IACUC - comitê institucional de cuidados e uso de animais
56 PFA – proteína de fase aguda
57 PT – proteína total
58 rt-PCR – reação em cadeia de polimerase em tempo real
59 RPC – Razão Proteína: Creatinina urinária
60 sCr – creatinina sérica

61
62 ***Autor correspondente:** Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto - Veterinary Clinic
63 Department, School of Veterinary Medicine and Animal Science. Rua Prof. Doutor Walter
64 Mauricio Correa, s/n, Unesp Campus de Botucatu. CEP: 18618-681, Botucatu, São Paulo, Brazil.
65 E-mail: tatiana.okamoto@unesp.br

66
67 This study is a collaborative project between IDEXX laboratories Inc., Westbrook, ME and the
68 School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Campus
69 of Botucatu, SP. Furthermore, this study was funded by the São Paulo Research Foundation under
70 the study protocol 2018/13427-6.

71

72 **Resumo**

Background: A proteína C reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda utilizada como marcador da resposta inflamatória em cães e humanos. Erliquiose monocítica canina (EMC), causada pela riquétsia *Ehrlichia canis*, é uma importante doença canina com distribuição mundial. O diagnóstico da doença e sua monitoração pode ser desafiador devido às suas diferentes fases e múltiplas manifestações clínicas.

Objetivos: Avaliar a utilização da Proteína C – Reativa como marcador inflamatório durante o diagnóstico, tratamento e monitoração de cães naturalmente infectados por Erliquiose monocítica canina.

Animais: Dezenove cães saudáveis foram incluídos no grupo controle (GC), e 16 cães naturalmente infectados com *E. canis* foram incluídos no Grupo Ehrlichia (GE).

Métodos: Todos os cães foram acompanhados por 45 dias. Os cães do GE foram tratados com doxiciclina duas vezes ao dia durante os primeiros 30 dias. Hematologia, perfil bioquímico e concentrações de PCR foram determinados nos dias 0, 0,5, 1, 15, 30 e 45. Um modelo linear misto foi usado para estimar a média populacional de cada parâmetro com paciente como efeito aleatório e dia e tratamento como fixo efeito.

Resultados: A CRP demonstrou concentrações mais altas no GE comparadas ao GC, além de uma correlação log-linear negativa durante o tratamento. Da mesma forma, sCr também demonstrou uma correlação log-linear negativa com a CRP ($P < 0,001$); bem como uma maior correlação entre CRP-sCr no GE ($P < 0,006$). Por outro lado, as concentrações de Proteína total (PT), Globulina e Razão Proteína: Creatinina urinária (UPC) apresentaram uma correlação logarítmica linear positivas com a CRP ($P < 0,008$); ($P < 0,007$) e ($P < 0,001$) respectivamente.

Conclusões e Importância clínica: A CRP é um biomarcador útil na avaliação da resposta inflamatória e monitoração do tratamento clínico de cães naturalmente infectados por EMC.

A proteína-C reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda (PFA) conservada evolutivamente. De artrópodes a humanos, a CRP foi encontrada em todos os organismos onde foi investigada.¹ Esta proteína é sintetizada principalmente pelo fígado em resposta a citocinas pró-inflamatórias, desta forma, ela desempenha um importante papel na imunidade inata, opsonização, ativação do complemento e ligação ao receptor das imunoglobulinas. A CRP é uma proteína da inflamação sistêmica aguda e, portanto, um marcador primário de inflamação.^{2,3}

Em várias espécies, como o cão, a CRP é uma PFA importante e, sua concentração sérica pode aumentar rapidamente de <1 mg/L para >100 mg/L como parte de uma série de doenças inflamatórias e infecciosas, incluindo as infecções por *E. canis*.⁴ A Erliquiose monocítica canina (EMC) é uma importante doença com distribuição mundial.⁵⁻⁷ *Ehrlichia canis* é uma bactéria dentro do grupo das α -proteobactérias, as quais são gram-negativas, pleomórficas e intracelulares obrigatórias que infectam uma ampla gama de mamíferos, em especial, em cães.⁶

Ehrlichia canis é da família das riquetsias, e transmitida pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus* (Carrapato marrom), um carrapato nidícola da família *Ixodidae*, amplamente disperso no mundo e, principalmente relatado durante o ano todo nas regiões tropicais e subtropicais, como no Brasil.⁶ Ainda, recentemente esta enfermidade tem chamado a atenção nas questões de saúde única como uma doença potencial zoonótica.^{8,9}

O diagnóstico da EMC pode ser desafiador devido às suas diferentes fases (aguda, subclínica e crônica), além das suas múltiplas manifestações clínicas; portanto, as técnicas diagnósticas tradicionais, incluindo hematologia, citologia, sorologia e isolamento, são ferramentas diagnósticas valiosas para esta doença, no entanto, um diagnóstico definitivo de infecção por *E. canis* requer técnicas moleculares.⁵⁻⁷

Alguns estudos prévios demonstraram que as concentrações de PFA, bem como da CRP foram altas de acordo com seus delineamentos em cães com EMC; no entanto, a vasta maioria

destes estudos foram de caráter experimental.¹⁰⁻¹⁶ Desta forma, o objetivo deste estudo foi determinar a concentração sérica da CRP como biomarcador da lesão inflamatória e na monitoração do diagnóstico e tratamento clínico de cães naturalmente infectados por EMC.

Material e Métodos

Todo o estudo foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA - FMVZ - UNESP, Botucatu – SP protocolo nº 70/2019– CEUA.

Animais e Plano de Estudo

Foram selecionados no total de 73 cães atendidos na rotina do hospital escola veterinário, onde foram inicialmente inscritos no estudo. Como critério de inclusão, a idade destes animais deveria ser entre 1 e 5 anos. As informações demográficas adicionais podem ser encontradas na tabela 1.

Trinta e dois animais saudáveis foram selecionados para o grupo controle (GC) e quarenta e um animais com histórico clínico de infestação de carrapatos, febre e sinais clínicos compatíveis com a doença foram selecionados para o grupo *Ehrlichia* (GE). A mediana da idade do GC foi de 3 anos (IQR: 2,0 - 3,2) e a idade mediana do GE foi de 2,5 anos (IQR: 2,0 - 4,2).

Grupo controle e critérios de inclusão

No total, foram recrutados 32 cães hígidos, atendidos no hospital veterinário universitário. Desta população foram incluídos dez machos e dez fêmeas (N=20), pesando entre 4 e 55 kg. Todos os animais incluídos apresentaram normalidade mediante aos seguintes exames realizados, tais como: hemograma, bioquímica sérica (glicemia, ureia, creatinina, proteína total, globulina,

albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamyl transferase) urinálise, UPC, urocultura e antibiograma, CRP, e ultrassonografia abdominal.

Para excluir a presença de co-infecções, também foram realizados exames de reação em cadeia de polimerase em tempo real (rt-PCR) para *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Leishmania spp.* e *Hepatozoon spp.*, bem como da reação imunoenzimática (ELISA) por meio de testes *snaps* para detecção de anticorpos como *Ehrlichia canis* ou *Ehrlichia ewingii*, *Babesia canis*, *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma platys* ou *Anaplasma phagocytophilum*, *Leishmania donovani* ou *Leishmania infantum* (SNAP 4Dx Plus e SNAP Leishmania, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME.), e por fim, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para Leishmaniose dos mesmos.

Grupo *Ehrlichia* e critérios de inclusão

Para este grupo, foram recrutados no total 41 cães com histórico prévio de infestação de ectoparasitas, diagnóstico positivo de EMC em contactante, lesões dermatológicas ligadas a dermatite aguda por picada de ectoparasitas, ou histórico de resgate da rua. Ainda, àqueles com sinais clínicos como apatia, hiporexia ou anorexia, letargia, febre, perda de peso, emese, secreção ocular, linfadenomegalia, abdominalgia, hepato e/ou esplenomegalia, hemorragias, petéquias e epistaxe; bem como de exames laboratoriais sugestivos de EMC pela presença (ou não) de anemia, trombocitopenia, leucocitose, hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia, proteinúria, aumento de bioquímica hepática e/ou renal foram critérios adotados para a recrutação do GE.

Isto posto, somente foram incluídos àqueles com rt-PCR positivo exclusivo para *Ehrlichia canis*, e concomitante, isentos de co-infecções onde testados pelos mesmos testes diagnósticos citados acima no GC. Consequentemente, apenas dez machos e seis fêmeas (N=16) pesando entre 3,8 e 35 Kg foram incluídos neste grupo.

Por fim, todos os animais incluídos no GE receberam ectoparasiticidas a fim de minimizar os riscos de reinfecção. Animais confinados ou semi-confinados receberam a administração por via oral do fármaco sarolaner (Symparic[®], Zoetis) de acordo com o peso do cão a cada 30 dias. Para os animais de vida livre, em especial, animais de zona rural, estes receberam a coleira com os fármacos imidacloprida e flumetrina (Seresto[®], Bayer) como tratamento preventivo tópico e, de acordo com seus respectivos pesos.

Critérios de exclusão

Foram excluídos todos os animais dos quais houve a falta de responsabilidade do tutor durante os retornos ou da desistência voluntária deles. Ainda, foram automaticamente excluídos os animais do CG e GE diagnosticados com co-infecções ou comorbidades, urocultura positiva, cadelas em estro, doença renal crônica prévia, e nefro/uretero/urolitíases, salvo apenas da erliquiose eleita para o GE.

Análises

Para o delineamento deste estudo, foi elaborado um programa de coleta de sangue e urina de ambos os grupos em momentos específicos, a fim de monitorar a resposta clínica e laboratorial dos cães doentes e o controle dos saudáveis (Figura 1).

Para o GC foram apenas dois momentos: M0 (inclusão) e M45 (45 dias após incluso). Já para o GE foram seis momentos: M0 (inclusão); M1 (12 horas após inclusão); M2 (24 horas após inclusão); M3 (15 dias de tratamento); M4 (30 dias de tratamento/ cura) e M5 (45 dias após inclusão ou 15 dias curado).

De acordo com o comitê de ética e pelas regulações de bem-estar animal internacional (IACUC)¹⁷ foi respeitado o volume limite de coleta de sangue de 1% do peso vivo para o

processamento das amostras de sangue. Para os exames de hemograma e rt-PCR, foi acondicionado 500 µl de sangue em um tubo *microtainer* e o restante colocado em tubos secos com gel separador para extrair o soro para os demais exames como ELISA, RIFI e Bioquímica sérica.

A urina foi coletada por cistocentese, uma alíquota de 2mL foi acondicionada em tubo com meio Stuart para urocultura em placas de ágar-sangue e ágar MacConkey no laboratório de microbiologia da instituição. O restante da amostra foi submetido para o laboratório de patologia clínico da instituição para a realização do exame de urinálise (físico, químico e sedimentoscopia); ainda, uma alíquota de 300 µl de sobrenadante foi realizado o exame de UPC.

Bioquímica séricos: A determinação sérica de glicemia, ureia, creatinina, proteína total, globulina, albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e gama-glutamil transferase foram realizadas pelo método de tecnologia de bioquímica seca *dry-slide*.

Proteína C Reativa: As concentrações séricas de CRP foram avaliadas por meio das tecnologias *dry-slide* associadas a um novo teste imunoenensaio sanduíche com conjugado de ouro, projetado para determinar a concentração da CRP canino. O intervalo de referência da normalidade da concentração sérica de CRP é de 0,1–1,0 mg/dL (unidade SI: 1,0–10,0 mg/L), valores superiores a 3 mg/dL (unidade SI: 30,0 mg/dL) indicam inflamação sistêmica clinicamente significativa.²⁰

Razão proteína: creatinina urinária: A determinação da RPC foi realizada pelo método quantitativo da tecnologia *dry-slide* associado ao suporte de diluições automatizadas enquanto corrige automaticamente as variações no volume e concentração da urina. O intervalo de referência da UPC é de <0,2 (sem proteinúria para cães); 0,2 – 0,5 (proteinúria transitória para cães) e > 0,5 (diagnóstico de proteinúria para cães).²¹

Todas as determinações bioquímicas séricas e urinárias foram realizadas em equipamento próprio de mensuração por bioquímica seca (IDEXX Catalyst One, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME.) de acordo com as especificações dos fabricantes e kits comerciais.

Plano de tratamento do GE

Após o diagnóstico confirmado pelo rt-PCR associado a exclusão de todas as demais co-infecções e comorbidades, os animais infectados receberam o tratamento de acordo com a literatura¹⁸ como o antimicrobiano doxiciclina (Doxitrat; Agener união) na dosagem de 7,5 mg/kg duas vezes ao dia, durante 28 dias. Além disso, para atenuar os riscos de gastroenterite medicamentosa, foi associado um inibidor de bomba de próton, como por exemplo o omeprazol (Gaviz V; Agener união), na dose de 0,5 a 1 mg/kg pela via oral uma vez ao dia e, preferencialmente oferecido uma hora antes do antimicrobiano conforme as orientações.¹⁹

Análise Estatística

A análise realizada neste estudo foi respectivamente aos 6 momentos do tratamento clínico de acordo com o protocolo do estudo.

Para contabilizar a variação individual do paciente, as medidas analisadas foram repetidas usando um modelo linear misto com a CRP como variável de resultado, tempo como efeito fixo e, cão (indivíduo) como efeito aleatório. Quatro modelos mistos foram criados usando globulina, sCr, RPC e PT como efeitos fixos adicionais. Devido à não normalidade dos resíduos, as formas logarítmicas da CRP foram utilizadas para garantir a homocedasticidade e verificadas por plotagens de resíduos (modelos em materiais suplementares).

Variáveis contínuas não relatadas como estimativas de modelo foram relatadas como mediana e intervalo. Variáveis categóricas foram relatadas em porcentagem e frequência. A significância estatística foi estabelecida em $\alpha = 0,05$. Toda a manipulação e análise de dados foram conduzidas usando o programa R versão 3.5.3 com os seguintes pacotes: tidyverse²² e lme4²³.

Resultados

O perfil da população amostral entre os grupos, além dos biomarcadores avaliados neste estudo estão representadas em formato de tabela com mediana e variação interquartil (IQR) (Tabelas 1 e 2), além de gráficos de linhas para ambos os grupos ao longo do tratamento (Figura 2). Das análises realizadas, a CRP apresentou uma relação log-linear negativa de acordo com a duração do estudo e com as concentrações de sCr (*inclinação*: 0,703, erro padrão: 0,002, $P < 0,001$); (*inclinação*: 0,797, erro padrão: 0,218, $P < 0,002$) respectivamente (Figuras 3 e 4).

Também observou-se que o GE apresentou concentrações mais altas de CRP durante o momento da inclusão em comparação ao GC (GE: 3,5 mg/dL vs. GC: 1,1 mg/dL, $P < 0,001$), e que o GE apresentou uma relação CRP-sCr mais alta do que o GC ($P < 0,006$).

Além disso, no GE, as concentrações de Proteína total (PT), Globulina e Razão Proteína: Creatinina urinária (RPC) apresentaram uma relação logarítmica linear positiva com a CRP (*inclinação*: 0,354, erro padrão: 0,048, $P < 0,008$); (*inclinação*: 0,389, erro padrão: 0,046, $P < 0,209$); (*inclinação*: 0,922, erro padrão: 0,074, $P < 0,001$,) respectivamente (Figuras 5-7).

No entanto, não houve interação significativa entre globulina, PT ou RPC em associação com CRP. Além disso, a associação entre a CRP e estes biomarcadores avaliados foi semelhante, independentemente dos grupos estudados (Figuras 5-7).

Discussão

Neste estudo prospectivo, observou-se no GE que, de acordo com a progressão do tratamento clínico, houve uma redução de 92,3% das concentrações de CRP após 15 dias de tratamento (M3), da normalização total das suas concentrações (VR: 0.0 – 1.0 mg/dL) após 30 dias de tratamento (M4), e ainda, da sua permanência durante a monitoração pós-alta médica (M6). Portanto, a CRP também demonstrou sua utilidade na monitoração da inflamação de cães com EMC ao longo do tratamento.

Além disso, observou-se também uma suspeita de reinfecção de quatro cães devido a persistência de altos valores da CRP durante os momentos M4 (30 dias) e M5 (45 dias), onde, posteriormente, todos apresentaram testes de Rt-PCR positivos para *E. canis* e, consequentemente, reiniciados em um novo tratamento de mais 30 dias.

Ainda, mediante o diagnóstico molecular das reinfecções, questionou-se aos tutores se o tratamento prescrito estava sendo realizado corretamente. Isto posto, os motivos de reinfecção apontados foram: falha do manejo farmacológico do tutor (n=2), e na falha de manejo ambiental do tutor por residir em ambiente rural com bovinos e equinos infestados de carrapatos (n=2).

Desta forma, apesar dos animais reinfectedados (n=4) serem excluídos do estudo, a CRP também foi útil como monitor de reinfecção dos animais em tratamento para EMC, corroborando com a literatura¹⁰; todavia, caberá ao clínico além de repetir os testes moleculares, descartar ainda a possibilidade de outras doenças inflamatórias concomitantes devido a alta sensibilidade do biomarcador.^{2,3}

A CRP é uma proteína da inflamação sistêmica aguda e é, portanto, um marcador primário de inflamação, uma vez que as concentrações das PFA como as α_2 e β_2 -globulinas também aumentam durante a fase aguda da EMC.²⁴ Em um estudo, os níveis de CRP e de α_1 -glicoproteína ácida (AAG) foram avaliados no plasma de 5 cães experimentalmente inoculados com *E. canis*, 12

cães naturalmente infectados e em 10 cães controle. Em todos os cães inoculados experimentalmente, ocorreu um aumento de 2 a 9 vezes nas concentrações de CRP e AAG de 4 a 6 dias após a inoculação.¹¹ Ainda, observou-se que apesar da persistência de *E. canis* nos cães experimentais, as concentrações de CRP e AAG diminuíram gradualmente para os níveis de pré-exposição no dia 34 pós-exposição.¹¹

Já em outro estudo por Shimada *et al.* (2002), as concentrações plasmáticas de CRP aumentaram entre 4 e 16 dias e atingiram o pico entre 15 e 42 dias após a inoculação com *E. canis* em cinco cães. Para Mylonakis *et al.* (2011) a CRP demonstrou maiores valores no grupo de animais em mielossupressão pela EMC comparados àqueles sem alterações medulares; porém, nenhuma das PFA avaliadas foram preditivas de melhores resultados clínicos.²⁵

Além disso, foi observado no GC uma única cadela saudável com a CRP elevada devido a gestação (terço inicial). A partir da terceira semana de gestação de cadelas, ocorre um aumento fisiológico de PFA durante a implantação embrionária e o desenvolvimento da placenta, em especial, devido a uma reação inflamatória induzida pela invasão endometrial embrionária. Como consequência, a determinação do perfil das PFA como a CRP foi proposta como um teste de gravidez precoce (a partir da terceira semana de gestação) em cadelas.⁴ Desta forma, com a sua remoção, a inclinação da linha de regressão para CRP ao longo do tempo seria reta e achatada (Figura 8).

Evidências cada vez mais numerosas sustentam a hipótese de que mecanismos hiperimunes podem estar envolvidos na patogenia da EMC.²⁶ Neste estudo prospectivo, observa-se também que a EMC, além de inflamatória, é uma doença reativa a produção exacerbada de imunoglobulinas, como observado nos resultados da correlação linear positiva entre CRP, PT e Globulina. Ainda, de acordo com os gráficos (Figuras 5 e 6) apesar desta correlação, não houve interações significativas entre a PT e Globulina com a CRP no GE, reforçando que, a EMC diante das associações

(similares) entre estes marcadores é uma doença altamente infecciosa (hiperproteinemia e hipergamaglobulinemia) e altamente inflamatória (aumento da CRP).

A hipergamaglobulinemia no EMC é geralmente policlonal e suas concentrações aumentam e persistem durante a fase febril até as fases subclínica e crônica da doença^{5,6}; sua forma monoclonal raramente ocorre, pois pode resultar em hiperviscosidade e em manifestações clínicas associadas.²⁷⁻²⁹ Ainda, existe uma fraca correlação entre as concentrações de gamaglobulina e os títulos de anticorpos específicos de *E. canis*.²⁹⁻³¹ Desta forma, sugere-se que a produção de anticorpos inespecíficos é induzida pela *E. canis* e que os anticorpos anti-*E. canis* não são a principal fonte de gamaglobulinas que contribuem para esta hipergamaglobulinemia, até mesmo na indução da produção das PFA.^{26,29,32,33}

Outra investigação neste estudo foi avaliar a saúde renal em cães naturalmente infectados com EMC. Em nosso estudo, os cães do GE apresentaram proteinúria e concentrações de sCr dentro da normalidade laboratorial. A correlação linear negativa observada entre PCR e sCr e, inversamente, a correlação linear positiva entre PCR e UPC significou que os cães do GE apresentaram resolução da proteinúria e inflamação durante o tratamento da CME; embora, uma diminuição da "função renal" devido ao aumento significativo da creatinina sérica.

Semelhante aos nossos achados, em um estudo experimental de cães induzidos por *E. canis*, foi observada proteinúria transitória durante a fase aguda da infecção pela determinação de UPC.³⁴ Além disso, a perda máxima de proteína na urina, que consistia principalmente de albumina, foi observados 2,5 a 3,5 semanas após a inoculação.³⁴ Subsequentemente, amostras de biópsia renal foram obtidas e os resultados mostraram glomerulopatia com alterações morfológicas mínimas e transitórias, em vez de glomerulonefrite mediada por imunocomplexos, justificando proteinúria transitória sem evidência histológica de doença glomerular.³⁴

No entanto, em um estudo prospectivo recente de histopatologia renal, 14 cadelas assintomáticas naturalmente infectadas com *E. canis* apresentaram nefropatia membranoproliferativa e membranosa com coloração de imunofluorescência positiva para imunoglobulinas.³⁵ Além disso, um estudo recente retrospectivo mostrou que os cães com anticorpos para erliquiose em regiões endêmicas estão predispostos à doença renal crônica (DRC).³⁶

Neste estudo a sCr foi o único marcador que demonstrou uma correlação linear negativa com a CRP; isto é, quanto maiores as concentrações séricas de CRP, menores foram as de sCr e, ao longo do tratamento clínico, o inverso também foi verdadeiro e estatisticamente significativo. É sabido que a literatura veterinária sobre a avaliação da função renal de cães com EMC ainda permanece escassa. No entanto, a aplicação de sCr como biomarcador de "função renal" em animais com doenças infecciosas e/ou inflamatórias como a EMC torna extremamente difícil classificar essa "função renal" subjetiva como real devido às influências catabólicas associadas à proteinúria, hiporexia, desidratação e animais com carência nutricional.

A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) desenvolveu diretrizes para o diagnóstico e classificação da lesão renal aguda (LRA) com base na concentração de sCr.³⁷ Em nosso estudo, observamos cinco cães não azotêmicos com aumento progressivo nas concentrações de sCr de 0,3 mg /dL dentro do intervalo não azotêmico entre M0 e M2 (24 horas), sugestivo de IRIS - LRA grau I. Apesar da história clínica, atenção deve ser dada à LRA, pois nenhum desses cães não azotêmicos apresentou oligúria, diminuição da densidade urinária, glicosúria ou presença de sedimento ativo.

Todavia, o emprego da sCr como marcador de “função” renal em animais com uma doença infecciosa e inflamatória como a EMC, associada de proteinúria em animais que estão clinicamente catabólicos, hiporéticos, desidratados e em baixos escores nutricionais, torna-se extremamente

desafiador classificar esta “função renal” subjetiva como real. A creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina no músculo e, portanto, sua concentração dependerá da massa muscular do indivíduo, assim sendo significativamente diminuída em animais com baixa massa muscular, como em indivíduos geriátricos, imaturos, em sarcopenia e/ou caquexia.³⁷ Sob o mesmo ponto de vista, a sCr também é influenciada pelo estado de hidratação, dieta e raças específicas.³⁷⁻
³⁸ Desta forma, ainda desconhecendo dos valores basais da sCr pode-se hipotetizar que: (1) a função renal normalizou após o tratamento, pois esta estava subestimada; (2) a função renal piorou após o tratamento pois seus valores, em sua inter-individualidade, aumentaram ao longo do tempo.

Este estudo apresentou algumas limitações. A primeira é que apesar de ser um estudo clínico prospectivo, o número maior de animais fortaleceria o poder estatístico das investigações. Em segundo, a EMC é uma doença infecciosa e altamente inflamatória; capaz de influenciar negativamente sinais clínicos propensos a desnutrição e desidratação; desta forma, torna-se desafiador para os clínicos estimarem a verdadeira “função” renal. Uma avaliação com a TFG padrão ouro como inulina ou iohexol poderia contribuir nesta avaliação, bem como de biomarcadores de lesão renal na presença de uma IRA subclínica. Em terceiro, este estudo clínico carece da concentração sérica basal para todos os biomarcadores avaliados, em especial para a creatinina sérica. Por último, por se tratar de um estudo prospectivo de uma doença infecciosa com riscos de diversas coinfeções e comorbidades, a CRP pode ser um biomarcador desafiador na monitoração de animais doentes com doenças concomitantes.

Em conclusão, a proteína C-reativa é um excelente biomarcador de inflamação que é útil no monitoramento do manejo clínico e reinfecção em cães naturalmente infectados por *E. canis*.

Reconhecimentos

Apoio financeiro: Este estudo e o autor principal foram financiados pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo no âmbito do processo FAPESP: 2018 / 13427-6, e IDEXX Laboratories Inc a qual forneceu todos os exames hematológicos, bioquímicos, novos biomarcadores, SNAP's Test *point of care*, e Análise de Rt-PCR gratuitos como colaboração de suporte para o estudo.

Declaração de conflito de interesses: Michael Coyne, Rachel Murphy e Donald Szlosek são atualmente funcionários da IDEXX Laboratories, Inc.. André Nanny Vieira Le Sueur, é aluno de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto, Alessandra Melchert, Fabiana Ferreira e Regina Kiomi Takahira são atualmente docentes da Universidade Estadual Paulista.

Declaração antimicrobiana off-label: Os autores declaram não usar antimicrobianos off-label.

Referências

1. Pathak A, Agrawal A. Evolution of C-Reactive Protein. *Front Immunol.* 2019; 30(10):943.
2. Moutachakkir M, Hanchi AL, Baraou A, et al. Immunoanalytical characteristics of C-reactive protein and high sensitivity C-reactive protein. *Ann Biol Clin (Paris).* 2017;75(2):225-229.
3. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-27. doi:10.1016/j.tvjl.2010.04.009
4. Ceron JJ, Eckersall PD, Martýnez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(2):85-99.
5. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J.* 2011;187(3):292-296.

6. Waner T, Harrus S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. *Isr J Vet Med*. 2013;68(1):12-18.
7. Vieira RF, Biondo AW, Guimarães AM, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2011;20(1):1-12.
8. Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela [published correction appears in *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Nov;1212(1):130. Xiong, Qingmin [corrected to Xiong, Qingming]]. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1078:110-117.
9. Bezerra MCF, Melo ALT, Taques IIGG, Aguiar DM, Pacheco RC, Shlessarenko RD. Seropositivity for *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in the human population of Mato Grosso, Central-Western Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(3):399-403.
10. Shimada T, Ishida Y, Shimizu M, et al. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun*. 2002;26(3):171-177.
11. Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, et al. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*. 1994;32(4):912-917.
12. Watanabe M, Oikawa T, Hiraoka H, et al. Experimental inoculation of beagle dogs with *Ehrlichia* species detected from *Ixodes ovatus*. *Vet Parasitol*. 2006;136(2):147-154.
13. Karnezi D, Ceron JJ, Theodorou K, et al. Acute phase protein and antioxidant responses in dogs with experimental acute monocytic ehrlichiosis treated with rifampicin. *Vet Microbiol*. 2016;184:59-63.
14. Rudoler N, Harrus S, Martinez-Subiela S, et al. Comparison of the acute phase protein and antioxidant responses in dogs vaccinated against canine monocytic ehrlichiosis and naive-challenged dogs. *Parasit Vectors*. 2015;8:175.

15. McBride JW, Corstvet RE, Gaunt SD, Boudreaux C, Guedry T, Walker DH. Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis immunoreactive proteins. *Infect Immun*. 2003;71(5):2516-2524.
16. Munhoz TD, Faria JL, Vargas-Hernández G, et al. Experimental Ehrlichia canis infection changes acute-phase proteins. *Rev Bras Parasitol Vet*. 2012;21(3):206-212. doi:10.1590/s1984-29612012000300006
17. Petrie, W.K., & Wallace, S.L. (Eds.). (2015). The Care and Feeding of an IACUC: The Organization and Management of an Institutional Animal Care and Use Committee, Second Edition (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b18269>
18. Mylonakis ME, Harrus S, Breitschwerdt EB. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (Ehrlichia canis). *Vet J*. 2019;246:45-53.
19. Marks SL, Kook PH, Papich MG, Tolbert MK, Willard MD. ACVIM consensus statement: Support for rational administration of gastrointestinal protectants to dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2018;32(6):1823-1840.
20. Covin MA, Gomez RR, Suchodolski JS, Steiner JM, Lidbury JA. Analytical validation of a point-of-care test and an automated immunoturbidimetric assay for the measurement of canine C-reactive protein in serum. *Can J Vet Res*. 2021 Oct;85(4):285-292. PMID: 34602733; PMCID: PMC8451710.
- 21.
22. Wickham H, et al. “Welcome to the tidyverse.” *J Open Source Sof*. 2019; 4(43), 1686. doi: 10.21105/joss.01686.
23. Bates D. et al. Fitting linear mixed-effects models using lme4. arXiv preprint. arXiv. 2014. 1406.5823.
24. Koj, A. 1984. Pathophysiology of plasma protein metabolism, p. 221–248.

Macmillan, London, United Kingdom.

25. Mylonakis ME, Ceron JJ, Leontides L, et al. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. *J Vet Intern Med.* 2011;25(4):811-817.

26. Harrus S, Waner T, Bark H, Jongejan F, Cornelissen AW. Recent advances in determining the pathogenesis of canine monocytic ehrlichiosis. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2745-2749.

27. Hoskins JD, Barta O, Rothschnitt J. Serum hyperviscosity syndrome associated with Ehrlichia canis infection in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1983;183(9):1011-964.

28. Perille AL, Matus RE. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. *J Vet Intern Med.* 1991;5(3):195-198.

29. Harrus S, Waner T, Avidar Y, Bogin E, Peh H, Bark H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. *Vet Parasitol.* 1996;66(3-4):241-249.

30. Reardon MJ, Pierce KR. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemic and lymphoreticular systems. *Vet Pathol.* 1981;18(1):48-61.

31. Weisiger RM, Ristic M, Huxsoll DL. Kinetics of antibody response to Ehrlichia canis assayed by the indirect fluorescent antibody method. *Am J Vet Res.* 1975;36(5):689-694.

32. Hildebrandt PK, Huxsoll DL, Walker JS, Nims RM, Taylor R, Andrews M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res.* 1973;34(10):1309-1320.

33. Woody BJ, Hoskins JD. Ehrlichial diseases of dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991;21(1):75-98.

34. Codner EC, Caceci T, Saunders GK, et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. *Am J Vet Res.* 1992;53(12):2286-2291.

35. Caster DJ, Summersgill JT, Paueksakon P, Massung RF, Shieh WJ, McLeish KR. Mixed cryoglobulinemia and secondary membranoproliferative glomerulonephritis associated with ehrlichiosis. *CEN Case Rep.* 2014;3(2):178-182.
36. Burton W, Drake C, Ogeer J, et al. Association Between Exposure to *Ehrlichia* spp. and Risk of Developing Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 2020;56(3):159-164.
37. Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol.* 2003;32(4):162-179.
38. Hokamp JA, Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol.* 2016;45(1):28-56. doi:10.1111/vcp.12333

Figuras

MOMENTOS DE COLETA DE SANGUE E URINA

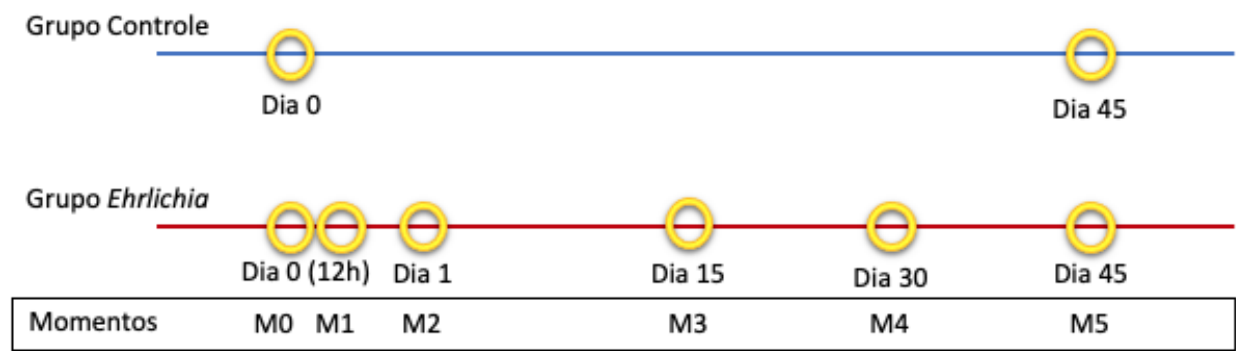


Figura 1: Intervalo das coletas de sangue e urina dos grupos controle e Ehrlichia respectivamente

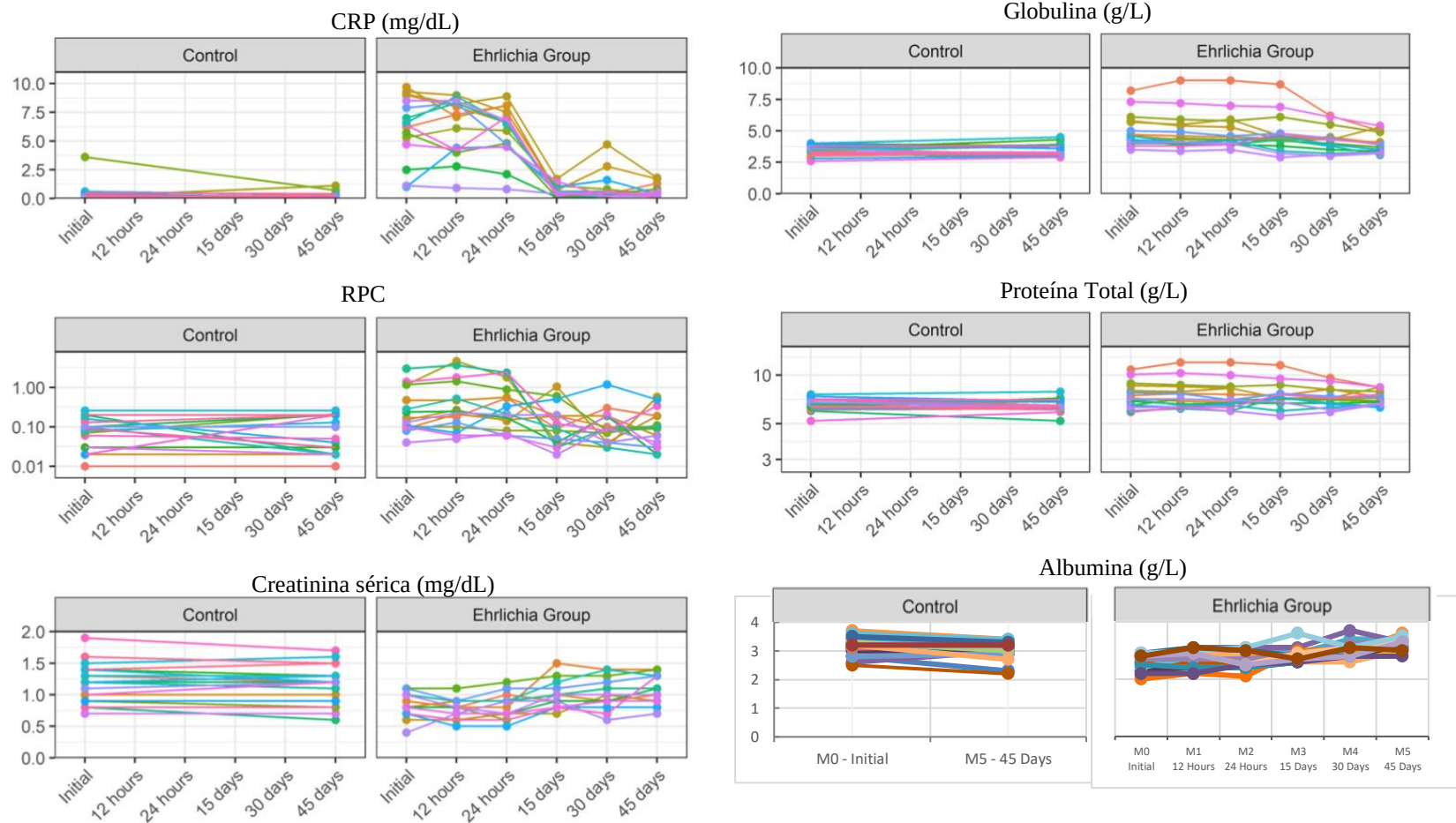


Figura 2: Gráfico de linha dos biomarcadores CRP, UPC, sCr, Globulina e Proteína Total pelo tempo de acompanhamento entre os grupos estudados.

CURVA DE REGRESSÃO LOG-LINEAR ENTRE A PROTEÍNA-C REATIVA E OS GRUPOS ESTUDADOS

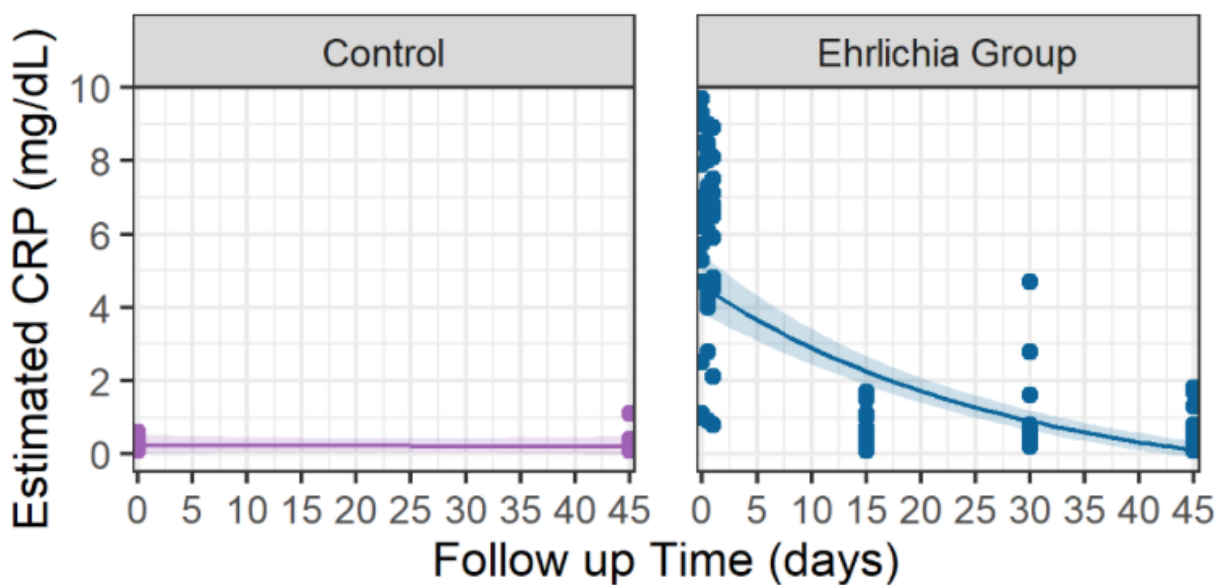


Figura 3: Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo tempo de acompanhamento. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de CRP durante o tempo de acompanhamento para o GC e GE respectivamente. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de CRP estimado.

CURVA DE REGRESSÃO LOG-LINEAR ENTRE A CREATININA E PROTEÍNA-C REATIVA

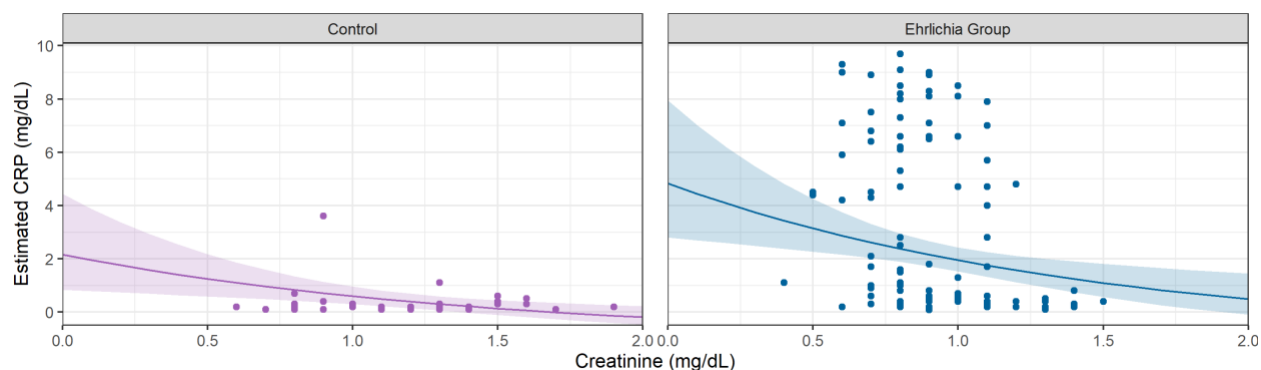


Figura 4: Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor sCr. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor de sCr do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.

CURVA DE REGRESSÃO LOG-LINEAR ENTRE GLOBULINA E PROTEÍNA-C REATIVA

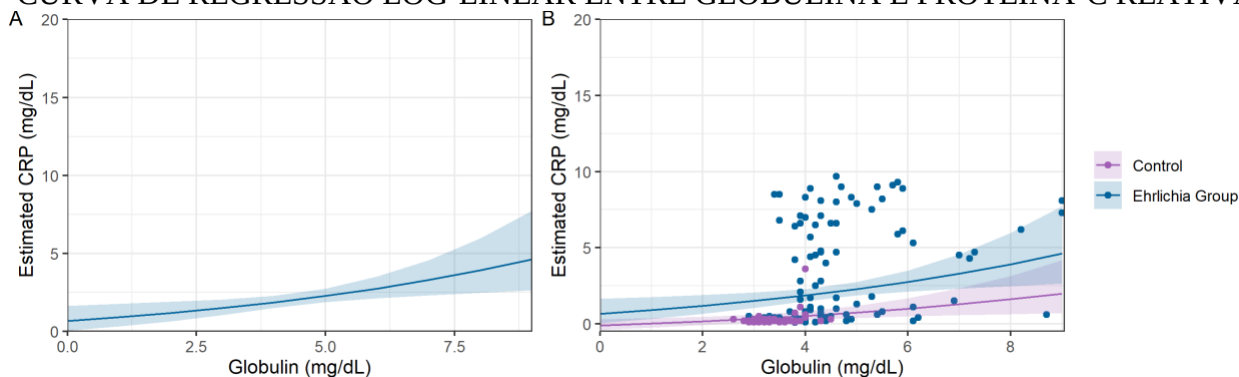


Figura 5: Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor de globulina. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor de globulina do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor estimado de proteína-C reativa.

CURVA DE REGRESSÃO LOG-LINEAR ENTRE A PROTEÍNA TOTAL E PROTEÍNA-C REATIVA

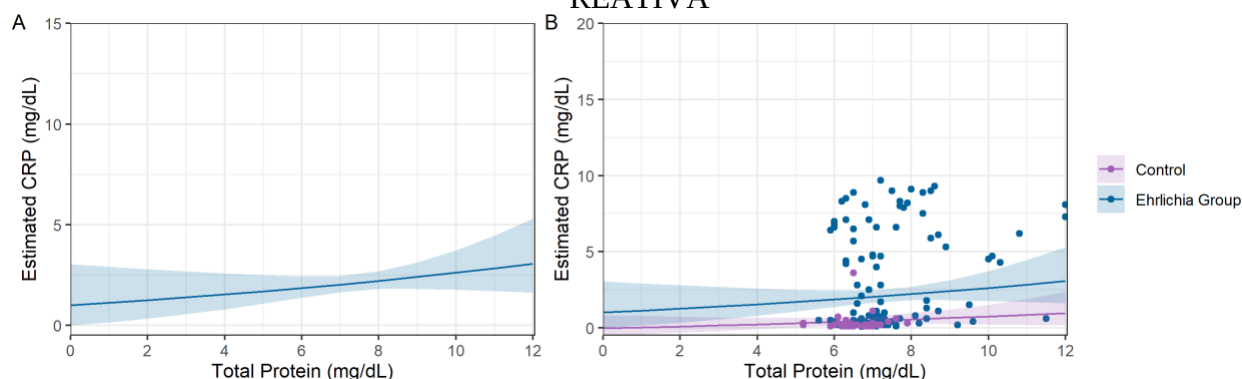


Figura 6: Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa pelo valor de proteína total. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de de proteína-C reativa para cada valor de proteína total do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.

CURVA DE REGRESSÃO LOG-LINEAR ENTRE RAZÃO PROTEÍNA: CREATININA
URINÁRIA E PROTEÍNA-C REATIVA

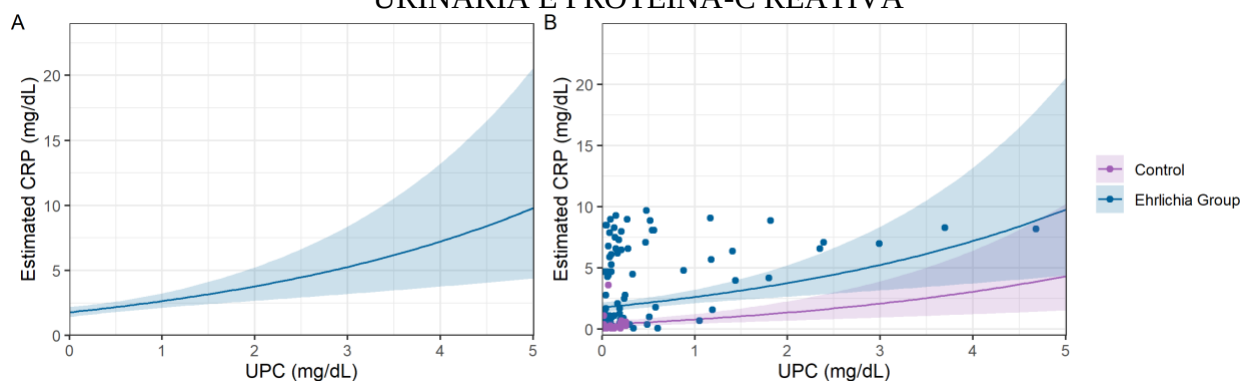


Figura 7: Modelo log-linear do valor estimado de proteína-C reativa por valor da razão proteína: creatinina urinária. As linhas roxas e azuis representam o valor médio estimado de proteína-C reativa para cada valor RPC do modelo de efeitos mistos. As faixas roxas e azuis representam o intervalo de confiança de 95% em torno do valor de proteína-C reativa estimado.

532 **Tabelas**

533

534 **Tabela 1.** Perfil amostral dos grupos.

535

<i>Categorias</i>	<i>GC (n=20)</i>	<i>GE (n=16)</i>
Fêmeas Não-castradas	20,0 % (4)	18,8 % (3)
Fêmeas Castradas	30,0 % (6)	18,8 % (3)
Machos Não-castrados	40,0 % (8)	56,2 % (9)
Machos Castrados	10,0 % (2)	6,2 % (1)
Idade (Mediana)	3 anos	2 anos

536 Legenda: GC = Grupo controle; GE = Grupo *Ehrlichia*.

Tabela 2. Mediana e amplitude interquartil dos biomarcadores avaliados nos grupos controle e *Ehrlichia* durante o delineamento do estudo.

	Grupo controle (n=20)		Grupo Ehrlichia (n=16)					
	Início	45 Dias	Início	12 horas	24 horas	15 Dias	30 Dias	45 Dias
Biomarcadores séricos								
Creatinina	1,2 (0,98 - 1,40)	1,2 (0,98 - 1,30)	0,80 (0,78 - 1,00)	0,80 (0,70 - 0,90)	0,75 (0,70 - 0,90)	0,95 (0,80 - 1,02)	0,95 (0,88 - 1,12)	1,10 (0,90 - 1,30)
CRP (mg/dL)	0,20 (0,18 - 0,30)	0,20 (0,10 - 0,23)	6,50 (5,15 - 8,62)	7,20 (4,27 - 8,30)	6,55 (4,65 - 7,20)	0,55 (0,40 - 0,77)	0,45 (0,27 - 0,65)	0,40 (0,27 - 0,65)
Proteína Total (g/dL)	6,50 (6,38 - 7,00)	6,45 (6,20 - 7,00)	7,15 (6,50 - 8,15)	7,10 (6,45 - 8,05)	7,00 (6,65 - 8,30)	7,25 (7,02 - 7,62)	7,20 (6,68 - 7,58)	7,05 (6,68 - 7,67)
Globulina (g/dL)	3,45 (3,20 - 3,73)	3,60 (3,10 - 3,80)	4,60 (4,10 - 5,73)	4,35 (4,07 - 5,43)	4,30 (3,98 - 5,42)	4,35 (4,10 - 4,80)	4,30 (3,72 - 4,50)	3,90 (3,38 - 4,30)
Albumina (g/dL)	3,2 (3,1 - 3,3)	3,1 (3,0 - 3,2)	2,65 (2,4 - 2,8)	2,85 (2,5 - 3,0)	2,6 (2,5 - 3,0)	2,8 (2,7 - 2,9)	3,0 (2,9 - 3,1)	3,2 (3,0 - 3,3)
Biomarcadores urinários								
RPC (g/dL)	0,08 (0,03 - 0,14)	0,08 (0,02 - 0,20)	0,16 (0,10 - 0,65)	0,24 (0,12 - 0,75)	0,21 (0,12 - 0,64)	0,09 (0,04 - 0,19)	0,08 (0,04 - 0,19)	0,10 (0,04 - 0,19)
Densidade urinária	1050 (1050 - 1050)	1050 (1048 - 1050)	1050 (1037 - 1050)	1049 (1030 - 1050)	1048 (1040 - 1050)	1045 (1039 - 1050)	1039 (1034,5 - 1045)	1041 (1026 - 1048)

Legenda: CRP = Proteína-C Reativa; RPC = Razão Proteína: Creatinina Urinária.

SEÇÃO II

NOVAS CONCEPÇÕES RENAIIS EM CÃES COM ERLIQUIOSE:

A ERA DOS BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL.

Para Carlota

(In memoriam)

*A Mulher a qual me ensinou o Amor
pela Coragem, Sabedoria e pelo Exemplo.*

Novel Renal Injury Markers in Dogs with Ehrlichiosis

André N.V. Le Sueur¹, Adriana A.L. de Souza², Antônio C. Paes², Regina K. Takahira³,
Alessandra Melchert³, Adriano S. Okamoto³, Michael Coyne⁴, Rachel Murphy⁵, Donald
Szlosek⁴, Sarah Peterson⁴, Priscylla T.C. Guimarães-Okamoto^{3*}

¹Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University - NCSU, Raleigh, North Carolina, United States of America.

²Department of Animal Production and Preventive Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil.

³Department of Veterinary Clinics, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University - UNESP, Botucatu, Brazil.

⁴IDEXX Laboratories Inc., Westbrook, Maine, United States of America

⁵Abbott Diagnostics Inc., Scarborough, Maine, United States of America

*Corresponding author

E-mail: tatiana.okamoto@unesp.br

Abstract

Canine monocytic ehrlichiosis (CME) has been observed to impact renal function. Currently, the recognition of acute kidney injury is through the nonspecific biomarker serum creatinine (sCr). Novel markers of renal injury such as urinary clusterin (uClust) and urinary cystatin B (uCysB) may increase our understanding of the relationship between ehrlichiosis and renal cellular injury. The aim of this study was to evaluate novel renal injury biomarkers in dogs with acute CME. Twenty healthy dogs were enrolled in the control group (CG), and 16 dogs naturally infected with *Ehrlichia canis* were included in the *Ehrlichia* Group (EG). All dogs were followed for 45 days. EG dogs were treated with doxycycline twice daily for the first 30 days. Urine and serum were collected at: 0, 0.5, 1, 15, 30, and 45 days after start of treatment. Urine concentrations of uClust and uCysB were determined using a research ELISA immunoassay. A linear mixed model was used to estimate population mean of renal injury markers with patient as the random effect, and day and treatment as fixed effects. EG was observed to have higher uClust values compared to CG (estimated population mean EG: 213 ng/dL vs. CG: 84 ng/dL, $P < 0.001$). EG was observed to have higher uCysB values compared to CG (estimated population mean EG: 248 ng/dL vs. CG: 38 ng/dL, $P < 0.001$). Increases in uCysB and uClust suggest the presence of renal injury and a possible mechanism for the observed predisposition to chronic kidney disease in dogs with ehrlichiosis.

Introduction

Acute kidney injury (AKI) is a heterogeneous syndrome representing damage to the nephrons reflected by a decrease in glomerular filtration rate (GFR), tubular dysfunction, and a decrease in urine output [1, 2]. Although initially presented by discrete

26 clinical signs with minimal laboratory changes, AKI is associated with multiple
27 pathophysiological processes of varying severity [1 – 4].

28 Kidney disease has been evaluated through the utilization of biomarkers in two
29 distinct groups: functional biomarkers, which provide an estimation of kidney health, and
30 active injury biomarkers, which provide detection of early or subclinical AKI and a key
31 to differential diagnosis and prognosis assessment [1, 3, 5, 6].

32 Serum creatinine (sCr), and more recently, symmetric dimethylarginine (SDMA),
33 are considered functional biomarkers because both correlate well with GFR using gold-
34 standard assays; however, the increase in sCr concentration is often too late to detect early
35 kidney injury (subclinical AKI) due to renal reserve [1, 5-7]. Consequently, prediction
36 and early detection of AKI is improved by tools such as novel AKI biomarker panels, risk
37 stratification, and clinical information systems [1 – 4, 8].

38 Defining AKI in dogs with CME is challenging, especially at the acute stage, this
39 globally endemic vector-borne disease is caused by *Ehrlichia canis* and is commonly
40 diagnosed in routine clinical practice in Brazil [9]. Dogs diagnosed with acute CME
41 present complex clinical signs and laboratory changes depending on the infecting dose,
42 the pathogenicity of the causative strain, age and immunity of the host, duration of
43 infection, history of concomitant disease, and coinfections [10,11]. Recently infected
44 dogs can present as asymptomatic; however, as the infection progresses, a non-
45 regenerative anemia and or thrombocytopenia develops, which eventually can lead to
46 multiple organ failure associated with pancytopenia due to bone marrow hypoplasia or
47 aplasia [10-12].

48 Canine ehrlichiosis can affect a variety of internal organs during asymptomatic,
49 acute, and chronic stages; however, acute CME can be treated with the use of
50 tetracyclines, such as doxycycline or minocycline for 3 to 4 weeks [10,12].

51 Histopathological studies in dogs diagnosed with sub-clinical CME showed that over
52 90% had structural abnormalities of the kidneys on light microscopy, such as the presence
53 of mesangial proliferation and synechiae; 100% of kidneys stained positive for
54 immunoglobulins seen in immunofluorescence, and above 55% of kidneys showed
55 structural abnormalities on electron microscopy described as subepithelial and mesangial
56 electron-dense with immune complexes deposits, glomerular projection spikes and
57 segmental effacement of podocyte foot processes [13, 14].

58 *E. canis* also causes a pro-inflammatory state that promotes periglomerular edema
59 resulting from cell extravasation. The subsequent accumulation of immune complexes in
60 the mesangium and glomerular tufts, as well as podocyte fusion and focal necrosis, leads
61 to proteinuria, with a substantial increase in urine protein: creatinine ratio concentrations
62 (UPC) and a decrease in GFR [14, 15].

63 Despite the histopathological evidence of nephron damage seen in previous
64 studies [13-15], the literature related to the detection of subclinical AKI in dogs with
65 CME by non-invasive assays is limited. The aim of this prospective clinical study was to
66 evaluate the concentrations of functional renal biomarkers and the novel urinary
67 biomarkers of active kidney injury, urinary cystatin B (uCysB) and urinary clusterin
68 (uClust), in dogs naturally infected with *E. canis* at the acute stage of CME.

69

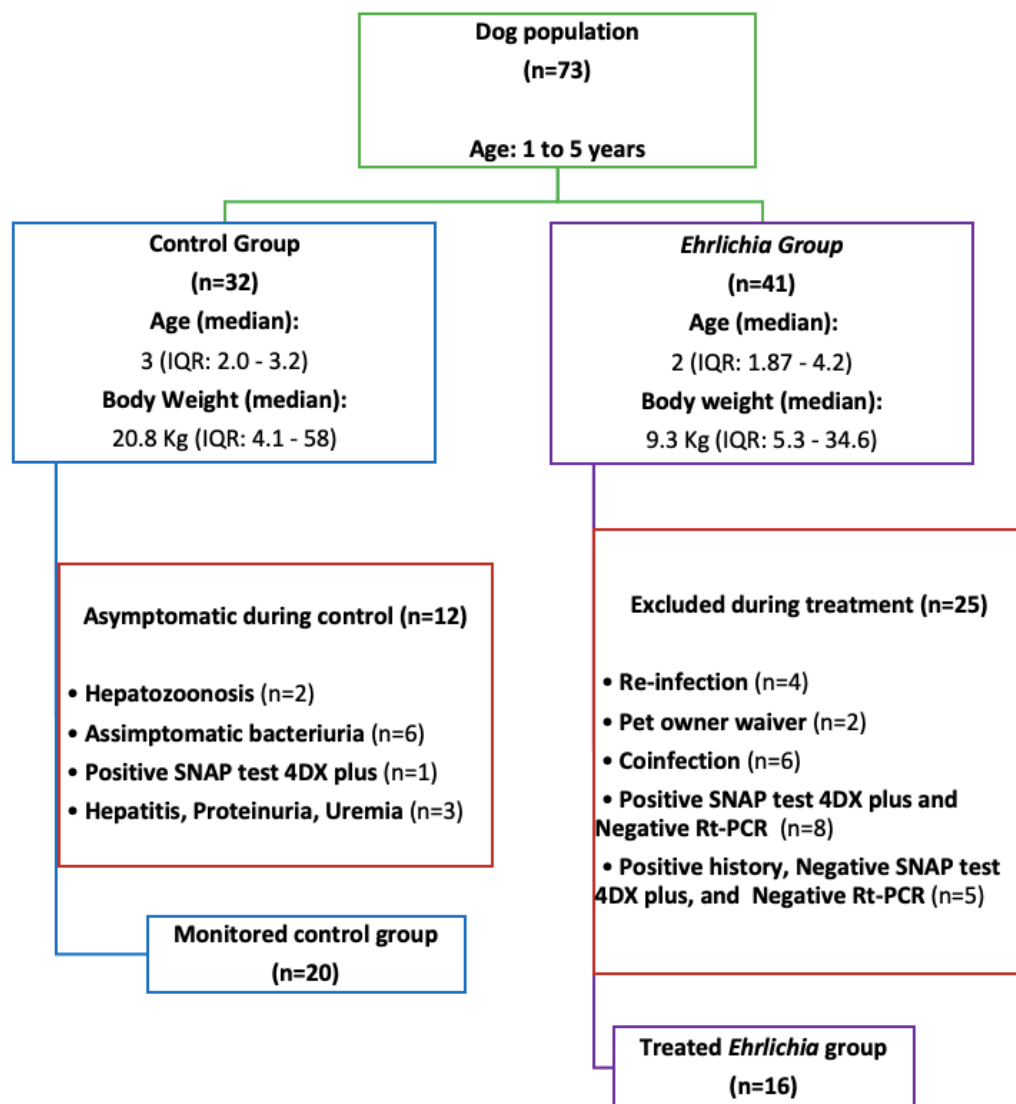
70 **Materials and methods**

71 The following study was revised and approved by the Ethics Committee on the
72 Use of Animals - ECUA - FMVZ - UNESP, Botucatu – SP protocol nº 70/2019 –
73 ECUA. Written informed consent was obtained from all dog owners.

74

75 **Animal groups and study design**

76 A cohort of 73 client-owned canines was systematically recruited from the pool
 77 of patients seeking standard veterinary care at the Veterinary Teaching Hospital of the
 78 School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University,
 79 Botucatu. These dogs were subsequently enrolled in the research study at its inception.
 80 Dogs of any breed and sex between 1 and 5 years of age were eligible for inclusion. A
 81 consort diagram of the study population is shown in Fig 1. Although it was not a
 82 predefined inclusion criterion, it is noteworthy that all client-owned dogs under
 83 evaluation in this study exhibited clinical symptoms and a documented history of
 84 exposure to vector-borne diseases.



85 Fig 1. Consort diagram of the population studied.

87 Thirty-two healthy faculty-owned dogs were prospectively enrolled for the control
88 group (CG), and forty-one client-owned dogs with a history of tick infestation, fever, and
89 clinical signs consistent with a tick-borne disease were enrolled for the *Ehrlichia* group
90 (EG).

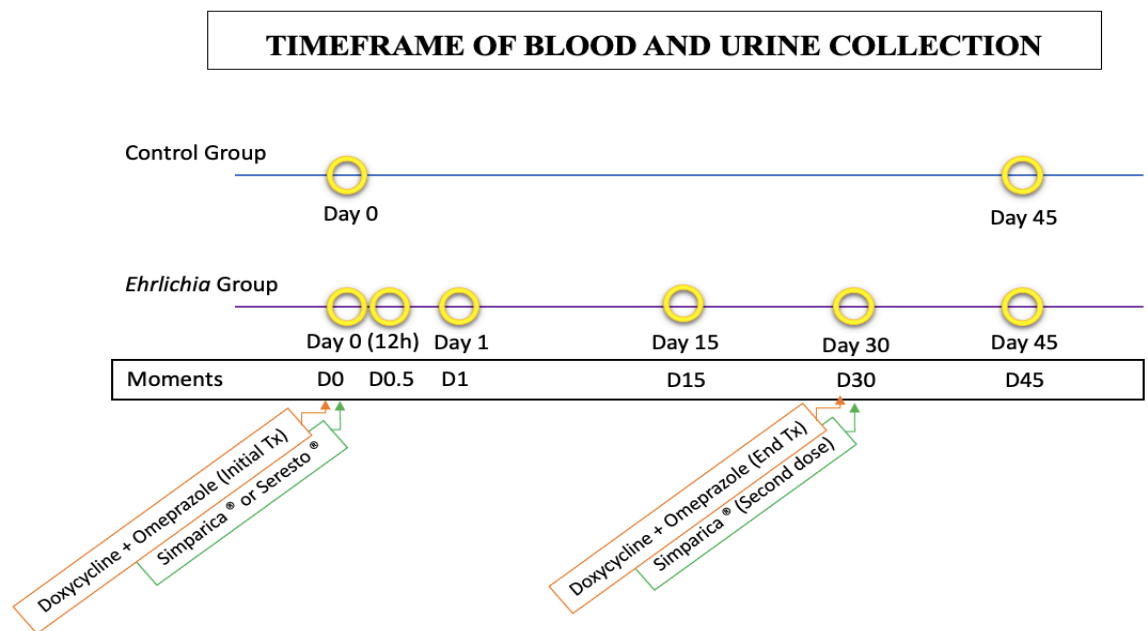
91 To check the health status of all dogs in the CG, blood and urine were collected
92 for a complete blood count (CBC), urinalysis, serum biochemistry, urine culture, and full
93 abdominal ultrasound. In accordance with the Ethics Committee and International Animal
94 Welfare Regulations, a blood sampling limit of 1% of body weight was respected in the
95 processing of all blood samples. For CBC and real-time polymerase chain reaction (RT-
96 PCR) tests, 500 µl of blood were placed in a microtainer tube, and the remainder was
97 placed in dry tubes with separating gel to collect serum for the other tests such as enzyme-
98 linked immunosorbent assay (ELISA), indirect fluorescent antibody test (IFAT), and
99 serum biochemistry assays. Urine was collected by cystocentesis, and a 2mL aliquot was
100 placed in a tube with Stuart medium for urine transportation, and culture was done on
101 blood agar and MacConkey agar plates. The remainder of the sample was submitted to
102 the institution's clinical pathology laboratory for urinalysis. In addition, an aliquot of 300
103 µl of the supernatant was used for UPC testing.

104 To exclude the presence of co-infections by other vector-borne diseases, screening
105 tests were performed on site using an ELISA to detect *Ehrlichia canis*, *E. ewingii*,
106 *Borrelia burgdorferi*, *Dirofilaria immitis*, *Anaplasma platys*, *A. phagocytophilum*,
107 *Leishmania donovani*, and *L. infantum* antibodies (IDEXX SNAP 4Dx Plus and IDEXX
108 SNAP Leishmania, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME.). In addition, RT-PCR tests
109 were performed for *E. canis*, *Ehrlichia spp.*, *Babesia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Leishmania*
110 *spp.*, and *Hepatozoon spp.*, IFAT was performed to exclude leishmaniasis. Only animals
111 that presented with laboratory results within normal reference ranges or negative for

112 infections in all exams described above were included. Dogs of both groups that were
113 diagnosed with coinfections or comorbidities, positive urine culture results, previous
114 history chronic kidney disease, presence of heart murmur, and presence of partial or
115 complete obstruction due to urolithiasis were excluded. Furthermore, all dogs failing to
116 return for follow-up visits or that were voluntarily withdrawn from the study were also
117 excluded. Throughout the duration of this research endeavor, there have been no instances
118 of mortality observed within the studied canine cohort.

119 For the EG, a total of 41 dogs were recruited presenting with a history of
120 ectoparasite infestation, a positive diagnosis of CME in contact dogs, dermatologic
121 lesions associated with acute dermatitis caused by ticks or a history of stray animal rescue.
122 Hospitalized patients with clinical signs including apathy, hyporexia or anorexia,
123 lethargy, fever, weight loss, vomiting, ocular discharge, lymphadenopathy, abdominal
124 pain, hepatomegaly and/or splenomegaly, hemorrhage, petechiae, and epistaxis;
125 laboratory tests suggestive of CME (anemia, thrombocytopenia, leukocytosis,
126 hyperproteinemia with hypergammaglobulinemia), were eligible for inclusion.

127 As in the CG, all dogs of EG were subjected to the above molecular tests to ensure
128 the final inclusion, consisting of a positive diagnosis in RT-PCR exclusively for *E. canis*,
129 and at the same time, absent of co-infections. All animals included in CG were monitored
130 at the time of inclusion (D0) and 45 days later (D45). The infected animals were examined
131 at their inclusion (D0), 12 hours (D0.5), 24 hours (D1), 15 days (D15), 30 days (D30),
132 and 45 days of follow-up or 15 days after discharge (D45) as shown in Fig 2.



134 **Fig 2. Timeframe of blood and urine collections of Control and *Ehrlichia* groups**
135 **respectively**

136

137 After confirmation of the RT-PCR test for *E. canis* infection, dogs in the EG were
138 treated with doxycycline (7.5mg /kg, PO, q12h), and omeprazole (1mg /kg, PO, q24h) for
139 30 days to treat their infection. In addition, on D30, the RT-PCR test for all vector-borne
140 diseases listed above and the IFAT for leishmaniasis were repeated in all dogs of EG, and
141 on D45 for CG.

142 Lastly, to minimize the risk of reinfection, all EG dogs received ectoparasiticides
143 throughout the study. Confined or semi-confined animals received oral administration of
144 sarolaner (Simparica®, Zoetis) at D0 and D30. Free-ranging animals, especially in rural
145 areas, received imidacloprid and a flumethrin impregnated collar (Seresto®, Bayer),
146 according to their respective weights as a topical treatment.

147

148 **Serum and urinary biomarkers**

149 Blood and urine samples were collected from all dogs as described above. Serum
150 was separated after centrifugation (1300 g, 10 min and room temperature). Serum
151 concentrations of glucose, creatinine, urea nitrogen, total protein, globulin, albumin,
152 alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, and gamma-glutamyl transferase were
153 determined in a specific dry-slide biochemical analyzer (IDEXX Catalyst One, IDEXX
154 Laboratories, Inc.). In addition, biochemical determination of UPC was performed in a
155 special biochemistry meter with dry slide in conjunction with the support of automatic
156 dilutions with automatic correction of variations in urine volume and concentration
157 (IDEXX Catalyst UPC test, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME.).

158 All serum and urine samples were stored in a freezer at -80°C until run in batch
159 (IDEXX Laboratories Inc., One IDEXX Drive, Westbrook, Maine, USA). Urinary CysB
160 and uClust concentrations were determined by a sandwich immunoassay test as
161 previously described [6]. The limit of quantitation (LOQ) for uCysB and uClust was 15
162 ng/mL, and 70 ng/mL, respectively.

163

164 **Statistical analysis**

165 To understand the effect of *E. canis* infection on renal biomarkers, four linear
166 mixed models were created with each biomarker as the outcome (Creatinine, SDMA,
167 uCysB, and uClust). Patient ID was used as the random effect to account for individual
168 patient variation. Both neuter status (Intact, Spayed, Neutered) and sex (Male, Female)
169 were initially considered as fixed effects for all models, but were removed due to lack of
170 effect. To correct for non-normality of the residuals, the log_{1p} forms of the biomarkers
171 were used to ensure homoscedasticity and verified by residual plots. For urinary Clusterin
172 and urinary Cystatin B values below the LOQ, the results were imputed as the LOQ value.
173 Continuous variables not reported as model estimates were reported as median and

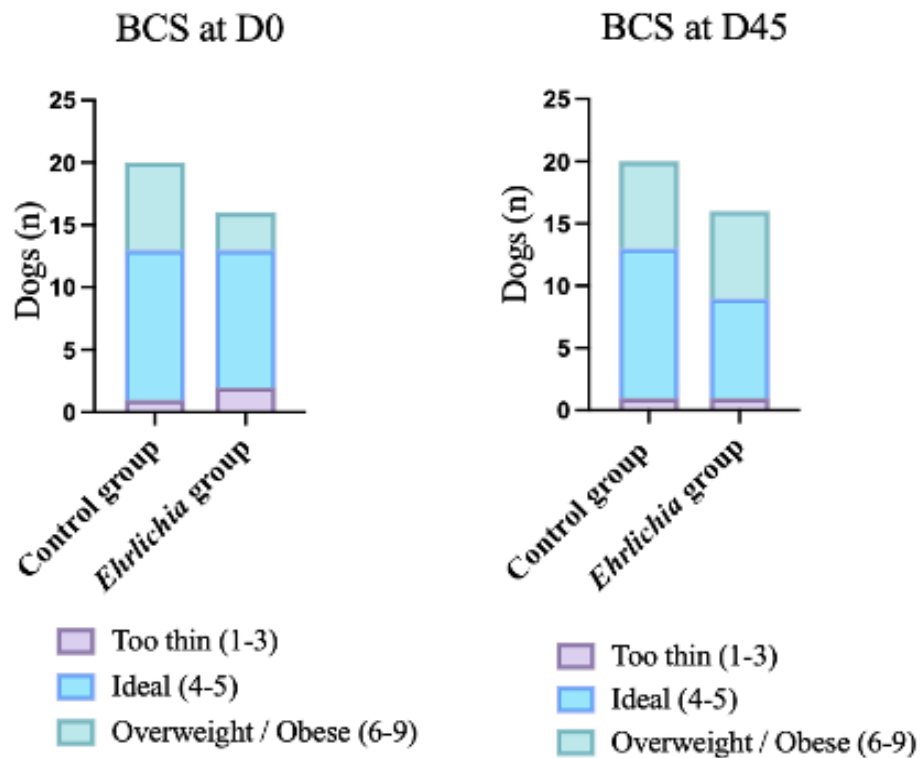
interquartile range (IQR). Categorical variables were reported as percent and frequency. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$. All data manipulation and analysis were conducted using R version 3.5.3 with the following packages: tidyverse and lme4 [16-18].

Results

The CG included twenty dogs (ten males and ten females) weighing between 4 and 55 kg, with a median weight of 20.8 kg. The EG included sixteen dogs (ten males and six females) weighing between 3.8 and 35 kg with a median weight of 9.3 kg. The median age of the CG was 3.0 years and the EG was 2.5 years.

The study population is represented in Fig 1. At time of inclusion, differences were found in weight distribution between the CG (Median: 20.8 Kg, IQR: 7.8-28.1) and EG (Median: 9.3 Kg, IQR: 6.4-15.4, Wilcoxon Rank Sum $P < 0.025$). At the end of the study (D45), no change in body weight (BW) was observed between the two groups (CG: Median: 20.7 Kg, IQR: 7.9 – 28.1, EG: Median: 10.9 Kg, IQR: 7.8 -19.4, Wilcoxon Rank Sum $P < 0.065$). Within the EG, a median increase in weight totaling 1.3 kilograms was observed over the duration of the study (Wilcoxon Rank Sum $P < 0.042$). The distribution of body condition score (BCS) between groups and exam days can be seen in Fig 3.

Body Condition Score (BCS) of both groups during inclusion and discharge of the study



192

193 **Fig 3. Body Condition Score (BCS) by group compared at study inclusion and**
 194 **completion of treatment.**

195

196 No differences were observed in the distribution of age at the time of inclusion
 197 between the CG (Median: 3 years, IQR: 2 – 4) and EG (Median: 2 years, IQR: 1.5 – 4
 198 Wilcoxon Rank Sum $P = 0.854$).

199 Upon presentation, differences between the CG and the EG across several pivotal
 200 parameters were observed. Specifically, red blood cell count (RBC), hemoglobin (HB),
 201 and hematocrit (Ht) displayed discernible variations between CG and EG (Wilcoxon
 202 Rank Sum $P < 0.001$, Table 1). Differences in platelet counts (PLT) were also observed
 203 between the two cohorts (Wilcoxon Rank Sum $P < 0.002$, Table 1). Conversely, no
 204 differences in the distribution of white blood cell count (WBC) and total protein (TP)

were observed between CG and EG (Wilcoxon Rank Sum $P = 0.562$ and $P = 0.431$ respectively, Table 1).

Table 1. Hematological Parameters in Control Group (CG) and *Ehrlichia* Group (EG) upon initial presentation.

Parameter	CG		EG		Wilcoxon Rank Sum
	Median	IQR	Median	IQR	
RBC (M/ μ L)	7.6	6.9 – 8.0	5.7	4.6 - 6.4	< 0.001
HB (g/dL)	18.0	16.5 - 19.3	13.4	10.8 - 14.3	< 0.001
Ht (%)	48.5	47 - 54.5	37.0	30.0 – 40.0	< 0.001
PLT (K/ μ L)	273.0	203.0 – 345.0	57.0	16.5 - 146.3	0.002
WBC (K/ μ L)	9.2	7.3 - 10.8	8.4	7.0 - 11.1	0.562
TP (g/dL)	6.9	6.2 - 7.2	7.1	6.5 - 8.2	0.431

Median concentrations of the urinary and serum biomarkers measured during the study for each group is shown in Table 2. The estimated values from the mixed effects model for the CG and EG of the four kidney biomarkers between groups during the course of the study are shown in Fig. 4 and the line plots across time with the measured results are shown in Fig. 5. On the initial visit, EG had lower sCr concentrations compared to CG (LMM-estimated population mean EG: 0.8 mg/dL vs. CG: 1.2 mg/dL, $P < 0.001$). Among CG, sCr was not observed to change during the study evaluation (slope < 0.001 mg/dL / day, LMM $P = 0.622$). In EG, sCr was observed to increase linearly from the initial visit (LMM-estimated mean 1.2 mg/dL) to the day 45 timepoint (LMM-estimated mean = 1.1 mg/dL, slope = 0.003 mg/dL / day, LMM $P < 0.001$).

222 **Table 2.** Urinary and serum biomarkers concentrations of Control Group, and *Ehrlichia* Group throughout the study period. Median
223 concentration and interquartile range for each biomarker are presented.

	Control Group (N = 20)		<i>Ehrlichia</i> Group (N = 16)					
	Inclusion	45 Days	Inclusion	12 hours	24 hours	15 Days	30 Days	45 Days
<i>Urinary</i>								
<i>biomarkers</i>								
UPC	0.08	0.08	0.16	0.24	0.21	0.09	0.08	0.10
(g/dL)	(0.03 - 0.14)	(0.02 - 0.20)	(0.10 - 0.65)	(0.12 - 0.75)	(0.12 - 0.64)	(0.04 - 0.19)	(0.04 - 0.19)	(0.04 - 0.19)
Clusterin	70.0	70.0	253.5	313.0	241.5	70.0	70.0	70.0
(ng/mL)	(70.0 – 85.8)	(70.0 – 78.0)	(93.8 -431.5)	(88.8 – 467.0)	(130.5 - 399)	(70.0 – 70.0)	(70.0 – 70.0)	(70.0 – 70.0)
Cystatin B	26.0	19.0	301.5	346.5	285.5	27.5	15.0	15.0
(ng/mL)	(15.0 – 57.2)	(15.0 – 31.8)	(207.0 – 1057.0)	(135.0 – 1175.0)	(100.5 – 1398.0)	(15.0 - 54.5)	(15.0 – 18.2)	(15.0 – 20.0)
USG	1050	1050	1050	1049	1048	1045	1039	1041
	(1050 - 1050)	(1048 - 1050)	(1037 - 1050)	(1030 - 1050)	(1040 - 1050)	(1039 - 1050)	(1034.5 - 1045)	(1026 -1048)

Serum

biomarkers

Creatinine	1.2	1.2	0.8	0.8	0.75	0.95	0.95	1.1
(mg/dL)	(0.98 -1.40)	(0.98 - 1.30)	(0.78 - 1.00)	(0.70 - 0.90)	(0.70 - 0.90)	(0.80 - 1.02)	(0.88 - 1.12)	(0.90 - 1.30)
SDMA (g/dL)	10.0	11.0	11.0	12.0	11.0	11.0	11.0	12.0
	(8.8 – 12.0)	(9.5 – 12.0)	(9.0 – 13.2)	(9.8 – 13.2)	(10.0 – 13.2)	(9.8 – 13.0)	(10.0 – 12.0)	(10.8 – 12.2)
TP (g/dL)	6.5	6.5	7.2	7.1	7.0	7.3	7.2	7.1
	(6.4 - 7.0)	(6.2 - 7.0)	(6.5 - 8.2)	(6.5 - 8.1)	(6.7 - 8.3)	(7.0 - 7.6)	(6.7 - 7.6)	(6.7 - 7.7)
Globulin (g/dL)	3.5	3.6	4.6	4.4	4.3	4.4	4.3	3.9
	(3.2 - 3.7)	(3.1 - 3.8)	(4.1 - 5.7)	(4.1 - 5.4)	(4.0 - 5.4)	(4.1 - 4.8)	(3.7 - 4.5)	(3.4 - 4.3)
Albumin (g/dL)	3.2	3.1	2.65	2.9	2.6	2.8	3.0	3.2
	(3.1 - 3.3)	(3.0 - 3.2)	(2.4 - 2.8)	(2.5 - 3.0)	(2.5 - 3.0)	(2.7 - 2.9)	(2.9 - 3.1)	(3.0 - 3.3)

224 Biomarkers and reference intervals (RI): UPC, urine protein: creatinine ratio (RI: 0-0.2 g/dL); Clusterin (RI: < 350 ng/mL); Cystatin B (RI: < 50
225 ng/mL); USG, urine specific gravity (RI > 1.030); Creatinine (RI: 0.5–1.8 mg/dL); SDMA ($\leq$ 14 μ g/dL); TP (RI: 5.2–8.2 g/dL); Globulin (RI: 2.5–
226 4.5 g/dL); Albumin (RI: 2.3–4.0 g/dL)

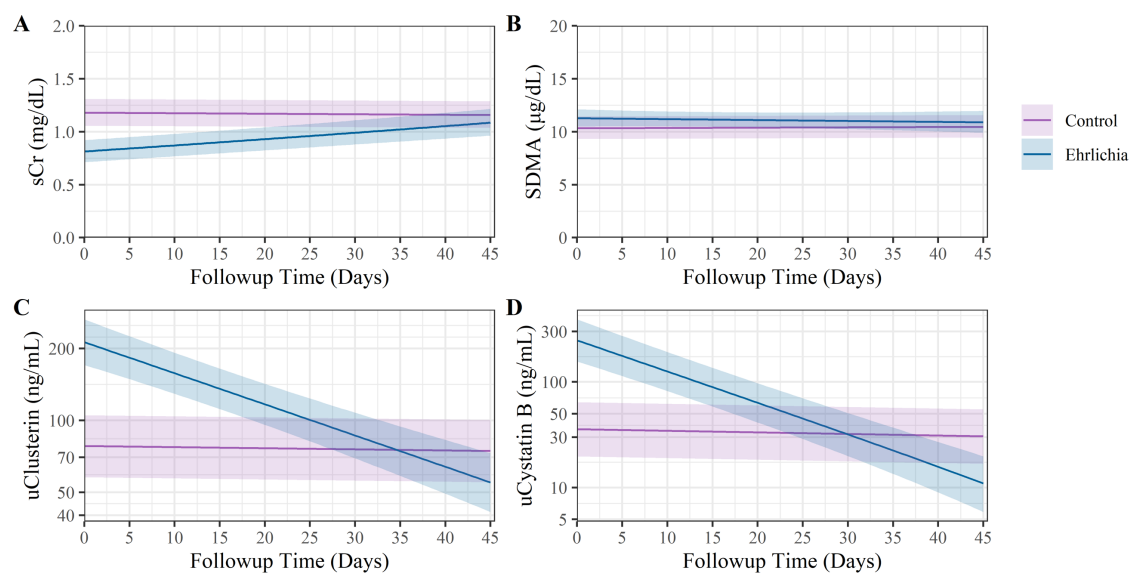


Figure 4. Estimated kidney biomarker levels between groups during study period.

Purple and blue lines represent the mean estimated biomarker values by follow up time from the mixed effects model for the CG and EG, respectively. Purple and blue bands represent the 95% confidence interval around the estimated biomarker values.

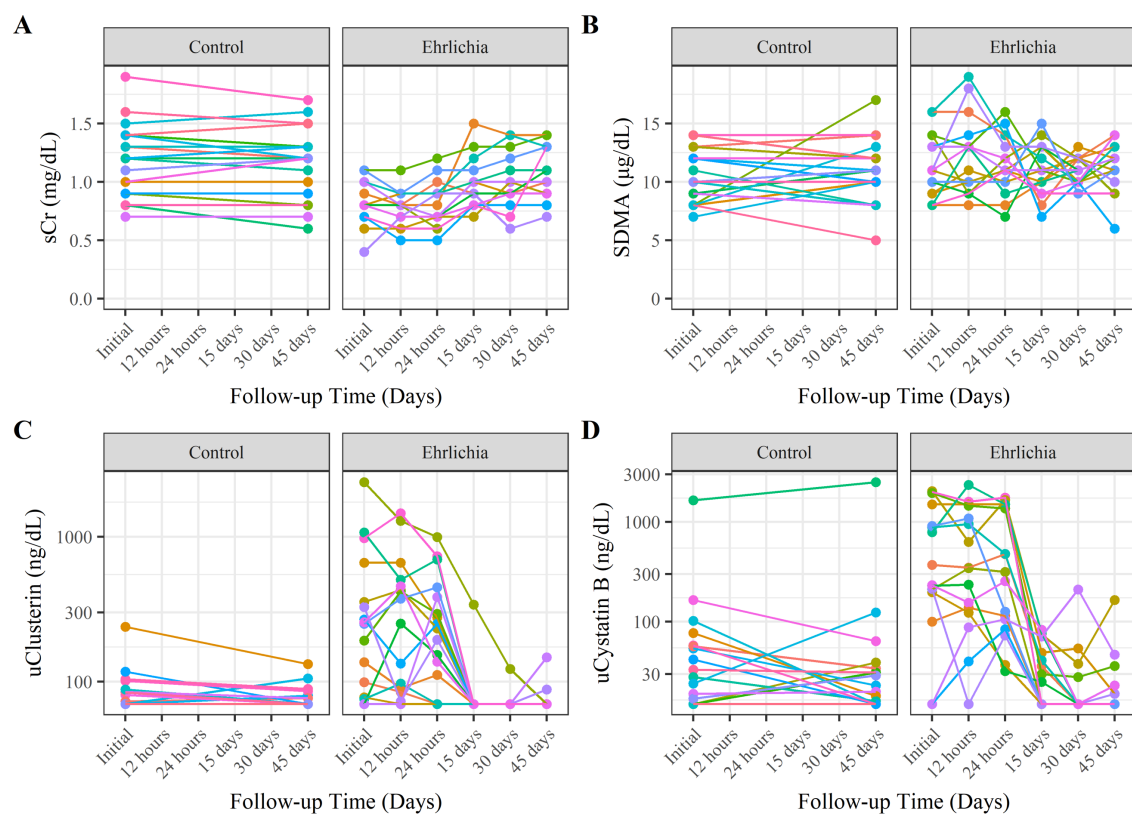


Figure 5. Spaghetti plot of renal biomarkers across study period by group. A) Serum Creatinine, B) SDMA, C) Urinary Clusterin, D) Urinary Cystatin B.

During the initial study visit, SDMA was similar between the EG and CG (EG: 10 ug/dL vs. CG: 11 ug/dL, $P = 0.169$), and was observed to be stable across the study period in both the EG (Slope < -0.001 ug/dL / day, LMM $P = 0.576$) and the CG (Slope < 0.001 ug/dL / day, LMM $P = 0.850$).

Additionally, the EG was observed to have higher uClust values compared to the CG upon initial visit (estimated mean EG: 213 ng/dL vs. CG: 78 ng/dL, LMM $P < 0.001$). The values of uClust remained stable throughout the study period among the CG dogs (Slope < -0.001 ng/dL / day, LMM $P = 0.800$, Fig. 4). Among the EG dogs, uClust values decreased linearly throughout the study period (Slope = -0.028 ng/dL / day, LMM $P < 0.001$, Fig.4).

The EG also demonstrated higher uCysB values compared to CG upon initial visit (estimated mean EG: 248 ng/dL vs. CG: 37 ng/dL, LMM $P < 0.001$). The concentrations of uCysB remained stable throughout the study period among CG dogs (Slope = -0.003 ng/dL / day, LMM $P = 0.654$). However, among EG dogs, uCysB concentrations decreased linearly throughout the study period (Slope = -0.062 ng/dL / day, LMM $P < 0.001$).

Discussion

In this study, we observed that dogs naturally infected with *E. canis* had high concentrations of urinary clusterin and cystatin B without the increase of routine functional kidney biomarkers such as sCr and SDMA. The increase in novel biomarkers have also been observed in previous studies in dogs with leishmaniasis, dogs envenomed

after snakebite, dogs with gentamicin-induced AKI, dogs undergoing hemorrhagic shock, dogs and cats undergoing dental procedures, and dogs with cardiovascular disease or dysfunction secondary to chronic kidney disease [6,19 - 24]. In all these studies, these urinary biomarkers have been shown to be early indicators of active kidney injury.

Urinary clusterin is considered a biomarker of kidney injury without specific localization in the nephron, arising from the S3 segment of the proximal tubule or in the distal tubule [25]. This glycoprotein has been investigated in several diseases such as Alzheimer's disease, obesity, and infertility because it is produced in many tissues and secreted in the blood, cerebrospinal fluid, and semen; therefore, clusterin kidney-related investigations must be performed in the urine to avoid extra-renal influences [6,22,23].

The significant increase of uClust levels at the time of inclusion in the EG and subsequent decrease over time suggests uClust may be useful in the detection of subclinical AKI by tubular injury. Similar findings have been reported in kidney disease studies including pre-renal injury (peri-infarction after partial nephrectomy, ischemia-reperfusion injury), renal causes (hereditary polycystic kidney disease), and post-renal causes (post-urethral obstruction) [26 - 30]. Furthermore, in an experimental rat model of bilateral renal ischemia, in rats with polycystic kidney disease, and in rats with focal segmental glomerulosclerosis, uClust concentrations helped to differentiate between tubular and glomerular types of proteinuria [25].

Urinary Cystatin B also showed a significant increase at the time of inclusion in EG, and subsequently decreased during clinical treatment of CME. Previous studies have shown that uCysB is related to inhibitors of cysteine proteases, which are composed of three major individual families [31]. Unlike cystatin C, which is useful as an endogenous indirect GFR marker [5], cystatin B is an intracellular protein and does not circulate freely at high concentrations in the blood. In the setting of active kidney injury, apoptosis and

necrosis of epithelial cells in the proximal tubule are likely to result in increased concentrations of serum and uCysB [6].

The assessment of renal function by sCr in cases of AKI may be challenging for clinicians because sCr is impacted by extra-renal influences such as muscle mass, BW, age, hydration status, and medication intake [5, 6, 32]. In this study we observed the correlation between sCr, BW, and BCS in the EG, and a significant difference in BW between groups at the time of inclusion, where the EG were clinically sick with previous history of anorexia or hyporexia, emesis (5 dogs), melena (1 dog), and were visually thinner (as observed via BCS).

As a result of the treatment administered to the EG, BCS increased due to the significant weight gain (median of 1.3 Kg), and by improved clinical signs. Similarly, sCr was observed to significantly increase linearly from the initial visit until the 45th day of investigation. Ehrlichiosis is a disease which predisposes to malnutrition and cachexia in addition to proteinuria; all these signs were observed in this prospective study [10,12].

Although no dog in this study had sCr concentrations above the reference limit, according to the International Renal Interest Society (IRIS), we observed five non-azotemic dogs with a progressive increase in sCr concentrations of 0.3 mg/dL within the non-azotemic range between D0 and D1 (24 hours), suggesting IRIS - grade I AKI [3].

To avoid the impact of extra-renal influences, no dog in the study was assessed at greater than 6% dehydration, nor did any dog receive intravenous fluid therapy in the 24 hours prior to blood collection. Dogs were fasted for the 8 hours prior to blood collection. Therefore, in this prospective study, acute CME and its inflammatory component may have caused an overestimation of renal function by decreased sCr concentrations due to weight loss, anorexia, fever, and worsening of clinical signs in EG, especially between the D0 and D1 [2, 10, 32, 33].

Symmetric dimethylarginine (SDMA) is a functional kidney biomarker highly correlated with GFR and is used for the early diagnosis of chronic kidney disease (CKD) and disease monitoring [7, 34, 35]. SDMA has advantages over sCr, such as early detection of impaired renal function, and it is not influenced by age, muscle mass, diet, or medication use [5, 7, 34-36]. Furthermore, increases in SDMA concentrations are mostly related to kidney dysfunction instead of kidney injury [36, 37].

During the ‘initiation’ stage of AKI, despite the presence of inflammatory components and cellular and vascular damage, GFR generally maintains compensated for by the underlying renal reserve, resulting in limited clinical or biochemical abnormalities [1, 2, 8, 38]. At this stage, regardless of the subtle decline of GFR, sCr concentrations (and hypothetically SDMA concentrations) will not increase as rapidly because of its curvilinear, hyperbolic, exponential relationship with GFR, as compared to active kidney injury biomarkers [1 – 3, 6, 38-40]. However, as the injury persists in association with the ‘extension’ stage of the disease, azotemia arises and an increase in SDMA concentrations is also expected [1, 2, 37, 40]. In this study, there were no differences in SDMA concentrations at the time of inclusion between groups and over time within EG or CG. These results were similar to recent reports that did not find an increase in SDMA levels in early AKI following snake bite envenomation, nor in a rat passive Heyman nephritis model of glomerulopathy [20, 24, 37]. SDMA has previously been shown to be useful in the detection of increased risk of CKD in dogs with *Ehrlichia* spp. antibodies [41], and dogs naturally infected by *Ehrlichia ewingii* [42]. In Qurollo et al. [42] 7 of the 41 dogs (17.1%) had SDMA concentrations (≥ 20 $\mu\text{g/dL}$); 4 were diagnosed with acute-on-chronic kidney disease, 2 with CKD, and 1 with protein-losing nephropathy based on proteinuria and ultrasonographic renal abnormalities indicative of chronic nephropathy;

Hence, on that study, all seven dogs with elevated SDMA concentrations had a previous diagnosis of CKD [42].

The presence of proteinuria found in dogs with ehrlichiosis is not exclusively renal type-related to the glomerulonephritis, but also from pre- and post-renal influences [9-15, 43-45]. Although the median UPC of the EG was not above the IRIS proteinuria sub-staging guidelines [46], some infected dogs presented with higher UPC concentrations (greater than 0.5) within the first 24 hours of evaluation and decreased subsequently during the treatment period, as shown in Table 2.

Although we were not able to perform a kidney biopsy, nor urinary western-blotting and electrophoresis for qualitative assays, previous histopathological studies have documented that the degree of proteinuria in dogs with CME is influenced by multiple sources consisted of mixed pre-renal proteinuria related to hyperglobulinemia, and renal proteinuria related to glomerulonephritis by immunoglobulin deposition in the glomerulus and tubular ischemia. [14,15, 43-45].

The group infected with *E. canis* presented a CBC compatible with the acute phase of ehrlichiosis by presence of thrombocytopenia in association with the lower range limits of erythrocyte count, such as RBC, HB, HT [9, 11-13]. In this study, microscopic blood smear was performed in all sick animals with no findings of cellular phagocytosis and megaplatelets, moreover the EG did not present leucocytosis and hyper/hypoproteinemia at day of inclusion.

There are several limitations with this study. First, this study evaluated only dogs with acute CME, not sub-clinical or chronic CME, and it is possible that biomarkers of renal function and injury may differ according to the stage of the ehrlichiosis. Second, a urinary Western blot assay with electrophoresis to qualitatively characterize proteinuria in dogs with ehrlichiosis was not performed. Third, this prospective study design lacks

baseline concentrations for all biomarkers studied, especially sCr and SDMA. Fourth, despite the inclusion of young animals and the exclusion of dogs with the presence of a heart murmur, cardiac evaluations such as electrocardiogram and echocardiogram were not performed for evaluation between the cardiac and renal axis of dogs with CME. Finally, the application of and evaluation of the muscle mass score on EG would have contributed to a better understanding of the impact of nutritional status on dogs with CME, as this was a confounding factor in the interpretation of kidney function determined by sCr concentrations.

Conclusion

Dogs naturally infected by *E. canis* and with clinical evidence of acute ehrlichiosis show increased concentrations of uCysB and uClust. These findings suggest the presence of subclinical renal injury while functional biomarkers such as sCr and SDMA remained unchanged. These observations may provide insight into the underlying mechanism responsible for the observed susceptibility to chronic kidney disease (CKD) in dogs with a history of *Ehrlichia* infections or the presence of *Ehrlichia* antibodies.

Acknowledgements

We are grateful to all pet owners who have put their trust in our team of residents, staff, postgraduate students, and teachers in providing the best supportive treatment for their animals with this study. Our special thanks to IDEXX Laboratories - Brazil for sending the samples to IDEXX Laboratories Inc-USA. This work is part of the Ph.D. thesis (2022) of A.N.V.L.S. at the Post-Graduation Program in Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University, São

Paulo, Brazil. This paper was presented as an abstract at the 2022 ACVIM Forum, Austin, TX.

References

1. Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury. *Lancet*. 2019 Nov 23;394(10212):1949-1964. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32563-2. PMID: 31777389.
2. Liu KD, Goldstein SL, Vijayan A, Parikh CR, Kashani K, Okusa MD, Agarwal A, Cerdá J; AKI!Now Initiative of the American Society of Nephrology. AKI!Now Initiative: Recommendations for Awareness, Recognition, and Management of AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2020 Dec 7;15(12):1838-1847. doi: 10.2215/CJN.15611219. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32317329; PMCID: PMC7769012.
3. Cowgill LD, Polzin DJ, Elliott J, Nabity MB, Segev G, Grauer GF, et al. Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2016 Nov;46(6):995-1013. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.06.001. PMID: 27593574.
4. Makris K, Spanou L. Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes. *Clin Biochem Rev*. 2016 May;37(2):85-98. PMID: 28303073; PMCID: PMC5198510.
5. Hokamp JA, Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol*. 2016;45(1):28-56. doi:10.1111/vcp.12333
6. Yerramilli M, Farace G, Quinn J, Yerramilli M. Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury: The Role of Novel Biomarkers as Early and Accurate Diagnostics. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2016 Nov;46(6):961-93. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.06.011. Epub 2016 Jul 30. PMID: 27485279.

7. Michael H, Szlosek D, Clements C, Mack R. Symmetrical Dimethylarginine: Evaluating Chronic Kidney Disease in the Era of Multiple Kidney Biomarkers. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2022;52(3):609-629. doi:10.1016/j.cvsm.2022.01.003
8. Basu RK, Gist K, Wheeler DS: Improving acute kidney injury diagnostics using predictive analytics. *Curr Opin Crit Care* 21: 473–478, 2015
9. Vieira RF, Biondo AW, Guimarães AM, et al. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011;20(1):1-12.
10. Mylonakis ME, Harrus S, Breitschwerdt EB. An update on the treatment of canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet J.* 2019;246:45-53.
11. Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J.* 2011;187(3):292-296.
12. Waner T, Harrus S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. *Isr J Vet Med.* 2013;68(1):12-18.
13. Hildebrandt PK, Huxsoll DL, Walker JS, Nims RM, Taylor R, Andrews M. Pathology of canine ehrlichiosis (tropical canine pancytopenia). *Am J Vet Res.* 1973;34(10):1309-1320.
14. Crivellenti LZ, Cintra CA, Maia SR, et al. Glomerulotubular pathology in dogs with subclinical ehrlichiosis. *PLoS ONE.* 2021; 16(12): e0260702. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260702>
15. Caster DJ, Summersgill JT, Pauksakon P, Massung RF, Shieh WJ, McLeish KR. Mixed cryoglobulinemia and secondary membranoproliferative glomerulonephritis associated with ehrlichiosis. *CEN Case Rep.* 2014;3(2):178-182.
16. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021 URL <https://www.R-project.org/>.

17. Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan LD, François R, et al. “Welcome to the tidyverse.” *J Open Source Softw.* 2019 4(43): 1686. doi:10.21105/joss.01686.
18. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. “Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4.” *J Stat Softw.* 2015 67(1):1–48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
19. García-Martínez JD, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Caldin M, Martínez-Subiela S. Urinary clusterin as a renal marker in dogs. *J Vet Diagn Invest.* 2012 Mar;24(2):301-6. doi: 10.1177/1040638711435112. Epub 2012 Feb 7. PMID: 22362533.
20. Gordin E, Gordin D, Viitanen S, Szlosek D, Coyne M, Farace G, et al. Urinary clusterin and cystatin B as biomarkers of tubular injury in dogs following envenomation by the European adder. *Res Vet Sci.* 2021 Jan;134:12-18. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.11.019. Epub 2020 Nov 24. PMID: 33278755.
21. Boyd CJ, Claus MA, Rasis AL, Cianciolo R, Bosio E, Hosgood G, et al. Evaluation of biomarkers of kidney injury following 4% succinylated gelatin and 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 administration in a canine hemorrhagic shock model. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2019 Mar;29(2):132-142. doi: 10.1111/vec.12814. Epub 2019 Feb 14. PMID: 30767375.
22. Hall JA, Forman FJ, Bobe G, Farace G, Yerramilli M. The impact of periodontal disease and dental cleaning procedures on serum and urine kidney biomarkers in dogs and cats. *PLoS One.* 2021 Jul 29;16(7):e0255310. doi: 10.1371/journal.pone.0255310. PMID: 34324590; PMCID: PMC8321124.
23. Hezzell MJ, Foster JD, Oyama MA, Buch J, Farace G, Quinn JJ, et al. Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. *Vet J.* 2020 Jan;255:105420. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.105420. Epub 2019 Dec 11. PMID: 31982083.

24. Harjen HJ, Anfinson KP, Hultman J, Moldal ER, Szlosek D, Murphy R, et al. Evaluation of Urinary Clusterin and Cystatin B as Biomarkers for Renal Injury in Dogs Envenomated by the European Adder (*Vipera berus*). *Top Companion Anim Med*. 2021 Sep 25;46:100586. doi: 10.1016/j.tcam.2021.100586. Epub ahead of print. PMID: 34583053.
25. Hidaka S, Kränzlin B, Gretz N, Witzgall R. Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res*. 2002 Dec;310(3):289-96. doi: 10.1007/s00441-002-0629-5. Epub 2002 Oct 2. PMID: 12457227.
26. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Manivel JC, Eddy AA, Rosenberg ME. Intrarenal distribution of clusterin following reduction of renal mass. *Kidney Int*. 1992 Apr;41(4):938-50. doi: 10.1038/ki.1992.144. PMID: 1513115.
27. Rosenberg ME, Paller MS. Differential gene expression in the recovery from ischemic renal injury. *Kidney Int*. 1991 Jun;39(6):1156-61. doi: 10.1038/ki.1991.146. PMID: 1910124.
28. Witzgall R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2175-88. doi: 10.1172/JCI117214. PMID: 7910173; PMCID: PMC294357.
29. Obermüller N, Gretz N, Kriz W, van der Woude FJ, Reilly RF, Murer H, Biber J, Witzgall R. Differentiation and cell polarity during renal cyst formation in the Han:SPRD (cy/+) rat, a model for ADPKD. *Am J Physiol*. 1997 Sep;273(3 Pt 2):F357-71. doi: 10.1152/ajprenal.1997.273.3.F357. PMID: 9321908.

30. Pearse MJ, O'Bryan M, Fisicaro N, Rogers L, Murphy B, d'Apice AJ. Differential expression of clusterin in inducible models of apoptosis. *Int Immunol*. 1992 Nov;4(11):1225-31. doi: 10.1093/intimm/4.11.1225. PMID: 1472475.
31. Ochieng J, Chaudhuri G. Cystatin superfamily. *J Health Care Poor Underserved*. 2010 Feb;21(1 Suppl):51-70. doi: 10.1353/hpu.0.0257. PMID: 20173285; PMCID: PMC2888135.
32. Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol*. 2003;32(4):162-179.
33. Cerdá J, Cerdá M, Kilcullen P, Prendergast J. In severe acute kidney injury, a higher serum creatinine is paradoxically associated with better patient survival. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Oct;22(10):2781-4. doi: 10.1093/ndt/gfm395. Epub 2007 Jun 27. PMID: 17597091.
34. Relford R, Robertson J, Clements C. Symmetric Dimethylarginine: Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2016 Nov;46(6):941-60. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.06.010. Epub 2016 Aug 5. PMID: 27499007.
35. Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli et al. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*. 2015 Jul-Aug;29(4):1036-44. doi: 10.1111/jvim.12835. Epub 2015 Jun 16. PMID: 26079532; PMCID: PMC4895368.
36. McKenna M, Pelligand L, Elliott J, Cotter D, Jepson R. Relationship between serum iohexol clearance, serum SDMA concentration, and serum creatinine concentration in non-azotemic dogs. *J Vet Intern Med*. 2020 Jan;34(1):186-194. doi: 10.1111/jvim.15659. Epub 2019 Nov 14. PMID: 31725186; PMCID: PMC6979102.

37. Coyne MJ, Schultze AE, McCrann DJ 3rd, Murphy RE, Cross J, Strong-Townsend M, Drake C, Mack R. Evaluation of renal injury and function biomarkers, including symmetric dimethylarginine (SDMA), in the rat passive Heymann nephritis (PHN) model. PLoS One. 2022 May 27;17(5):e0269085. doi: 10.1371/journal.pone.0269085. PMID: 35622875; PMCID: PMC9140233.
38. Basile DP, Bonventre JV, Mehta R, Nangaku M, Unwin R, Rosner MH, Kellum JA, Ronco C; ADQI XIII Work Group. Progression after AKI: Understanding Maladaptive Repair Processes to Predict and Identify Therapeutic Treatments. J Am Soc Nephrol. 2016 Mar;27(3):687-97. doi: 10.1681/ASN.2015030309. Epub 2015 Oct 30. PMID: 26519085; PMCID: PMC4769207.
39. Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. J Vet Pharmacol Ther. 1995 Dec;18(6):418-21. doi: 10.1111/j.1365-2885.1995.tb00619.x. PMID: 8789693.
40. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, et al. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. J Vet Intern Med. 2017 May;31(3):799-804. doi: 10.1111/jvim.14694. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28370549; PMCID: PMC5435041.
41. Burton W, Drake C, Ogeer J, et al. Association Between Exposure to *Ehrlichia* spp. and Risk of Developing Chronic Kidney Disease in Dogs. J Am Anim Hosp Assoc. 2020;56(3):159-164.
42. Quorllo BA, Buch J, Chandrashekar R, Beall MJ, Breitschwerdt EB, Yancey CB, Caudill AH, Comyn A. Clinicopathological findings in 41 dogs (2008-2018) naturally infected with *Ehrlichia ewingii*. J Vet Intern Med. 2019 Mar;33(2):618-629. doi: 10.1111/jvim.15354. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30604457; PMCID: PMC6430920.

43. Bonfanti U, Zini E, Minetti E, Zatelli A. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. J Vet Intern Med. 2004 Sep-Oct;18(5):618-24. doi: 10.1892/0891-6640(2004)18<618:flpanr>2.0.co;2. PMID: 15515575.
44. Codner EC, Maslin WR. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am J Vet Res. 1992;53:294-299.
45. Codner EC, Caceci T, Saunders GK, Smith CA, Robertson JL, Martin RA, et al. Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. Am J Vet Res. 1992 Dec;53(12):2286-91. PMID: 1476309.
46. Vaden SL, Elliott J. Management of Proteinuria in Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2016 Nov;46(6):1115-30. doi: 10.1016/j.cvsm.2016.06.009. Epub 2016 Jul 30. PMID: 27485278

CONCLUSÕES

Neste estudo prospectivo, concluiu-se que cães infectados naturalmente por *Ehrlichia canis* apresentam lesão renal aguda subclínica devido ao aumento das concentrações urinárias de cistatina B e clusterina, enquanto os marcadores de função como creatinina sérica e SDMA permaneceram sem alteração. Ainda, a presença de proteinúria demonstrada no grupo de cães com erliquiose houve uma significativa correlação com a globulina, caracterizando uma proteinúria pré-renal além de renal intrínseca como mencionado em outros estudos. Da mesma forma, a Erliquiose também é uma doença altamente inflamatória demonstrada pelo aumento exponencial das concentrações séricas de proteína C-reativa sendo um biomarcador útil na monitoração do tratamento clínico e no diagnóstico da reinfecção de cães infectados por esta doença.

Apesar da necessidade de estudos futuros sobre marcadores de lesão renal em cães, recomenda-se terapia de suporte adequada e monitoração da função renal (durante e após o tratamento) para cães infectados para *E.canis*, mesmo na ausência de evidência de LRA com base na avaliação de sCr de rotina.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABRAHAMSON, M.; *et al.* Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. **Journal of Biological Chemistry**. v.261, p.11282–11289, 1986.

ABRAMS-OGG, A.; *et al.* Lymphoma and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs a preliminary study 2017 ACVIM FORUM RESEARCH REPORT PROGRAM. In: **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.31, p.1572- 1604, 2017.

ABUELO, J. G. Normotensive ischemic acute renal failure. **New England Journal of Medicine**. v.357, n.8, p.797-805, 2007. doi:10.1056/NEJMra064398

AGUIAR, D. M.; *et al.* Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**. v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B.; In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489–493, 2008.

AGUIAR, C. L. G.; *et al.* Parâmetros da fase de vida livre de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): adaptado ao clima subtropical. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.4, p. 375-380, 2013.

AGUIAR, D. M.; *et al.* Uncommon *Ehrlichia canis* infection associated with morulae in neutrophils from naturally infected dogs in Brazil. **Transboundary and emerging diseases**. v.67, n.2, p.135–141, 2020. <https://doi.org/10.1111/tbed.13390>

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina Revisão. **Clinica Veterinária**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.

ANGELOTTI, M. L., LAZZERI, E.; ROMAGNANI, P. Localization of Injury and Repair Pathways. In: Ronco, C.; Bellomo, R.; KELLUM, J. A.; RICCI, Z. **Critical Care Nephrology**. 3ed. Philadelphia: Elsevier, 2019. cap. 32, p.173-178.e2 <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44942-7.00032-7>

APFALTER, P.; REISCHL, U.; HAMMERSCHLAG, M. R. In-house nucleic acid amplification assays in research: how much quality control is needed before one can rely upon the results? **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 12, p. 5835-5841, 2005.

AROCH, I.; HARRUS, S. The use of hematopoietic growth factors: recombinant human granulocyte colony stimulating factor and recombinant human erythropoietin in severe pancytopenia due to canine monocytic ehrlichiosis. **Israel Journal of Veterinary Medicine**. v.56, p.65–69, 2001.

ASSAIFE-LOPES, N.; *et al.* Inhibition of renal Na⁺-ATPase activity by inosine is mediated by A1 receptor-induced inhibition of the cAMP signaling pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.489, p.76–81, 2009.

BAI, L.; *et al.* Molecular prevalence and haemato-biochemical profile of canine monocytic ehrlichiosis in dogs in and around Hisar, Haryana, India. **Journal of Parasitic Diseases**. v.41, n.3, p.647-654, 2017. doi:10.1007/s12639-016-0860-8

BARAL R, M.; *et al.* Biological variation and reference change values of feline plasma biochemistry analytes. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.16, p.317–325, 2014.

BARNES, J. L.; GLASS LI, W. F. Renal interstitial fibrosis: a critical evaluation of the origin of myofibroblasts. **Contributions to nephrology**. v.169, p.73–93, 2011. <https://doi.org/10.1159/000313946>

BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of veterinary internal medicine**. v.10, n.4, p.271–274, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1996.tb02061.x>

BEDFORD, M. T.; CLARKE, S. G. Protein arginine methylation in mammals: who, what and why. **Molecular Cell**. v.33, p.1-13, 2009.

BEZERRA, M.; *et al.* Seropositivity for Rickettsia spp. and Ehrlichia spp. in the human population of Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.50, n.3, p.399–403, 2017. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0318-2016>

BONVENTRE, J. V. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. **Journal of American Society of Nephrology**. v.14 (Suppl. 1), p.S55–61, 2003. [PubMed: 12761240]

BOVEÉ, K. C.; *et al.* Long-term measurement of renal function in partially nephrectomized dogs fed 56, 27, or 19% protein. **Investigative Urology**. v.16, p.378–384, 1979.

BRANDÃO, L. P.; *et al.* Platelet aggregation studies in acute experimental canine ehrlichiosis. **Veterinary clinical pathology**. v.35, n.1, p.78–81, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2006.tb00091.x>

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P.; WATSON, A. D. Creatinine in the dog: a review. **Veterinary Clinical Pathology**. v.32, p.162–179, 2003.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of clinical microbiology**. v.36, n.9, p.2645–2651, 1998. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.9.2645-2651.1998>

BREMER, W. G.; *et al.* Transstadial and intrastadial experimental transmission of *Ehrlichia canis* by male *Rhipicephalus sanguineus*. **Veterinary parasitology**. v.131, n.1-2, p.95–105, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.030>

BRICKER, N. S.; KLAHR, S.; RIESELBACH, R. E. The functional adaptation of the diseased kidney. I. Glomerular filtration rate. **Journal of Clinical Investigation**. v.43, p.1915–1921, 1964.

BROWN, S. A.; *et al.* Single-nephron adaptations to partial renal ablation in the dog. **American Journal of Physiology**. v.258, p.F495–F503, 1990.

BURTON, W.; *et al.* Association Between Exposure to Ehrlichia spp. and Risk of Developing Chronic Kidney Disease in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.56, p.159–164, 2020. <https://doi.org/10.5326/JAAHA-MS-7012> PMID: 32182116

CAN, A.; *et al.* Dimethylarginines in patients with type 2 diabetes mellitus: relation with the glycaemic control. **Diabetes Research and Clinical Practice**. v.94, p.e61-e64, 2011.

CARVALHO, M. B. Insuficiência renal aguda. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. 1. ed. v.2. São Paulo: Editora Roca, cap.158, p.1364-1393, 2015.

CASTER, D. J.; *et al.* Mixed cryoglobulinemia and secondary membranoproliferative glomerulonephritis associated with ehrlichiosis. **CEN case reports**, v.3, p.178-182, 2014.

CAXITO, M. S.; *et al.* Alterações da medula óssea e a importancia do mielograma no diagnóstico da ehrlichiose monocítica canina. **Revista Veterinária e Zootecnia**. v.25, n.1 p.61-6, 2018. Disponível em: <https://rvz.emnuvens.com.br/rvz/article/view/37>

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. **Veterinary Journal**. v.34, p.85-99, 2005.

CHOI-MIURA, N. H.; *et al.* Identification of the Disulfide Bonds in Human Plasma Protein SP-40,40 (Apolipoprotein-J). **The Journal of Biochemistry**. v.122, p.557–561, 1992.

CLABOTS, M. F.; GAILLARD, E.; AUMANN, M. Acute kidney injury, seizures, and hypertonic hyponatremia secondary to mannitol intoxication in a dog. **Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio)**. v.29, n.6, p.680–685, 2019. <https://doi.org/10.1111/vec.12902>

CODNER, E. C.; *et al.* Investigation of glomerular lesions in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.2286-2291, 1992.

CODNER, E. C.; MASLIN, W. R. Investigation of renal protein loss in dogs with acute experimentally induced Ehrlichia canis infection. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.294–299, 1992.

COLE, L. P.; *et al.* Hypertension, retinopathy, and acute kidney injury in dogs: A prospective study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.34, n.5, p.1940-1947, 2020. doi:10.1111/jvim.15839

CONCORDET, D.; *et al.* A multicentric retrospective study of serum/plasma urea and creatinine concentrations in dogs using univariate and multivariate decision rules to evaluate diagnostic efficiency. **Veterinary Clinical Pathology**. v.37, p.96–103, 2008.

COSTA, J. O.; *et al.* *Ehrlichia canis* infection in a dog in Belo Horizonte-Brazil. **Arquivos Escola Veterinária UFMG**. v. 25, p. 199-200, 1973.

COSTA Jr, L. M. C. *et al.* Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**. v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COWGILL, L. D. **IRIS - Grading of acute kidney injury, 2016**. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/4_ldc-revised-grading-of-acute-kidney-injury.pdf. Acesso em 09 de Maio de 2021.

COWGILL, L. D.; *et al.* Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? **Veterinary clinics of North America. Small animal practice**. v.46, n.6, p.995–1013, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.001>

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 173-185, 2008.

DE CASTRO, *et al.* Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. **Veterinary Parasitology**, v.119, n.1, p.73–86, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.012>

DES VIGNES, F.; *et al.* 2001. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. **Journal of Infectious Diseases**. v.183, p.773-778, 2001.

DEVARAJAN, P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.17, n.6, p.1503-1520, 2006. doi:10.1681/ASN.2006010017

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

DIETERLE, F.; *et al.* Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. **Nature Biotechnology**. v.28, p.463–469, 2010.

DIMITROULAS, T., *et al.* Symmetric dimethylarginine (SDMA) serum levels in rheumatoid arthritis: correlations with insulin resistance and disease activity scores. **Amino Acids**. v.47, p.1995-2004, 2015.

DIXON, J. J.; *et al.* Symmetrical dimethylarginine is a more sensitive biomarker of renal dysfunction than creatinine. **Journal of Critical Care**. v.17, sup.2, p.423, 2013.

DUMLER, J. S.; *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v.51, p.2145–2165, 2001. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>

DUMLER, J. S.; *et al.* Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, Supl. 1, p. 45-51, 2007.

DUNLOP M. M.; *et al.* Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. **Journal of Small Animal Practice**. v.52, p.4–10, 2011.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary journal**. v.185, p.23–27, 2010.

EDDLESTONE S. M.; *et al.* Failure of imidocarb dipropionate to clear experimentally induced Ehrlichia canis infection in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.20, n.4, p.840-4, Jul 2006. doi: 10.1892/0891-6640(2006)20[840:foidtc]2.0.co;2. PMID: 16955806.

EDDLESTONE, S. M.; *et al.* PCR detection of Anaplasma platys in blood and tissue of dogs during acute phase of experimental infection. **Experimental parasitology**. v.115, n.2, p.205–210, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.08.006>

ELTZSCHIG, H. K. Adenosine: an old drug newly discovered. **Anesthesiology**. v.111, p.904–915, 2009.

EVANS, G. O. Post-prandial changes in canine plasma creatinine. **Journal of small animal practice**. v. 28, p. 311–315, 1987.

FARIA, J. L.; *et al.* Ehrlichia canis morulae and DNA detection in whole blood and spleen aspiration samples. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.19, n.2, p.98-102, 2010. PMID: 20624346.

FEEMAN, W. E.; COUTO, C. G.; GRAY, T. L. Serum creatinine concentrations in retired racing Greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**. v.32, p.40–42, 2003.

FERENBACH, D. A.; BONVENTRE, J. V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD. **Nature Reviews Nephrology**. v.11, p.264–76, 2015. [PubMed: 25643664]

FINCO, D. R.; *et al.* Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. **American journal of veterinary research**. v.52, n.7, p.1029–1032, 1991.

FLECK, C.; *et al.* Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. **Clinica Chimica Acta**. v.336, p.1-12, 2003.

FOSTER J. D. Extracorporeal Therapies in the Emergency Room and Intensive Care Unit. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v.50, n.6, p.1215-1236, Nov 2020. doi: 10.1016/j.cvsm.2020.07.014. PMID: 32981594.

FOURIE J. J.; STANNECK, D.; LUUS, H. G. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary Parasitology**. v.197, p.595-603, 2013.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERRDT, E. B. A Retrospective Study of Ehrlichiosis in 62 Dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.13, p.194-201, 1999.

GARCIA-MARTINEZ, J. D.; *et al.* Urinary clusterin as a renal marker in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.24, 301–306, 2015.

GHYS, L.; *et al.* Cystatin C: A New Renal Marker and Its Potential Use in Small Animal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.28, p.1152-1164, 2014.

GORDIN, E.; *et al.* Urinary clusterin and cystatin B as biomarkers of tubular injury in dogs following envenomation by the European adder. **Research in Veterinary Science**. v.134, p.12-18, 2021. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.11.019. PMID: 33278755.

GORI, E.; *et al.* Acute pancreatitis and acute kidney injury in dogs. **Veterinary Journal**. v.245, p.77-81, 2019. doi:10.1016/j.tvjl.2019.01.002

HALL, J. A.; *et al.* Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.29, p.808-814, 2015.

HALL, J. A.; *et al.* Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.794-802, 2016a.

HALL, J. A.; *et al.* Positive impact of nutritional interventions on serum symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations in client-owned geriatric dogs. **PLoS One**. v.11, p.e0153653, 2016b.

HALL, J. A.; *et al.* Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in cats with kidney stones. **PLoS One**. v.12, p.e0174854, 2017.

HARISON, E.; *et al.* Acute azotemia as a predictor of mortality in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.26, p.1093–1098, 2012.

HARRUS, S., *et al.* Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **The Veterinary record**. v.141, n.14, p.360–363, 1997. <https://doi.org/10.1136/vr.141.14.360>

HARRUS, S.; *et al.* Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 36, n. 1, p. 73-76, 1998.

HARRUS, S.; DAY, M. J.; WANER, T.; BARK, H. Presence of immune-complexes, and absence of antinuclear antibodies, in sera of dogs naturally and experimentally infected with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**. v.83, n.4, p.343-349, 2001. doi: 10.1016/s0378-1135(01)00431-x. PMID: 11600268.

HARRUS, S.; *et al.* Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**. v. 86, n. 4, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; *et al.* Comparison of simultaneous splenic sample PCR with blood sample PCR for diagnosis and treatment of experimental *Ehrlichia canis* infection. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**. v.48, n.11, p.4488-90, Nov 2004. doi: 10.1128/AAC.48.11.4488-4490.2004. PMID: 15504892; PMCID: PMC525421.

HARRUS, S.; WANER, T. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **Veterinary journal**. v.187, n.3, p.292–296, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.02.001>

HARRUS, S.; WANER, T.; NEER, T. M. *Ehrlichia canis* infection. In: GREENE, C. E. (Org.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 4th edition. Georgia: Elsevier, p. 227-256, 2015.

HEILE, C.; *et al.* Transmission time of tic-borne disease agents in dogs: *Borrelia*, *Anaplasma/Ehrlichia* and *Babesia*. **Praktische Tierarzt**. v.88, n.8, p.584-590, 2007.
HILDEBRANDT, P. K.; *et al.* Ultrastructure of *Ehrlichia canis* **Infection and Immunity**, v. 7, n. 2, p. 265-271, 1973.

HIDAKA, S.; *et al.* Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. **Cell and Tissue Research**. v.310, p.289–296, 2002.

HIMMELFARB, J.; *et al.* Evaluation and initial management of acute kidney injury. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**. v.3, n.4, p.962-967, 2008. doi:10.2215/CJN.04971107

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

HOSTE, E. A.; KELLUM, J. A. AKI severity class doesn't tell all: the case for transient AKI. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**. v.25, n.6, p.1738-1739, 2010 doi:10.1093/ndt/gfq133

HSU, R. K.; HSU, C. Y. The Role of Acute Kidney Injury in Chronic Kidney Disease. **Seminars in Nephrology**. v.36, n.4, p.283-292, 2016. doi:10.1016/j.semnephrol.2016.05.005

HUMPHREYS, B. D.; *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. **Cell Stem Cell**. v.2, p.284–91, 2008. [PubMed: 18371453]

HUMPHREYS, B. D.; *et al.* Repair of injured proximal tubule does not involve specialized progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.108, p.9226–31, 2011. [PubMed: 21576461]

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; WALKER, J. S. Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 157, n. 11, p. 1627-1632, 1970.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other tests for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 32, n. 7, p. 1658-1662, 1994.

IRIS Canine GN Study Subgroup on Immunosuppressive Therapy Absent a Pathologic Diagnosis; *et al.* Consensus guidelines for immunosuppressive treatment of dogs with glomerular disease absent a pathologic diagnosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, n.1, p.S55–S59, 2013. <https://doi.org/10.1111/jvim.12222>

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. Overview of the IRIS staging system for CKD (revised 2019) [Internet]. 2020. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/education/staging_system.html

KAKOMA, I., *et al.* Autologous lymphocyte-mediated cytotoxicity against monocytes in canine ehrlichiosis. **American journal of veterinary research**. v.38, n.10, 1557–1559, 1977.

KAKIMOTO, Y.; AKAZAWA, S. Isolation and identification of N-G, N-G- and N-G, N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. **The Journal of Biological Chemistry**. v.245, p.5751-5758, 1970.

KATAVOLOS, P.; *et al.* Duration of tick attachment required for transmission of granulocytic ehrlichiosis. **The Journal of infectious diseases**. v.177, n.5, p.1422–1425, 1998. <https://doi.org/10.1086/517829>

KEIR, I.; KELLUM, J. A. Acute kidney injury in severe sepsis: pathophysiology, diagnosis, and treatment recommendations. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**. v.25, n.2, p.200-209, 2015. doi:10.1111/vec.12297

KELLUM, J. A.; *et al.* Recovery after Acute Kidney Injury. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. v.195, n.6, p.784-791, 2017. doi:10.1164/rccm.201604-0799OC

KIELSTEIN, J. T.; *et al.* Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function - A meta-analysis. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 21, n. 9, p. 2446–2451, 2006.

KIELSTEIN, J. T.; *et al.* SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation. **Nephrology Dialysis Transplantation**. v. 26, n. 1, p. 324–328, 2011.

KOPKE, M. A.; *et al.* Variability of symmetric dimethylarginine in apparently healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.32, p.736-742, 2018.

KOPKE, M. A.; *et al.* Response to letter to editor regarding the variability of symmetric dimethylarginine in apparently healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.33, p.9-10, 2019.

KYLES, A. E.; *et al.* Clinical, clinicopathologic, radiographic, and ultrasonographic abnormalities in cats with ureteral calculi: 163 cases (1984-2002). **Journal of the American Veterinary Medicine Association**. v.226, n.6, p.932-936, 2005. doi:10.2460/javma.2005.226.932

LAMEIRE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **Lancet**. v.365, p.417-430, 2005. doi:10.1016/S0140-6736(05)17831-3

LAMEIRE N. The definitions and staging systems of acute kidney injury and their limitations in practice. **Arab Journal of Nephrology and Transplantation**. v.6, p.145-152, 2013.

LANGHORN, R.; *et al.* Symmetric dimethylarginine in cats with hypertrophic cardiomyopathy and diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.32, p.57-63, 2018.

LANGSTON C. Managing fluid and electrolyte disorders in renal failure. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v.38, n.3, p.677-xiii, 2008. doi:10.1016/j.cvsm.2008.01.007

LANGSTON C, *et al.* Methods of urolith removal. **Compendium on Continuing Education for Veterinarians**. v.32, n.6, p.E1-E8, 2010.

LANGSTON C. Managing Fluid and Electrolyte Disorders in Kidney Disease. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v.47, n.2, p.471-490, 2017. doi:10.1016/j.cvsm.2016.09.011

LANGSTON, C.; GORDON, D. Effects of IV Fluids in Dogs and Cats With Kidney Failure. **Frontiers in veterinary Science**. v.8, p.659960, 2021. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.659960>

LE SUEUR A. N. V.; *et al.* Symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with International Renal Interest Society stage 4 chronic kidney disease undergoing intermittent hemodialysis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.33, n.6, p.2635-2643, 2019. doi:10.1111/jvim.15612

LEGATTI, S. A. M.; *et al.* Acute kidney injury in cats and dogs: A proportional meta-analysis of case series studies. **PLoS One**. v.13, n.1, e0190772, jan, 2018. doi:10.1371/journal.pone.0190772

LESKOV, K. S.; *et al.* Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. **Journal of Biological Chemistry**. v. 278, p.11590–11600, 2003.

LEVEY, A. S.; *et al.* Nomenclature for kidney function and disease: report of a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Consensus Conference. **Kidney International**. v.97, n.6, p.1117-1129, 2020 doi:10.1016/j.kint.2020.02.010

LEWIS JR, G. E.; RISTIC, M. Effect of canine immune macrophages and canine immune serum on the growth of *Ehrlichia canis*. **American journal of veterinary research**. v.39, n.1, p.77–82, 1978.

LI, R.; MUGFORD, A.; HUMM, K. Acute kidney injury in dogs and cats 2. Management, treatment and outcome. **In Practice**, v.35, p.302–316, Jun 2013. doi:10.1136/inp.f3640

LIFFMAN, R.; *et al.* Establishment of reference intervals for serum symmetric dimethylarginine in adult non racing greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**. v.47, p.458-463, 2018.

LINETZ, E. H.; GRAVES, T. K. Glomerular filtration rate in general small animal practice. **Compendium**. v.32, n.10, p.E1–E6, 2010.

LIU, K. D.; BRAKEMAN, P. R. Renal repair and recovery. **Critical care medicine**. v.36, s.4, p.S187–S192, 2008. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318168ca4a>

LOMBI, F.; MURYAN, A.; CANZONIERI, R.; TRIMARCHI, H. Biomarkers in acute kidney injury: Evidence or paradigm? **Nefrología – English Version**, v.36, p.339-346, 2016.

LUCKSCHANDER, N.; KLEITER, M.; WILLMANN, M. Durch Ehrlichia canis verursachte Nierenamyloidose [Renal amyloidosis caused by Ehrlichia canis]. **Schweizer Archiv fur Tierheilkunde**, v.145, n.10, p.482–485, 2003. <https://doi.org/10.1024/0036-7281.145.10.482>

MADDENS, B.; *et al.* Escherichia coli pyometra induces transient glomerular and tubular dysfunction in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.1263–1270, 2010.

MADDENS, B.; *et al.* Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on protein-uria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.25, p.1075-1083, 2011.

MAURIN, M.; ABERGEL, C.; RAOULT, D. DNA gyrase-mediated natural resistance to fluoroquinolones in *Ehrlichia* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, p.2098–2105, 2001.

MÅRTENSSON, J.; MARTLING, C. R.; BELL, M. Novel biomarkers of acute kidney injury and failure: clinical applicability. **British journal of anaesthesia**. v.109, n.6, p.843–850, 2012. <https://doi.org/10.1093/bja/aes357>

MARTINEZ, J.; LONDOÑO, L. A.; SCHAER, M. Retrospective evaluation of acute kidney injury in dogs with pit viper envenomation (2008-2017): 56 cases. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**. v.30, n.6, p.698-705, 2020. doi:10.1111/vec.13007

MAVROMATIS, K.; *et al.* The genome of the obligately intracellular bacterium *Ehrlichia canis* reveals themes of complex membrane structure and immune evasion strategies. **Journal of bacteriology**. v.188, n.11, p.4015–4023, 2006. <https://doi.org/10.1128/JB.01837-05>

McGILL J. L.; *et al.* Antigen-Specific CD4⁺CD8⁺Double-Positive T Cells Are Increased in the Blood and Spleen During *Ehrlichia chaffeensis* Infection in the Canine Host. **Front Immunology**. v.11, n.9, p.1585, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.01585. PMID: 30050533; PMCID: PMC6050357.

McKENNA, M.; *et al.* Relationship between serum iohexol clearance, serum SDMA concentration, and serum creatinine concentration in non-azotemic dogs. **Journal of veterinary internal medicine**. v.34, n.1, p.186–194, 2020. <https://doi.org/10.1111/jvim.15659>

MEDAILLE, C.; *et al.* Comparison of plasma/serum urea and creatinine concentrations in the dog: a 5-year retrospective study in a commercial veterinary clinical pathology laboratory. **Journal of Veterinary Medicine: A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**. v.51, p.119– 123, 2004.

MEHTA, R. L.; *et al.* Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. **Critical Care**. v.11, n.2, R31, 2007 doi:10.1186/cc5713

MEHTA, R. L. Renal Recovery After Acute Kidney Injury and Long-term Outcomes: Is Time of the Essence? **JAMA Network Open**. v.3, n.4 p.e202676, Abr, 2020. doi:10.1001/jamanetworkopen.2020.2676

MISBACH, C.; *et al.* Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age, and gender, and establishment of reference intervals. **Veterinary Clinical Pathology**. v.43, p.371–380, 2014.

MIYAGAWA, Y.; TAKEMURA, N.; HIROSE, H. Assessments of factors that affect glomerular filtration rate and indirect markers of renal function in dogs and cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v.72, p.1129–1136, 2010.

MOESGAARD, S. G.; *et al.* Neurohormonal and circulatory effects of short-term treatment with enalapril and quinapril in dogs with asymptomatic mitral regurgitation. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.19, p.712-719, 2005.

MOESGAARD, S. G.; *et al.* Effects of breed, gender, exercise and white-coat effect on markers of endothelial function in dogs. **Research in Veterinary Science**. v.82, p.409-415, 2007.

MOLITORIS, B. A, SUTTON, T. A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure. **Kidney International**. v.66, n.2, p.496-499, 2004. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.761_5.x

MORAES-FILHO, J.; *et al.* 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**. v.117, p.51–55, 2011.

MUGFORD, A.; LI, R.; HUMM, K. Acute kidney injury in dogs and cats 1. Pathogenesis and diagnosis. **In Practice**, v.35, p.253–264, 2013.

MUSTONEN, S.; ALA-HOUHALA, I. O.; TAMMELA, T. L. Long-term renal dysfunction in patients with acute urinary retention. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**. v.35, n.1, p.44-48, 2001. doi:10.1080/00365590151030804

MYLONAKIS, M. E.; *et al.* Evaluation of cytology in the diagnosis of acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a comparison between five methods. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 2-3, p. 197-204, 2003.

MYLONAKIS, M. E., *et al.* Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v.40, n.3, 174–184, 2004. <https://doi.org/10.5326/0400174>

MYLONAKIS, M. E., *et al.* Cytologic patterns of lymphadenopathy in canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary clinical pathology**. v.40, n.1, p.78–83, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00293.x>

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; BOGGESS, M. M. SDMA assay validation, stability, and evaluation as a marker for early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.29, p.1036–1044, 2015.

NAKAMURA, M.; *et al.* C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v.70, p.127-131, 2008.

NAVAR, L. G.; *et al.* Paracrine regulation of the renal microcirculation. **Physiological Reviews**. v.76, p.425–536, 1996.

NEER, T. M.; *et al.* Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. American College of Veterinary Internal Medicine. **Journal of veterinary internal medicine**. v.16, n.3, p.309–315, 2002. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2002\)016<0309:csoedo>2.3.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2002)016<0309:csoedo>2.3.co;2)

NISHIYAMA, A.; *et al.* Renal interstitial adenosine metabolism during ischemia in dogs. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**. v.280, p.231–238, 2001.

NYINDO, M.; *et al.* Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American journal of veterinary research**. v.41, n.2, p.250–254, 1980.

OCHIENG, J.; CHAUDHURI, G. Cystatin superfamily. **Journal of Health Care Poor Underserved**. v.21, p.51–70, 2010.

OKUSA, M. D.; PORTILLA, D. Pathophysiology of acute kidney injury. In: YU, A. S. L.; CHERTOW, G. M.; LUYCKX, V. A.; MARSDEN, P. A.; SKORECKI, K.; TAAL, M. W. **Brenner Rector's The Kidney**. 11ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. Cap.28 p. 906–39

OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses. **The Medical Clinics of North America**. v. 86, n. 2, p. 375-392, 2002.

OSTERMANN, M.; *et al.* Controversies in acute kidney injury: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Conference. **Kidney International**. v.98, n.2, p.294-309, 2020. doi:10.1016/j.kint.2020.04.020

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal of Physiology: Renal Physiology**. v.284, n.4, p.F608-F627, 2003. doi:10.1152/ajprenal.00284.2002

PADDOCK, C. D.; CHILDS, J. E. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 1, p. 37-64, 2003.

PAGE, R. L. Clinical implication of lymphocyte phenotyping. In: PROCEEDINGS OF THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 9., 1995, p. 257.

PAGITZ, M.; FROMMLET, F.; SCHWENDENWEIN, I. Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.21, p.936–942, 2007.

PALM C. A.; *et al.* Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin as a Marker for Identification of Acute Kidney Injury and Recovery in Dogs with Gentamicin-induced Nephrotoxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, n.1, p.200-205, 2016. doi:10.1111/jvim.13819

PALEVSKY, P. M.; *et al.* KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**. v.61, n.5, p.649–672, 2013. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2013.02.349>

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**. v.23, p.1045-1050, 2009.

PEAKE, M.; WHITING, M. Measurement of serum creatinine – current status and future goals. **The Clinical Biochemist. Reviews**. v.27, p.173-184, 2006.

PEDERSEN, L. G., *et al.* Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. **Research in Veterinary Science**. v.80, p.336-342, 2006.

PEREZ, M.; *et al.* (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1078, p.110–117. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.016>

PETERSON, M. E.; CASTELLANO, C. A.; RISHNIW, M. Evaluation of Body Weight, Body Condition, and Muscle Condition in Cats with Hyperthyroidism. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.30, p.1780–1789, 2016. <https://doi.org/10.1111/jvim.14591> PMID: 27667652

PREISS, D. J.; GODBER, I. M.; LAMB, E. J.; DALTON, R. N.; GUNN, I. R. The influence of a cooked-meat meal on estimated glomerular filtration rate. **Annals Clinical Biochemistry**, v. 44, n. Pt1, p. 35–42, 2007.

PRESSLER, B. M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**. v.43, n.6, p.1193–v, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2013.07.011>

QUINN, J.; ZIEBA, M.; YERRAMILI, M. ACVIM abstract NU-13: effect of blood contamination in canine urine on the performance of a commercial immunoassay for the acute kidney injury (AKI) marker: urinary clusterin (UCLUS). **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.29, p.1214, 2015.

QUROLLO, B. A.; *et al.* Clinicopathological findings in 41 dogs (2008-2018) naturally infected with *Ehrlichia ewingii*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.33, n.2, p.618-629, 2019. doi: 10.1111/jvim.15354. Epub 2019 Jan 2. PMID: 30604457; PMCID: PMC6430920

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 23, p.710–715, 2011.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. I. Sequential reaction of the hemicanal and lymphoreticular systems. **Veterinary Pathology**. v.18, p.48–61, 1981a.

REARDON, M. J.; PIERCE, K. R. Acute experimental canine ehrlichiosis. II. Sequential reaction of hemic and lymphoreticular system of selectively immunosuppressed dogs. **Veterinary Pathology**. v.18, p.384–395, 1981b.

RELFORD, R.; ROBERTSON, J.; CLEMENTS, C. Symmetric Dimethylarginine: SDMA. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 46, n. 6, p. 941–960, 2016.

REYNOLDS B. S.; *et al.* Breed dependency of reference intervals for plasma biochemical values in cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.809–818, 2010.

RIECK, S. E.. Caracterização molecular, antigênica e epidemiológica da *Ehrlichia canis* em Uberlândia, MG, Brasil. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

RISTIC, M.; *et al.* Evidence of a serologic relationship between *Ehrlichia canis* and *Rickettsia sennetsu* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 30, n. 6, p. 1324-1328, 1981.

ROBERTS, V, S.; *et al.* The role of adenosine receptors A2A and A2B signaling in renal fibrosis. **Kidney International**. v.86, p.685–92, 2014.

ROSS, L. Acute Kidney Injury in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v.41, n.1, p.1–14, 2011.

RØRTVEIT, R.; *et al.* Age-related changes in hematologic and serum biochemical variables in dogs aged 16-60 days. **Veterinary Clinical Pathology**. v.44, p.47–57, 2015.

RUAUX, C. G.; *et al.* Estimates of biological variation in routinely measured biochemical analytes in clinically healthy dogs. **Veterinary Clinical Pathology**. v.41, p.541–547, 2012.

RUMBEIHA, W. K.; MURPHY, M. J. Nephrotoxics. In: BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. **Kirk's Current Veterinary Therapy XV**. 1 ed. Missouri: Elsevier, 2013. cap 1, p.e29-34

SAINZ Á.; *et al.* Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. **Parasites and Vectors**. v.8, n.75, p.1-20, 2015. doi: 10.1186/s13071-015-0649-0. PMID: 25649069; PMCID: PMC4324656.

SAITO, T. B.; *et al.* Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 70, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANTARÉM, V. A.; AGUIAR, D. M. Erliquiose canina. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.(Org.). Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. 1a edição. Rio de Janeiro: Roca, p. 95-111, 2016.

SAOTOME, T.; *et al.* The impact of experimental hypoperfusion on subsequent kidney function. **Intensive Care Medicine**. v.36, p.533-40, 2010.

SAVARESE, A.; *et al.* Reliability of symmetric dimethylarginine in dogs with myxomatous mitral valve disease as a kidney biomarker. **Open Veterinary Journal**. v.8, p.318-324, 2018.

SATO, M.; *et al.* *Ehrlichia canis* in dogs experimentally infected, treated, and then immune suppressed during the acute or subclinical phases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.34, n.3, p.1214-1221, 2020. doi: 10.1111/jvim.15750. Epub 2020 Apr 8. PMID: 32267035; PMCID: PMC7255653.

SEGEV, G.; *et al.* Renal amyloidosis in dogs: a retrospective study of 91 cases with comparison of the disease between Shar-Pei and non-Shar-Pei dogs. **Journal of veterinary internal medicine**. v.26, n.2, p.259–268, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00878.x>

SEGEV, G.; *et al.* Validation of a Clinical Scoring System for Outcome Prediction in Dogs with Acute Kidney Injury Managed by Hemodialysis. **Journal of veterinary internal medicine**. v.30, n.3, p.803–807, 2016. <https://doi.org/10.1111/jvim.13930>

SCHWEDHELM, E.; BÖGER, R. H. The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease. **Nature Reviews Nephrology**. v.7, p.275–85, 2011.

SHIPOV, A.; *et al.* Prognostic indicators for canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary parasitology**. v.153, p.131–138, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.01.009>

SIEW, E.D.; DAVENPORT, A. The growth of acute kidney injury: a rising tide or just closer attention to detail? **Kidney International**. v.87, n.1, p.46–61, 2015. doi:10.1038/ki.2014.293

SMETS, P. M.; *et al.* Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.24, p.65–72, 2010.

SPIELMAN, W. S.; THOMPSON, C. I. A proposed role for adenosine in the regulation of renal hemodynamics and renin release. **The American Journal of Physiology. Renal Fluid and Electrolyte Physiology**. v.242, p.F423–F435, 1982.

SPIELMAN, W. S.; AREND, L. J. Adenosine receptors and signaling in the kidney. **Hypertension**. v.17, p.117–130, 1991.

STILLMAN, B. A., *et al.* Performance of a commercially available in-clinic ELISA for detection of antibodies against *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Ehrlichia ewingii* and *Dirofilaria immitis* antigen in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.245, n.1, p.80–86, 2014. <https://doi.org/10.2460/javma.245.1.80>

SUTTON, T. A.; FISHER, C. J.; MOLITORIS, B. A. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure. **Kidney International**. v.62, n.5, p.1539–1549, 2002. doi:10.1046/j.1523-1755.2002.00631.x

SYKES, J. E.; *et al.*, 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of veterinary internal medicine**. v.25, n.1, p.1–13, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2010.0654.x>

SYKES, J. E. Ehrlichiosis. In: SYKES, J. E. **Canine and Feline Infectious Diseases**. 1 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2013, cap. 28, p. 278–289.

SZLOSEK D.; *et al.* A retrospective evaluation of the relationship between symmetric dimethylarginine, creatinine and body weight in hyperthyroid cats. **PLoS One**. v.15, n.1, p.e0227964, 2020. doi:10.1371/journal.pone.0227964

TANIKAWA, A.; *et al.* *Ehrlichia canis* in dogs in a semiarid region of Northeastern Brazil: serology, molecular detection and associated factors. **Research in veterinary science**. v.94, n.3, p.474–477, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.10.007>

THOEN, M.E.; KERL, M.E. Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio)**. v.21, p.648–657, 2011.

THOMAS, S.; POPOV, V. L.; WALKER, D. H. Exit mechanisms of the intracellular bacterium *Ehrlichia*. **PloS one**. v.5, n.12, p.e15775, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015775>

THOMAS, M.E. *et al.* The definition of acute kidney injury and its use in practice. **Kidney International**. v.87, n.1, p.62-73, 2015. doi:10.1038/ki.2014.328

TORRES, H. M.; *et al.* Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para reação de imunofluorescência indireta. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**. v. 9, n. 2, p. 77-82, 2002.

UCHINO, S. The meaning of transient azotemia. **Contributions to Nephrology**. v.165, p.337-344, 2010.

ULLEBERG, T.; *et al.* Plasma creatinine in dogs: intra- and inter-laboratory variation in 10 European veterinary laboratories. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.53, p.25, 2011.

VADEN, S. L.; LEVINE, J.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* v.11, p.58–64, 1997.

VALLI, V. E. O., The hematopoietic system: ehrlichiosis. In: JUBB, K. V. F. KENNEDY, P. C.; PALMER, N. **Pathology of Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, 1993. p. 195–196.

VASKE, H. H.; SCHERMERHORN, T.; GRAUER, G. F. Effects of feline hyperthyroidism on kidney function: a review. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.18, p.55–59, 2016. <https://doi.org/10.1177/1098612X15575385> PMID: 25749888

VENKATACHALAM, M. A.; *et al.* Failed Tubule Recovery, AKI-CKD Transition, and Kidney Disease Progression. **Journal of the American Society of Nephrology**. v.26, n.8, p.1765–1776, 2015. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015010006>

VIEIRA, R. F. C.; *et al.* Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, 2011.

WANER, T.; *et al.* Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**. v. 95, n. 1, p. 1-15, 2001.

WANER, T. Hematopathological changes in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, v. 63, n. 1, 2008.

WANER, T.; HARRUS, S. Canine monocytic ehrlichiosis – from pathology to clinical manifestations. **Israel Journal of Veterinary Medicine**, v. 68, n. 1, 2013.

WEESE, J. S.; *et al.* International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. **Veterinary Journal**. v.247, p.8-25, Mai 2019. doi: 10.1016/j.tvjl.2019.02.008. Epub 2019 Feb 26. PMID: 30971357.

WEISBORD, S.D.; PALEVSKY, P.M. Prevention and management of acute kidney injury. *In*: YU, A. S. L.; CHERTOW, G. M.; LUYCKX, V. A.; MARSDEN, P. A.; SKORECKI, K.; TAAL, M. W. **Brenner Rector's The Kidney**. 11ed. Philadelphia: Elsevier, 2020. Cap.29 p. 940–77.

WEISER, M.G., *et al.* Granular lymphocytosis and hyperproteinemia in dogs with chronic ehrlichiosis. **Journal of American Animal Hospital Association**. v.7, p.84–88, 1991.

WYATT, A. R.; YERBURY, J. L.; WILSON, M. R. Structural characterization of clusterin- chaperone client protein complexes. **Journal of Biological Chemistry**. v.284, p.21920–21927, 2009.

YABSLEY, M. J. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis*: vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries, **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2-4, p. 136-148, 2010.

YERRAMILLI, M.; FARACE, G.; QUINN, J.; YERRAMILLI, M. Kidney Disease and the Nexus of Chronic Kidney Disease and Acute Kidney Injury. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1–33, 2016.

ZAMAGNI, S.; *et al.* Comparison of clinicopathological patterns of renal tubular damage in dogs with acute kidney injury caused by leptospirosis and other aetiologies. **Veterinary Journal**. v.266, p.105573, Dez 2020. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105573. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33323170.

ZHOU, X.; MA, B.; LIN, Z.; QU, Z.; HUO, Y.; WANG, J.; LI, B. Evaluation of the usefulness of novel biomarkers for drug induced acute kidney injury in the beagle dogs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.280, p.30–35, 2014.

NORMAS DA REVISTA

Seção 1.

**“C-reactive protein and canine monocytotropic ehrlichiosis:
A new clinical perspective.”**

Revista: Veterinary Record

[https://onlinelibrary.wiley.com/pb-
assets/assets/20526121/Style%20guide%20for%20BVA%20veterinary%20journals-
1607340780507.pdf](https://onlinelibrary.wiley.com/pb-assets/assets/20526121/Style%20guide%20for%20BVA%20veterinary%20journals-1607340780507.pdf)

Seção 2.

**“New Kidney Concepts in Dogs with Ehrlichiosis:
The Era of Kidney Injury Biomarkers.”**

Revista: Plos One

<https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

