DÓRIS PEREIRA HALFEN

Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-
inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos
alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas

São Paulo

2016

DÓRIS PEREIRA HALFEN

Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto

De acordo:

Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3405
FMVZ

Halfen, Dóris Pereira

Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas / Dóris Pereira Halfen. -- 2016.

106 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Prof. Dr. Márcio Antonio Brunetto.

1. Canino. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Aminoácidos. 4. Desnutrição. 5. FGF-23. 6. Hiperparatireoidismo secundário renal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do metabolismo protéico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas", protocolado sob o nº 3138/2013, utilizando 20 (vinte) cães, sob a responsabilidade do(a) Maria Claudia Araripe Sucupira e Marcia Mery Kogika, foi aprovado em reunião de 4/9/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of protein and mineral metabolism and proinflammatory and oxidative status of dogs with chronic renal failure fed prescription diet for kidney disease", protocol number 3138/2013, utilizing 20 (twenty) dogs, under the responsibility Maria Claudia Araripe Sucupira e Marcia Mery Kogika, was approved in the meeting of day 9/4/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 5 de setembro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HALFEN, Dóris Pereira

Título: **Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até este momento da minha vida.

Agradeço imensamente ao meu orientador Márcio Antonio Brunetto por me dar a oportunidade de concluir meu doutorado em uma das universidades mais prestigiadas do mundo. Pela paciência, tempo, dedicação e amizade dados a mim.

Agradeço muito a minha família, pois sem ela absolutamente nada disso seria possível. Não existem palavras capazes de descrever minha gratidão.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, os distantes que hoje estão perto e os de perto que hoje estão distantes. Os responsáveis por inúmeros momentos de divertimento, mas também de seriedade que acompanharam esse período.

Aos meus amigos queridos Eduardo Braghirolli, Valter M Winkel, Fernanda Chicharo Chacar, Cíntia Ribas Martorelli, Fábio A. Teixeira, Dielly Silva, Livia Chimati Fatini, Suzana Enuno e Júlia Toledo.

Aos membros do Grupo de Estudos em Nutrição Pet (GENP) por todos os ensinamentos, oportunidades e conhecimentos que compartilhamos juntos.

À Universidade de São Paulo e Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia que me receberam de braços abertos.

Ao Departamento de Clínica Médica e ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária pelo imenso acolhimento recebido e a secretária da pós-graduação Adelaide F. J. Borges.

Agradeço a todos os professores que me auxiliaram e guiaram nessa longa caminhada em especial a Professora Márcia Mery Kogika e a Mária Cláudia Araripe Sucupira.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me auxiliar financeiramente durante todo este processo.

Agradeço à Premier Pet, a Cristiana Pontieri e a Juliana Tolo Jeremias pelo apoio fundamental e imprescindível para a realização deste estudo. Ao Hospital Veterinário (HOVET) da FMVZ/USP, seus funcionários e colegas por nos permitir realizar o trabalho desenvolvido e a oportunidade de trabalhar e aprender com eles.

Ao meu amigo e colega Douglas Segalla Caragelasco, um cara excepcional e fundamental companheiro de trabalho que muito me ajudou a chegar até aqui.

Ao meu inestimável amigo João Paulo Fernandes Santos, que esteve presente e continuará presente em toda essa caminhada.

Aos tutores e seus cães mais que especiais, parceiros de trabalho, que nos ajudaram a construir este estudo ao acreditarem que o conhecimento é o meio pelo qual chegaremos, quem sabe um dia, a cura do muito que nos aflige.

E agradeço aos animais.....eternamente agradecida aos animais.

Meus mais sinceros MUITO, MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

HALFEN, D. P. H. **Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas.** [Evaluation of protein and mineral metabolism and proinflammatory and oxidative status of chronic renal failure dogs fed prescription diet for kidney disease patients]. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A doença renal crônica (DRC) é a afecção renal mais frequente em cães e caracteriza-se pela progressiva redução do número de néfrons funcionais. Com a evolução da doença, os cães podem apresentar um conjunto de manifestações clínicas denominada uremia. O suporte nutricional objetiva atenuar os efeitos do estado urêmico, retardar a progressão da doença e melhorar a qualidade de vida dos animais. O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da dieta coadjuvante e manejo dietético no metabolismo de cálcio e fósforo [fósforo, cálcio total (CaT), cálcio iônico (Cai), paratormônio (PTH) e FGF-23 séricos], escore de condição corporal (ECC), escore de massa muscular (EMM), concentrações séricas de aminoácidos (AAs) e citocinas inflamatórias (CIT), bem como a capacidade antioxidante total (CAT) de cães com DRC alimentados com dieta coadjuvante. Foram selecionados 10 cães com DRC estádios 3 e 4 (IRIS, 2015) provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As variáveis PTH, FGF-23, AAs, CIT e CAT foram avaliadas no início do estudo (T0) e após 6 meses de manejo dietético (T6). As determinações séricas de ureia, creatinina, CaT, Cai e fósforo; ECC e EMM foram determinadas em T0 e a cada 30 dias, durante os 6 meses de estudo. Para a análise dos resultados, testes estatísticos paramétricos e não paramétricos foram empregados e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As concentrações séricas de ureia, fósforo, CaT, Cai, IL-6, IL-10, TNF- α , CAT, PTH e FGF-23 não apresentaram diferença entre os momentos T0 e T6. A creatinina elevou-se em T6 ($p = 0,0022$). Os AAs fenilalanina, triptofano e ornitina decresceram no tempo T6 ($p = 0,0273$; $p = 0,0253$; $p = 0,0443$, respectivamente) e a hidroxiprolina aumentou em T6 ($p = 0,0073$). As concentrações séricas de PTH apresentaram correlação com a creatinina e ureia ($r = 0,45$, $p < 0,05$; $r = 0,67$, $p < 0,01$; respectivamente). O Cai apresentou correlação negativa com a ureia ($r = -0,59$, $p < 0,01$) e o fósforo sérico apresentou correlação positiva com o FGF-23 ($r = 0,51$; $p < 0,05$). A ureia e creatinina apresentaram correlação positiva ($r = 0,62$; $p < 0,01$). De acordo com

os resultados encontrados, conclui-se que a dieta e o manejo nutricional empregados foram eficazes no controle do hiperparatireoidismo secundário renal, estresse oxidativo, marcadores inflamatórios e na manutenção do escore de condição corporal, massa muscular e nutrição proteica dos cães avaliados.

Palavras-chave: Canino. Espécies reativas de oxigênio. Aminoácidos. Desnutrição. FGF-23. Hiperparatireoidismo secundário renal.

ABSTRACT

HALFEN, D. P. H. **Evaluation of protein and mineral metabolism and proinflammatory and oxidative status in dogs with chronic kidney disease fed with diet prescription for kidney disease patients.** [Avaliação do metabolismo proteico e mineral e do status pró-inflamatório e oxidativo de cães doentes renais crônicos alimentados com dieta de prescrição para pacientes nefropatas]. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Chronic kidney disease (CKD) is the most common kidney disease in dogs and characterized by progressive reduction in the number of functional nephrons. With the evolution of the disease the dogs may present a set of clinical manifestations denominated uremia. The efforts of nutritional support are to mitigate the effects of uremic state, slow the progression of the disease and improve the quality of life of the animals. The aim of this study was to evaluate the effects of prescription diet and dietary management on the metabolism of calcium and phosphorus [phosphorus, total calcium (CaT), ionized calcium (Cai), parathyroid hormone (PTH) and FGF-23 in the serum], body condition score (BCS), muscle mass score (MME), serum concentrations of amino acids (AAs) and inflammatory cytokines (CYT), as well as the total antioxidant capacity (TAC) of dogs with CKD fed with a coadjuvant diet. Were selected 10 dogs with CKD stage 3 and 4 (IRIS, 2015), from the Veterinary Hospital at School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo. The PTH, FGF-23, AAs, CYT and TAC variables were evaluated at baseline (T0) and after 6 months of dietary management (T6). The serum determinations of urea, creatinine, CaT, Cai and phosphorus; BCS and MMS were determined at T0 and every 30 days, for 6 months. For the analysis of the results, parametric and non-parametric statistical tests were used and values of $p < 0.05$ were considered significant. Serum concentrations of urea, phosphorus, CaT, Cai, IL-6, IL-10, TNF- α , CAT, PTH, FGF-23 did not differ between T0 and T6. Serum creatinine increased in T6 ($p = 0.0022$). The AAs phenylalanine, tryptophan and ornithine decreased in T6 ($p = 0.0273$; $p = 0.0253$; $p = 0.0443$, respectively) and hydroxyproline increased in T6 ($p = 0.0073$). Serum PTH concentrations correlate positively with the concentrations of creatinine and urea ($r = 0.45$, $p < 0.05$; $r = 0.67$, $p < 0.01$; respectively). The Cai was negatively correlated with urea ($r = -0.59$, $p < 0.01$) and serum phosphorus was positively correlated with FGF-23 ($r = 0.51$; $p < 0.05$). The urea and creatinine were positively correlated ($r = 0.62$; $p < 0.01$). It was concluded that diet and nutritional management were effective in the control of

renal secondary hyperparathyroidism, oxidative stress, inflammatory markers and maintenance of body condition score, muscle mass and protein nutrition in the evaluated dogs.

Keywords: Canine. Reactive oxygen species. Amino acids. Malnutrition. FGF-23.
Renal secondary hyperparathyroidism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estadiamento da doença renal crônica	20
Figura 2 - Desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (Hipótese do “calcitriol trade off”).....	25
Figura 3 - Interação de fatores que levam a formação de espécies reativas de oxigênio na DRC	37
Figura 4 - Potenciais mecanismos pelos quais as citocinas pró e anti-inflamatórias atuam durante a uremia	39
Figura 5 - Concentrações séricas de fósforo de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6.....	63
Figura 6 - Concentrações séricas de cálcio total de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6.....	66
Figura 7 - Concentrações séricas de cálcio iônico de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6	67
Figura 8 - Concentrações séricas de paratormônio (PTH) de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6.....	69
Figura 9 - Concentrações séricas de FGF-23 de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6.....	701
Figura 10 Concentrações aminoacídicas séricas de cães doentes renais crônicos nos tempos T0 e T6.....	80
Quadro 1 - Avaliações realizadas nos diferentes tempos experimentais	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e perfil aminoacídico da dieta oferecida para os cães incluídos no estudo	49
Tabela 2 - Concentrações séricas de uréia, creatinina, cálcio total, cálcio iônico, fósforo, paratormônio e FGF-23 de cães com doença renal crônica nos momentos T0 e T6 e cães saudáveis do grupo controle.....	65
Tabela 3 - Correlações entre as concentrações séricas de PTH, cálcio total (caT), cálcio iônico (Cai), fósforo, FGF-23, creatinina e uréia nos tempos T0 e T6	73
Tabela 4 - Concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α de cães doentes renais crônicos nos tempos T0 e T6.....	75
Tabela 5 - Concentrações dos aminoácidos séricos em cães doentes renais nos tempos T0 e T6	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	aminoácido
AAE	aminoácidos essenciais
AA NE	aminoácidos não essenciais
AGPI	ácidos graxos poli-insaturados
ALA	alanina
ARG	arginina
ASN	aspargina
ASP	ácido aspártico
BCAA	aminoácidos de cadeia ramificada
Cai	cálcio iônico
CaT	cálcio total
CAT	capacidade antioxidante total
cCa	cálcio complexado
CIS	cisteína
CIT	citrulina
DCCR	desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada
DEP	desnutrição energético-proteica
DHA	docosahexaenóico
DRC	doença renal crônica
ECC	escore de condição corporal
EM	energia metabolizável
EMM	escore de massa muscular
EPA	eicosapentaenóico
EROs	espécies reativas de oxigênio
FEN	fenilalanina
FGF-23	fator de crescimento de fibroblastos-23
GLI	glicina
GLN	glutamina
GLU	ácido glutâmico
GSH	glutathione na forma reduzida
GSSH	glutathione na forma oxidada
HIS	histidina
HPSR	hiperparatireoidismo secundário renal
HPR	hidroxiprolina
ILE	isoleucina
LEU	leucina
LIS	lisina
MET	metionina
ORN	ornitina
pCa	cálcio ligado a proteínas séricas
PRO	prolina
PTH	paratormônio
PTHi	paratormônio intacto
SER	serina
TAU	taurina
TBARS	ácido tiobarbitúrico

TCD	túbulo contorcido distal
TCP	túbulo contorcido proximal
TFG	taxa de filtração glomerular
THR	treonina
TIR	tirosina
TRP	triptofano
VAL	valina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	FUNÇÃO E ANATOMIA RENAL	18
2.2	CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES	19
2.3	FISIOPATOGENIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	20
2.4	HIPERTENSÃO GLOMERULAR	22
2.5	HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO RENAL E O METABOLISMO DO CÁLCIO E FÓSFORO	23
2.6	IMPORTÂNCIA DA DIETA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	26
2.6.1	Restrição proteica na dieta	26
2.6.2	Restrição dietética de fósforo	30
2.7	FGF-23 E A DOENÇA RENAL CRÔNICA	32
2.8	ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E MASSA MUSCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	34
2.9	ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	35
2.10	A INFLAMAÇÃO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	38
2.11	DISTÚRBIOS DO METABOLISMO AMINOACÍDICO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	42
3	OBJETIVOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	ANIMAIS E LOCAL DE CONDUÇÃO DO ENSAIO	48
4.2	DIETA E MANEJO ALIMENTAR DOS CÃES	48
4.3	COLHEITA DE MATERIAL E EXAMES REALIZADOS	50
4.3.1	Colheita de urina	51
4.3.2	Colheita de sangue	51
4.3.3	Exame de urina	52
4.4	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52
4.4.1	Hemograma	52
4.4.2	Creatinina e ureia	53
4.4.3	ALT, FA, albumina, proteínas totais, triglicéride e colesterol	53
4.4.4	Cálcio sérico total, cálcio iônico, fósforo, sódio e potássio	53
4.5	DETERMINAÇÃO DO pH SANGUÍNEO E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BICARBONATO	54
4.6	DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA	54

4.7	DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR	55
4.8	DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS.....	55
4.9	DETERMINAÇÃO DE PARATORMÔNIO (PTH)	56
4.10	QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, IL-10 e TNF- α	56
4.11	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)	57
4.12	DETERMINAÇÃO DO FGF-23	57
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1	URINA.....	59
5.2	PRESSÃO ARTERIAL E EQUILÍBRIO ÁCIDO BÁSICO	60
5.3	PERFIL BIOQUÍMICO	61
5.3.1	Creatinina e ureia	61
5.3.2	Fósforo	62
5.3.3	Cálcio total e cálcio iônico	66
5.4	PARATORMÔNIO (PTH).....	68
5.5	FGF-23	70
5.6	CORRELAÇÃO ENTRE PTH, CÁLCIO TOTAL, CÁLCIO IÔNICO, FÓSFORO, FGF-23, CREATININA E UREIA.....	72
5.7	CITOCINAS	74
5.8	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	76
5.9	PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR	77
5.10	AMINOÁCIDOS SÉRICOS	78
6	CONCLUSÕES	86
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
	REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é considerada a afecção renal mais comum em cães, principalmente nos animais idosos, embora cães jovens também possam apresentá-la, principalmente como consequência de alterações hereditárias ou congênitas. O tratamento é recomendado de acordo com a evolução da doença e segundo recomendações mais recentes, de acordo com o estágio em que o paciente se encontra (IRIS, 2015).

Com a evolução da DRC, os animais tendem a manifestar um conjunto de sintomas chamados de síndrome urêmica ou uremia, caracterizado por alterações tóxicas e sistêmicas.

O aumento das concentrações de paratormônio, secretado em excesso, devido a menor excreção de fósforo, consequente ao comprometimento renal, resulta no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal, uma das principais consequências da DRC.

As espécies reativas de oxigênio, que podem ser produzidas em maior quantidade devido a hiperfuncionalidade dos néfrons remanescentes, com consequente desequilíbrio entre a excessiva formação de compostos oxidantes e insuficientes mecanismos de defesa, podem gerar lesões em lipídios, proteínas, carboidratos e DNA celular e contribuir para a progressão da doença.

Além disso, a acidose metabólica, condição frequente em animais com DRC avançada, apresenta importante papel no catabolismo proteico, através da ativação da via proteolítica proteasoma-ubiquitina, a qual induz a degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada e aumenta a degradação proteica, alterações que podem resultar em perda de massa muscular, balanço nitrogenado negativo e agravar a uremia.

As alterações hidroeletrolíticas e do equilíbrio ácido básico, associadas ao déficit energético, observados, principalmente, em animais hiporéticos ou anoréticos, alterações de metabolismo e aumento da produção de mensageiros intercelulares (citocinas), podem resultar na síndrome caquexia (condição frequente em cães com DRC avançada) que culmina na redução do escore de condição corporal e na perda de massa muscular, com consequente redução da qualidade de vida e piora do prognóstico dos pacientes.

O suporte nutricional é considerado um dos princípios pilares do tratamento da DRC. Seus objetivos consistem no fornecimento da necessidade energética e nutricional diária (balanço energético positivo), assim como em atenuar as manifestações clínicas consequentes a evolução da doença e melhorar a qualidade de vida dos animais. Apesar da ênfase do manejo dietético no passado ter sido focada na redução apenas da quantidade de proteína e de fósforo ingerida, recomendações mais recentes, baseadas nos aspectos discutidos anteriormente, apontam que a dieta para o paciente doente renal crônico deva focar além do controle do teor de proteína, também no seu valor biológico e que possa acarretar na menor produção de compostos nitrogenados não proteicos. No que se refere à quantidade, é importante ressaltar que restrições exageradas de proteínas poderão causar o catabolismo endógeno de proteínas e resultar na formação de compostos nitrogenados não proteicos e piora da uremia. Ainda, com base nas alterações provocadas pela DRC, é de suma importância que as formulações das dietas estejam também voltadas para o controle de outros processos que aceleram a perda dos néfrons remanescentes, como o controle da ingestão energética, eletrólitos, agentes alcalinizantes, ácidos graxos poli-insaturados (AGP) ômega-3 e antioxidantes.

Apesar da importância do assunto, existem muitas dúvidas em relação as consequências da DRC e o papel da dieta e do manejo nutricional em controlá-las ou atenuá-las. Dessa forma, o presente estudo objetivou investigar alguns aspectos ainda pouco explorados dentro do tema.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FUNÇÃO E ANATOMIA RENAL

Em cães e gatos o rim é unilobar, recoberto por uma cápsula fibrosa e composto por um grupo de néfrons. O parênquima é formado por uma região medular e outra cortical (POLZIN, 2011). O néfron é a unidade funcional do rim, sendo este constituído pelo glomérulo, túbulo contorcido proximal (TCP), alça de Henle, túbulo contorcido distal (TCD) e ducto coletor. Os cães possuem cerca de 500.000 néfrons por rim, sendo a urina formada no interior de cada um deles em 3 etapas: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular (BROWN, 2011; KOGIKA; WAKI; MARTONELLI, 2015). Dentre as funções renais, tem-se a excreção de metabólitos indesejáveis, regulação do equilíbrio hídrico e eletrolítico, regulação da osmolalidade dos líquidos corporais, regulação da pressão arterial, equilíbrio ácido básico, secreção, metabolismo e excreção de hormônios e gliconeogênese. Os rins realizam suas mais importantes funções através da filtração do plasma e posterior remoção de substâncias do filtrado (GUYTON; HALL, 2006).

O glomérulo consiste em um tufo de capilares anastomosados pelo qual grandes quantidades de água e solutos são filtrados do sangue. Os capilares são constituídos de células epiteliais, sendo todo o glomérulo envolvido pela cápsula de Bowman. O líquido filtrado pelos capilares flui para o interior da cápsula e então para o TCP, deslocando-se após para a alça de Henle e em seguida para o TCD e ducto coletor (GUYTON; HALL, 2006). A taxa de filtração glomerular (TFG) é definida como o volume de ultrafiltrado produzido pela filtração glomerular por unidade de tempo e é considerada a melhor indicadora da função renal (POLZIN, 2011).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES

A Doença renal crônica (DRC) é a doença geniturinária mais comum em cães e gatos. É definida como lesão renal existente, com ou sem decréscimo da TFG e/ou com redução da TFG em mais de 50%, persistente há pelo menos 3 meses, acompanhada de mecanismos compensatórios, a fim de preservar a função renal (POLZIN, 2009).

A DRC é frequentemente considerada uma doença de animais geriátricos, embora possa ocorrer em todas as idades. Estima-se que a incidência de DRC na população de cães seja de 0,5 a 1,6%. (POLZIN, 2011). A *International Renal Interest Society* (IRIS, 2015) propõe um sistema de estadiamento composto por quatro estádios de evolução da DRC. Os estádios são estabelecidos principalmente de acordo com as concentrações séricas de creatinina, pois esta é a forma mais comum de estimar a TFG. Devido ao caráter progressivo da doença, a diferenciação dos estádios é de grande importância para o estabelecimento de condutas terapêuticas, diagnósticas e prognósticas.

O estágio 1 é considerado como estado não azotêmico (creatinina sérica <1,4 mg/dL), embora haja alteração renal, como a incapacidade de concentrar urina, proteinúria renal e alterações renais ao exame de imagem e biópsia. O estágio 2 resulta em discreta azotemia em avaliações seriadas (creatinina sérica entre 1,4 mg/dL e 2 mg/dL). Os pacientes nos estádios 1 e 2 não demonstram manifestações clínicas de alteração renal, à exceção de poliúria e polidipsia. No estágio 3 há presença de azotemia em grau moderado (creatinina sérica entre 2,1 mg/dL e 5 mg/dL) e presença de manifestações clínicas moderadas de uremia. O estágio 4 caracteriza-se por intensa azotemia, onde há severa perda da função renal e inúmeras manifestações sistêmicas de uremia (POLZIN, 2009; WAKI et al., 2010) (Figura 1). Os diferentes estádios da DRC podem requerer tratamento específico e de acordo com as manifestações clínicas. Dessa forma, para o melhor entendimento das práticas clínicas aplicadas, faz-se necessário o conhecimento da fisiopatogenia da doença e suas complicações sistêmicas.

Figura 1 - Estadiamento da doença renal crônica

Fonte: (IRIS, 2015)

2.3 FISIOPATOGENIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A perda da função renal na DRC é caracterizada pela redução progressiva do número de néfrons. Após a instalação inicial da lesão, ocorrem mudanças adaptativas, estruturais e funcionais dos néfrons remanescentes, na tentativa de manutenção da homeostase, principalmente quanto à regulação do volume e da composição do fluido corporal extracelular. Em longo prazo, essas mudanças tornam-se deletérias e como consequência, ocorre aumento das lesões e declínio progressivo da função renal (POLZIN, 2011). Inicialmente, presumia-se que a redução da função renal era consequente a doença renal primária, entretanto, estudos em diversas espécies sugerem que a perda de tecido renal compromete a funcionalidade dos néfrons remanescentes, o que resulta em progressão da doença renal, independente da causa inicial (HOSTETTER et al., 2001; POLZIN 2011).

Como processo de adaptação, os néfrons remanescentes são sobrecarregados para recuperar parte da função perdida. A TFG total dos rins é definida como a soma da TFG individual de cada néfron. Deste modo, o rim é capaz de adaptar-se e minimizar suas perdas funcionais. No entanto, há um “custo” a pagar por estas

adaptações, pois os néfrons remanescentes tornam-se “hiperfuncionais”, com consequente auto-destruição e progressão espontânea da DRC (POLZIN, 2011).

Harris e Neilson (2006) propuseram um modelo dividido em seis passos para explicar a progressão da DRC:

No primeiro passo, a lesão glomerular persistente leva a diminuição da TGF e menor produção de urina, com isso há ativação do Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (SRAA), com consequente hipertensão local dos tufo glomerulares, que por sua vez, resulta em aumento da TFG individual do néfron e consequente proteinúria.

No segundo passo, a proteinúria acompanhada pelo aumento da produção local de angiotensina II eleva o fluxo de citocinas distais e induz o acúmulo de células mononucleares intersticiais.

A terceira etapa inicia-se com a atração de neutrófilos intersticiais, que são rapidamente substituídos por resposta imune caracterizada por macrófagos e linfócitos T que acabam por resultar em nefrite intersticial.

Na fase quatro, a inflamação afeta os epitélios tubulares e induz remodelação tecidual. Além disso, as células epiteliais tubulares são substituídas por fibroblastos.

Na quinta etapa, os fibroblastos formam uma matriz de colágeno que interrompe o fluxo de vasos e túbulos.

Na etapa final, resta apenas uma cicatriz acelular, resultado de células que foram confinadas em um ambiente desfavorável à sobrevivência (POLZIN; 2011).

A Angiotensina II (Ang II) e a aldosterona, além de exercerem efeitos diretos sobre as células renais, também estimulam diretamente a inflamação e estresse oxidativo renal. Para que a Ang II exerça seus efeitos é necessário que se ligue aos receptores acoplados à proteína G do tipo 1 (AT1) e 2 (AT2), sendo o receptor AT1 o mediador dos efeitos mais deletérios da Ang II. A Ang II não atua apenas como um peptídeo vasoativo, mas como uma citocina reguladora do crescimento celular, inflamação e fibrose. Dessa forma, promove a produção renal de TNF- α e regula mediadores pró-inflamatórios como a IL-6. A aldosterona estimula a atividade da NADPH oxidase que aumenta a formação de EROs como os superóxidos e peróxidos de hidrogênio, os quais por sua vez estimulam fatores de transcrição pró-inflamatórios como a proteína ativadora -1 (AP-1) e o NF-K β com consequente aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias. A aldosterona ainda estimula a expressão de moléculas

pró-fibróticas como o fator de crescimento transformador $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1). (REMUZZI et al., 2005; BROWN, 2013).

2.4 HIPERTENSÃO GLOMERULAR

Com o aumento da lesão renal, a capacidade de auto regulação dos néfrons sobreviventes é perdida. Tal alteração faz com que toda a pressão do fluxo seja transmitido para os glomérulos e resulte em hipertensão intraglomerular (BROWN; FINCO; NAVAR, 1995). Com o aumento do fluxo plasmático renal, ocorre aumento da produção do filtrado glomerular (hiperfiltração glomerular) como forma de manutenção da TFG. A hipertensão glomerular e hiperperfusão estão associadas à elevação da angiotensina II e aldosterona induzindo expansão da matriz extracelular e células mesangiais com aumento do volume e superfície do tufo glomerular. A expansão da área do glomérulo vem acompanhada de aumento de volume, mas isto ocorre sem que haja aumento correspondente do número de células epiteliais que recobrem o glomérulo (podócitos) (RENNKE; DENKER, 2007; POLZIN, 2011).

Quando o glomérulo se expande, a superfície de filtração acompanha, ocorre a hipertrofia e não hiperplasia dos podócitos e assim, consequente redução na densidade celular, contribuindo para a proteinúria e injúria celular. Os podócitos limitam a passagem de macromoléculas, contribuindo para a manutenção da integridade da barreira de filtração. Dessa forma, a proteinúria ocorre em néfrons com podócitos danificados, e a perda destas células resultam em redução da integridade estrutural, proteinúria e glomeruloesclerose (RENNKE; DENKER, 2007; POLZIN, 2011). Em decorrência da perda de proteínas, grande quantidade destas moléculas são encontradas no filtrado. Tal aumento de concentração produz sobrecarga de reabsorção pelas células tubulares do segmento proximal do néfron, injúria e consequente perda deste néfron e perpetuação da lesão renal (POLZIN; OSBORNE; ROSS, 2005; WAKI et al., 2010).

Com a contínua perda de néfrons e consequente redução da TFG ocorre aumento das concentrações séricas de uréia e creatinina. O acúmulo destes compostos nitrogenados não proteicos chama-se azotemia e é observado quando há perda de pelo menos 70% dos néfrons funcionais em cães (POLZIN 2011; KOGIKA;

WAKI; MARTONELLI, 2015). Devido à progressão da DRC, os animais podem manifestar um conjunto de sintomas chamados de síndrome urêmica ou uremia, caracterizado como uma síndrome tóxica e polissistêmica. O decréscimo da TFG resulta em menor excreção de fósforo pelo rim e consequente hiperfosfatemia, o que pode levar ao desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPSR), osteodistrofia e distúrbios no metabolismo do cálcio e fósforo (POLZIN; OSBORNE; ROSS, 2005; KOGIKA; WAKI; MARTONELLI, 2015).

2.5 HIPERPARATIREOIDISMO SECUNDÁRIO RENAL E O METABOLISMO DO CÁLCIO E FÓSFORO

O paratormônio (PTH) regula as concentrações séricas de cálcio e fósforo, através da modulação de determinadas células do tecido ósseo. No tecido ósseo, o PTH aumenta a liberação de cálcio e fósforo via reabsorção óssea. Nos rins, estimula a reabsorção tubular de cálcio e inibe a de fósforo, além de acelerar a síntese de calcitriol, este por sua vez aumenta a absorção intestinal de cálcio, e em menor grau, de fósforo. O principal fator de regulação da secreção de PTH é a concentração sérica de cálcio, que varia de forma inversa à sua concentração e, pequenas oscilações deste causam grandes variações na secreção do PTH (ZATZ, 2011).

O PTH é sintetizado pelas glândulas paratireóides e sua molécula intacta, denominado PTH intacto (PTH_i, responsável pela bioatividade) é descrita como a de maior relevância clínica. O HPSR renal se desenvolve logo no início da DRC, podendo estar presente em cães e gatos no momento do diagnóstico (BARBER; ELLIOTT; TORRANCE, 1993; RAMASAMY, 2006).

O HPSR é uma das consequências da doença renal crônica, que por comprometer o metabolismo do cálcio e fósforo, pode acarretar desmineralização óssea e mineralização de tecidos moles, incluindo o tecido renal e resultar em maior perda de néfrons. O aumento das concentrações séricas de PTH é considerado como um dos principais fatores envolvidos na síndrome urêmica, além disso, atribui-se ao excesso de PTH a inibição da eritropoiese e o aumento da fragilidade eritrocitária

(SLATOPOLSKY; MARTIN; HRUSKA, 1980; BARBER; ELLIOTT, 1998; GIOVANINNI, 2015).

Conforme já mencionado, o comprometimento renal resulta em menor excreção de fósforo e frequentemente observa-se hiperfosfatemia na DRC, o que favorece a hipocalcemia ionizada, pela formação de complexos séricos entre fosfato e cálcio e pela inibição da atividade da enzima 1- α -hidroxilase, inibida pela retenção de fósforo, e consequente diminuição na formação do calcitriol. O calcitriol é a forma ativa da vitamina D, formado pela hidroxilação do 25-hidroxicolecalciferol (caldiol) nos túbulos renais, através da atuação da 1- α -hidroxilase (POLZIN, 2011; GIOVANINNI, 2015).

A menor concentração de calcitriol resulta em decréscimo na absorção intestinal de cálcio e assim, favorece a hipocalcemia, que por sua vez estimula a secreção do PTH pelas glândulas paratireóides. O Calcitriol inibe a produção de PTH por *feed back* negativo e, devido a sua redução ocorre menor supressão deste (NAGODE; CHEW; PODELL, 1996; POLZIN 2011). O cálcio presente no sangue é formado por três frações: Cálcio ionizado (Cai), cálcio ligado a proteínas séricas (pCa) e o cálcio complexado (cCa). O Cai é considerado a fração mais importante do ponto de vista biológico, por representar cerca de 56% da concentração total de cálcio. (SCHENCK; CHEW, 2003; POLZIN, 2011).

A deficiência do calcitriol resulta em descontrole da síntese e secreção de PTH. A hipótese do “*calcitriol trade of*” explica o desenvolvimento do HPSR (Figura 2). O calcitriol é sintetizado nos túbulos renais e devido à perda de néfrons, ocorre sua diminuição no organismo. Somado a isto, está o fato do excesso de fósforo inibir a atividade da enzima 1 α -hidroxilase, sendo esta a responsável pela hidroxilação do caldiol (formado no fígado) em calcitriol. O calcitriol inibe a produção de PTH nas glândulas paratireóides por *feed back* negativo e por estar em baixas concentrações, reduz sua supressão ao PTH. A combinação das reduzidas concentrações de calcitriol e Cai, permite aumento da síntese e secreção de PTH. Por sua vez, as altas concentrações de PTH “conseguem” regular a atividade da enzima 1- α -hidroxilase, retomando a produção normal do calcitriol (se houverem néfrons suficientes). No entanto, estas concentrações de calcitriol são mantidas às “custas” da liberação anormal de PTH, que possui efeitos em diversos órgãos, inclusive nos rins (DEYKIN; BALKO; BRICKER, 1972; CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011).

Figura 2 - Desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal (Hipótese do “*calcitriol trade off*”)

Fonte: (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011)

As anormalidades na homeostase do cálcio e fósforo geram efeitos negativos no funcionamento renal, sendo a hiperfosfatemia associada ao menor tempo de vida em gatos com DRC (KING et al., 2007). Conforme já mencionado, o HPSR pode estar presente logo no início da doença. Cortadellas et al. (2010) observaram prevalência de 76% de hiperparatireoidismo em 54 cães com DRC. Esta alteração, quando analisada de acordo com o estágio da DRC apresentou as seguintes distribuições: estágio 1 = 36%; 2= 50%; 3= 96% e 4= 100%. A hiperfosfatemia foi constatada em 18% dos animais no estágio 1 e em 100% dos animais no estágio 4. A hipocalcemia ionizada foi mais significativa nos animais em estágio 4, e o calcitriol decresceu em paralelo ao avanço da doença, com maior significância a partir do estágio 3.

Estudos em gatos corroboram os achados clínicos demonstrados em cães, onde observou-se prevalência de 84% de hiperparatireoidismo em 80 gatos com diagnóstico de DRC. Dos animais no estágio 2, 47% apresentaram HPSR; 87% no estágio 3 e 100% no estágio 4. Em relação a hiperfosfatemia, 20% dos gatos no estágio 2 apresentaram alterações; 49% no 3 e 100% no estágio 4. Já com relação ao cálcio, 26% dos animais apresentaram concentrações reduzidas de Cai, principalmente no estágio 4.

No trabalho realizado por Lazaretti et al. (2006), as concentrações séricas de PTHi em cães com DRC variou de 15 a 1658 pg/mL, sendo que 28 dos 30 cães avaliados apresentaram concentrações mais elevadas que os valores máximos obtidos em cães saudáveis. As concentrações séricas de CaT corrigido e fósforo também foram maiores e o PTHi apresentou correlação positiva com o fósforo ($r=0,56$).

Gatos renais crônicos apresentaram HPSR mesmo antes do desenvolvimento da azotemia. No trabalho realizado por Finch; Syme e Elliott (2012) as concentrações de PTH aumentaram antes dos animais tornarem-se azotêmicos, esse aumento ocorreu antes das mudanças plasmáticas de cálcio e fósforo.

2.6 IMPORTÂNCIA DA DIETA NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Os objetivos no tratamento de pacientes com DRC são controlar as manifestações clínicas da uremia, minimizar os distúrbios associados a perda de fluidos, distúrbios eletrolíticos e ácido-básicos, fornecer adequado suporte nutricional e retardar a progressão da doença (POLZIN, 2005). O manejo nutricional do paciente com DRC engloba todos estes objetivos, sendo a dieta para nefropatas, quando comparada a dieta de manutenção, formulada com restrição de proteína, fósforo e sódio, com maior teor de gordura, ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e capacidade tamponante. Além disso, algumas dietas coadjuvantes formuladas para gatos doentes renais crônicos possuem maiores teores de potássio para prevenção da hipocalcemia (ALLEN; FORRESTER; ADAMS, 2010). A restrição de proteína e fósforo são duas estratégias importantes para se manejar os cães com DRC, por isso serão discutidas de forma mais detalhada nos itens 2.6.1 e 2.6.2 .

2.6.1 Restrição proteica na dieta

A relação entre dieta e doença renal crônica vem sendo estudada há mais de cinco décadas e é consenso que a modificação dietética gera benefícios ao paciente

renal, entretanto opiniões em relação ao perfil da dieta tendem a divergir. É de acordo geral que a menor ingestão proteica na dieta é indicada com o intuito de controlar as manifestações clínicas da uremia, já que muitos dos distúrbios metabólicos associados a esta condição resultam do acúmulo de resíduos derivados do catabolismo proteico. O excesso proteico na dieta é catabolizado em ureia e outros compostos nitrogenados, que normalmente seriam excretados pelo rim. Caso a ingestão de aminoácidos seja insuficiente para manter o balanço nitrogenado, haverá degradação de proteína endógena (musculatura ou parênquima de órgãos), portanto objetiva-se a manutenção deste balanço, mas ao mesmo tempo deve-se evitar o excesso, através do decréscimo da ingestão proteica proporcional ao declínio da TFG (ALLEN; FORRESTER; ADAMS, 2010).

O decréscimo da ingestão proteica pode reduzir a hiperfuncionalidade tubular ao reduzir a carga ácida e amoniogênese renal. Em geral, o metabolismo proteico é o maior gerador de íons H^+ e ao se diminuir a ingestão proteica, a dieta auxilia na manutenção do equilíbrio ácido-básico (RELMAN et al., 1961; ALLEN; FORRESTER; ADAMS, 2010).

A metionina e cisteína são exemplos de aminoácidos que contribuem para o aumento da carga ácida renal por conterem enxofre, sendo a proteína animal constituída de maiores concentrações destes em comparação a vegetal. A baixa ingestão energética (gorduras e carboidratos) e/ou proteica levará ao catabolismo dos reservatórios energéticos corporais, incluindo o catabolismo proteico para a utilização dos aminoácidos na gliconeogênese. Portanto, é necessário que se evite o excesso proteico, mas sem impor deficiência, além disso, a restrição de proteína é necessária para se conseguir a redução de fósforo da dieta (BURKHOLDER, 2000; ALLEN; FORRESTER; ADAMS, 2010).

O estudo realizado por Brenner, Meyer e Hostetter (1982) demonstrou que em ratos o consumo excessivo de proteína foi associado à hipertensão capilar glomerular e hiperfiltração. Com a redução da ingestão proteica estas alterações hemodinâmicas foram diminuídas e foi observada preservação da estrutura glomerular normal.

Polzin et al. (1983) compararam a eficiência de três dietas fornecidas durante 40 semanas para cães com DRC induzida, sendo estas, uma dieta de manutenção (44% de proteína na MS) e duas de restrição proteica (8,2% e 17,2% MS). Os animais

que recebiam as dietas com restrição demonstraram redução na mortalidade, redução da concentração sérica de ureia, assim como das manifestações clínicas secundárias à uremia. A dieta com restrição moderada demonstrou ser a mais benéfica ao *status* nutricional dos cães. Em 1988, Polzin e colaboradores observaram que a proteína dietética influenciou na função renal, proteinúria e morfologia renal de cães nefrectomizados. Neste estudo, animais alimentados com 18% de proteína demonstraram redução da proteinúria e lesão renal (POLZIN et al., 1988).

A restrição de proteína e fósforo também demonstraram benefícios para cães doentes renais crônicos alimentados com dieta comercial e dieta caseira, quando formuladas com reduzido teor de fósforo e restrição proteica moderada. Verificou-se nos dois grupos que houve redução da concentração de uréia, creatinina e relação cálcio:fósforo sanguíneo, sendo que estes parâmetros bioquímicos aproximaram-se aos parâmetros de referência para cães saudáveis (LEIBETSEDER; NEUFELD, 1991).

Passados dez anos, um estudo realizado com cães doentes renais crônicos comparou animais alimentados com dieta de manutenção e dieta renal durante dois anos. O grupo alimentado com a dieta de manutenção apresentou significativo aumento da ureia e creatinina séricas, em contrapartida, os animais que consumiram a dieta renal apresentaram retardo das crises urêmicas, ocorrendo em média 615 dias após, em contraste com a média de 252 dias do grupo controle. Ao final do experimento, 65% dos cães controle desenvolveram crises urêmicas em comparação aos 33% dos alimentados com dieta coadjuvante ao tratamento da DRC (JACOB et al., 2002).

Trabalho semelhante foi realizado em gatos com DRC espontânea estádios 2 e 3. Os animais que receberam dieta renal apresentaram menores concentrações séricas de ureia e maiores concentrações de bicarbonato, além disso, maior número de animais que receberam dieta de manutenção apresentaram episódios urêmicos (26%), em comparação aos gatos que receberam dieta coadjuvante (0%), além de redução significativa de mortes relacionadas à falência renal (ROSS et al., 2006).

A restrição de fósforo e proteína demonstrou novamente benefícios a doentes renais crônicos no estudo de Elliott et al. (2000), onde gatos alimentados com dieta renal apresentaram redução sérica de fósforo e ureia e menor aumento da concentração de PTH, em comparação aos animais que não receberam a dieta. A

média de sobrevida dos animais alimentados com a dieta coadjuvante foi de 633 dias, informação que contrastou de forma significativa ao grupo controle, que apresentou sobrevida de 264 dias.

Em cães com DRC induzida, estudou-se a relação entre a redução proteica na dieta e sua influência na morbidade, mortalidade e função renal dos animais. Os resultados demonstraram que os animais alimentados com dieta contendo 8,2% e 17,2% de proteína apresentaram redução na morbidade, mortalidade associadas à síndrome urêmica, proteinúria e na concentração sérica de ureia em comparação aos animais que recebiam dieta com 44,4% de proteína. A redução na magnitude da proteinúria também foi observada em cães com doença glomerular ao consumirem uma dieta restrita em proteína (14,1% MS) (POLZIN et al., 1984; BURKHOLDER et al., 2004).

Em relação a eficiência das dietas coadjuvantes para a doença renal crônica, um estudo retrospectivo comparou a eficácia entre dietas renais comerciais e dietas convencionais para gatos com DRC. Os pesquisadores comprovaram que a média de sobrevida dos animais alimentados com as dietas renais foi em torno de 16 meses e entre os que consumiam dietas convencionais de manutenção foi de 7 meses (PLANTINGA et al., 2005). Adams e colaboradores (1994) comprovaram os efeitos prejudiciais do excessivo consumo proteico em gatos com DRC induzida ao observarem maior proteinúria, injúria renal e alterações glomerulares nos animais que ingeriram uma dieta com 51,7% de proteína, em comparação aos 27,6% fornecido ao outro grupo (ADAMS et al., 1994). A quantidade ideal de proteína para cães com DRC ainda continua incerta. Alguns estudos relatam ausência de efeito adverso na alimentação com alta proteína em cães, sem diferenças na TFG e proteinúria nos animais alimentados com alta e baixa proteína (ROBERTSON et al., 1986; FINCO et al., 1994).

Ainda são escassos os trabalhos que identificaram relação entre a dieta e o estadiamento da doença renal crônica, principalmente nos estádios mais severos, mas atualmente o manejo nutricional na doença renal tem como foco a supressão dos sintomas urêmicos e retardo da progressão da doença renal, sendo necessários novos estudos sobre a relação da dieta renal nos diferentes estádios. O teor proteico da dieta deve ser ajustado com o intuito de minimizar os excessos que possam exacerbar em azotemia, assim como evitar restrição em demasia para que não resulte em má nutrição. Procura-se proporcionar redução das manifestações clínicas, mas

sem causar deficiência proteica, utilizando fontes proteicas de alta qualidade para minimizar os riscos de deficiência de aminoácidos essenciais na gravidade da anemia, já que estes compostos podem causar hemólise (ELLIOT, 2012).

2.6.2 Restrição dietética de fósforo

A restrição de fósforo no controle do HPSR vem sendo investigada há mais de quatro décadas, sendo esta uma das principais características das dietas coadjuvantes ao tratamento da doença renal crônica. Tal recomendação tem como objetivo diminuir sua retenção e a ocorrência de hiperfosfatemia com o propósito de se evitar o desenvolvimento do HPSR e desacelerar a progressão da doença. No entanto, alguns aspectos ainda não foram elucidados, como por exemplo, se os efeitos da diminuição dietética de fósforo geram mudanças hemodinâmicas nos rins, reduzem a mineralização renal, alteram as concentrações celulares de cálcio e fosfato ou atuam de outras formas (RITZ; GROSS; DIKOW, 2005).

Slatopolsky et al. (1971) observaram que a restrição de fósforo foi benéfica em cães com DRC induzida. Através de procedimentos cirúrgicos, os pesquisadores reduziram em até $\frac{1}{4}$ a TFG dos animais e relataram que ao oferecerem uma dieta restrita em fósforo (ingestão menor que 100 mg ao dia/animal), as concentrações de PTH sérico praticamente não se alteraram. Em contrapartida, os animais que receberam a dieta sem restrição (ingestão de 1200 mg de fósforo ao dia/animal), apresentaram aumento de PTH sérico em até 20 vezes. O mesmo grupo de pesquisadores decresceu a ingestão de fósforo pelos cães com DRC, proporcionalmente à redução da TFG e observaram que a menor ingestão de fósforo preveniu o aumento da liberação do PTH. A partir destes dois estudos, os pesquisadores concluíram a importância da restrição de fósforo na dieta e no controle do HPSR (SLATOPOLSKY et al., 1972).

Lopez-Hilker et al. (1990) corroboraram os estudos anteriores ao fornecerem quatro dietas com teores de inclusão decrescentes de fósforo (0,95%; 0,6%; 0,45% e 0,3%) para cães nefrectomizados (5/6). Os resultados demonstraram redução de aproximadamente 70% do PTH sérico quando os cães foram alimentados com a dieta formulada com 0,3% de fósforo. Barber et al. (1999) avaliaram 15 gatos doentes renais

crônicos alimentados por 5 meses com dieta restrita em fósforo e proteína. Os resultados demonstraram que apenas a dieta foi suficiente para que houvesse queda nas concentrações plasmáticas de PTH e fosfato, sendo que 8 dos animais apresentaram concentrações de PTH dentro do intervalo de referência, diferente dos animais que receberam dieta de manutenção, sem restrição de fósforo e apresentaram aumento do PTH plasmático.

A restrição mineral em cães com DRC induzida foi estudada por Brown et al. (1991). Os pesquisadores observaram que os animais que receberam menores quantidades de fósforo e cálcio na dieta, apresentaram menores concentrações plasmáticas de fosfato e creatinina. Além disso, ao final do experimento, 75% destes animais sobreviveram, em comparação aos 33% dos animais alimentados com dieta de manutenção. A perda progressiva da função renal foi associada principalmente à nefrocalcinose.

Experimento semelhante foi realizado por Finco et al. (1992a), onde os cães com DRC induzida, ao receberem uma dieta restrita em fósforo (0,4%), apresentaram maior sobrevida e TFG estável por mais tempo. O trabalho falhou em demonstrar influência da quantidade proteica da dieta nos parâmetros avaliados. Apesar da restrição de fósforo, o PTH aumentou significativamente em todos os grupos, antes e depois do fornecimento da dieta. No estudo seguinte realizado pelo mesmo grupo, os autores observaram benefícios com a restrição de fósforo e cálcio na dieta de cães (0,4% e 0,6% respectivamente), com retardo do declínio da função renal e maior tempo de sobrevida (FINCO et al., 1992b).

Alguns estudos relacionaram o aumento do fósforo sérico ao maior risco de morte em gatos com DRC. Boyd et al. (2008) constataram que o aumento de 1 unidade da concentração de fósforo sérico (mg/dL) aumentou em 11,8% o risco de morte. Kuwahara e colaboradores (2006) realizaram um estudo retrospectivo e observaram que a concentração de fosfato plasmática pode ser usada como fator prognóstico de mortalidade.

2.7 FGF-23 E A DOENÇA RENAL CRÔNICA

O fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23) é uma fosfatonina (hormônio regulador da excreção de fosfato), produzida por osteócitos e osteoblastos, e representa uma conexão direta entre os ossos, rins, paratireóides e demais órgãos envolvidos nos distúrbios do metabolismo mineral e ósseo na DRC. As concentrações circulantes de FGF-23 elevam-se após moderada lesão renal e aumentam progressivamente durante o curso da DRC, tanto pelo aumento da secreção pelos osteócitos em resposta à hiperfosfatemia, como pelo decréscimo de seu catabolismo devido ao agravamento da lesão renal. A elevação do FGF-23 tem demonstrado ocorrer previamente às alterações nas concentrações de cálcio, fósforo ou PTH, motivo pelo qual este metabólito tem sido considerado como um dos primeiros biomarcadores da DRC. Um estudo realizado por Isakova et al. (2011), no qual os autores incluíram mais de 3.800 pacientes humanos com DRC estádios 2 a 4, demonstrou-se que embora a média de fosfato sérico e PTH estivessem dentro dos intervalos de referência, a concentração sérica média de FGF-23 estava elevada e apresentava aumento com o decréscimo da TFG.

O FGF-23 está intimamente envolvido na patogênese do metabolismo mineral e ósseo da DRC, conhecidos na medicina humana como distúrbios do metabolismo mineral e ósseo da DRC (DMO-DRC) (MOE et al., 2006). A fisiologia entre o FGF-23 e a DRC não está ainda elucidada e envolve complexos mecanismos de ação. Hardcastle e Dittmer (2015) procuraram descrever de forma simples algumas de suas interações: as concentrações plasmáticas de FGF-23 elevam-se no início da DRC, entretanto não está claro o que ocorre primeiro, se o decréscimo da TFG, a hiperfosfatemia ou o aumento do FGF-23. O aumento da concentração plasmática de FGF-23 leva à inibição da expressão da enzima 1- α -hidroxilase e consequente decréscimo da concentração plasmática de calcitriol, o que resulta na perda do *feed back* negativo que este exerce no PTH. O paratormônio por sua vez, já encontra-se elevado devido ao decréscimo da concentração plasmática de cálcio resultante da hiperfosfatemia e diminuição plasmática do calcitriol, agravando ainda mais o quadro da doença (HARDCASTLE; DITTMER, 2015).

Klotho é uma proteína transmembrana expressa em tecidos que regulam a homeostase do cálcio, entre eles os túbulos contorcidos proximais e distais e glândula

paratireóide. O FGF-23 necessita desta proteína como cofator para que possa exercer seu efeito fosfatúrico. A expressão de Klotho está reduzida em injúrias renais, como na DRC. Devido a esta deficiência, a atuação do FGF-23 na excreção do fosfato nos túbulos proximais está limitada e o PTH torna-se o principal mecanismo regulador da homeostase do fosfato (OLIVEIRA; MOYSÉS, 2010; HRUSKA; SEIFERT; SUGATANI, 2015).

Até a presente data, existem poucos estudos que avaliaram o FGF-23 em gatos com DRC e/ou hipertireoidismo, e em cães há um resumo publicado em congresso até o presente momento. Em 2013, pesquisadores observaram que as concentrações de FGF-23 elevaram-se de forma paralela ao aumento das concentrações de creatinina, sendo que o valor mais elevado de FGF-23 ocorreu em gatos com hiperfosfatemia, mesmo quando comparado com animais normofosfatêmicos no mesmo estágio da DRC. Em adição, o fosfato, creatinina, PTH e cálcio total foram considerados preditores independentes das concentrações de FGF-23. Os autores concluíram que este metabólito pode ser um mediador ou marcador do HPSR em felinos (GEDDES et al., 2013a).

Em complementação ao trabalho anterior, observou-se que o fornecimento de dieta coadjuvante ao tratamento da DRC para gatos doentes renais crônicos reduziu a concentração plasmática de FGF-23. Os animais que encontravam-se hiperfosfatêmicos, antes da introdução da dieta, apresentaram redução na concentração plasmática de fosfato, PTH e FGF-23. Nos animais normofosfatêmicos, observou-se diminuição do FGF-23, embora em ambos os grupos a creatinina tenha se mantido estável (GEDDES; ELLIOTT; SYME, 2013).

Como mencionado anteriormente, o FGF-23 é secretado em resposta à hiperfosfatemia e possui efeito fosfatúrico, sendo atualmente postulado possível papel central no desenvolvimento do HPSR. Gatos com hipertireoidismo podem apresentar elevadas concentrações de fosfato e PTH. Tal achado pode ser associado à doença renal crônica subjacente. No trabalho realizado por Williams, Elliott e Syme (2011), gatos hipertireoideos, que desenvolveram azotemia durante o estudo apresentaram concentrações plasmáticas de FGF-23 mais elevadas em comparação aos animais não azotêmicos. Após a instituição do tratamento, o fosfato plasmático não decresceu nos animais pré-azotêmicos, diferentemente dos animais não azotêmicos. Os pesquisadores especularam se a elevação do FGF-23 em ambos os grupos poderia ter relação com o decréscimo da TFG.

Finch et al. (2012) avaliaram gatos geriátricos não azotêmicos e encontraram maiores concentrações de FGF-23 nos animais que tornaram-se azotêmicos no decorrer da pesquisa. Os resultados encontrados foram diferentes dos animais que mantiveram-se não azotêmicos. Além disso, o FGF-23 apresentou correlação positiva com o PTH e negativa com a TFG. Os pesquisadores concluíram que o FGF-23 pode prever o desenvolvimento de azotemia em gatos geriátricos e sugeriram associação entre o FGF-23 e o HPSR.

Em ratos com DRC em estágio inicial foram observadas concentrações séricas normais de fosfato, calcitriol diminuído e aumento na excreção de fosfato. Após a inibição da atividade do FGF-23, a excreção do fosfato decresceu, as concentrações séricas de fosfato aumentaram e as de calcitriol foram normalizadas. Estes achados indicam que a retenção de fosfato é prevenida pelas ações do FGF-23. A produção de FGF-23 pode aumentar em resposta à retenção de fosfato, o que ocorre com o declínio da função renal. No início da DRC, há néfrons suficientes para responder ao aumento do FGF-23 e assim aumentar a excreção de fosfato. Esse mecanismo compensatório resulta em concentrações plasmáticas dentro do intervalo considerado normal. Nos estágios mais avançados, o decréscimo do número de néfrons funcionais limita a capacidade de excreção do fosfato (HASEGAWA et al., 2010). Conforme discutido, o papel do FGF-23 na fisiopatologia da DRC demonstra grande importância e muitos mecanismos ainda necessitam ser elucidados.

2.8 ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E MASSA MUSCULAR NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

O fornecimento de uma dieta coadjuvante para o tratamento da doença renal crônica tem demonstrado benefícios ao prolongar a sobrevivência e retardar o aparecimento das crises urêmicas em cães com DRC. Além de tudo isso, evitar a má nutrição em pacientes renais crônicos consequente à insuficiente ingestão dietética e toxinas urêmicas é fundamental, já que na maioria dos casos de DRC em cães e gatos

a morte ou eutanásia ocorrem direta ou indiretamente devido a esta condição (LEIBETSEDER; NEUFELD, 1991; MITCH, 1997; JACOB et al., 2002; POLZIN, 2011).

A escala de avaliação do escore de condição corporal (ECC) de nove pontos foi desenvolvida por Laflamme (1997). O seu emprego na avaliação de todos os pacientes é uma das diretrizes recomendadas pelo Comitê Global de Nutrição da *World Small Animal Veterinary Association* (WSAVA). Tal avaliação reflete as consequências da ingestão alimentar e nutrientes nas últimas semanas ou meses e deve ser realizada de forma conjunta a avaliação do peso corporal, bem como do escore de massa muscular (EMM), pois avalia a quantidade de tecido adiposo, mas não a perda muscular.

Michel et al. (2011) desenvolveram a escala de quatro pontos de avaliação do escore de massa muscular (EMM) como forma de avaliar a perda de massa magra, onde 3 representa massa muscular normal; 2 = discreta perda de massa muscular; 1 = moderada perda e 0 = severa perda de massa magra.

Parker e Freeman (2011) encontraram associação entre o escore de condição corporal e o tempo de sobrevida de cães com DRC. Os autores compararam cães abaixo do peso, com cães em condição corporal ideal e acima do ideal, no momento do diagnóstico da doença e correlacionaram com o tempo de sobrevida. Observaram que os animais com baixo ECC apresentaram menor sobrevida que os animais com ECC ideal ou acima do ideal. Resultado semelhante foi encontrado em gatos com DRC, onde animais considerados caquéticos apresentaram maior frequência de óbito, quando comparados aos animais com ECC ideal (CASTRO et al., 2010). Estes estudos demonstram a importância da manutenção do ECC em animais doentes renais crônicos.

2.9 ESTRESSE OXIDATIVO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

Radical livre é qualquer átomo ou molécula que contenha um ou mais elétrons desemparelhados. Elétrons não pareados alteram sua reatividade química, muitas vezes, por gerarem maior reatividade que seu correspondente não radical (HALLIWELL, 1994). Uma variedade de moléculas derivadas do oxigênio, referidas como espécies reativas de oxigênio (EROs), são produzidas em baixas concentrações pelo metabolismo aeróbico do rim. Alguns importantes EROs renais incluem o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), que quando

presentes em excesso podem danificar lipídeos, proteínas, DNA e gerar alterações estruturais e funcionais com consequente apoptose e necrose celular (GALLE, 2001; BROWN, 2008).

Em condições normais, as células renais estão em constante reparação e baixas concentrações de EROs não prejudicam as funções deste órgão. No entanto, durante o chamado estresse oxidativo, ocorre acúmulo destes elementos, devido ao desequilíbrio entre a formação e remoção (GALLE, 2001). O estresse oxidativo é definido como o dano tecidual resultante do desequilíbrio entre a excessiva formação de compostos oxidantes e insuficientes mecanismos de defesa. Tais alterações são particularmente problemáticas na DRC, pois o tecido renal remanescente torna-se hiperfuncional, apresenta aumento na fosforilação oxidativa e consequente produção de EROs. A hipóxia ocasionada pela anemia também exacerba o estresse oxidativo, visto que os eritrócitos atuam como antioxidantes renais. A angiotensina II aumenta diretamente a produção de EROs pelas células glomerulares e tubulares ao estimular a atividade da NADPH oxidase, além da hipertensão glomerular, hiperfiltração e aumento do tráfego transglomerular de proteínas. As células tubulares precisam “trabalhar” mais para reabsorver estes solutos e assim, contribuem para o estresse oxidativo no néfron. Além disso, os pacientes com DRC podem apresentar relativa deficiência de antioxidantes. Em cães e gatos com DRC, existe a hipótese de que o estresse oxidativo contribua para a fibrose intersticial, glomeruloesclerose, hipertensão e inflamação renal (Figura 3) (LOCATELLI et al., 2003; BROWN, 2008).

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais. Este sistema é dividido em enzimático e não-enzimático. O sistema de defesa enzimático, como referido, inclui enzimas e o sistema de defesa não-enzimático inclui, especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam vitaminas, minerais e compostos fenólicos (BARBOSA et al., 2010). Os importantes sistemas antioxidantes renais incluem defesas enzimáticas, entre elas a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (LOCATELLI et al., 2003; BROWN, 2008). O estudo realizado por Galvão (2014) demonstrou que cães com DRC naturalmente adquirida apresentaram tendência à diminuição do poder antioxidante conforme o estadiamento da doença, embora os autores não tenham conseguido comprovar diferença significativa entre eles.

Figura 3 - Interação de fatores que levam a formação de espécies reativas de oxigênio na DRC

Fonte: (BROWN, 2008)

A produção de EROS está aumentada na DRC devido a complexa interação de fatores: angiotensina II, hipertensão glomerular, hiperfiltração, hipermetabolismo tubular, hipertensão sistêmica, anemia, hipóxia tecidual e inflamação

Em trabalho semelhante ao anterior, a capacidade antioxidante total (CAT) de cães doentes renais crônicos estava diminuída. Os autores também encontraram baixas concentrações de albumina plasmática, o que pode ter contribuído para a redução da CAT, já que a albumina exerce importante papel antioxidante (SILVA et al., 2013). Kogika et al. (2015) utilizaram substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para mensurar o estresse oxidativo em tecidos e células. Os autores encontraram elevadas concentrações em cães com DRC estádios 3 e 4 em comparação aos animais saudáveis, além disso houve correlação positiva entre a creatinina sérica e as concentrações plasmáticas de TBARS.

Em gatos com DRC, a atividade da glutatona-peroxidase no estágio 4 apresentou aumento em comparação ao grupo controle, embora a capacidade antioxidante total plasmática não tenha exibido alterações entre os grupos. Os autores sugeriram que os mecanismos de defesa antioxidante podem não estar comprometidos em gatos doentes renais crônicos (KROFIČ ŽEL; TOZON; NEMEC SVETE, 2014). Contrário ao trabalho anterior, Keegan e Webb (2010) observaram redução da CAT e razão glutatona/glutamina oxidada elevada em gatos com DRC, achado consistente com a ativação dos mecanismos antioxidantes.

Alguns antioxidantes naturais como a vitamina E e carotenóides podem atenuar os danos causados pelas EROs no organismo. Yu e Paetau-Robinson (2006) demonstraram que a suplementação da dieta com vitamina E, C e β -caroteno fornecida a gatos doentes renais crônicos reduziu danos no DNA celular. Efeito benéfico da suplementação de vitamina E, carotenoides e luteína também foram observados em cães com DRC induzida. O fornecimento de uma dieta combinada com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e antioxidantes demonstrou resultados aditivos em atenuar a redução da TFG, proteinúria, glomeruloesclerose e fibrose intersticial do rim (BROWN, 2008).

2.10 A INFLAMAÇÃO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A inflamação é um processo fisiológico em resposta a diferentes estímulos e necessita ser precisamente regulada, uma vez que deficiências ou excessos estão diretamente relacionados à mortalidade e morbidade do paciente. A via final comum da DRC é caracterizada pela progressiva fibrose glomerular e/ou túbulo-intersticial, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda de funcionamento dos néfrons por esclerose glomerular e atrofia tubular, onde os mecanismos inflamatórios possuem participação no processo fisiopatológico de progressão da lesão renal (RUIZ-ORTEGA et al., 2001; TRACEY, 2002; EDDY, 2005; VIANNA et al., 2011).

Especificamente em relação ao tecido renal, a inflamação participa de forma ativa dos mecanismos de progressão da lesão em doenças de diversas etiologias (Figura 4). Mediante diversos estudos, pressupõe-se que em doenças que acometem o glomérulo, os eventos ocorram na sequência abaixo:

- 1) A lesão glomerular persistente gera hipertensão capilar, com aumento da filtração glomerular e consequente passagem de proteínas para o fluido tubular;
- 2) A proteinúria de origem glomerular eleva a produção de angiotensina II, que por sua vez ocasiona a liberação de mediadores inflamatórios (citocinas e quimiocinas), as quais induzem ao acúmulo de células mononucleares no interstício renal;
- 3) O recrutamento inicial de neutrófilos é substituído por macrófagos e linfócitos T, que desencadeiam resposta imune e resultam em nefrite intersticial;

4) As células tubulares respondem ao processo inflamatório por meio de lesão da membrana basal e pela transição epitelial-mesenquimal e transformação em fibroblastos intersticiais;

5) Os fibroblastos produzem colágeno, que substituem as estrutura celular de vasos e túbulos renais, com posterior formação de cicatriz celular (EDDY, 2005; PECOITS-FILHO; SYLVESTRE; STENVINKEL, 2005; STENVINKEL et al., 2005; VIANNA et al., 2011).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, a interleucina 6 (IL-6) desempenha papel central na patofisiologia dos efeitos adversos da inflamação em pacientes renais. Além disso, concentrações séricas elevadas de IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) tem sido associadas à redução do apetite na DRC. A inflamação e caquexia são frequentes nestes pacientes e tendem a se agravar ainda mais nos estádios finais da doença (CHEUNG; PAIK; MAK, 2010).

Figura 4 - Potenciais mecanismos pelos quais as citocinas pró e anti-inflamatórias atuam durante a uremia

Fonte: (STENVINKEL et al., 2005)

A IL-6 é produzida por diversos tipos de células imunológicas e seus maiores efeitos são consequências de sua presença na circulação, podendo ocorrer em pontos distintos de sua origem. A combinação entre os efeitos locais e distintos pode ser uma das razões pelas quais a IL-6 é considerada uma “má” citocina, sendo em humanos demonstrado seu envolvimento na perda de massa muscular. Citocinas pró-inflamatórias como a IL-6 podem ainda causar má nutrição tanto pelo aumento do catabolismo proteico, quanto pela inibição do apetite (STENVINKEL et al., 2002, 2005).

O TNF- α tem a capacidade de mediar o catabolismo por diferentes mecanismos. Um deles é o aumento da hidrólise proteica e degradação da proteína muscular. Este demonstrou ativar o fator de transcrição NF- κ B, o que leva a interrupção da diferenciação do músculo esquelético e reparação de tecido muscular danificado. Além disso, a perda de massa muscular pode ocorrer devido à ativação da via proteolítica ubiquitina-proteassoma e acelerar ainda mais o processo de degradação (STENVINKEL et al., 2005). O estudo realizado por Pereira et al. (1994) encontrou maiores concentrações séricas de TNF- α em humanos adultos com DRC, quando comparados a pacientes saudáveis. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas, os pacientes renais, independente do estágio da doença, apresentaram maiores concentrações circulantes de TNF- α .

O termo caquexia tem sido usado para descrever a combinação da diminuição do apetite e o aumento do catabolismo da gordura e massa muscular, sendo caracterizada por resposta sistêmica mal adaptada que inclui anorexia, elevada taxa metabólica, perda de massa muscular e subutilização da energia fornecida pela gordura. O caquético encontra-se normalmente em anorexia e a resposta habitual quando um indivíduo saudável não se alimenta é a diminuição da taxa metabólica como mecanismo de proteção das reservas energéticas.

As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e TNF- α são capazes de induzir a anorexia pelas suas ações centrais. Comprovou-se que estas citocinas ao serem administradas por via periférica ou diretamente no cérebro resultaram em anorexia, além de modular atividades gastrointestinais, causam alterações metabólicas, afetam o sistema endócrino e modulam perfis de neurotransmissores. Os efeitos diretos destas citocinas pró-inflamatórias em neurônios sensíveis à glicose no hipotálamo demonstraram-se capazes de causar mudanças nos padrões alimentares de humanos e animais (PLATA-SALAMÁN, 1998).

A angiotensina II estimula a produção do TNF- α , sendo esta citocina associada à fibrose intersticial por estimular a diferenciação de miofibroblastos, além de estimular o NF-K β e agentes pré fibróticos. Em modelo experimental de glomerulopatia em camundongos, tanto a deficiência genética de TNF- α quanto a inibição farmacológica dessa citocina atenuaram o desenvolvimento de lesões glomerulares (KARKAR; SMITH; PUSEY, 2001).

A interleucina 10 (IL-10) é proveniente de células imunoativas, principalmente monócitos e linfócitos e tem sido considerada como uma das mais importantes citocinas anti-inflamatórias. Sua secreção ocorre após a liberação de fatores pró-inflamatórios, com o intuito de assegurar que qualquer resposta inflamatória excessiva será inibida após algumas horas. A IL-10 pode ser induzida por catecolaminas ou TNF- α , vinculando sua produção a reações de estresse ou inflamação. Como é principalmente depurada pelos rins, possivelmente pela filtração glomerular e metabolismo tubular, sua meia vida plasmática pode estar aumentada na insuficiência renal. Além disso, na uremia, os monócitos produzem quantidades maiores de IL-10 quando comparado a indivíduos saudáveis, possivelmente como consequência da ativação crônica dos monócitos (MORITA et al., 1997; BRUNET, 1998; STENVINKEL et al., 2005).

Pesquisadores compararam dois grupos de ratos, um grupo *knockout* para IL-10 e outro grupo controle, ambos com lesões de isquemia-reperfusão renal induzida. No grupo knockout foram observadas lesões tubulares e fibrose tubulointersticial mais graves e maior expressão do fator pró-fibrótico TGF- β , além do desenvolvimento de severa inflamação renal associada à elevação da IL-6. Os estudiosos evidenciaram que a IL-10 possui papel fundamental de proteção no desenvolvimento da inflamação renal e fibrose durante a DRC e Insuficiência renal aguda (SUN et al., 2016).

As causas do estado pró-inflamatório crônico na DRC não estão totalmente elucidadas, entretanto, é provável que sejam multifatoriais, sendo algumas destas ações o decréscimo da taxa de filtração glomerular, estresse oxidativo, possíveis infecções concomitantes, infecções do trato urinário, acúmulo de toxinas urêmicas, sobrecarga de fluidos, redução do *clearance* renal, aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, distúrbios no metabolismo cálcio-fósforo e HPSR (CHEUNG; PAIK; MAK, 2010).

A dieta pode influenciar na redução da inflamação na DRC, através da ação dos ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3. Estes nutracêuticos podem

atuar na hemodinâmica renal, agregação plaquetária, peroxidação lipídica, pressão sanguínea sistêmica, proliferação das células mesangiais e na concentração plasmática de lipídeos (BROWN et al., 1998; FORRESTER; ADAMS; ALLEN, 2010). Animais alimentados com maiores concentrações de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 apresentaram menores concentrações de eicosanóides da série 2 e maiores da série 3, sendo estes últimos derivados do metabolismo dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), os quais são menos potentes em induzir vasoconstrição e agregação plaquetária (FORRESTER; ADAMS; ALLEN; 2010).

O estudo de Brown et al. (1998) demonstrou que a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (EPA e DHA) na dieta de cães com doença renal crônica induzida resultou em menores concentrações de creatinina, colesterol, triglicérides, decréscimo da magnitude da proteinúria, infiltrado intersticial e glomeruloesclerose, quando comparado com cães suplementados com ácidos graxos poli-insaturados ômega-6. Os autores concluíram que a suplementação de EPA e DHA possui efeito renoprotetor. Em trabalho posterior, a suplementação com AGPI ω -3 à cães com DRC nos estádios iniciais preveniu a hipertensão glomerular e reduziu a produção de eicosanóides pró-inflamatórios (BROWN et al., 2000).

2.11 DISTÚRBIOS DO METABOLISMO AMINOACÍDICO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

As proteínas fornecidas pela dieta são necessárias por duas razões, primeiramente fornecem aminoácidos essenciais (AAE), que não podem ser sintetizados pelo organismo e são necessários para a síntese de diversas proteínas. Em segundo lugar, provêm aminoácidos não essenciais (AANE) utilizados como fonte de carbono e nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos (AA) e carbono para a gliconeogênese e/ou energia, além de componentes necessários à síntese de compostos indispensáveis, como purinas, pirimidinas, hormônios, entre outros. São 10 os AA classificados como essenciais aos cães: histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis), metionina (Met), fenilalanina (Fen), treonina (Thr), triptofano

(Trp), valina (Val) e arginina (Arg). Os mesmos AA são necessários ao homem, exceto a arginina (NRC, 2006).

Os AA não são armazenados na mesma intensidade que a gordura e carboidratos. As proteínas estruturais de todos os tecidos, especialmente os músculos, fígado e albumina, podem ser considerados como reserva aminoacídica. A proteína muscular representa a maior reserva, onde os AA podem ser removidos quando necessário, entretanto, na ocorrência de desnutrição energético-proteica (DEP), com elevação do catabolismo muscular e contínua ausência de consumo alimentar (anorexia) o resultado pode ser atrofia muscular com decréscimo de albumina, pois os esqueletos de carbono são continuamente utilizados como fonte energética (GROSS et al., 2010).

Muitos dos óbitos de cães e gatos doentes renais crônicos são resultado direto ou indireto da deficiência nutricional resultante da progressiva hiporexia e/ou anorexia associadas à doença (POLZIN, 2007). Em pacientes humanos com DRC, algumas das causas da DEP incluem a diminuição da ingestão de energia e/ou proteína, elevação de citocinas pró-inflamatórias, perda crônica de sangue devido aos distúrbios gastrintestinais e endócrinos (ex. resistência insulínica, HPSR e deficiência de calcitriol), acúmulo de produtos metabólicos, que possam induzir a perda de massa magra, tais como ácidos orgânicos e inorgânicos e perda das funções metabólicas renais (KOPPLE, 1999).

As toxinas urêmicas podem afetar o metabolismo dos aminoácidos e proteínas pela alteração das atividades enzimáticas e consequente alteração do transporte, através das membranas celulares; inibição das ligações a proteínas, desordens metabólicas e aumento da predisposição à anorexia e infecções. A fração excretada de aminoácidos é geralmente maior na insuficiência renal avançada, mas a quantidade absoluta de aminoácidos excretados pode ser normal, diminuída, ou aumentada. Em geral, a excreção urinária é tão baixa em relação à ingestão dietética, que parece improvável que a doença renal possa afetar as concentrações plasmáticas e o metabolismo dos aminoácidos (KOPPLE, 1978). Kopple et al. (1978) observaram que em humanos, podem ocorrer inúmeras anormalidades nos aminoácidos plasmáticos na doença renal. Os aminoácidos essenciais tendem a diminuir, particularmente o triptofano total, valina, leucina, isoleucina, tirosina e lisina e os não essenciais estão frequentemente aumentados, o que demonstra geralmente reduzida razão AEE/AANE.

Fukuda e Kopple (1980) encontraram padrões similares de aminoácidos plasmáticos de cães urêmicos aos de pessoas na mesma condição. Os autores encontraram decréscimo das concentrações plasmáticas de histidina, isoleucina, leucina, lisina, valina, tirosina e serina e aumento de citrulina. Os autores relataram razão serina/glicina inferior a considerada normal, mas as razões tirosina/fenilalanina, valina/glicina e AAE/AANE estavam semelhantes ao grupo controle, o que diferiu dos valores encontrados em humanos urêmicos, onde todas estas razões estavam abaixo da normalidade. Os autores questionaram se muitas das anormalidades aminoacídicas em pessoas possam ocorrer devido ao desbalanço dietético, embora neste estudo os animais não estavam recebendo dieta com restrição proteica.

No estudo realizado por Hansen et al. (1992) em cães com DRC naturalmente adquirida (estádios 2 e 3), os pesquisadores compararam dois grupos de animais, sendo um grupo composto por cães doentes renais crônicos e o outro por animais hígidos. Os cães receberam duas dietas, uma de manutenção (31% de proteína) e outra com restrição proteica (16%). Os autores relataram que quando os animais doentes renais receberam a dieta de manutenção houve redução das concentrações séricas de glutamina, leucina, prolina e serina e aumento das concentrações de cistationina e 3-metilhistidina em comparação ao grupo controle. Ao receberem a dieta com restrição proteica, houve redução apenas da serina e aumento das concentrações de cistionina, fenilalanina e 3-metilhistidina. Ao compararem o perfil de aminoácidos séricos entre os animais doentes renais ao receberam a dieta sem restrição e após a dieta com restrição, tanto o grupo dos doentes renais, quanto o controle, apresentaram redução de taurina, serina e treonina e elevação do glutamato. Em relação às concentrações urinárias de aminoácidos, ambos os grupos apresentaram excreção muito semelhante, demonstrando possível preservação renal de aminoácidos. Os autores concluíram que os cães com DRC não apresentaram severas anormalidades dos aminoácidos séricos.

A acidose metabólica é considerada uma complicação comum da DRC em cães e gatos. No estudo realizado por Jacob et al. (2002) constatou-se que 15% dos cães diagnosticados com DRC apresentaram acidose metabólica. O desenvolvimento desta alteração do equilíbrio ácido-básico ocorre em razão da falha renal e consequente incapacidade de excretar as cargas ácidas diárias provenientes do metabolismo endógeno. Os rins excretam os íons hidrogênio e promovem a reabsorção do bicarbonato filtrado, através do uso do fosfato e sulfato como agentes

tamponantes de hidrogênio e também através da amoniogênese renal. Devido ao reduzido número de néfrons funcionais, os pacientes com DRC apresentam limitações para elevar a produção de amônia e excretar hidrogênio (JACOB et al., 2002; POLZIN, 2011).

Os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, valina e isoleucina, conhecidos como BCAA (*Branched Chain Amino Acids*) são os mais abundantes na massa muscular. Há evidências de que pacientes humanos urêmicos possam apresentar metabolismo anormal destes aminoácidos, incluindo baixas concentrações no plasma e no fluido intracelular muscular. A acidose metabólica estimula a elevação da atividade da desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR). Esta enzima limita a velocidade do catabolismo dos BCAA (MITCH, 1997). A terapia de alcalinização inverte a degradação proteica associada a acidose. Especula-se que em pH intracelular baixo, que caracteriza a acidose, possa ocorrer alteração da transcrição gênica e assim, ocorre o aumento da atividade citosólica das vias proteolíticas dependentes de ubiquitina – ATP. A suplementação de bicarbonato demonstrou elevar as concentrações de valina, leucina e isoleucina na musculatura de indivíduos em hemodiálise (LÖFBERG et al., 1997; POLZIN, 2011).

A acidose metabólica tem a capacidade de induzir um ciclo de má nutrição proteica. O excessivo catabolismo proteico pode continuar este ciclo independente de adequada ingestão dietética. Este processo de forma crônica, pode acelerar a degradação de AA sulfurados, que, por sua vez, podem agravar a acidose metabólica. A necessidade proteica em humanos saudáveis e com DRC parece ser semelhante, exceto em situações de acidose. Quando o *status* ácido-básico está normal, mecanismos adaptativos promovem a redução da perda de massa muscular em adultos alimentados com dieta de restrição proteica (MITCH, 1997). Existe também a possibilidade da acidose comprometer as adaptações fisiológicas à restrição de proteínas e assim, agravar ainda mais a desnutrição, já que o catabolismo proteico encontra-se elevado em doentes com acidose como forma de prover fonte de nitrogênio para a síntese de glutamina hepática, que servirá de substrato para a amoniogênese renal (MITCH, 1997; POLZIN, 2011). A combinação dos efeitos de redução da síntese proteica devido a uremia e a acelerada proteólise, devido à acidose, promove elevação da ureia circulante e consequente aumento da excreção de nitrogênio e balanço nitrogenado negativo típico da acidose urêmica (POLZIN, 2011).

O metabolismo de proteínas e aminoácidos na doença renal pode ser afetado pela insuficiência de múltiplas funções metabólicas do próprio rim. Vários aminoácidos são sintetizados ou convertidos pelos rins e liberados na circulação, como a arginina, tirosina, cisteína, metionina (a partir da homocisteína), ornitina e serina. Assim, a perda da função renal pode contribuir para a alteração no conjunto (*pool/s*) de aminoácidos. Além disso, AA que são convencionalmente denominados como não essenciais, podem tornar-se condicionalmente indispensáveis ou essenciais (ROTH; DRUML, 2011).

O rim do ser humano desempenha importante papel na homeostase dos conjuntos (*pool/s*) de aminoácidos do organismo. Isto ocorre através da síntese, filtração, reabsorção e excreção urinária de aminoácidos e peptídeos. Em um homem saudável de 70kg, aproximadamente 50 a 70g de AA são filtrados diariamente. Desta quantidade, cerca de 97 a 98% será reabsorvido pelos túbulos proximais. Além disso, o rim é o órgão principal para a eliminação de glutamina, prolina, citrulina, cisteína e glicina do sangue arterial e lança alguns aminoácidos na circulação sistêmica, tais como a serina, cisteína, tirosina e arginina e em menores quantidades, treonina, lisina e leucina. O rim caracteriza-se por ser um órgão de elevado *turnover* proteico, sendo que a degradação proteica supera sua síntese (TESSARI et al., 1996; GARIBOTTO et al., 2010).

Chan, Rozanski e Freeman (2009) estudaram a relação dos aminoácidos plasmáticos em cães em estado crítico. Nos 48 animais enfermos avaliados (inclusos animais com pancreatite aguda, sepse e trauma) os autores constataram baixas concentrações de alanina, arginina, metionina, prolina e serina e altas concentrações de lisina e fenilalanina em comparação aos animais controle. Entre os animais sobreviventes, a arginina, isoleucina, leucina, serina e BCAAs totais apresentavam-se em maiores concentrações em relação aos que vieram a óbito

3 OBJETIVOS

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da dieta coadjuvante e manejo dietético em cães com doença renal crônica estádios 3 e 4, acompanhados pelo período de 180 dias, no metabolismo de cálcio e fósforo (fósforo, cálcio total, cálcio iônico, paratormônio e FGF-23 séricos), pressão arterial sistêmica, equilíbrio ácido básico, escore de condição corporal, escore de massa muscular, concentrações séricas de aminoácidos, citocinas inflamatórias e capacidade antioxidante total.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E LOCAL DE CONDUÇÃO DO ENSAIO

Foram selecionados 10 cães, 5 machos e 5 fêmeas, de diferentes raças, diagnosticados com doença renal crônica estádios 3 e 4, segundo a IRIS (2015) e 10 cães hígidos, escore de condição corporal e massa muscular ideal, provenientes do atendimento do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais - Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado na cidade universitária “Armando de Salles Oliveira”, município de São Paulo, Brasil, com aprovação pela “Comissão de Ética no Uso de Animais” da FMVZ/USP (protocolo nº 3138/2013).

Os cães foram selecionados de acordo com as manifestações clínicas e laboratoriais compatíveis com doença renal crônica nos estádios 3 e 4, ou seja, com concentrações séricas de creatinina entre 2,1 a 5,0mg/dL e >5,0mg/dL, respectivamente (IRIS, 2015), em quadro clínico estável, bom estado geral e que não apresentassem anorexia ou comprometimento do apetite, náusea ou vômito, afecções associadas e que não estivesse em tratamento com dieta coadjuvante.

4.2 DIETA E MANEJO ALIMENTAR DOS CÃES

A dieta experimental foi extrusada na unidade fabril da Premier Pet, localizada na cidade de Dourado – SP. Os teores nutricionais atenderam as recomendações do NRC (2006) e AAFCO (2009) para cães adultos, com exceção do fósforo e proteína, que foram reduzidos. A dieta foi fornecida gratuitamente aos tutores dos animais incluídos no estudo e estes foram orientados a seguirem as recomendações do protocolo do estudo. Os cães passaram por período de adaptação à nova dieta mediante mistura do alimento anterior à dieta experimental, que foi realizada de forma gradual até que fosse atingida a quantidade total recomendada da dieta coadjuvante. O cálculo da quantidade a ser fornecida foi efetuado de acordo com as

recomendações de necessidade energética do NRC (2006) para cães adultos, através da fórmula: $95 \times (PC)^{0,75} = \text{Kcal/dia}$ e dividida pela energia metabolizável da dieta, previamente calculada em ensaio de metabolismo no Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier Pet, localizado em Dourado - SP. As reavaliações referentes ao manejo alimentar foram realizadas periodicamente em intervalos de 07 ou 15 dias, na dependência da necessidade de cada paciente. A composição química e o perfil aminoacídico da dieta estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição química e perfil aminoacídico da dieta* oferecida para os cães incluídos no estudo

Nutrientes	
Matéria seca (%)	90,00
Proteína bruta (%)	14,50
Extrato etéreo (%)	18,00
Matéria mineral	5,50
Matéria fibrosa (%)	3,50
Cálcio (%)	0,50
Fósforo (mg/kg)	0,30
Potássio (mg/kg)	0,60
Ômega 6 (%)	2,00
Ômega 3 (%)	0,52
EPA + DHA (%)	0,65
Vitamina E	0,65
Excessos de bases (mEq/kg)	113,00
Energia metabolizável (Kcal/g)	4.072
Composição em aminoácidos	
Aminoácidos essenciais	g/100kcal de EM
Arginina	1,16
Fenilalanina	0,75
Histidina	0,33
Isoleucina	0,86
Leucina	0,98
Lisina	0,91
Metionina	0,31
Treonina	0,58
Triptofano	0,12
Valina	0,75

(continua)

Composição em aminoácidos	
Aminoácidos não essenciais	g/100kcal de EM¹
Alanina	1,07
Aspartato	1,25
Cisteína	0,07
Glicina	1,02
Glutamato	2,13
Prolina	0,52
Serina	0,76
Taurina ²	-
Tirosina	0,32

Premier Nutrição Clínica Renal Cães (Premier Pet); ¹EM – Energia metabolizável; ²A taurina plasmática não foi quantificada na análise; Ingredientes da dieta: farinha de vísceras de frango, proteína isolada de soja, ovo desidratado, quirera de arroz, milho integral moído, cevada, polpa de beterraba, gordura de frango, gordura animal estabilizada, óleo de peixe, hidrolisado de frango, antioxidante BHA, citrato de potássio, cloreto de potássio, levedura seca de cervejaria, premix mineral transquelatado (cobre, ferro, iodo, manganês, selênio, zinco), premix vitamínico (ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3

4.3 COLHEITA DE MATERIAL E EXAMES REALIZADOS

Amostras de sangue e urina foram colhidas para realização dos exames bioquímicos: Hemograma, contagem de plaquetas, determinações séricas de ureia, creatinina, albumina, proteínas totais, triglicérides e colesterol, fosfatase alcalina (FA), alanina aminotransferase (ALT), sódio, potássio, cálcio iônico (Cai), cálcio total (CaT), fósforo, triglicérides, colesterol, pH sanguíneo e concentração de bicarbonato, exame de urina (exame de urina tipo 1 e urocultura com antibiograma). Os períodos foram denominados como tempos, sendo, T0 o momento inicial, antes dos animais receberem a dieta, seguido dos tempos subsequentes T1 (30 dias), T2 (60 dias), T3 (90 dias), T4 (120 dias) e T5 (150 dias) e T6, período final, 180 dias após receberem a dieta. As coletas de sangue para determinação das concentrações de aminoácidos séricos, PTH, citocinas, capacidade antioxidante total e FGF-23 foram realizadas nos momentos T0 e T6 (Quadro 1).

Quadro 1 - Avaliações realizadas nos diferentes tempos experimentais

Período inicial (T0)	A cada 30 dias	Período final (T6)
<p>-Pesagem e exame físico</p> <p>-Colheita de sangue para hemograma, determinações séricas de ureia, creatinina, albumina, proteínas totais, triglicérides e colesterol, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, sódio, potássio, cálcio iônico (Cai), cálcio total (CaT), fósforo, triglicérides, colesterol, pH sanguíneo e concentração de bicarbonato</p> <p>-Colheita de urina para exame de urina tipo I e II</p> <p>-Determinação da pressão arterial sistêmica</p> <p>-Determinação do ECC e EMM</p>		
<div> <div> <p>-Determinação dos aminoácidos séricos, PTH, citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α; CAT, FGF-23</p> </div> <div> <p>-Determinação dos aminoácidos séricos, PTH, citocinas IL-6, IL-10 e TNF-α; CAT, FGF-23</p> </div> </div>		

4.3.1 Colheita de urina

As amostras de urina foram coletadas por cistocentese monitorada por ultrassonografia ou cateterização uretral e processadas 2h após a coleta. Para a urocultura, a urina foi processada em 30 minutos ou mantida sob refrigeração por até 2 horas.

4.3.2 Colheita de sangue

Após jejum de 12h, as amostras de sangue foram coletadas de modo asséptico das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas e acondicionadas em frascos com

EDTA¹ para hemograma e outro com gel ativador de coagulação² para obtenção de soro para exames bioquímicos, perfil aminoacídico, PTH, citocinas, capacidade antioxidante total e FGF-23.

4.3.3 Exame de urina

As análises foram realizadas de acordo com as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP. As amostras foram avaliadas em relação às características físico-químicas com a utilização de fitas reagentes Combur-Test® (Roche). A densidade foi mensurada por refratometria (marca ATAGO; modelo T2-N3) e o sedimento urinário obtido mediante prévia centrifugação e analisado por microscopia óptica. Para urocultura foi utilizado placas de cultivo (meio ágar sangue e MacConkey) e incubados a $35^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24h a 48h para verificação de crescimento bacteriano.

4.4 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Todas as análises foram mensuradas de acordo com as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP, conforme descrição abaixo.

4.4.1 Hemograma

O hemograma foi efetuado em contador eletrônico, para uso veterinário, da marca Horiba ABX®, modelo ABC Vet. O hematócrito foi determinado por meio de

¹ BD Vacutainer® K2 EDTA 3,6mg Ref 367841

² BD Vacutainer® SST™ Advance Ref 367953

tubos microcapilares e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada por microscopia óptica do esfregaço sanguíneo por microscopia de luz.

4.4.2 Creatinina e ureia

A creatinina sérica foi analisada por meio do emprego de kit comercial da marca Labtest³, pelo método picrato alcalino. A uréia sérica pelo emprego do kit comercial da marca Diasys⁴, pelo método enzimático FS urease GLDH.

4.4.3 ALT, FA, albumina, proteínas totais, triglicéride e colesterol

A atividade sérica da ALT foi analisada pelo emprego do kit comercial da marca Biosystems⁵, pelo método IFCC e a fosfatase alcalina por meio do emprego de kit comercial da marca Biosystems, pelo método IFCC/SEQC. A albumina por meio do kit comercial da marca Labtest, pelo método verde de bromocresol e as proteínas totais por meio do kit comercial da marca Labtest®, pelo método do biureto. Para as análises da concentração sérica de triglicérides foi utilizado o kit comercial da marca Biosystems®, pelo método glicerol fosfato oxidase/peroxidase e de colesterol por meio do kit comercial da marca Biosystems®, pelo método enzimático oxidase/peroxidase.

4.4.4 Cálcio sérico total, cálcio iônico, fósforo, sódio e potássio

A dosagem do cálcio sérico total foi realizada por método colorimétrico, utilizando-se ensaio comercial em analisador automático da marca Labtest®, modelo Labmax 240 com o kit de cálcio da marca Biosystems® (Ref. 11570) e metodologia colorimétrica arsenazo III (SARKAR; CHAUHAN, 1967). A fração do cálcio iônico foi

³Labtest, Lagoa Santa, Brasil.

⁴Diasys – Diagnostic System, Holzheim, Alemanha.

⁵Biosystem S.A., Barcelona, Espanha.

medida pelo método do eletrodo íon seletivo em analisador automático de eletrólitos (OMNI C, COBAS B 121 – Roche[®]). A dosagem de fósforo inorgânico foi realizada através do método enzimático colorimétrico, com o uso do ensaio comercial em analisador automático da Labtest[®], modelo Labmax 240.

A dosagem de sódio e potássio foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, com o uso do ensaio comercial em analisador automático da Labtest[®], modelo Labmax 240, com kit de sódio e potássio enzimático da Labtest[®] (ref 124 e ref. 125, respectivamente)

4.5 DETERMINAÇÃO DO pH SANGUÍNEO E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE BICARBONATO

Para esta análise, foram coletadas amostras de 0,5 mL de sangue da veia cefálica, com seringas da linha BD A-line[™] e imediatamente após a coleta, foram mensurados o pH sanguíneo venoso e bicarbonato pela técnica de hemogasometria, utilizando-se analisador automático (OMINI C, COBAS B 121 – Roche[®]) no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP.

4.6 DETERMINAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÊMICA

A pressão arterial sistólica foi mensurada nos animais experimentais e grupo controle pelo método indireto com *Doppler*. As mensurações foram realizadas antes do exame físico, coleta de materiais para exames laboratoriais ou qualquer intervenção terapêutica nosocomial e em ambiente calmo. Os manguitos utilizados apresentaram aproximadamente largura de 40% da medida da circunferência do membro torácico (em nível do terço médio – região de rádio e ulna). Caso não houvesse um manguito com a medida exata era então utilizado aquele com a medida imediatamente superior, a fim de se evitar superestimação dos valores de pressão arterial na leitura. Sempre que possível, as aferições foram realizadas pela mesma

pessoa, mantendo a mesma posição e atitude. Foram realizadas seis mensurações, sendo a primeira delas descartada. O valor considerado como a pressão arterial sistêmica sistólica do paciente (em mmHg) foi determinado pela média aritmética das medidas. Caso houvessem dúvidas quanto a mensuração, trocava-se o local de colocação do manguito e nova leitura era realizada. O diagnóstico de hipertensão sistêmica só poderia ser confirmado após duas mensurações sequenciais, com intervalo de 7 a 15 dias entre elas.

4.7 DETERMINAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR

A avaliação destas duas variáveis foi realizada em todos os momentos do estudo. O escore de condição corporal foi determinado de acordo com a escala de um a nove pontos, validada para cães por Laflamme (1997). Essa avaliação foi realizada pela mesma pessoa durante todo o período experimental para se evitar possíveis erros de avaliação pela subjetividade. O escore de massa muscular foi avaliado nos mesmos momentos, de acordo com a escala de 4 pontos (0-3) (MICHEL et al., 2011).

4.8 DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Após as coletas, as amostras de sangue foram centrifugadas e alíquotas de 0,5mL de soro foram congeladas a -80°C até serem encaminhadas para a análise. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)⁶ em coluna LUNA C18 100Å 5u 250x4,6mm 00G-4252-EQ para determinação dos aminoácidos totais. Os aminoácidos livres foram analisados em coluna HPLC Luna 3u C18(2) 100A 250x4,6mm 00G-4251-E0, baseado na técnica de White, Hart e Fry (1986). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 254nm. Todas estas análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Nutrição de Monogástricos

⁶ Agilent 1200 Series

do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP. Paralelo às análises de soro, foi realizada a análise de aminoácidos em uma amostra de 50g da dieta também pelo método HPLC.

4.9 DETERMINAÇÃO DE PARATORMÔNIO (PTH)

As amostras referentes a estas análises foram coletadas e imediatamente colocadas em gelo para serem centrifugadas a 4°C em centrífuga refrigerada (MR23i, Jouan S.A, Saint Herblain, França) no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP. Alíquotas de 1mL de soro foram armazenadas a -80° C até envio para o laboratório PROVET Ltda, localizado em São Paulo, SP, que por sua vez enviou ao *Diagnostic Center for Population and Animal Health* localizado na *Michigan State University*, East Lansing, EUA. A determinação do paratormônio intacto foi realizado por ensaio imunorradiométrico (IRMA). Este método consistiu no emprego de dois anticorpos para reconhecimento de dois epítomos distintos da molécula do PTH intacto (PTHi). As concentrações de PTH nas amostras foram determinadas por interpolação através de uma curva de calibração.

4.10 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, IL-10 e TNF- α

As amostras referentes a estas análises foram coletadas e imediatamente colocadas em gelo para serem centrifugadas a 4°C em centrífuga refrigerada (MR23i, Jouan S.A, Saint Herblain, França) no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP. Alíquotas de 1mL de soro foram armazenadas a -80°C. Ao término das coletas, as amostras foram enviadas para o Laboratório Especializado em Análises Científicas – LEAC, São Paulo – SP. As citocinas TNF- α , IL-6 e IL-10 foram dosadas em painel de citocinas Milliplex™MAP kit CCYTO-90K-03 (MILLIPORE, Billerica, Massachusetts, EUA), validada para cães, lote 2661543. As amostras e padrões foram incubados com as microesferas acopladas a um anticorpo específico. Após lavagem, foi adicionado o anticorpo de detecção

biotinilado e depois incubados com estreptavidina-PE. As amostras foram lidas no sistema de *array* líquido – Milliplex (Luminex 200, Luminex Corporation, St. Charles, Missouri, EUA).

4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)

As amostras referentes a estas análises foram coletadas e imediatamente colocadas em gelo para serem centrifugadas a 4°C em centrífuga refrigerada (MR23i, Jouan S.A, Saint Herblain, França) no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP. Alíquotas de 1mL de soro foram armazenadas a -80°C. Ao término das coletas, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório Especializado em Análises Científicas – LEAC, São Paulo – SP. Para as análises, foi utilizado o kit Quantichrom™ Antioxidant Assay (DTAC-100, Bioassay systems, Califórnia, EUA), lote BE08A22. O método baseou-se em um teste Elisa de determinação colorimétrica quantitativa da CAT, medida por meio da quantidade de Cu^{2+} que é reduzido pelos antioxidantes para Cu^+ . O Cu^+ resultante forma complexos coloridos com o reagente (corante). A unidade da cor a 570 nm é proporcional ao estado antioxidante da amostra. A leitura foi realizada na leitora Stat Fax modelo 2100 (Awareness Technology). Para a determinação das concentrações de antioxidante foi construída uma curva padrão com a expressão dos resultados em equivalentes de TROLOX μM (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

4.12 DETERMINAÇÃO DO FGF-23

As amostras referentes a estas análises foram coletadas e imediatamente colocadas em gelo para serem centrifugadas a 4°C em centrífuga refrigerada (MR23i, Jouan S.A, Saint Herblain, França) no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica/Hospital Veterinário da FMVZ/USP. Alíquotas de 1mL de soro foram armazenadas a -80° C até envio para a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade do Estado de Ohio, Columbus, Ohio, EUA. As amostras foram enviadas

devidamente refrigeradas por meio de transportadora especializada. As concentrações séricas de FGF-23 foram analisadas em kit ELISA FGF-23 (Laboratório Kainos, Tokio, Japão) de acordo com as instruções do fabricante. O kit ELISA FGF-23 foi validado para amostras caninas por Kogika et al. (2016) e demonstrou linearidade, com base nos coeficientes de variação do intra e inter-ensaio, que foram $< 7\%$.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa computacional *Statistical Analysis System* (Versão 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Os dados foram previamente submetidos à análise de normalidade dos resíduos pelo teste de SHAPIRO WILK e também testados quanto à homogeneidade das variâncias pelo teste F. Os resultados totalizaram 3 grupos, sendo estes, DRC T0 (Doentes renais crônicos T0), DRC T6 (Doentes renais crônicos após 6 meses) e grupo controle. Os dados foram analisados através de teste T pareado (DRC T0 vs DRC T6) e teste T não pareado (DRC T0 vs Controle; DRC T6 vs Controle). Os resultados que após transformações não apresentaram normalidade e/ou homogeneidade na comparação entre DRC T0 vs DRC T6, normalidade na comparação de DRC T0 vs Controle; DRC T6 vs Controle, foram então analisados por estatística não paramétrica pelo PROC NPAR1WAY do SAS, através do teste de WILCOXON, correspondente ao teste T pareado, ou pelo teste de MANN-WHITNEY, correspondente ao teste T não pareado. As correlações entre as variáveis foram realizadas por estatística não paramétrica (Correlação de Spearman). Para todas as variáveis foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Apesar de algumas variáveis terem sido avaliadas ao longo do estudo (a cada 30 dias; Quadro 1), considerou-se para análise estatística os valores dos tempos T0 e T6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos dez cães doentes renais crônicos selecionados, 2 eram sem raça definida, 1 Dachshund, 1 American Pit Bull Terrier, 1 Cocker Spaniel, 1 Labrador Retriever, 1 Golden Retriever, 1 Beagle, 1 Shih Tzu e 1 Yorkshire Terrier, com idade média de $8,89 \pm 4,46$ anos e peso corporal médio de $16,33 \pm 14,64$ kg. Durante os 6 meses de duração do estudo todos os animais apresentaram boa aceitação da dieta. Apenas um animal apresentou episódio de diarreia após a troca do alimento, que foi sanado em três dias, sem necessidade de terapia específica. Três animais foram tratados com bloqueadores H_2 (Ranitidina) e bicarbonato de sódio quando $HCO_3^- < 18$ mEq/L. Dois animais necessitaram da utilização de estimulantes do apetite (Cobavital®) e cinco animais foram tratados com quelante de fósforo (Hidróxido de alumínio). Durante o período de 6 meses do experimento todos os animais apresentaram hemograma e eritrograma dentro da normalidade para animais saudáveis e encontravam-se hidratados, com exceção de um animal que apresentou piora clínica com quadro agudo de descompensação da DRC, o qual necessitou retornar diariamente até estabilização, precisando receber fluidoterapia subcutânea de manutenção com solução fisiológica de NaCl 0,9%.

5.1 URINA

O pH urinário manteve-se dentro do intervalo de referência durante os 6 meses de observação, em T0 o pH médio foi de 6,50 e em T6 6,40, sem diferença entre os tempos ou em comparação aos animais saudáveis ($p > 0,05$). Os animais doentes renais apresentaram isostenúria em comparação aos animais hígidos (média de 1,036) tanto no tempo T0, como T6, com média de 1,014 e 1,016 respectivamente, sem diferença entre os momentos ($p > 0,05$).

5.2 PRESSÃO ARTERIAL E EQUILÍBRIO ÁCIDO BÁSICO

A pressão arterial sistólica não apresentou diferença entre os períodos inicial e final. Os animais apresentaram normotensão em ambos os tempos, com média de $138,8 \pm 8,30$ mmHg em T0 e $138,4 \pm 5,49$ em T6 (BROWN et al., 2007). O pH sanguíneo e bicarbonato sanguíneo em T0 foram de 7,33 e 21,36 e em T6 de 7,32 e 19,64, respectivamente. Ambos os valores encontravam-se dentro dos intervalos de referência para a espécie. Tanto o pH sanguíneo, quanto o bicarbonato não demonstraram diferença estatística entre os tempos T0 e T6 ($p=0,7049$ e $p=0,0729$, respectivamente), resultados que demonstram manutenção da capacidade tamponante. No entanto, três dos dez animais precisaram ser tratados com suplementação de bicarbonato de sódio quando $\text{HCO}_3^- < 18$ mEq/L.

Devido à diminuição do número de néfrons em decorrência da DRC, os néfrons remanescentes necessitam excretar maior quantidade de H^+ para a manutenção do balanço ácido do organismo. Para que isso ocorra, cada néfron precisa aumentar tanto a excreção de ácido titulável (H^+ excretado com os tampões urinários, como o tampão amônia e tampão fosfato) quanto de amônio (NH_4^+). Em condições normais não haveria a possibilidade de elevar a excreção de ácidos tituláveis, mas devido ao aumento da TFG por néfron, há também a de tampões fixos e com isso a taxa de ácido titulável pelos rins permanece estável até fases avançadas da DRC.

A excreção de amônio também eleva-se para que o tecido renal remanescente consiga manter por mais tempo o balanço de ácidos fixos (ácido titulável e amônio). Em humanos, quando a TFG decai abaixo de 30% do normal (fases finais da DRC), torna-se impossível para o rim neutralizar os ácidos gerados pelo organismo, o que resulta em quadro progressivo de acidose metabólica (ZATZ, 2011). Somado a isto, cães no estágio 3 da DRC demonstraram ávida reabsorção de bicarbonato, tanto no túbulo proximal, quanto distal em comparação a cães no estágio 1, demonstrando que esta adaptação renal auxilia na manutenção do equilíbrio ácido-básico, mesmo nas fases avançadas da DRC (WONG; QUAMME; DIRKS, 1984).

5.3 PERFIL BIOQUÍMICO

Os triglicérides, sódio, potássio, ALT e FA dos animais doentes renais crônicos encontravam-se dentro do intervalo de referência para a espécie nos momentos T0 e T6. No tempo T0 a concentração sérica de colesterol apresentou-se levemente elevada, média de 294mg/dL (referência 125 a 270mg/dL) em relação aos animais saudáveis ($p=0,0350$), possivelmente pela maior concentração de gordura da dieta de prescrição para nefropatas. O aumento não demonstra relevância clínica, pois em cães, valores de colesterol entre 300mg/dL e 500mg/dL são considerados como pouco elevados (WHITNEY, 1992). As concentrações séricas de proteína total e albumina são consideradas indicadores bioquímicos do status nutricional e, no presente estudo, não se diferenciaram entre os tempos T0 e T6 ($p=0,7772$ e $p=1,0000$, respectivamente). Os valores encontrados nos dois momentos de avaliação estavam dentro do intervalo de referência para cães saudáveis.

5.3.1 Creatinina e ureia

As concentrações séricas de uréia não apresentaram diferença entre os tempos T0 e T6 ($p=0,1871$), mas a creatinina demonstrou elevação no mesmo período ($p=0,0022$; Tabela 3). No início do estudo, dos dez animais selecionados, apenas um dos cães estava já no estágio 4 (creatinina sérica = 5,1mg/dL). Dos demais animais, dois evoluíram para o estágio 4 ao longo dos 6 meses, demonstrando progressão da doença.

Em alguns animais com DRC a função renal pode apresentar declínio linear, ao passo que em outros, a função renal mantém-se estável por determinado período, seguido por queda brusca (POLZIN, 2011). As orientações apresentadas pela IRIS (2015) postulam que a mudança de dieta para um alimento coadjuvante deve ser realizada a partir do estágio II, com exceção aos casos que apresentam valores de RPC entre 0,2 e 0,5 (*borderline*), no estágio I, aos quais já se recomenda a instituição do manejo dietético com alimento de prescrição, devido à proteinúria.

No estudo realizado por Jacob et al. (2002), cães doentes renais crônicos (creatinina sérica entre 2 e 8mg/dL) alimentados com dieta restrita em fósforo e proteína, durante o período de dois anos, apresentaram elevação da creatinina sérica. Apesar da doença ter demonstrando progressão, os animais apresentaram frequência três vezes menor de crises urêmicas e tempo de sobrevivência três vezes maior em comparação ao grupo de cães com DRC alimentados com dieta de manutenção. Os autores ressaltaram a importância do estudo em demonstrar que, embora a dieta não consiga impedir a inexorável progressão da doença, pode-se aumentar a sobrevivência dos animais e melhorar sua qualidade de vida.

São escassos os estudos que avaliaram o papel da dieta coadjuvante para o tratamento da doença renal crônica nos diferentes estádios da doença. Cabe ressaltar que o presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos da dieta restrita em fósforo e proteína em cães com doença renal crônica espontânea e avançada (estádios 3 e 4).

5.3.2 Fósforo

A concentração de fósforo nos animais doentes renais apresentou valores elevados quando comparados aos do grupo controle, tanto no tempo T0 ($p=0,0004$), quanto no T6 ($p<0,0001$). A concentração sérica de fósforo dos animais com DRC não apresentou diferença entre os tempos (Tabela 2; Figura 5), achado que demonstra que a combinação entre a dieta coadjuvante e o tratamento terapêutico foi eficiente em manter as concentrações deste mineral constantes. Como mencionado anteriormente, durante o estudo, 5 dos 10 animais necessitaram receber quelante de fósforo, pois a restrição dietética deste contribuiu no retardo da doença ao auxiliar a manutenção das concentrações de fósforo, contudo nos estádios mais avançados, muitas vezes faz-se necessária a utilização de quelantes de fósforo para controle (POLZIN, 2011).

Segundo a IRIS (2015), concentrações de fósforo sérico acima de 4,5mg/dL classificam os cães como hiperfosfatêmicos. Nos tempos T0 e T6, 60% e 80% dos animais, respectivamente, apresentaram hiperfosfatemia. Semelhante ao presente estudo, Martínez e Carvalho (2014) relataram concentrações séricas de fósforo nos estádios 3 e 4 diferentes não apenas dos animais hígidos, mas também dos doentes

renais estádios 1 e 2. Os achados do presente estudo também foram semelhantes aos encontrados por Cortadellas et al. (2010), onde no estágio 1 -18% dos animais apresentavam hiperfosfatemia, no 2- 40%, 3- 92% e 100% no estágio 4. Os autores concluem que a retenção de fósforo pode ocorrer já nos estádios iniciais da doença. Em gatos doentes renais crônicos os resultados foram semelhantes: 2% no estágio 1, 20% dos animais no estágio 2 apresentaram hiperfosfatemia, 49% no 3 e 100% no 4 (BARBER; ELLIOTT, 1998).

Figura 5 - Concentrações séricas de fósforo de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6

A elevação das concentrações séricas de fósforo tem sido associada ao aumento da mortalidade em cães, gatos e pessoas (BROWN et al., 1991b; FINCO et al., 1992b; BLOCK et al., 1998; KUWAHARA et al., 2006; BOYD et al., 2008). Finco et al. (1992a) observaram que a sobrevivência de cães doentes renais crônicos aumentou ao serem alimentados com dieta de baixo fósforo (0,4%) em comparação aos animais que apresentaram maior ingestão deste mineral (manejados com dieta que continha 1,4%). King et al. (2007) relataram associação entre altas concentrações de fosfato (>6,8mg/dL) no plasma e menor longevidade em gatos. Boyd et al. (2008) constataram que o aumento de 1mg/dL na concentração de fósforo sérico elevou para 11,8% o

risco de morte em gatos. No presente estudo, apesar de não ter sido observado redução da concentração sérica de fósforo na avaliação final, pode-se inferir que a dieta foi eficaz em evitar a elevação sérica de fósforo em relação ao tempo inicial.

Conforme já mencionado, elevações nas concentrações séricas de fósforo podem ocorrer nos estádios iniciais da DRC, ponto que reforça a recomendação do controle na ingestão já nos primeiros estádios. Resultados positivos através do controle dietético de fósforo foram encontrados por Elliott et al. (2000), onde o emprego uma dieta restrita em proteína (14%) e fósforo (0,58%) no manejo alimentar de gatos com DRC demonstrou resultado positivo na redução da concentração de fosfato sérico. Em contrapartida, no trabalho de Jacob et al. (2002) os autores não encontraram diferenças nas concentrações de fósforo entre os grupos. Embora os pesquisadores não tenham encontrado diferença, o grupo que consumiu dieta coadjuvante apresentou concentração sérica média de fósforo menor (5,1mg/dL) que o grupo que não havia recebido a dieta restrita em proteína e fósforo (6,6mg/dL).

Tabela 2 - Concentrações séricas de uréia, creatinina, cálcio total, cálcio iônico, fósforo, paratormônio e FGF-23 de cães com doença renal crônica nos momentos T0 e T6 e cães saudáveis do grupo controle.

Variáveis	Tratamentos			DRC T0 vs DRC T6		DRC T0 vs Controle		DRC T6 vs Controle	
	DRC T0	DRC T6	Controle	P	EPM	p	EPM	p	EPM ²
Ureia (md/dL)	206,07	235,34	39,29	0,1871	13,75	<0,0001	20,43	0,0002 ¹	-
Creatinina (mg/dL)	3,11	4,30	1,12	0,0022	0,34	0,0002 ¹	-	<0,0001	0,45
Cálcio total (mg/dL)	11,33	11,94	10,73	0,3129	0,34	0,1950	0,23	0,0847	0,34
Cálcio iônico (mmol/L)	1,41	1,38	1,41	0,2327	0,02	0,9730	0,01	0,3442	0,02
Fósforo (mg/dL)	5,15	5,36	3,34	0,6309	0,28	0,0004	0,32	<0,0001	0,30
Paratormônio (pg/mL)	145,81	336,48	-	0,2077	70,62	-	-	-	-
FGF-23 (pg/mL)	5645,67	5788,56	-	0,8580	1157,67	-	-	-	-

¹Teste não paramétrico (Mann Whitney)

² EPM – erro padrão da média

5.3.3 Cálcio total e cálcio iônico

As concentrações séricas de cálcio total e cálcio iônico não apresentaram diferenças no grupo DRC nos momentos T0 e T6 e nem quando estes valores foram comparados com o grupo controle (Tabela 2). Os animais encontravam-se hidratados quando as amostras foram coletadas, com o intuito de não mascarar os valores séricos de cálcio. Estes resultados demonstram que o CaT e Cai mantiveram-se semelhantes aos valores dos animais hígidos. Nas figuras 6 e 7 estão ilustradas as variações nas concentrações séricas de CaT e Cai, nos momentos T0 e T6, respectivamente.

Figura 6 - Concentrações séricas de cálcio total de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6

Figura 7 - Concentrações séricas de cálcio iônico de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6

O acúmulo de fosfato, ocasionado pelo comprometimento renal favorece a hipocalcemia ionizada de duas formas, primeiro pela formação de complexos séricos entre fosfato e cálcio; segundo, ao inibir a atividade da enzima 1α -hidroxilase, responsável pela hidroxilação do 25-hidroxicolecalciferol (calcidiol) nos túbulos renais e formação do calcitriol, forma ativa da vitamina D. Menores concentrações de calcitriol resultam em menor absorção intestinal de cálcio (SCHENCK; CHEW, 2003; POLZIN, 2011; GIOVANINNI, 2015).

O Cai apresentou-se elevado em um animal no T0 e T6 e diminuído em apenas um animal no tempo T6 (n=10). Em contrapartida, os valores encontrados de CaT foram maiores em relação aos de referência em 50% dos animais no tempo T0 e 40% no T6. Nenhum animal apresentou hipocalcemia calciônica total. Ao se comparar as proporções de hipercalcemia e hipocalcemia entre o CaT e Cai, pôde-se observar tendência do CaT em superestimar a hipercalcemia e subestimar a hipocalcemia do Cai

Os resultados encontrados no presente estudo foram semelhantes aos publicados por outros autores. Um estudo avaliou 490 cães com DRC e os resultados de cálcio total não refletiram as de cálcio iônico, pois 22% destes animais apresentaram hipercalcemia total (CaT) e 19% hipocalcemia total. Já as concentrações de cálcio ionizado demonstraram elevação em apenas 9% dos animais e 36% apresentaram decréscimo. O cálcio total sérico elevado em pacientes com DRC ocorre predominantemente como consequência do aumento da complexação de cálcio com ânions como citrato, fosfato ou sulfato (SCHENCK; CHEW, 2003; CHEW; DiBARTOLA; SCHENCK, 2011).

No estudo de Kogika et al. (2006) as concentrações séricas de cálcio iônico em cães doentes renais crônicos estavam diminuídas em comparação ao grupo controle, 56% (n=25) dos cães apresentaram hipocalcemia iônica e em 24% o Cai estava aumentado. A concentração de CaT não se diferenciou dos animais hígidos, demonstrando hipocalcemia total em apenas 8% dos animais e hipercalcemia em 16%.

Ao contrário dos achados anteriores, Martínez e Carvalho (2014) não encontraram diferença no CaT de cães nos estádios 3 e 4 em comparação aos estádios 1 e 2, mas observaram elevação do Cai nos animais em estádios mais avançados.

5.4 PARATORMÔNIO (PTH)

Não foi observada diferença nas concentrações séricas de PTH no grupo de cães doentes renais nos momentos T0 e T6 (Tabela 3). Em T0, oito dos dez animais apresentavam hiperparatireoidismo (paratormônio > 55pg/mL)⁷ e em T6, sete apresentaram HPSR. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística significativa, na figura 8 pode-se observar que no momento T6 os valores mais elevados demonstram importante relevância biológica. Em T0 os valores variaram de 12,38 a 674,28pg/mL e no momento T6 a variação foi de 4,76 a 811pg/mL.

⁷ Valores fornecidos pelo Laboratório.....(4,7 a 54,5pg/mL)

Figura 8 - Concentrações séricas de paratormônio (PTH) de cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6

Lazaretti et al. (2006) também encontraram valores discrepantes de PTHi em cães com DRC, que variaram de 15 a 1658 pg/mL. Em cães hígidos, os valores mínimo e máximo encontrados foram de 2,50 a 176 pg/mL, respectivamente. Os autores verificaram alta frequência de HPSR em cães com DRC: dos 30 cães avaliados, 28 apresentaram elevação do PTHi sérico em comparação aos animais hígidos.

Barber e Elliott (1998) encontraram resultados semelhantes, com alta prevalência de HPSR em gatos com DRC. Dos 80 animais avaliados, 84% apresentaram elevação de PTHi, 47% no estágio 2; 87% no estágio 3 e 100% no estágio 4.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram os de Cortadellas et al. (2010) que observaram 96% de prevalência de HPSR em cães doentes renais crônicos estádios 3 e 4. Os autores apontaram o HPSR como a anormalidade mais comum no metabolismo de cálcio e fósforo, inclusive como precedente ao desenvolvimento de hiperfosfatemia.

Os estudos que avaliaram os efeitos do manejo dietético nas concentrações séricas de PTH demonstraram resultados variados. No trabalho de Jacob et al. (2002)

não foram observadas diferenças nas concentrações de paratormônio entre os grupos, entretanto, um ano após o estudo, os valores médios de PTH quase dobraram em relação aos valores iniciais, independente da dieta consumida pelos cães. Em experimento análogo realizado com gatos doentes renais estádios 2 e 3, não houve alteração do PTH sérico tanto no grupo que recebeu dieta renal, quanto no que recebeu dieta de manutenção, demonstrando que a dieta não influenciou nas concentrações de PTH durante os dois anos de estudo (ROSS et al., 2006).

Em contraste aos estudos apresentados anteriormente, Elliott et al. (2000) observaram redução do PTH sérico em gatos doentes renais crônicos ao fornecerem dieta restrita em fósforo (0,58%) e proteína (14%), em comparação ao grupo alimentado com dieta de manutenção.

Com base nos resultados encontrados no presente estudo, ao se considerar que foram incluídos somente animais em estádios avançados da DRC, espera-se maior variação nas concentrações de PTH. Como não foi encontrada diferença entre os tempos inicial e final, nos valores de fósforo sérico, pode-se inferir que a dieta contribuiu para a estabilização da liberação de PTH.

5.5 FGF-23

Os resultados das concentrações séricas de FGF-23 estão apresentados na tabela 2 e ilustrados na Figura 9. Nos 6 meses de acompanhamento, três dos dez animais apresentaram decréscimo das concentrações de FGF-23 e sete demonstraram elevação. No entanto, não houve diferença entre os tempos T0 e T6. Os valores médios encontrados no tempo T0 e T6 foram de 5.645,67 e 5.788,56pg/mL, respectivamente (Figura 9).

Geddes et al. (2013a) encontraram em seu estudo concentrações médias de FGF-23 de 1.282pg/mL em gatos com DRC estágio 3 e de 33.478pg/mL no estágio 4. Os valores médios encontrados para gatos geriátricos (controle) variaram de 54 a 700pg/mL. Os autores questionaram os altos valores encontrados nos animais saudáveis e levantaram a hipótese dos gatos serem adaptados ao consumo de alta proteína e, conseqüentemente, maior ingestão de fósforo.

Figura 9 - Concentrações séricas de FGF-23 em cães doentes renais crônicos nos momentos T0 e T6

A retenção de fósforo ocasionada pelo decréscimo da taxa de filtração glomerular está relacionada ao desenvolvimento do HPSR. O FGF-23 é um hormônio fosfatúrico, que atenua a retenção do fósforo e suas concentrações plasmáticas elevam-se logo no início da DRC em humanos, entretanto não está claro o que ocorre primeiro, se é o decréscimo da TFG, a hiperfosfatemia ou o aumento do FGF-23 (GUTIERREZ et al., 2005; HARDCASTLE; DITTMER, 2015).

No trabalho realizado por Williams, Elliott e Syme (2011) gatos hipertireoideos, que desenvolveram azotemia durante o estudo, apresentaram concentrações plasmáticas de FGF-23 mais elevadas em comparação aos animais não azotêmicos. Após a instituição do tratamento, o fosfato plasmático não decresceu nos animais pré-azotêmicos, diferente dos animais não azotêmicos. Os pesquisadores ficaram na dúvida se a elevação do FGF-23 em ambos os grupos teve relação com o decréscimo da TFG.

Semelhante ao trabalho anterior, o FGF-23 demonstrou predizer o desenvolvimento da azotemia em gatos geriátricos. Durante 12 meses, os autores observaram que os animais que apresentavam FGF-23 elevado no início do estudo

desenvolviam azotemia, ao passo que os animais que mantinham concentrações normais, mantiveram-se não azotêmicos. Além disso, os pesquisadores encontraram correlação positiva entre o FGF-23, creatinina e PTH plasmático. A taxa de filtração glomerular e o FGF-23 demonstraram correlação negativa (FINCH et al., 2013).

No estudo realizado por Geddes et al. (2013a), em gatos doentes renais crônicos, os pesquisadores constataram elevação linear entre o FGF-23 e as concentrações de creatinina plasmática. Os autores observaram que o FGF-23 estava mais elevado nos gatos azotêmicos e com hiperfosfatemia, em comparação aos animais normofosfatêmicos (no mesmo estágio da doença), sugerindo que o FGF-23 possa ser um mediador ou preditor do HPSR em felinos.

Diferente do presente estudo, gatos doentes renais crônicos que foram alimentados com dieta coadjuvante ao tratamento da DRC demonstraram redução da concentração plasmática de FGF-23. Os animais hiperfosfatêmicos antes do início do estudo, apresentaram redução de fosfato, PTH e FGF-23. Já os gatos normofosfatêmicos apresentaram apenas diminuição do FGF-23, embora em ambos os grupos a creatinina tenha se mantido estável. Os autores apontaram que a dieta restrita em fosfato auxiliou na manutenção das concentrações séricas de fósforo e FGF-23 dentro do intervalo de referência em gatos com DRC (GEDDES; ELLIOTT; SYME, 2013).

Até o momento, não foram encontrados trabalhos publicados que tenham avaliado as concentrações de FGF-23 em cães com DRC associado aos possíveis efeitos do manejo dietético nas concentrações deste marcador, fato este que dificulta a discussão dos resultados encontrados. No entanto, ao se considerar que foram incluídos cães com DRC avançada (estádios 3 e 4) e os resultados não terem sido diferentes nos momentos inicial e final, pode-se afirmar que a dieta foi importante para desacelerar a progressão da doença, com base nos resultados deste marcador.

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE PTH, CÁLCIO TOTAL, CÁLCIO IÔNICO, FÓSFORO, FGF-23, CREATININA E UREIA

As correlações entre as concentrações séricas de PTH, cálcio total, cálcio iônico, fósforo, FGF-23, creatinina e uréia no tempo T0 e T6 estão apresentadas na

Tabela 3. As concentrações séricas de PTH apresentaram correlação positiva com as de creatinina e uréia. O cálcio iônico apresentou correlação negativa com a uréia. O fósforo sérico apresentou correlação positiva com o FGF-23. A uréia e creatinina apresentaram correlação positiva, como o esperado.

Tabela 3 - Correlações de Spearman entre as concentrações séricas de PTH, cálcio total (CaT), cálcio iônico (Cai), fósforo, FGF-23, creatinina e uréia de cães com DRC nos tempos T0 e T6

Variáveis	PTH	CaT	Cai	Fósforo	FGF-23	Creatinina	Uréia
PTH	1,00	-0,02 ^{NS}	-0,43 ^{NS}	0,40 ^{NS}	0,31 ^{NS}	0,45*	0,67**
Cálcio total		1,00	0,38 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,33 ^{NS}	-0,01 ^{NS}	-0,02 ^{NS}
Cálcio iônico			1,00	-0,27 ^{NS}	0,13 ^{NS}	-0,34 ^{NS}	-0,59**
Fósforo				1,00	0,51*	0,14 ^{NS}	0,38
FGF23					1,00	0,26 ^{NS}	0,24 ^{NS}
Creatinina						1,00	0,62**
Ureia							1,00

NS - Não significativo

*p<0,05; **p<0,01

Nos estádios mais avançados da doença renal crônica, há menor número de nefróns remanescentes e com isso, menor capacidade de excreção do fosfato e consequente hiperfosfatemia. O aumento do fósforo favorece o decréscimo de cálcio iônico pela formação de complexos plasmáticos com o fosfato e pelo decréscimo do calcitriol e com isso, ocorre menor absorção intestinal de cálcio. A consequente hipocalcemia estimula a síntese de PTH como forma de controlar o equilíbrio do cálcio e fósforo (POLZIN, 2011).

Semelhante ao presente estudo, Finch; Syme e Elliott (2012) não encontraram correlação entre as concentrações plasmáticas de PTH e fósforo, mas obtiveram correlação positiva entre PTH, creatinina e uréia plasmáticos ao avaliarem gatos geriátricos azotêmicos. Os pesquisadores descreveram que o fato de não haver correlação significativa entre o PTH e fósforo, possa sugerir que outras variáveis, além do fósforo e cálcio, podem estar envolvidas na regulação do PTH. A correlação positiva com a creatinina e uréia era esperada, pois com a deterioração da função renal, as concentrações de PTH tendem a se elevar como mecanismo compensatório para a manutenção das concentrações de fosfato.

Por outro lado, Lazaretti et al. (2006) encontraram correlação positiva entre fósforo e PTHi séricos em cães doentes renais crônicos. Cortadellas et al. (2010), da mesma forma, encontraram correlação entre fósforo e PTH circulante, além de fraca correlação negativa entre o PTH e o Cai. Semelhante aos trabalhos anteriores, Barber e Elliott (1998) relataram em gatos doentes renais crônicos associação entre PTH e fosfato. Estes autores demonstraram que 50% da variabilidade das concentrações do PTH foram explicadas por mudanças nas concentrações séricas de fosfato.

Giovaninni et al. (2013) encontraram correlação positiva entre PTHi e fósforo ao avaliarem 40 gatos doentes renais crônicos nos estádios de 2,3 e 4 e correlação negativa com o cálcio iônico. No presente estudo, é possível que o número de animais avaliados (n=10), não tenha sido suficiente para se encontrar correlação significativa entre o PTH e fósforo.

Por outro lado, a correlação positiva entre FGF-23 e fósforo observada no presente estudo, corrobora os achados de Geddes, Elliott e Syme (2013), os quais verificaram correlação positiva entre FGF-23, creatinina, fosfato e PTH em gatos azotêmicos alimentados com dieta coadjuvante renal. Os autores observaram que o FGF-23 apresentou elevação simultânea à de creatinina plasmática e também se correlacionou com as concentrações plasmáticas de PTH, além de apresentarem maiores valores nos animais hiperfosfatêmicos.

De forma contrária, Finch et al. (2013) ao avaliarem gatos azotêmicos e não azotêmicos, não encontraram correlação entre fosfato e FGF-23. No entanto, houve correlação entre FGF-23, PTH e creatinina plasmática. Os autores apontaram o limitado número de animais avaliados e o fato de alguns gatos não apresentarem anormalidades funcionais no rim e por isso a não correlação entre FGF-23 e fosfato sérico.

5.7 CITOCINAS

As concentrações das citocinas séricas IL-6, IL-10 e TNF- α não demonstraram alteração significativa entre os tempos T0 e T6, demonstrando que durante os seis meses em que os animais consumiram a dieta coadjuvante o status inflamatório

permaneceu constante (Tabela 4). Até o presente momento não foram encontrados estudos que tenham avaliado o perfil de citocinas inflamatórias ou anti-inflamatórias em cães com doença renal crônica e nem informações relacionadas aos efeitos do manejo dietético na possível modulação na produção de citocinas em cães com DRC. Dessa forma, as informações encontradas no presente estudo foram comparadas e ou discutidas com trabalhos em humanos.

Tabela 4 - Concentrações séricas das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- α de cães doentes renais crônicos nos tempos T0 e T6

Variáveis	Tratamentos		DRC T0 vs DRC T6	
	DRC T0	DRC T6	P	EPM
Citocinas				
IL-6 (pg/mL)	52,67	97,26	0,1486	30,37
IL-10 (pg/mL)	6,93	9,04	0,6276	2,37
TNF- α (pg/mL)	9,34	15,87	0,2891	5,20

Em trabalho relativamente recente, Barreto et al. (2010) observaram que as concentrações de IL-6 aumentaram com a progressão da DRC em pessoas, inclusive encontravam-se elevadas, já nos estádios iniciais da doença. Os autores relataram associação entre IL-6 e mortalidade dos pacientes, sendo que esta demonstrou maior índice de predição em comparação ao TNF- α .

Em humanos, a elevação das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 demonstraram estar associadas ao maior risco de morte em pacientes com insuficiência renal aguda. As concentrações séricas destes mensageiros intercelulares eram maiores em pacientes que vieram a óbito. Quando comparadas a pacientes doentes renais crônicos em estágio final, apresentaram concentrações 10 a 20x maiores nos pacientes com IRA grave. Os autores demonstraram que para cada aumento de uma unidade (log) de IL-6 e IL-10, as chances de morte elevaram-se em 65% e 34%, respectivamente. Os mesmos sugeriram que a relação da IL-10 com o óbito dos pacientes possa ser devido ao seu poder em inibir respostas inflamatórias dos monócitos à endotoxinas, entre outros estímulos, como possível justificativa para que esta citocina anti-inflamatória possa contribuir para o agravamento da doença (SIMMONS et al., 2004).

Kalantar-zadeh et al. (2004) encontraram associação entre citocinas inflamatórias e disorexia ao avaliarem 331 pacientes humanos em hemodiálise. Os

autores encontraram maiores concentrações séricas de IL-6 e TNF- α em pacientes que relatavam apetite diminuído ou muito diminuído, além disso, constataram aumento de 4 a 5 vezes no risco de mortalidade em pacientes hiporéticos, em comparação aos com apetite normal.

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) demonstraram associação com marcadores inflamatórios circulantes no estudo de Ferrucci et al. (2006). Os autores avaliaram as concentrações plasmáticas de AGPI e sua relação com as concentrações de IL-6, IL-10 e TNF- α em 1.123 pessoas cardiopatas. Houve associação entre concentrações mais baixas de EPA na circulação e aumento da IL-6 e menores valores de DHA e decréscimo de IL-10.

A presença de maiores concentrações de óleo de peixe na composição da dieta empregada no presente estudo pode ter contribuído para uma menor elevação das citocinas inflamatórias, como comprovado no estudo de Brow (2008) que demonstrou que a suplementação de EPA e DHA (óleo de peixe) na dieta de cães, reduziu a concentração de alguns eicosanóides inflamatórios na urina, mas não foram avaliadas citocinas.

5.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

A média da capacidade antioxidante total (CAT) em T0 e T6 foi de 50,64 e 62,71, respectivamente, sem diferença entre os tempos ($p=0,6758$), demonstrando que possivelmente o consumo da dieta coadjuvante durante os 6 meses foi eficiente na manutenção da capacidade antioxidante dos cães doentes renais. No entanto, ao se confrontar os resultados encontrados no presente estudo com os publicados na literatura, as informações são contraditórias. Um ponto importante que deve ser considerado é a variação das metodologias empregadas para a avaliação desta variável.

Na DRC, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) é particularmente problemática devido também a hiperfuncionalidade dos néfrons remanescentes. Além disso, o estado de má nutrição que o doente renal crônico em estágio avançado normalmente apresenta, culmina na redução da disponibilidade de vitaminas antioxidantes (LOCATELLI et al., 2003; BROWN, 2008).

Galvão (2014) avaliou o *status* antioxidante de cães doentes renais crônicos que não receberam qualquer tratamento ou dieta coadjuvante anterior, nos quatro diferentes estádios da doença. O autor observou tendência à diminuição da CAT conforme a progressão da doença, embora os resultados não tenham diferido entre os estádios da DRC ou entre os animais doentes e saudáveis. Resultado semelhante foi obtido por Krofič žel; Tozon e Nemec Svete (2014), onde a CAT não diferiu entre gatos com DRC e saudáveis. O estudo sugeriu que os mecanismos de defesa antioxidante podem não apresentar alterações em gatos doentes renais crônicos.

Em contrapartida, Silva et al. (2013) relataram redução da CAT em cães doentes renais crônicos estádios 3 e 4, quando comparados com cães hígidos, mas não observaram variação entre os diferentes estádios da doença. O mesmo foi observado em gatos doentes renais crônicos, que apresentaram CAT reduzida em relação aos animais hígidos. Os autores relataram ainda, elevada razão GSH/GSSH, demonstrando ativação dos mecanismos antioxidantes (KEEGAN; WEBB, 2010).

A associação entre antioxidantes naturais, provenientes da dieta, e sua capacidade em diminuir o estresse oxidativo foi comprovada por Yu, Gross e Allen (2006) ao suplementaram vitamina E, C e β -caroteno para cães com DRC estádios 2 e 3. Como resultados, o estudo demonstrou significativa redução do estresse oxidativo, creatinina sérica e aumento do peso corporal em comparação ao grupo alimentado com dieta sem suplementação. Efeito similar foi observado em gatos com DRC suplementados com vitamina E, C e β -caroteno (YU; PAETAU-ROBINSON, 2006).

5.9 PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR

O peso corporal médio dos cães com DRC em T0 foi de 16,34 kg e em T6 de 14,78 kg. Houve redução significativa do peso corporal médio entre os tempos T0 e T6 ($p=0.0453$), com redução média de 1,5 kg nos 6 meses de observação. A progressão da doença e o desenvolvimento da uremia tendem a resultar na menor aceitação da dieta. No presente estudo, mesmo com a grande maioria dos animais apresentando boa aceitação e com poucos episódios de recusa da dieta durante o

acompanhamento, os animais ainda perderam peso nos 6 meses de observação. O escore de condição corporal (ECC) e escore de massa muscular (EMM) dos animais quando comparados nos momentos T0 e T6 não apresentaram diferença estatística ($p=0,3750$; $0,6250$, respectivamente). A média do ECC no T0 e T6 foi de 5,70 e 5,30; respectivamente, valores considerados dentro da faixa ideal ou até pouco acima do ideal. Os valores de EMM nos momentos T0 e T6 foram de 2,20 e 2,40; respectivamente. Ao se considerar a escala que varia de 0-3, os animais enquadraram-se dentro do grupo com perda leve de musculatura, compatível muitas vezes com sua idade. Pois, geralmente, animais idosos tendem a perder massa muscular como mecanismo fisiológico, denominado sarcopenia. No presente estudo, há que se considerar que os cães eram portadores de uma doença crônica que pode resultar em caquexia. Nesse caso, a manutenção do EMM ao longo dos seis meses é um resultado importante, pois demonstra que os animais mantiveram massa muscular no período de avaliação. A ausência de estudos que tenham utilizado esta ferramenta em cães com DRC até o momento, dificulta a discussão dos resultados ora encontrados

Alguns estudos avaliaram a correlação entre ECC e prognóstico de cães e gatos com DRC. Parker e Freeman (2011) demonstraram que cães com ECC entre 1 e 3 apresentaram menor sobrevida quando comparados a animais com ECC ideal ou em sobrepeso e obesos. Da mesma forma, Castro et al. (2010) observaram maior ocorrência de óbitos em gatos considerados caquéticos quando comparados a animais com ECC ideal. Os autores concluíram que o ECC pode ser um bom indicador de prognóstico, o que demonstra a importância da manutenção da condição corporal ideal, principalmente durante o desenvolvimento da doença.

5.10 AMINOÁCIDOS SÉRICOS

As concentrações séricas dos aminoácidos nos momentos T0 e T6 foram semelhantes, com exceção da fenilalanina, triptofano, ornitina e hidroxiprolina, que apresentaram redução e tendência de aumento da citrulina no tempo T6 ($p= 0,0577$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Concentrações dos aminoácidos séricos em cães doentes renais crônicos nos tempos T0 e T6

Variáveis	Tratamentos		DRC T0 vs DRC T6	
	DRC T0	DRC T6	P	EPM
Aminoácidos essenciais (μmol/L)				
Arginina (ARG)	165,98	153,36	0,2824	7,47
Histidina (HIS)	65,02	74,77	0,0761	3,09
Isoleucina (ILE)	44,11	45,83	0,7475	3,00
Leucina (LEU)	87,65	86,22	0,9113	5,88
Lisina (LIS)	107,27	110,51	0,7771	6,51
Metionina (MET)	44,79	41,57	0,2517	2,24
Fenilalanina (FEN)	76,64	66,23	0,0273*	2,34
Treonina (THR)	150,57	164,85	0,6781	14,01
Triptofano (TRP)	199,59	150,65	0,0253*	9,68
Valina (VAL)	113,68	122,68	0,5277	6,83
Aminoácidos não essenciais (μmol/L)				
Alanina (ALA)	351,64	361,34	0,8290	33,39
Asparagina (ASN)	70,45	72,30	0,8072	4,46
Aspartato (ASP)	6,25	6,08	0,8133	0,33
Cisteína (CIS)	7,65	7,90	0,9905	0,95
Citrulina (CIT)	95,47	117,23	0,0577	8,02
Glicina (GLI)	253,75	247,49	0,8945	23,23
Glutamato (GLU)	27,60	25,22	0,3237	1,59
Glutamina (GLN)	506,40	547,11	0,4615	28,67
Hidróxirolina (HPR)	32,75	16,35	0,0073**	4,08
Ornitina (ORN)	17,72	15,15	0,0443	1,15
Prolina (PRO)	164,83	133,27	0,1665	13,16
Serina (SER)	80,11	74,92	0,6006	5,34
Taurina (TAU)	333,30	236,06	0,1470	35,66
Tirosina (TYR)	33,11	28,41	0,2434	1,96
BCAA ²	245,44	254,74	0,6693	15,34
AAE ³	1055,29	1016,68	0,6131	36,69
AANE ⁴	1982,09	1888,99	0,5923	108,14
Razões dos aminoácidos (μmol/L)				
AAE/AANE	0,55	0,55	0,8401	0,02
Val/Gli	0,49	0,59	0,3303	0,05
Arg/Cit	1,79	1,48	0,0966	0,13
Tir/Fen	0,43	0,43	0,9973	0,02
Ser/Gli	0,32	0,32	0,8153	0,01

¹Teste não paramétrico (Wilcoxon)²Aminoácidos de cadeia ramificada (soma dos aminoácidos Isoleucina, Leucina e Valina)³Aminoácidos essenciais⁴Aminoácidos não essenciais

Figura 10 - Concentrações aminoacídicas séricas de cães doentes renais crônicos nos tempos T0 e T6

† Aminoácidos essenciais; letras a e b indicam diferença significativa entre as médias;

ALA- alanina; ARG- arginina; ASN- asparagina; CIS- cisteína; CIT- citrulina; FEN- fenilalanina; GLN- glutamina; GLI- glicina; GLU- glutamato; HIS- histidina; HPR- hidroxiprolina; ILE- isoleucina; LEU- leucina; LIS- lisina; MET- metionina; ORN- ornitina; PRO- prolina; SER- serina; TAU- taurina; TIR- tirosina; THR- treonina; TRP- triptofano; VAL- valina

As razões séricas dos aminoácidos foram calculadas para a avaliação da habilidade dos rins em realizar interconversões dos AA (Tir/Fen; Ser/Gli e Arg/Cit). Entre os tempos T0 e T6 nenhuma das razões plasmáticas se diferenciou. Baseado em estudos realizados em humanos, calculou-se a razão entre os aminoácidos essenciais e aminoácidos não essenciais (AEE/AANE) e razão valina/glicina para avaliar anormalidades nutricionais, estas também mantiveram-se inalteradas entre os tempos. Não houve correlação entre as concentrações séricas de aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs), concentração de bicarbonato e pH sanguíneo (Tabela 6). A hidroxiprolina não apresentou correlação significativa com o PTH, tanto no tempo T0 ($r=0,03$; $p=0,9460^8$) quanto no tempo T6 ($r=-0,03$; $p=0,9460^9$).

Em humanos, a doença renal crônica causa anormalidades nos aminoácidos plasmáticos, entre elas, a tendência à diminuição de aminoácidos essenciais (AEE), incluindo os aminoácidos de cadeia ramificada, leucina, valina e isoleucina conhecidos como BCAAs (*Branched chain amino acids*).

⁸ Correlação de Spearman

⁹ Correlação de Spearman

Como típicas alterações nos aminoácidos plasmáticos em pacientes com moderada a avançada DRC em humanos são citadas concentrações aumentadas de citrulina, 1- e 3- metilhistidina, prolina, glicina e cisteína e decréscimo de valina, serina, tirosina e triptofano total. Os BCAAs são os mais abundantes na massa muscular e devido à anorexia ou hiporexia e ao metabolismo anormal em pacientes urêmicos, geralmente, encontram-se diminuídos no plasma e no fluido intracelular muscular (KOPPLE et al., 1978; GARIBOTTO, 1999).

O decréscimo de fenilalanina sérica encontrado no presente trabalho discorda dos achados de Hansen et al. (1992). O trabalho destes autores foi desenvolvido em cães com DRC naturalmente adquirida associado a um grupo de animais hígidos, recebendo dois tipos de dieta, primeiramente uma de manutenção (31% de proteína) e outro com restrição proteica (16% de proteína). Os pesquisadores observaram maiores concentrações de fenilalanina nos dois grupos de animais alimentados com baixa proteína, portanto, os autores não associaram a elevação da fenilalanina a anormalidades da doença. No presente estudo, no tempo T0, os animais não recebiam dieta equilibrada e restrita em proteína e possivelmente pode ter resultado em reduções dos aminoácidos séricos, ocasionadas pelas mudanças no perfil aminoacídico da dieta. Devido a ausência de informações sobre a quantidade de aminoácidos ingeridos antes do estudo, pois os animais eram domiciliados e recebiam dietas diferentes, a comparação entre os perfis dietéticos não foi possível.

O balanço entre a captação de fenilalanina e liberação de tirosina foi estudado em cães com doença renal crônica induzida e seus resultados sugerem que apesar da redução na função renal, não houve alteração no metabolismo da fenilalanina ou tirosina (KOPPLE; FUKUDA, 1980). No estudo realizado por Fukuda e Koople (1980) em cães urêmicos, as concentrações de fenilalanina não demonstraram anormalidade, assemelhando-se aos valores de cães hígidos. Em humanos, as concentrações séricas de fenilalanina também demonstraram valores dentro do intervalo de referência, mesmo nos estádios avançados da doença (CEBALLOS et al., 1990; LAIDLAW et al., 1994; DURANTON et al., 2014). Tizianello et al. (1980) verificaram que em humanos doentes renais crônicos a captação renal de fenilalanina desapareceu e a liberação renal de tirosina decresceu entre 60% a 70%. Em cães, assim como em humanos, a fenilalanina é um aminoácido essencial. A tirosina é considerada condicionalmente essencial, por que pode ser sintetizada apenas pela hidroxilação da fenilalanina. Em humanos com DRC avançada observou-se que a

conversão de fenilalanina à tirosina estava reduzida, com consequente redução da razão tirosina/fenilalanina em relação ao grupo controle (MØLLER et al., 2000; BOIRIE et al., 2004; KOPPLE, 2007).

As concentrações de citrulina séricas apresentaram tendência à elevação no tempo T6, corroborando os achados de Hansen et al. (1992) ao demonstrarem que cães com DRC naturalmente adquirida alimentados com dieta de restrição proteica, apresentaram aumento de citrulina (2x mais), quando comparados com cães saudáveis alimentados com a mesma dieta. Fukuda e Kopple (1980) encontraram resultados semelhantes em cães com DRC induzida ao observarem elevação da citrulina plasmática. Os achados em cães assemelham-se aos de humanos doentes renais crônicos, onde a elevação de citrulina plasmática é geralmente encontrada, mesmo nos estádios iniciais, demonstrando aumento gradual com a progressão da doença, sugerindo que a produção persistente de citrulina, na presença de dano renal, certamente, ocasiona sua elevação (KOPPLE et al., 1978; CEBALLOS et al., 1990; LAIDLAW et al., 1994; DURANTON et al., 2014).

O rim possui importante função na conversão de citrulina em arginina, cuja função pode estar alterada na doença renal, conforme demonstrado por Tizianello et al., (1980). Neste estudo, pessoas com DRC apresentaram captação de citrulina e liberação de arginina alteradas, ou seja, houve redução de 60-70% da captação de citrulina pelo rim. Além disso, Chen et al. (2010) verificaram menor atividade das enzimas argininosuccinato sintetase (ASS) e argininosuccinato liase (ASL), responsáveis pela conversão renal de citrulina em arginina, no córtex renal de ratos com DRC. Achado que justifica a menor razão arginina/citrulina encontrada em pessoas doentes renais crônicas estágio 4, quando comparados aos estádios 2 e 3 (DURANTON et al., 2014).

As concentrações séricas de triptofano (TRP) reduziram entre os tempos T0 e T6, o que pode inicialmente ter ocorrido pela mudança de dieta, embora a diminuição do triptofano ocorra com o agravamento da DRC, como demonstrado por Schefold et al. (2009), ao verificaram que com a progressão da doença houve aumento da atividade da enzima indolamina 2,3-dioxigenase (IDO), responsável pelo catabolismo do TRP e consequente agravo deste processo. Os autores sugeriram ainda, que a elevação da IDO possa ser consequente à inflamação crônica. Conforme já comentado, no presente estudo, o fornecimento de dieta com menor teor proteico pode justificar o decréscimo sérico do triptofano, entretanto, no estudo realizado por

Hansen et al. (1992), quando cães com DRC passaram a receber a dieta com restrição proteica, não houve redução sérica de triptofano. No entanto, os animais provavelmente apresentavam a doença em estádios iniciais. Os resultados ora apresentados corroboram os encontrados em pessoas doentes renais em estádios mais avançados (estádios 4 e 5), onde o TRP sérico apresentou diminuição significativa, quando comparado aos valores de indivíduos doentes renais crônicos nos estádios 2 e 3, embora não tenha sido encontrada maior excreção deste na urina, o que sugere aumento no catabolismo deste aminoácido (DURANTON et al., 2014).

No presente trabalho a hidroxiprolina sérica decresceu entre os tempos T0 e T6. A HPR é um dos aminoácidos não essenciais que geralmente está elevado no plasma de pessoas doentes renais crônicas e a osteodistrofia renal está associada ao seu aumento no plasma (DUBOVSKÝ; PACOVSKÝ; DUBOVSKÁ, 1965; KOPPLE et al., 1978). Até o momento inexistem informações sobre seu metabolismo em cães ou gatos com DRC, mas em humanos Laidlaw (1994) observou elevação sérica da hidroxiprolina plasmática em doentes renais crônicos nos estádios mais avançados.

De forma semelhante, Uehara (1993) observou altas concentrações séricas de HPR livre (90% na circulação) em pessoas com DRC avançada. O autor relatou que o grupo de indivíduos com evidência de reabsorção óssea exibiram significativa elevação da HPR sérica livre e encontraram correlação positiva entre HPR e PTH. O pesquisador sugeriu que a HPR livre possa refletir acelerado processo de reabsorção óssea. Os autores citaram a elevação da hidroxiprolina livre relacionada à uremia devido ao aumento da degradação de colágeno ósseo, consequente ao HPSR, catabolismo anormal de aminoácidos e falhas no transporte tubular renal (DUBOVSKÝ et al., 1968). No presente estudo, como mencionado anteriormente, não foi encontrada correlação significativa entre a HPR sérica e o PTH nos tempos T0 ($r=0,03$; $p=0,9460$) e T6 ($r=-0,03$; $p=0,9460$). Até o momento não foram publicados estudos em cães ou gatos que associem a HPR sérica ou urinária com prognóstico ou severidade da doença renal crônica. A restrição proteica pode ser uma possibilidade para justificar o seu decréscimo, entretanto, vale destacar que em ratos urêmicos quando alimentados com dieta balanceada, primeiramente com 24% de proteína e após com 6%, a HPR elevou-se no plasma em quase duas vezes e a prolina manteve-se inalterada (KIHLEBERG et al., 1982).

A diminuição da ornitina sérica entre os tempos T0 e T6 diferem dos resultados encontrados em outros estudos (FUKUDA; KOPPLE, 1980; HANSEN et al., 1992).

Estes autores não encontraram alteração nas concentrações de ornitina em cães doentes renais crônicos. Em humanos, os resultados das concentrações de ornitina são contraditórios. Laidlaw et al. (1994) não observaram aumento ou redução nas concentrações plasmáticas de ornitina, mesmo com o avanço da doença. Ceballos et al. (1990) relataram aumento das concentrações plasmáticas nos estádios iniciais da doença, que se mantiveram com a progressão da DRC. Já Durantón et al. (2014) encontraram aumento significativo da ornitina plasmática nos estádios mais avançados da doença, em comparação aos estádios iniciais. Swendseid et al. (1978) relataram que em ratos urêmicos as três vias metabólicas do catabolismo da ornitina, via ornitina carbamointransferase, transaminase e descarboxilase apresentaram diminuição da atividade, o que poderia justificar a elevação da ornitina no plasma, entretanto os autores relataram que em pacientes humanos, a elevação desta não foi pronunciada e que houve aumento com a maior ingestão de proteína, tanto em indivíduos normais, quanto em urêmicos. Tizianello et al. (1980) não observaram liberação de ornitina renal na corrente circulatória de indivíduos doentes renais crônicos, podendo ser ocasionado devido a menor captação de citrulina, e consequente redução da arginina e liberação de ornitina para a circulação, o que poderia justificar a menor concentração sérica da mesma quando estes recebem dieta com restrição proteica.

As anormalidades entre os aminoácidos essenciais e não essenciais (razão AEE/ANEE) e razão valina/glicina não foram demonstradas no presente estudo (Figura 10). Em humanos com DRC normalmente os AAE encontram-se diminuídos e os AANE encontram-se elevados, o que torna a razão AAE/AANE reduzida em comparação a pessoas saudáveis, o que parece se confirmar também em animais com DRC (KOPPLE, 1978; HANSEN et al., 1992; DURANTON et al., 2014). As ausências de anormalidade nas razões encontradas no presente estudo podem indicar que a quantidade de proteína oferecida aos animais, bem como o perfil aminoacídico das fontes proteicas utilizadas na formulação da dieta, foram eficientes para atender a necessidade proteica dos cães incluídos no estudo. Além disso, conforme já discutido, a manutenção do escore de condição corporal, escore de massa muscular, bem como albumina e proteína total séricas reforçam esta afirmação.

Young et al. (1982) encontraram inter-relação entre a valina plasmática e medidas antropométricas utilizadas na avaliação da má nutrição em pacientes

submetidos à hemodiálise e sugeriram que a redução plasmática de aminoácidos, particularmente a valina possa estar associada a redução da síntese de proteínas plasmáticas no fígado. A má nutrição, geralmente, associada a pacientes urêmicos, devido à hiporexia ou anorexia, torna-se ainda mais grave devido ao quadro de acidose metabólica, responsável por estimular a elevação da atividade da desidrogenase de cetoácidos de cadeia ramificada (DCCR), responsável por limitar a velocidade do catabolismo dos aminoácidos de cadeia ramificada (valina, leucina e isoleucina) (MITCH, 1997). No presente trabalho não houve correlação entre os aminoácidos valina, leucina e isoleucina e o pH sanguíneo e concentração de bicarbonato sanguíneo. Tal achado pode estar relacionado ao possível efeito da dieta em auxiliar no controle da acidose desenvolvida pelos animais, aspecto importante para se reduzir ou prevenir o catabolismo muscular. Como já esperado, as concentrações séricas de valina apresentaram forte correlação positiva com a isoleucina e leucina ($r=0,81$, $p=0,01$; $r=0,90$, $p=0,01$, respectivamente) assim como as concentrações sericas de Isoleucina e leucina ($r=0,89$, $p=0,01$).

6 CONCLUSÕES

A dieta e o manejo alimentar instituídos durante o período de 6 meses, associados ao tratamento de suporte, foram eficazes no controle da uremia, hiperparatireoidismo secundário renal, equilíbrio ácido-básico, pressão arterial, capacidade antioxidante e produção de citocinas inflamatórias, bem como na manutenção do escore de condição corporal, escore de massa muscular e nutrição proteica de cães com doença renal crônica avançada (estádios 3 e 4).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um ponto limitante do presente estudo foi a ausência de um grupo controle para algumas variáveis estudadas. Tal falha deve-se em partes ao fato dos animais incluídos no estudo serem domiciliados e de tutores. Esta condição implicou em alguns aspectos importantes, como por exemplo a padronização da dieta inicial, para as coletas no tempo T0. No entanto, acreditamos que essa dificuldade seja do conhecimento da comunidade científica em se tratando de estudos clínicos. Outro aspecto refere-se à questões éticas relacionadas ao desenvolvimento da pesquisa. Temos o entendimento de que o melhor delineamento seria a inclusão de um grupo de animais com DRC, porém alimentados com uma dieta de manutenção. No entanto, na nossa percepção, não concordamos com o emprego de uma dieta inadequada para a situação, que sabidamente poderá implicar na redução da expectativa de vida dos cães incluídos no grupo controle.

REFERÊNCIAS

ADAMS, L. G.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; O'BRIEN, T. D.; HOSTETTER, T. H. Influence of Dietary Protein/calorie Intake on Renal Morphology and Function in Cats with 5/6 Nephrectomy. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 70, n. 3, p. 347–57, 1 mar. 1994. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/8145529>>. Acesso em: 1 out. 2015.

ALLEN, T. A.; FORRESTER, S. D.; ADAMS, L. G. **Chronic Kidney Disease**. In: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSCH P. Small Animal Clinical Nutrition. 5. ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2010. p. 765-812.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS. (AAFCO). **Official publication 2009**, Washington DC: AAFCO, 2009.

BARBER, P. J.; ELLIOTT, J. Feline chronic renal failure: calcium homeostasis in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. **The Journal of small animal practice**, v. 39, n. 3, p. 108–16, mar. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9551377>>. Acesso em: 22 set. 2015.

BARBER, P. J.; ELLIOTT, J.; TORRANCE, A. G. Measurement of feline intact parathyroid hormone: Assay validation and sample handling studies. **Journal of Small Animal Practice**, v. 34, n. 12, p. 614–620, dez. 1993. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-5827.1993.tb02594.x>>. Acesso em: 8 out. 2015.

BARBER, P. J.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELL, P. J.; ELLIOTT, J. Effect of dietary phosphate restriction on renal secondary hyperparathyroidism in the cat. **The Journal of small animal practice**, v. 40, n. 2, p. 62–70, mar. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10088085>>. Acesso em: 30 set. 2015.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. de C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 2010. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XS2010W00061>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

BARRETO, D. V.; BARRETO, F. C.; LIABEUF, S.; TEMMAR, M.; LEMKE, H.-D.; TRIBOUILLOY, C.; CHOUKROUN, G.; VANHOLDER, R.; MASSY, Z. A. Plasma Interleukin-6 Is Independently Associated with Mortality in Both Hemodialysis and Pre-Dialysis Patients with Chronic Kidney Disease. **Kidney international**, v. 77, n. 6, p. 550–6, mar. 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20016471>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

BLOCK, G.; HULBERT-SHEARON, T.; LEVIN, N.; PORT, F. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: A national study. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 31, n. 4, p. 607–617, abr. 1998. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272638698000912>>. Acesso em: 21 nov. 2015.

BOIRIE, Y.; ALBRIGHT, R.; BIGELOW, M.; NAIR, K. S. Impairment of phenylalanine conversion to tyrosine in end-stage renal disease causing tyrosine deficiency. **Kidney international**, v. 66, n. 2, p. 591–6, ago. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15253711>>. Acesso em: 27 out. 2016.

BOYD, L. M.; LANGSTON, C.; THOMPSON, K.; ZIVIN, K.; IMANISHI, M. Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000-2002). **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1111–7, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://deepblue.lib.umich.edu/handle/2027.42/75440>>. Acesso em: 29 set. 2015.

BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease. **The New England journal of medicine**, v. 307, n. 11, p. 652–9, 9 set. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7050706>>. Acesso em: 25 out. 2016.

BROWN, N. J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 8, p. 459–469, 18 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23774812>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BROWN, S. A. Oxidative Stress and Chronic Kidney Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 38, n. 1, p. 157–166, 1 jan. 2008. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/18249247>>. Acesso em: 11 out. 2015.

BROWN, S. A.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; COWELL, C.; FINCO, D. R. Beneficial effects of chronic administration of dietary c0-3 polyunsaturated fatty acids in dogs with renal insufficiency. **J Lab Clin Med**, v. 131, n. 5, p. 447–455, 1998.

BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; WHITE, J. V.; FINCO, D. R. Beneficial effects of dietary mineral restriction in dogs with marked reduction of functional renal mass. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v.

1, n. 10, p. 1169–79, abr. 1991a. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1768812>>. Acesso em: 13 mar. 2015.

BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; BARSANTI, J. A.; WHITE, J. V.; FINCO, D. R. Beneficial Effects of Dietary Mineral Restriction in Dogs with Marked Reduction of Functional Renal Mass. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 1, n. 10, p. 1169–79, abr. 1991b. Disponível em:
<<http://europepmc.org/abstract/med/1768812>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

BROWN, S. A.; FINCO, D. R.; NAVAR, L. G. Impaired Renal Autoregulatory Ability in Dogs with Reduced Renal Mass. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 5, n. 10, p. 1768–74, 1 abr. 1995. Disponível em:
<<http://europepmc.org/abstract/med/7787144>>. Acesso em: 9 ago. 2015.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 542–558, maio 2007. Disponível em:
<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03005.x>>. Acesso em: 13 set. 2016.

BROWN, S. **Physiology of the kidneys**. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. (Ed.). *Nephrology and Urology of small animals*. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. p. 10-17.

BRUNET, P. IL-10 Synthesis and Secretion by Peripheral Blood Mononuclear Cells in Haemodialysis Patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 13, n. 7, p. 1745–1751, 1 jul. 1998. Disponível em:
<<http://europepmc.org/abstract/med/9681722>>. Acesso em: 4 dez. 2015.

BURKHOLDER, W. J. Dietary considerations for dogs and cats with renal disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 216, n. 11, p. 1730–1734, 2000.

BURKHOLDER, W. J.; LEES, G. E.; LEBLANC, A. K.; SLATER, M. R.; BAUER, J. E.; KASHTAN, C. E.; MCCracken, B. A.; HANNAH, S. S. Diet Modulates Proteinuria in Heterozygous Female Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. **Journal of veterinary internal medicine**, 2004. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300979668>>. Acesso em: 19 set. 2015.

CASTRO, M. C. N. e; SANTOS; VIEIRA, A. B.; SALOMÃO, M. C.; GERSHONY, L. C.; SOARES, A. M. B.; FERREIRA, A. M. R. Escore de condição corporal como indicador do prognóstico de gatos com doença renal crônica. **Ciencia Rural**, v. 40, n. 2, p. 365–370, 2010.

CEBALLOS, I.; CHAUVEAU, P.; GUERIN, V.; BARDET, J.; PARVY, P.; KAMOUN, P.; JUNGERS, P. Early alterations of plasma free amino acids in chronic renal failure. **Clinica Chimica Acta**, v. 188, n. 2, p. 101–108, abr. 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000989819090154K>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

CHAN, D. L.; ROZANSKI, E. A.; FREEMAN, L. M. Relationship among Plasma Amino Acids, C-Reactive Protein, Illness Severity, and Outcome in Critically Ill Dogs. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 3, p. 559–63, 6 jan. 2009. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/19645841>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

CHEN, G.-F.; BAYLIS, C. In vivo renal arginine release is impaired throughout development of chronic kidney disease. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 298, n. 1, p. F95-102, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19906948>>. Acesso em: 4 out. 2016.

CHEUNG, W. W.; PAIK, K. H.; MAK, R. H. Inflammation and Cachexia in Chronic Kidney Disease. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 25, n. 4, p. 711–24, 1 abr. 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20111974>>. Acesso em: 29 nov. 2015.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Chronic Renal Failure**. In: CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. (Ed.). *Canine and Feline Nephrology and Urology*. 2. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2011. p. 145-196.

CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J.; BAYÓN, A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 73–9, jan. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2009.0415.x>>. Acesso em: 19 set. 2015.

DEYKIN, D.; BALKO, C.; BRICKER, N. S. On the Pathogenesis of the Uremic State. **New England Journal of Medicine**, v. 286, n. 20, p. 1093–1099, 18 maio 1972. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM197205182862009>>. Acesso em: 22 set. 2016.

DUBOVSKÝ, J.; DUBOVSKÁ, E.; PACOVSKÝ, V.; HRBA, J. Free and peptide hydroxyproline in chronic uremia. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 19, n. 3, p. 387–90, mar. 1968. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5643306>>. Acesso em: 7 set. 2016.

DUBOVSKÝ, J.; PACOVSKÝ, V.; DUBOVSKÁ, E. Plasma hydroxyproline and proline in primary hyperparathyroidism and in chronic uremia. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 12, n. 2, p. 230–2, ago. 1965. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5856287>>. Acesso em: 2 set. 2016.

DURANTON, F.; LUNDIN, U.; GAYRARD, N.; MISCHAK, H.; APARICIO, M.; MOURAD, G.; DAURÈS, J.-P.; WEINBERGER, K. M.; ARGILÉS, A. Plasma and urinary amino acid metabolomic profiling in patients with different levels of kidney function. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 9, n. 1, p. 37–45, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24235289>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

EDDY, A. A. Progression in Chronic Kidney Disease. **Advances in chronic kidney disease**, v. 12, n. 4, p. 353–65, 1 out. 2005. Disponível em: <<http://europaepmc.org/abstract/med/16198274>>. Acesso em: 23 set. 2015.

ELLIOTT, J.; RAWLINGS, J. M.; MARKWELL, P. J.; BARBER, P. J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: effect of dietary management. **The Journal of small animal practice**, v. 41, n. 6, p. 235–42, jun. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10879400>>. Acesso em: 16 set. 2015.

ELLIOTT, D. A. **Nutritional management of kidney disease**. In: FASCETTI, A.J.; DELANEY, S. J. (Ed.). Applied Veterinary Clinical Nutrition. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2012. p. 251-267.

EPSTEIN, F. H.; BRENNER, B. M.; MEYER, T. W.; HOSTETTER, T. H. Dietary Protein Intake and the Progressive Nature of Kidney Disease: **New England Journal of Medicine**, v. 307, n. 11, p. 652–659, 9 set. 1982. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM198209093071104>>. Acesso em: 25 out. 2016.

FERRUCCI, L.; CHERUBINI, A.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; CORSI, A.; LAURETANI, F.; MARTIN, A.; ANDRES-LACUEVA, C.; SENIN, U.; GURALNIK, J. M. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 91, n. 2, p. 439–46, fev. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234304>>. Acesso em: 16 set. 2016.

FINCH, N. C.; GEDDES, R. F.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. Fibroblast Growth Factor 23 (FGF-23) Concentrations in Cats with Early Nonazotemic Chronic Kidney Disease (CKD) and in Healthy Geriatric Cats. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 227–33, 4 jan. 2013. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/23363336>>. Acesso em: 24 out. 2015.

FINCH, N. C.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. Parathyroid Hormone Concentration in Geriatric Cats with Various Degrees of Renal Function. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 10, p. 1326–35, 15 nov. 2012. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/javma.241.10.1326>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; BROWN, C. A.; BARSANTI, J. A.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. Effects of Aging and Dietary Protein Intake on Uninephrectomized Geriatric Dogs. **American journal of veterinary research**, v. 55, n. 9, p. 1282–90, 1 set. 1994. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/7802397>>. Acesso em: 22 set. 2015.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; DUNCAN, R. J.; BARSANTI, J. A.; BENNETT, S. E. Effects of Dietary Phosphorus and Protein in Dogs with Chronic Renal Failure. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 12, p. 2264–71, 1 dez. 1992a. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/1476305>>. Acesso em: 19 set. 2015.

FINCO, D. R.; BROWN, S. A.; CROWELL, W. A.; GROVES, C. A.; DUNCAN, J. R.; BARSANTI, J. A. Effects of Phosphorus/calcium-Restricted and Phosphorus/calcium-Replete 32% Protein Diets in Dogs with Chronic Renal Failure. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 1, p. 157–63, 1 jan. 1992b. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/1539911>>. Acesso em: 19 set. 2015.

FUKUDA, S.; KOPPLE, J. D. Chronic uremia syndrome in dogs induced with uranyl nitrate. **Nephron**, v. 25, n. 3, p. 139–43, jan. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7360299>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 16, n. 11, p. 2135–7, nov. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11682656>>. Acesso em: 9 out. 2015.

GALVÃO, A. L. B. **Estresse oxidativo em cães com Doença Renal Crônica**. 2014. 95 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2014.

GARIBOTTO, G. Muscle Amino Acid Metabolism and the Control of Muscle Protein Turnover in Patients with Chronic Renal Failure. **Nutrition**, v. 15, n. 2, p. 145–155, 1 fev. 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/9990580>>. Acesso em: 9 out. 2015.

GARIBOTTO, G.; SOFIA, A.; SAFFIOTI, S.; BONANNI, A.; MANNUCCI, I.; VERZOLA, D. Amino Acid and Protein Metabolism in the Human Kidney and in Patients with Chronic Kidney Disease. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 29, n. 4, p. 424–33, 1 ago. 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20207454>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

GEDDES, R. F.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. The Effect of Feeding a Renal Diet on Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations in Cats with Stable Azotemic Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1354–1361, nov. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jvim.12187>>. Acesso em: 27 out. 2016.

GEDDES, R. F.; FINCH, N. C.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. Fibroblast Growth Factor 23 in Feline Chronic Kidney Disease. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 234–41, 4 jan. 2013a. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/23398216>>. Acesso em: 24 out. 2015.

GEDDES, R. F.; FINCH, N. C.; SYME, H. M.; ELLIOTT, J. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 122–133, 6 mar. 2013b. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/vec.12032>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

GIOVANINNI, L. H.; KOGIKA, M. M.; LUSTOZA, M. D.; RECHE JUNIOR, A.; WIRTHL, V. A. B. F.; SIMÕES, D. M. N.; COELHO, B. M. Serum intact parathyroid hormone levels in cats with chronic kidney disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 2, p. 229–235, fev. 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2013000200015&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 15 set. 2016.

GIOVANINNI, L. H. **Hiperparatireoidismo Secundário Renal**. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. (Ed.). *Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos*. 1. ed. São Paulo: Roca, 2015. p. 1410-1415.

GUTIERREZ, O.; ISAKOVA, T.; RHEE, E.; SHAH, A.; HOLMES, J.; COLLERONE, G.; JÜPPNER, H.; WOLF, M. Fibroblast Growth Factor-23 Mitigates Hyperphosphatemia but Accentuates Calcitriol Deficiency in Chronic Kidney Disease. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 16, n. 7, p. 2205–15, jul. 2005. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/15917335>>. Acesso em: 4 jan. 2016.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Ed., 2006. 1664 p.

GROSS, K. L.; YAMKA, R. M.; KHOO, C.; FRIESEN, K. G. **Macronutrients**. In: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSCH P. Small Animal Clinical Nutrition. 5. ed. Topeka: Mark Morris Institute, 2010. p. 49-105.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **The Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721–724, set. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014067369492211X>>. Acesso em: 29 abr. 2015.

HANSEN, B.; DIBARTOLA, S. P.; CHEW, D. J.; BROWNIE, C.; BERRIE, H. K. Amino Acid Profiles in Dogs with Chronic Renal Failure Fed Two Diets. **American journal of veterinary research**, v. 53, n. 3, p. 335–41, mar. 1992. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/1595958>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

HARDCASTLE, M. R.; DITTMER, K. E. Fibroblast Growth Factor 23: A New Dimension to Diseases of Calcium-Phosphorus Metabolism. **Veterinary pathology**, v. 52, n. 5, p. 770–84, 1 set. 2015. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/26018436>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

HARRIS, R. C.; NEILSON, E. G. Toward a unified theory of renal progression. **Annual review of medicine**, v. 57, p. 365–80, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16409155>>. Acesso em: 22 jun. 2015.

HASEGAWA, H.; NAGANO, N.; URAKAWA, I.; YAMAZAKI, Y.; IJIMA, K.; FUJITA, T.; YAMASHITA, T.; FUKUMOTO, S.; SHIMADA, T. Direct Evidence for a Causative Role of FGF23 in the Abnormal Renal Phosphate Handling and Vitamin D Metabolism in Rats with Early-Stage Chronic Kidney Disease. **Kidney International**, v. 78, n. 10, p. 975–980, 15 set. 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20844473>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

HOSTETTER, T. H.; OLSON, J. L.; RENNKE, H. G.; VENKATACHALAM, M. A.; BRENNER, B. M. Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response

to renal ablation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 12, n. 6, p. 1315–25, jun. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11373357>>. Acesso em: 28 out. 2015.

HRUSKA, K. A.; SEIFERT, M.; SUGATANI, T. Pathophysiology of the chronic kidney disease-mineral bone disorder. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 24, n. 4, p. 303–9, jul. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26050115>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

IRIS. International Renal Interest Society. **Iris Guidelines 2015**. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/guidelines/index.html>>. Acesso em: 12 set 2016.

ISAKOVA, T.; WAHL, P.; VARGAS, G. S.; GUTIÉRREZ, O. M.; SCIALLA, J.; XIE, H.; APPLEBY, D.; NESSEL, L.; BELLOVICH, K.; CHEN, J.; HAMM, L.; GADEGBEKEU, C.; HORWITZ, E.; TOWNSEND, R. R.; ANDERSON, C. A. M.; LASH, J. P.; HSU, C.-Y.; LEONARD, M. B.; WOLF, M. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. **Kidney international**, v. 79, n. 12, p. 1370–8, jun. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.2011.47>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ALLEN, T. A.; KIRK, C. A.; NEATON, J. D.; LEKCHAROENSUK, C.; SWANSON, L. L. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 8, p. 1163–70, 15 abr. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11990962>>. Acesso em: 16 set. 2015.

KALANTAR-ZADEH, K.; BLOCK, G.; MCALLISTER, C. J.; HUMPHREYS, M. H.; KOPPLE, J. D. Appetite and Inflammation, Nutrition, Anemia, and Clinical Outcome in Hemodialysis Patients. **The American journal of clinical nutrition**, v. 80, n. 2, p. 299–307, ago. 2004. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/15277149>>. Acesso em: 19 jan. 2016.

KARKAR, A. M.; SMITH, J.; PUSEY, C. D. Prevention and treatment of experimental crescentic glomerulonephritis by blocking tumour necrosis factor-alpha. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 16, n. 3, p. 518–24, mar. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11239025>>. Acesso em: 11 out. 2015.

KEEGAN, R. F.; WEBB, C. B. Oxidative Stress and Neutrophil Function in Cats with Chronic Renal Failure. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 3, p. 514–9, 6 jan. 2010.

Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/20384951>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

KIHLBERG, R.; STERNER, G.; WENNEBERG, A.; DENNEBERG, T. Plasma free amino acid levels in uremic rats given high and low protein diets or intravenous infusions of amino acid solutions. **The Journal of nutrition**, v. 112, n. 11, p. 2058–70, nov. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6813436>>. Acesso em: 7 set. 2016.

KING, J. N.; TASKER, S.; GUNN-MOORE, D. A.; STREHLAU, G. Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 5, p. 906–916, set. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03042.x>>. Acesso em: 2 nov. 2015.

KOGIKA, M. M.; WAKI, M. F.; MARTONELLI, C. R. **Doença Renal Crônica**. In: JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P.; KOGIKA, M. M. (Ed.). Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos. 1. ed. São Paulo: Roca, 2015. p. 1394-1409.

KOGIKA, M. M.; LUSTOZA, M. D.; HAGIWARA, M. K.; CARAGELASCO, D. S.; MARTORELLI, C. R.; MORI, C. S. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. **Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 44, n. 1, p. 70–8, mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25512201>>. Acesso em: 26 nov. 2015.

KOGIKA, M. M.; LUSTOZA, M. D.; NOTOMI, M. K.; WIRTHL, V. A. B. F.; MIRANDOLA, R. M. S.; HAGIWARA, M. K. Serum Ionized Calcium in Dogs with Chronic Renal Failure and Metabolic Acidosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 35, n. 4, p. 441–445, dez. 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/17123251>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

KOPPLE, J. D. Abnormal amino acid and protein metabolism in uremia. **Kidney International**, v. 14, n. 4, p. 340–348, out. 1978. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ki.1978.134>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KOPPLE, J. D. Pathophysiology of Protein-Energy Wasting in Chronic Renal Failure. **J. Nutr.**, v. 129, n. 1, p. 247S–, 1 jan. 1999. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/129/1/247S.short>>. Acesso em: 20 out. 2015.

KOPPLE, J. D. Phenylalanine and tyrosine metabolism in chronic kidney failure. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6 Suppl 1, p. 1586S–1590S; discussion 1597S–1598S, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17513431>>.

Acesso em: 11 ago. 2016.

KOPPLE, J. D.; FUKUDA, S. Effects of amino acid infusion and renal failure on the uptake and release of amino acids by the dog kidney. **The American journal of clinical nutrition**, v. 33, n. 7, p. 1363–72, jul. 1980. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7395764>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

KOPPLE, J. D.; JONES, M.; FUKUDA, S.; SWENDSEID, M. E. Amino Acid and Protein Metabolism in Renal Failure. **The American journal of clinical nutrition**, v. 31, n. 9, p. 1532–40, set. 1978. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/685869>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KROFIČ ŽEL, M.; TOZON, N.; NEMEC SVETE, A. Plasma and Erythrocyte Glutathione Peroxidase Activity, Serum Selenium Concentration, and Plasma Total Antioxidant Capacity in Cats with IRIS Stages I-IV Chronic Kidney Disease. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 1, p. 130–6, 2 jan. 2014. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/24341729>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

KUWAHARA, Y.; OHBA, Y.; KITOH, K.; KUWAHARA, N.; KITAGAWA, H. Association of Laboratory Data and Death within One Month in Cats with Chronic Renal Failure. **The Journal of small animal practice**, v. 47, n. 8, p. 446–50, 1 ago. 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/16911112>>. Acesso em: 6 out. 2015.

LAFLAMME D. Development and validation of a body condition score system for dogs. **Canine Practice**, v. 22, n.4, p. 10-15, 1997.

LAIDLAW, S. A.; BERG, R. L.; KOPPLE, J. D.; NAITO, H.; WALKER, W. G.; WALSER, M. Patterns of fasting plasma amino acid levels in chronic renal insufficiency: results from the feasibility phase of the Modification of Diet in Renal Disease Study. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 23, n. 4, p. 504–13, abr. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8154485>>. Acesso em: 19 ago. 2016.

LAZARETTI, P.; KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; LUSTOZA, M. D.; MIRANDOLA, R. M. S. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2006. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=XS2006040406>>. Acesso em: 9 nov. 2015.

LEIBETSEDER, J.; NEUFELD, K. Effects of medium protein diets in dogs with

chronic renal failure. **The Journal of Nutrition**, v. 121, n. 11, p. 145–149, 1991.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K.-U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCALI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 18, n. 7, p. 1272–80, jul. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12808161>>. Acesso em: 27 out. 2016.

LÖFBERG, E.; WERNERMAN, J.; ANDERSTAM, B.; BERGSTRÖM, J. Correction of Acidosis in Dialysis Patients Increases Branched-Chain and Total Essential Amino Acid Levels in Muscle. **Clinical nephrology**, v. 48, n. 4, p. 230–7, 1 out. 1997. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/9352157>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

LOPEZ-HILKER, S.; DUSSO, A. S.; RAPP, N. S.; MARTIN, K. J.; SLATOPOLSKY, E. Phosphorus restriction reverses hyperparathyroidism in uremia independent of changes in calcium and calcitriol. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 259, n. 3, p. F432–437, 1 set. 1990. Disponível em: <<http://ajprenal.physiology.org/content/259/3/F432.short>>. Acesso em: 30 set. 2015.

MAK, R. H.; CHEUNG, W. Energy Homeostasis and Cachexia in Chronic Kidney Disease. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)**, v. 21, n. 12, p. 1807–14, 1 dez. 2006. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/16897005>>. Acesso em: 11 out. 2015.

MARTÍNEZ, P. P.; CARVALHO, M. B. **Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica** *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 25 fev. 2014. . Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/pesqvetbras/article/view/14413>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

MICHEL, K. E.; ANDERSON, W.; CUPP, C.; LAFLAMME, D. P. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **The British journal of nutrition**, v. 106 Suppl, p. S57-9, out. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22005437>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

MITCH, W. E. Mechanisms Causing Loss of Lean Body Mass in Uremia. **Advances in nephrology from the Necker Hospital**, v. 26, p. 133–42, 1 jan. 1997. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/8922130>>. Acesso em: 4 dez. 2015.

MOE, S.; DRÜEKE, T.; CUNNINGHAM, J.; GOODMAN, W.; MARTIN, K.; OLGAARD, K.; OTT, S.; SPRAGUE, S.; LAMEIRE, N.; EKNOYAN, G. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney international**, v. 69, n. 11, p. 1945–53, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641930>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

MØLLER, N.; MEEK, S.; BIGELOW, M.; ANDREWS, J.; NAIR, K. S. The kidney is an important site for in vivo phenylalanine-to-tyrosine conversion in adult humans: A metabolic role of the kidney. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 3, p. 1242–6, 1 fev. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10655515>>. Acesso em: 1 set. 2016.

MORITA, Y.; YAMAMURA, M.; KASHIHARA, N.; MAKINO, H. Increased Production of Interleukin-10 and Inflammatory Cytokines in Blood Monocytes of Hemodialysis Patients. **Research communications in molecular pathology and pharmacology**, v. 98, n. 1, p. 19–33, 1 out. 1997. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/9434312>>. Acesso em: 4 dez. 2015.

NAGODE, L. A.; CHEW, D. J.; PODELL, M. Benefits of Calcitriol Therapy and Serum Phosphorus Control in Dogs and Cats with Chronic Renal Failure. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 6, p. 1293–1330, nov. 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195561696501300>>. Acesso em: 8 out. 2015.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. (NRC). **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, D.C: National Academy of Science; National Academy Press, 2006. 398 p.

OLIVEIRA, R. B. de; MOYSÉS, R. M. A. FGF-23: State of the Art. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 32, n. 3, p. 323–31, 9 jan. 2010. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/21103697>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

PARKER, V. J.; FREEMAN, L. M. Association between Body Condition and Survival in Dogs with Acquired Chronic Kidney Disease. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1306–11, 12 jan. 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/22092621>>. Acesso em: 9 out. 2015.

PECOITS-FILHO, R.; SYLVESTRE, L. C.; STENVINKEL, P. Chronic Kidney Disease and Inflammation in Pediatric Patients: From Bench to Playground. **Pediatric**

nephrology (Berlin, Germany), v. 20, n. 6, p. 714–20, 1 jun. 2005. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/15856313>>. Acesso em: 11 out. 2015.

PEREIRA, B. J.; SHAPIRO, L.; KING, A. J.; FALAGAS, M. E.; STROM, J. A.; DINARELLO, C. A. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undialyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients. **Kidney international**, v. 45, n. 3, p. 890–6, mar. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8196293>>. Acesso em: 11 out. 2015.

PLANTINGA, E. A.; EVERTS, H.; KASTELEIN, A. M. C.; BEYNEN, A. C. Retrospective study of the survival of cats with acquired chronic renal insufficiency offered different commercial diets. **Veterinary Record**, v. 157, 2005.

PLATA-SALAMÁN, C. R. Cytokines and Anorexia: A Brief Overview. **Seminars in oncology**, v. 25, n. 1 Suppl 1, p. 64–72, 1 fev. 1998. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/9482542>>. Acesso em: 11 out. 2015.

POLZIN, D. J. 11 guidelines for conservatively treating chronic kidney disease. 2007. Disponível em: <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/11-guidelines-conservatively-treating-chronic-kidney-disease>>. Acesso em: 20 out. 2015.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. **Chronic Kidney Disease**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Ed.). Textbook of Veterinary Internal Medicine. 6. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2005. p. 1756-1785.

POLZIN, D. J. **Chronic Kidney Disease**. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. (Ed.). Nephrology and Urology of small animals. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011. p. 433-471.

POLZIN, D. J.; LEININGER, J. R.; OSBORNE, C. A.; JERAJ, K. Development of Renal Lesions in Dogs after 11/12 Reduction of Renal Mass. Influences of Dietary Protein Intake. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 58, n. 2, p. 172–83, 1 fev. 1988. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/3339859>>. Acesso em: 1 out. 2015.

POLZIN, D. J. **Diagnosing & Staging of Chronic Kidney Disease**: Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2009/lecture28/1.pdf?LA=1>>. Acesso em 28 set. 2016.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; HAYDEN, D. W.; STEVENS, J. B. Influence of

reduced protein diets on morbidity, mortality, and renal function in dogs with induced chronic renal failure. **American journal of veterinary research**, v. 45, n. 3, p. 506–17, mar. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6711979>>. Acesso em: 16 set. 2015.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B.; HAYDEN, D. W. Influence of modified protein diets on the nutritional status of dogs with induced chronic renal failure. **American journal of veterinary research**, v. 44, n. 9, p. 1694–702, set. 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6625324>>. Acesso em: 25 out. 2016.

RAMASAMY, I. Recent advances in physiological calcium homeostasis. **Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC**, v. 44, n. 3, p. 237–73, 1 jan. 2006. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2006.44.issue-3/cclm.2006.046/cclm.2006.046.xml>>. Acesso em: 29 out. 2015.

RELMAN, A. S.; LENNON, E. J.; LEMANN, J.; JR. Endogenous production of fixed acid and the measurement of the net balance of acid in normal subjects. **The Journal of clinical investigation**, v. 40, n. 9, p. 1621–30, set. 1961. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13740723>>. Acesso em: 25 out. 2016.

RENNKE, H. G.; DENKER, B. M. **Renal Pathophysiology: The Essentials**. 2. Ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007. 400 p.

REMUZZI, G.; PERICO, N.; MACIA, M.; RUGGENENTI, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. **Kidney International**, v. 68, n. 99, p. S57–S65, dez. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16336578>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

RITZ, E.; GROSS, M.-L.; DIKOW, R. Role of calcium-phosphorous disorders in the progression of renal failure. **Kidney International**, v. 68, n. S99, p. S66–S70, dez. 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.09912.x>>. Acesso em: 19 set. 2015.

ROBERTSON, J. L.; GOLDSCHMIDT, M.; KRONFELD, D. S.; TOMASZEWSKI, J. E.; HILL, G. S.; BOVEE, K. C. Long-term renal responses to high dietary protein in dogs with 75% nephrectomy. **Kidney international**, v. 29, n. 2, p. 511–9, fev. 1986. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3702209>>. Acesso em: 22 set. 2015.

ROSS, S. J.; OSBORNE, C. A.; KIRK, C. A.; LOWRY, S. R.; KOEHLER, L. A.; POLZIN, D. J. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous

chronic kidney disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 6, p. 949–957, 2006.

ROTH, E.; DRUML, W. Plasma Amino Acid Imbalance: Dangerous in Chronic Diseases? **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 14, n. 1, p. 67–74, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/21088569>>. Acesso em: 14 dez. 2015.

RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; SUZUKI, Y.; RUPÉREZ, M.; EGIDO, J. Proinflammatory Actions of Angiotensins. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 10, n. 3, p. 321–329, 1 maio 2001. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/11342793>>. Acesso em: 2 dez. 2015.

SARKAR, B. C.; CHAUHAN, U. P. A new method for determining micro quantities of calcium in biological materials. **Analytical biochemistry**, v. 20, n. 1, p. 155–66, jul. 1967. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6071917>>. Acesso em: 3 nov. 2016

SCHEFOLD, J. C.; ZEDEN, J.-P.; FOTOPOULOU, C.; VON HAEHLING, S.; PSCHOWSKI, R.; HASPER, D.; VOLK, H.-D.; SCHUETT, C.; REINKE, P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 6, p. 1901–1908, 1 jun. 2009. Disponível em: <<http://ndt.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/ndt/gfn739>>. Acesso em: 6 set. 2016.

SCHENCK, P. A.; CHEW, D. J. Determination of calcium fractionation in dogs with chronic renal failure. **American journal of veterinary research**, v. 64, n. 9, p. 1181–4, set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13677399>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

SILVA, A. C. R. A.; DE ALMEIDA, B. F. M.; SOEIRO, C. S.; FERREIRA, W. L.; DE LIMA, V. M. F.; CIARLINI, P. C. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, v. 77, n. 2, p. 136–41, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605930&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 out. 2015.

SIMMONS, E. M.; HIMMELFARB, J.; SEZER, M. T.; CHERTOW, G. M.; MEHTA, R. L.; PAGANINI, E. P.; SOROKO, S.; FREEDMAN, S.; BECKER, K.; SPRATT, D.; SHYR, Y.; IKIZLER, T. A. Plasma Cytokine Levels Predict Mortality in Patients with Acute Renal Failure. **Kidney international**, v. 65, n. 4, p. 1357–65, abr. 2004.

Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/15086475>>. Acesso em: 27 dez. 2015.

SLATOPOLSKY, E.; CAGLAR, S.; GRADOWSKA, L.; CANTERBURY, J.; REISS, E.; BRICKER, N. S. On the prevention of secondary hyperparathyroidism in experimental chronic renal disease using “proportional reduction” of dietary phosphorus intake. **Kidney international**, v. 2, n. 3, p. 147–51, set. 1972. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4669450>>. Acesso em: 30 set. 2015.

SLATOPOLSKY, E.; CAGLAR, S.; PENNELL, J. P.; TAGGART, D. D.; CANTERBURY, J. M.; REISS, E.; BRICKER, N. S. On the Pathogenesis of Hyperparathyroidism in Chronic Experimental Renal Insufficiency in the Dog. **The Journal of clinical investigation**, v. 50, n. 3, p. 492–9, 1 mar. 1971. Disponível em: <<http://pmc/articles/PMC291955/?report=abstract>>. Acesso em: 22 set. 2015.

SLATOPOLSKY, E.; MARTIN, K.; HRUSKA, K. Parathyroid hormone metabolism and its potential as a uremic toxin. **The American journal of physiology**, v. 239, n. 1, p. F1-12, jul. 1980. Disponível em: <<http://ajprenal.physiology.org/content/239/1/F1.abstract>>. Acesso em: 8 out. 2015.

STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. (SAS). Institute Incorporation. **SAS User's guide**: statistics. 8. ed. Cary: SAS, 2001.

STENVINKEL, P.; BARANY, P.; HEIMBÜRGER, O.; PECOITS-FILHO, R.; LINDHOLM, B. Mortality, Malnutrition, and Atherosclerosis in ESRD: What Is the Role of Interleukin-6? **Kidney international. Supplement**, n. 80, p. 103–8, 1 maio 2002. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/11982823>>. Acesso em: 1 nov. 2015.

STENVINKEL, P.; KETTELER, M.; JOHNSON, R. J.; LINDHOLM, B.; PECOITS-FILHO, R.; RIELLA, M.; HEIMBURGER, O.; CEDERHOLM, T.; GIRNDT, M. IL-10, IL-6, and TNF-Alpha: Central Factors in the Altered Cytokine Network of Uremia-The Good, the Bad, and the Ugly. **Kidney International**, v. 67, n. 4, p. 1216–1233, 1 abr. 2005. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/15780075>>. Acesso em: 11 out. 2015.

SUN, W.; CAO, C.; HUANG, W.; CHEN, W.; YASSER, G.; SUN, D.; WAN, X. Interleukin-10 deficiency increases renal inflammation and fibrosis in a mouse ischemia-reperfusion injury model. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 9, n. 3, p. 3037–3043, 2016. Disponível em: <www.ijcep.com>. Acesso em: 11 jun. 2016.

SWENDSEID, M. E.; WANG, M.; SCHUTZ, I.; KOPPLE, J. D. Metabolism of urea

cycle intermediates in chronic renal failure. **The American journal of clinical nutrition**, v. 31, n. 9, p. 1581–6, set. 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/685873>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

TESSARI, P.; GARIBOTTO, G.; INCHIOSTRO, S.; ROBAUDO, C.; SAFFIOTI, S.; VETTORE, M.; ZANETTI, M.; RUSSO, R.; DEFERRARI, G. Kidney, splanchnic, and leg protein turnover in humans. Insight from leucine and phenylalanine kinetics. **The Journal of clinical investigation**, v. 98, n. 6, p. 1481–92, 15 set. 1996. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=507576&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 dez. 2015.

TIZIANELLO, A.; DE FERRARI, G.; GARIBOTTO, G.; GURRERI, G.; ROBAUDO, C. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. **The Journal of clinical investigation**, v. 65, n. 5, p. 1162–73, maio 1980. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=371450&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 27 out. 2015.

TRACEY, K. J. The Inflammatory Reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853–9, 20 jan. 2002. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/12490958>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

UEHARA, H. Reevaluation of the usefulness of serum free hydroxyproline as a parameter for assessing renal osteodystrophy. **Nihon Jinzo Gakkai shi**, v. 35, n. 1, p. 49–58, jan. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8336400>>. Acesso em: 2 set. 2016.

VIANNA, H. R.; SOARES, C. M. B. M.; TAVARES, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, A. C. S. e. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. **J. bras. nefrol**, v. 33, n. 3, p. 351–364, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-28002011000300012>. Acesso em: 29 nov. 2015.

ZATZ, R. **Doença/ Insuficiência Renal Crônica**. In: ZATZ, R. (Ed.). Bases Fisiológicas da Nefrologia. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 333-360.

WAKI, M. F.; MARTORELLI, C. R.; MOSKO, P. E.; KOGIKA, M. M. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. **Ciência Rural**, v. 40, n. 10, p. 2226–2234, 2010. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33119160020>>. Acesso em: 28 out. 2015.

WILLIAMS, T. L.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. Changes in plasma Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23) concentrations after treatment of hyperthyroidism (HTH) in cats with variable renal function. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 3, p. 678, maio 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2011.0726.x>>. Acesso em: 24 out. 2015.

WHITE, J. A.; HART, R. J.; FRY, J. C. An Evaluation of the Waters Pico-Tag System for the Amino-Acid Analysis of Food Materials. **The Journal of automatic chemistry**, v. 8, n. 4, p. 170–7, jan. 1986. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/18925132>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

WHITNEY, M. S. Evaluation of hyperlipidemias in dogs and cats. **Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)**, v. 7, n. 4, p. 292–300, nov. 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1470771>>. Acesso em: 2 mar. 2015.

WONG, N. L.; QUAMME, G. A.; DIRKS, J. H. Tubular handling of bicarbonate in dogs with experimental renal failure. **Kidney international**, v. 25, n. 6, p. 912–8, jun. 1984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6471673>>. Acesso em: 3 jan. 2017.

YOUNG, G. A.; SWANEPOEL, C. R.; CROFT, M. R.; HOBSON, S. M.; PARSONS, F. M. Anthropometry and plasma valine, amino acids, and proteins in the nutritional assessment of hemodialysis patients. **Kidney international**, v. 21, n. 3, p. 492–9, mar. 1982. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6806521>>. Acesso em: 16 ago. 2016.

YU, S.; GROSS, K.; ALLEN, T. A renal food supplemented with vitamins E, C and beta-carotene reduces oxidative stress and improves kidney function in client-owned dogs with stages 2 or 3 kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 6, p. 1537, nov. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1939-1676.2006.tb00777.x>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

YU, S.; PAETAU-ROBINSON, I. Dietary Supplements of Vitamins E and C and β -Carotene Reduce Oxidative Stress in Cats with Renal Insufficiency. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 4, p. 403–413, maio 2006. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11259-006-3269-5>>. Acesso em: 13 jun. 2016.