

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U** LISBOA

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM CÃES DIABÉTICOS: ANÁLISE DE INDICADORES

SARA CASTANHO BARBOSA

ORIENTADORA:  
Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor  
Villa de Brito

2020



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO RENAL EM CÃES DIABÉTICOS: ANÁLISE DE INDICADORES

SARA CASTANHO BARBOSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor António Freitas Duarte

VOGAIS:

Doutor Rodolfo Oliveira Leal

ORIENTADORA:

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes Vítor  
Villa de Brito

2020

Nome: Sara Castanho Barbosa

Título da Tese ou  
Dissertação: Avaliação Da Função Renal Em Cães Diabéticos: Análise De Indicadores

Ano de conclusão: 2020

Designação do curso de  
Mestrado: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar  
 Morfologia e Função  Sanidade Animal

Declaro sob compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Publicação de artigo científico.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três, retirando as que não interessam):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 14 de janeiro de 2020

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

Começo por agradecer à Professora Doutora Teresa Villa de Brito, por toda a ajuda e orientação ao longo de todo este percurso, e por nunca me ter deixado desistir quando surgiram dificuldades e obstáculos. Obrigada pela paciência e por acreditar no nosso projeto até ao fim!

Ao CIISA e ao Professor Doutor Carlos Fontes, obrigada pelo financiamento que em muito ajudou a que o projeto se concretizasse.

A todos os proprietários dos animais aqui representados, sejam clientes, colegas ou amigos, não tenho palavras para vos agradecer. A vossa vontade de ajudar e solidariedade é algo que nunca vou esquecer.

A todos os médicos veterinários que me ajudaram na recolha de casos e colheita de amostras, no Hospital Escolar Veterinário, no Centro Veterinário de Alverca, no Hospital Veterinário das Laranjeiras, no Hospital Veterinário Atlântico, no Hospital Veterinário do Arco do Cego e Centro Veterinário “Império do Animal”, um grande, grande obrigada. Este trabalho não teria sido possível sem vós.

Aos enfermeiros, que tantas vezes encontraram um bocadinho para me ajudar nas colheitas, Dirce, Filipe(s), Joana, Luís, Magali, Pedro, Rita, Sofia e Tiago, podem, desde já, cobrar-me os favores que quiserem e para sempre!

À Dra. Salomé, à Dra. Alexandra e à Pamela do Laboratório de Análises Clínicas Prof. Dr. Braço Forte, o meu obrigada pela simpatia e por todas as vezes que me ajudaram nas minhas embrulhadas.

Aos meus colegas (e amigos!) estagiários, os 6 meses que passei no HEV nunca teriam sido tão bons sem vós. Que o vosso percurso esteja sempre cheio de oportunidades e de coisas boas, e espero que alcancem os objetivos que acharem inatingíveis.

A todos os médicos/funcionários com quem tive o prazer de partilhar o meu estágio, obrigada por todo o conhecimento e simpatia que levo de recordação do Hospital. Nunca me vou cansar de elogiar a vossa dedicação e o vosso empenho em crescer e fazer sempre melhor.

Não podia deixar de agradecer também a toda a equipa do Centro Veterinário de Alverca, em especial ao Dr. Nuno Santos, à Dra. Vanessa Borges e ao Dr. David Santos, que não só me receberam de braços abertos, como me desafiaram todos os dias. O vosso trabalho foi uma das razões que me fez escolher o que estou a fazer hoje.

Aos meus Pais, por todas as vezes que ouviram os meus desabafos, nos dias menos bons, e as minhas vitórias, nos dias incríveis, pela paciência, pelo apoio, por me terem dado tudo para poder estar onde estou hoje. Aos meus irmãos, Joana e Miguel, por tentarem sempre ajudar, mesmo com as ideias e soluções mais mirabolantes, mas sempre cheias de

boas intenções. Aos meus Avós, por quererem sempre saber de tudo e por tomarem conta de mim ao longo de todos estes anos.

Ao João, mais que um namorado, um grande amigo e um companheiro, que acredita em mim mesmo quando eu acho que não consigo mais, que me ensinou que o não está sempre garantido e que vale sempre a pena lutar por aquilo que queremos, por muito que custe e por muito que demore. Tornaste Veterinária menos dura de estudar. Que o futuro nos traga mais e muitas aventuras.

A todos os meus amigos, obrigada. Ao Alex e à Nídia, companheiros de boleia, e os meus anjinhos, é tão bom saber que vos tenho sempre comigo. À Quica, a minha parceira de laboratório e de viagem, e à Nené, a minha nortenha e a primeira pessoa que conheci na faculdade, que nunca deixemos de ter conversas filosóficas sem pés nem cabeça e que se lembrem sempre que a vida é melhor do que nos parece. Os meus parceiros de tantas colheitas, só o facto de lá estarem comigo tornava tudo mais fácil. Obrigada pelas vezes que largaram os vossos afazeres só para me dar uma ajuda. Se me despachar disto antes de vós, quero que saibam que estou (e vou sempre estar) a torcer por vocês.

Aos Vadios, que me deram recordações e histórias para toda uma vida. Acho que se confirma que os amigos da faculdade duram para sempre. A todo o grupo incrível que viajou para Marrocos, que daqui a uns anos nos reunamos e repitamos!

À Cocas, à Sopas e à Tixa; apesar de estarmos espalhadas pelo mundo e de nos vermos cada vez menos, trago-vos sempre no peito em cada viagem que faço, em cada marco que alcanço. Que a vida nos volte a trazer para mais perto uma das outras e que o futuro nos traga mais e mais coisas boas.

## Resumo

A diabetes mellitus (DM) é a doença mais comum do pâncreas endócrino no cão. É uma síndrome caracterizada por hiperglicemia crônica, glicosúria, polifagia, poliúria/polidipsia e perda de peso. A nefropatia diabética (ND) corresponde a uma possível complicação da DM que, no caso dos humanos, corresponde à principal causa de doença renal crônica nos países ocidentais. A ND é caracterizada por microalbuminúria, proteinúria, hipertensão arterial sistêmica e perda de função renal. Os estudos realizados no âmbito da ND canina são escassos e, apesar da sua existência estar documentada, a sua expressão na prática clínica é baixa, o que a torna um tópico pouco discutido.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a função renal em cães com diagnóstico de DM, assim como a ocorrência de proteinúria, de modo a identificar a presença, ou não, de ND. Foi também avaliada a correlação entre estas variáveis e o tempo desde o diagnóstico de DM e a dose de insulina instituída.

O estudo incluiu 18 cães diabéticos e 17 cães saudáveis de idades e pesos idênticos. Nos cães diabéticos, 38,9% apresentaram um RPCU superior a 0,5. Este grupo apresentou ainda uma razão de possibilidades (*odds ratio*) de 10,87 (95% IC, 1,71-127,08,  $p < 0,05$ ) de desenvolver proteinúria em relação aos saudáveis. Apesar de os níveis de ureia não diferirem significativamente entre os dois grupos, o grupo diabético apresentou concentrações de creatinina e DMAS inferiores às encontradas no grupo saudável ( $p < 0,05$ ). Não foi encontrada uma correlação significativa entre as concentrações de ureia, creatinina, DMAS ou o RPCU e a duração do diagnóstico de DM, ou com a dose de insulina em curso.

Apesar de a ND clínica ser improvável em cães, os resultados obtidos evidenciam o possível efeito da DM a nível renal. Os níveis inferiores de creatinina e DMAS nos cães diabéticos sugerem a ocorrência de hiperfiltração glomerular, o que pode indicar a presença de alterações hemodinâmicas renais. Além disto, estes cães apresentam uma maior possibilidade de desenvolver proteinúria, o que reforça a importância da monitorização do RPCU nestes animais.

Este é o primeiro estudo de que temos conhecimento que não só avalia os valores de DMAS em cães diabéticos, como também os compara com os encontrados em cães saudáveis. Dos resultados obtidos poderemos inferir que os animais do nosso estudo com DM se possam encontrar numa fase de pré-nefropatia diabética, numa fase silenciosa, ou numa fase de nefropatia diabética incipiente. Continuam a ser necessários mais estudos que elucidem o impacto da DM sobre os biomarcadores de função e lesão renal de modo a melhor esclarecer a sua relevância na prática clínica veterinária.

Palavras-chave: diabetes mellitus, nefropatia, cão, biomarcadores, proteinúria.

## Abstract

Diabetes mellitus (DM) is the most common disease of the endocrine pancreas in dogs. It's a syndrome characterized by chronic hyperglycaemia, glycosuria, polyphagia, polyuria/polydipsia and weight loss. Diabetic nephropathy (DN) is a possible complication of DM that, in humans, is the main cause of chronic kidney disease in western countries. DN includes microalbuminuria, proteinuria, systemic hypertension and impaired kidney function. There are only a few studies regarding canine DN and, even though there are some reports of its occurrence in dogs, it isn't a popular topic because of how rare it is in clinical practice.

The aim of this study was to evaluate the renal function of dogs diagnosed with DM, as well as the occurrence of proteinuria, in order to identify the presence or absence of DN. We also tested if there was a correlation between these biomarkers and the time of diagnosis of DM and the insulin dosage they were being treated with.

The study included 18 diabetic dogs and 17 healthy dogs with similar ages and weights. 38,9% of the diabetic dogs had an UPC ratio higher than 0,5. This group had an *odds ratio* of 10,87 (95% IC, 1,71-127,08,  $p < 0,05$ ) of developing proteinuria when compared to healthy ones. Even though the serum urea concentration didn't differ between the two groups, diabetic dogs had significantly lower serum concentrations of creatinine and SDMA ( $p < 0,05$ ). There was no significant correlation between serum urea, creatinine or SDMA and UPC ratio and the time of diagnosis. We also didn't find an association between any of these variables and insulin dosage.

Even though the occurrence of clinical DN is unlikely in dogs, our results show the possible impact of DM on the kidney. The lower levels of serum creatinine and SDMA seen in diabetic dogs when compared to healthy ones suggest that glomerular hyperfiltration is present, which may be related with hemodynamic changes in the kidney. Besides, these dogs showed a higher chance of developing proteinuria, which reinforces the importance of UPC ratio assessment when monitoring these patients.

To our knowledge, this is the first study that not only evaluates SDMA levels in diabetic dogs, but also compares them to those found in healthy ones. Our results suggest that the diabetic dogs in our study can be in a pre-diabetic nephropathy phase, in a silent phase or in an incipient diabetic nephropathy phase.

More studies are needed in order to better understand how DM impacts kidney's function and injury biomarkers and their relevance in veterinary practice.

Key words: diabetes mellitus, nephropathy, dog, biomarkers, proteinuria.

## Índice

---

<b>I – Relatório de Atividades de Estágio.....</b>	<b>1</b>
<b>II – Revisão bibliográfica.....</b>	<b>5</b>
1. Diabetes mellitus no cão.....	5
1.1. Epidemiologia.....	5
1.2. Fisiopatologia.....	5
1.3. Classificação da diabetes mellitus.....	6
1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1.....	6
1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2.....	7
1.4. História e sinais clínicos.....	8
1.5. Diagnóstico.....	8
1.6. Tratamento.....	9
2. Nefropatia diabética.....	9
2.1. Fisiopatologia.....	10
2.1.1. Alterações bioquímicas.....	10
2.1.1.1. Stress oxidativo.....	10
2.1.1.2. Via dos poliós.....	10
2.1.1.3. Produtos terminais de glicação avançada ( <i>advanced glycation end products</i> - AGE).....	11
2.1.1.4. Via da proteína cinase C.....	12
2.1.1.5. Via da hexamina.....	12
2.1.2. Hiperfiltração.....	13
2.2. Formas clínicas de nefropatia diabética em humanos.....	15
2.2.1. Forma proteinúrica.....	16
2.2.2. Forma não-proteinúrica.....	17
2.3. Alterações histopatológicas.....	18
2.4. Diagnóstico.....	18
2.5. Contexto médico-veterinário.....	19
3. Avaliação laboratorial do aparelho urinário.....	21
3.1. Função renal.....	21
3.1.1. Ureia e creatinina.....	21
3.1.2. Dimetilarginina simétrica (DMAS).....	21
3.1.3. Cistatina C.....	22
3.2. Proteinúria.....	22
3.2.1. Microalbuminúria (MA).....	23
3.2.2. Rácio Proteína-Creatinina Urinário (RPCU).....	23

4. Estadiamento IRIS .....	24
<b>III – Avaliação da função renal em cães diabéticos: análise de indicadores .....</b>	<b>26</b>
1. Introdução e objetivos .....	26
2. Materiais e Métodos .....	26
2.1. Animais .....	26
2.1.1. Grupo com diabetes mellitus (GDM) .....	26
2.1.2. Grupo Saudável (GS) .....	27
2.2. Critérios de exclusão .....	27
2.3. Colheita de sangue e urina e acondicionamento das amostras .....	28
2.4. Análises laboratoriais .....	28
2.4.1. Medição da ureia .....	28
2.4.2. Medição da creatinina .....	28
2.4.3. Medição da DMAS .....	28
2.4.4. Medição do RPCU .....	29
2.5. Análise Estatística .....	29
3. Resultados .....	30
3.1. Caracterização da amostra .....	30
3.1.1. Grupo com diabetes mellitus (GDM) .....	30
3.1.2. Grupo Saudável (GS) .....	30
3.2. Análise de biomarcadores de função renal .....	32
3.2.1. Ureia e creatinina .....	32
3.2.2. DMAS .....	34
3.2.3. RPCU .....	35
3.3. Correlação entre a duração do diagnóstico de DM com as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e o RPCU .....	37
3.4. Correlação entre a dose de insulina e as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e o RPCU .....	39
4. Discussão .....	40
5. Conclusão .....	45
<b>IV - Bibliografia .....</b>	<b>47</b>
<b>V – Anexos .....</b>	<b>59</b>
Anexo 1: Classificação histopatológica da nefropatia diabética (Tervaert et al. 2010). ....	59
Anexo 2: Classificação histopatológica da nefropatia diabética em casos de DM tipo 2 (Fioretto and Mauer 2007) .....	59
Anexo 3: Estadiamento IRIS com base na concentração plasmática de creatinina e DMAS (International Renal Interest Society 2019) .....	60

Anexo 4: Subestadiamento IRIS com base na pressão arterial sistêmica (PAS) (International Renal Interest Society 2019).....	61
Anexo 5: Termo de consentimento de participação no estudo. ....	62
Anexo 6: Questionário preenchido pelos proprietários dos cães do GDM. ....	63
Anexo 7: Resultados do GDM – Animais, anamnese, concentração de ureia, creatinina, DMAS e RPCU. ....	64
Anexo 8: Resultados do GS – Animais, anamnese, concentração de ureia, creatinina, DMAS e RPCU. ....	65

## Lista de Figuras

Figura 1: O papel da hiperglicemia no stress oxidativo, o seu impacto na glicólise e as vias bioquímicas que conduzem à lesão microvascular na DM (adaptado de Brownlee 2001 e Brownlee 2005). ....	13
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo no GDM. ....	31
Gráfico 2: Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo no GS. ....	31
Gráfico 3: Frequência relativa das categorias de peso no GDM. ....	32
Gráfico 4: Frequência relativa das categorias de peso no GS. ....	32
Gráfico 5: Box Plot da distribuição da concentração de ureia sérica (mg/dl) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde. Dois <i>outliers</i> foram identificados pelo software, um em cada grupo.....	33
Gráfico 6: Box Plot da concentração de creatinina sérica (mg/dl) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde.....	34
Gráfico 7: Box Plot da concentração sérica de DMAS ( $\mu\text{g/dl}$ ) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde.....	35
Gráfico 8: Box Plot do Rácio proteína-creatinina urinário (RPCU) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde. Dois <i>outliers</i> foram identificados pelo software no grupo GS. ....	36
Gráfico 9: Distribuição das variáveis ureia (A), creatinina (B), DMAS (C) e RPCU (D) em relação à duração do diagnóstico de DM no GDM. ....	38
Gráfico 10: Distribuição das variáveis ureia (A), creatinina (B), DMAS (C) e RPCU (D) em relação à dose de insulina (UI/kg) no grupo DM. ....	39

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Classificação etiológica da DM sugerida pelo projeto ALIVE (adaptado). .....	7
Tabela 2: Subestadiamento IRIS quanto à proteinúria (International Renal Interest Society 2019). .....	25
Tabela 3: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no GDM considerando os parâmetros da idade, peso, duração do diagnóstico e dose de insulina em curso. ....	31
Tabela 4: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no grupo GS considerando os parâmetros da idade e peso. ....	31
Tabela 5: Número de animais e sua percentagem segundo o grupo e o grau de proteinúria. ....	36
Tabela 6: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada nos grupos GDM e GS considerando os parâmetros de concentrações de ureia, concentrações de creatinina e concentrações de DMAS, e RPCU. ....	37

## **Lista de abreviaturas e siglas**

IMC – índice de massa corporal  
ADN – ácido desoxirribonucleico  
ADP - adenosina difosfato  
AGE - *advanced glycation end products*  
AGL – ácidos gordos livres  
ALT – alanina aminotransferase  
ATP – adenosina trifosfato  
BID – *bis in die*  
BP – *borderline* proteinúrico  
CAMV – centros de atendimento médico-veterinário  
CC – condição corporal  
CKD273 – classificador proteómico urinário CKD273  
CKD-EPI - Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration  
CoA – coenzima A  
DM – diabetes mellitus  
DMAS – dimetilarginina simétrica  
DRC – doença renal crónica  
EROS – espécies reativas de oxigénio  
FADH<sub>2</sub> - flavina adenina dinucleótido  
FAS – fosfatase alcalina sérica  
FF – fração de filtração  
FMV-ULisboa – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa  
FR – frequência relativa  
GAPDH - gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase  
GFAT - glutamina:frutose-6 fosfato amidotransferase  
GH - *growth hormone*  
HEV – Hospital Escolar Veterinário  
Inc. - *incorporated*  
IL - interleucina  
IRA – insuficiência renal aguda  
IRIS – International Renal Interest Society  
ITU - infeção do trato urinário  
KIM-1 - *kidney injury molecule-1*  
LADA - *latent autoimmune diabetes in adults*  
L-FABP - *liver-type fatty acid binding protein*  
MA -- microalbuminúria

MDRD - Modification of Diet in Renal Disease  
NAD<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleótido oxidado  
NADH - nicotinamida adenina dinucleótido reduzido  
NADPH - nicotinamida adenina dinucleótido fosfato  
ND – nefropatia diabética  
NF-κB - fator nuclear kappa B  
NGAL - *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*  
NP – não-proteinúrico  
NO – monóxido de azoto  
OR – *odds ratio*  
P – proteinúrico  
PAAF – punção aspirativa com agulha fina  
PARP - poli (adenosina trifosfato-ribose) polimerase  
PAS – pressão arterial sistémica  
PD – polidipsia  
PP – perda de peso  
PU – poliúria  
RAGE - *receptors for advanced glycation end products*  
RNA – ácido ribonucléico  
RPCU – rácio proteína-creatinina urinário  
T4 – tiroxina  
TAC – tomografia axial computadorizada  
TFG – taxa de filtração glomerular  
TGF - *transforming growth factor*  
TNF - *tumor necrosis factor*  
UDP - uridina difosfato  
VEGF-A - *vascular endothelial growth factor A*  
WT1 – *Wilm's tumor protein*

### **Lista de símbolos**

% - percentagem  
< - menor que  
> - maior que  
± - desvio padrão  
≤ - menor ou igual que  
≥ - maior ou igual que  
® / ™ - marca registada

$\mu\text{g}$  - micrograma  
 $\mu\text{g/dl}$  – micrograma por decilitre  
dl - decilitro  
 $g$  – força centrífuga  
 $g$  – grama  
kg – quilograma  
L – litro  
mg – miligrama  
 $\text{mg/dl}$  – miligrama por decilitro  
ml – mililitro  
 $\text{ml/min/L}$  – mililitro por minuto por litro  
mmHg – milímetro de mercúrio  
 $^{\circ}\text{C}$  - graus Celsius  
 $p$  – p-value  
UI – unidades internacionais  
UI/kg – unidades internacionais por quilograma  
 $x$  – cruzamento  
A – alfa  
B – beta  
 $\delta$  - delta  
 $\kappa$  - kappa

## **I – Relatório de Atividades de Estágio**

---

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa), no período de 10 de Setembro de 2018 a 8 de Março de 2019. Durante este período, foram realizadas diferentes atividades clínicas nos serviços de Medicina Geral, Medicina Interna, Oftalmologia, Dermatologia, Oncologia, Radiologia, Ecografia, Cirurgia e na Unidade de Isolamento de Doenças Infecto-Contagiosas em turnos rotativos, compreendidos em horários das 8h às 15h e das 14h às 21h. Já as atividades na área do Internamento foram realizadas em turnos de 12 horas, das 8h às 20h ou das 20h às 8h, com supervisão de um médico veterinário responsável e enfermeiros/auxiliares veterinários. No total, foram realizadas 949 horas de estágio.

### **Medicina Geral**

Em Medicina Geral, realizaram-se 203 horas de assistência aos médicos veterinários de serviço. Nesta área, contactou-se com os proprietários dos pacientes, no sentido de desenvolver técnicas de comunicação e estabelecer empatia com os clientes, de modo a permitir a recolha de uma história clínica correta e completa. Na maioria das consultas foi feita a anamnese e o exame físico dos pacientes com posterior verificação pelo médico veterinário assistente. Foi feita a contenção dos animais, a colocação de colares isabelinos e de açaimes, a administração de vacinas e de diversos fármacos, foram feitas colheitas de sangue, colheitas de urina por cistocentese e por algaliação, colheitas de amostras por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) para citologia, colocação de cateteres endovenosos, preparação de sistemas de soro, prescrição de receitas e preenchimento de requisições de análises clínicas.

As consultas observadas mais frequentemente foram as de rotina (vacinação e desparasitação), bem como as de exame clínico de animais novos que vieram pela primeira vez ao HEV. Foram, também, frequentes as consultas cujo estímulo iatrotópico estava relacionado com problemas do foro digestivo, urinário, neurológico ou músculo-esquelético. Assistiu-se, igualmente, a consultas de urgência, sobretudo de animais em estado convulsivo, com traumatismos diversos, com crises de dispneia ou com obstrução do trato urinário inferior. Nestes casos, auxiliou-se o médico veterinário assistente na disponibilização de uma via endovenosa aberta, na preparação e administração de fármacos, na realização de oxigenoterapia, entubação, técnicas de reanimação e exames complementares de diagnóstico.

## **Medicina Interna**

Nesta área realizaram-se 70 horas de assistência ao médico veterinário de serviço. Assistiu-se maioritariamente a consultas de referência ou de segunda opinião e de acompanhamento do tratamento. A maioria dos casos tratavam-se de doenças endócrinas, mas também gastroenterite crónica por causas variadas e doenças do aparelho respiratório, em fase de diagnóstico ou já em tratamento. Também foi observada a realização de endoscopias digestivas altas e baixas e endoscopias do aparelho respiratório, algumas com recolha de biópsias, lavagens broncoalveolares ou remoção de corpos estranhos.

## **Oftalmologia**

Em Oftalmologia, realizaram-se 49 horas de assistência ao médico veterinário de serviço. Foram realizados exames oftalmológicos, com verificação dos reflexos palpebral, pupilar e de ameaça, realização do teste de Schirmer, tonometria, biomicroscopia e exame do fundo do olho, com posterior verificação pelo médico veterinário responsável. As afeções mais frequentemente observadas foram úlceras de córnea, catarata, glaucoma e luxações do cristalino. Foi, também, observada a realização de eletrorretinografia e de cirurgias oculares, nomeadamente enucleação do globo ocular, correção de entrópion e facoemulsificação do cristalino com implantação de uma lente intraocular para correção de cataratas.

## **Dermatologia**

Em Dermatologia, realizaram-se 35 horas de assistência ao médico veterinário de serviço. Foram realizados exames dermatológicos com recolha de amostras para citologia por meio de fita-cola, por aposição com lâmina e com recurso a zaragatoa, com posterior coloração e observação ao microscópico ótico. Foi observada também a realização de testes intradérmicos. A dermatite atópica foi a doença mais frequentemente observada.

## **Oncologia**

Nesta área realizaram-se 63 horas de assistência ao médico veterinário e ao enfermeiro de serviço. Muitas destas consultas consistiram na explicação aos proprietários do processo de quimioterapia, os cuidados a ter, possíveis efeitos secundários, a taxa de sucesso, o prognóstico e a sua relação com a qualidade de vida do animal. Foi também prestada assistência ao enfermeiro responsável pelos animais sujeitos a quimioterapia, com a receção e pesagem dos animais, colocação de cateteres endovenosos, recolha de sangue para hemograma, colocação de colares isabelinos, preparação dos quimioterápicos e a sua administração. Neste âmbito, foi-se familiarizado com os perigos associados à

administração e manipulação de quimioterápicos e com os equipamentos de proteção individual adequados.

### **Radiologia**

Nesta área realizaram-se 49 horas de trabalho, divididas pelas áreas de raio-X e tomografia axial computadorizada (TAC). No raio-X, foi feita a contenção e posicionamento dos animais. Quando necessário, foi feita a sedação ou anestesia geral dos animais, com posterior monitorização anestésica dos mesmos. Na TAC, foi observada a redação de relatórios dos exames realizados e foi realizada a cateterização, indução anestésica, entubação, monitorização anestésica e preparação e administração de contraste endovenoso.

### **Ecografia**

Foram realizadas 56 horas de trabalho nesta área. Aqui, procedeu-se à tricotomia e contenção dos animais e auxiliou-se na realização de cistocenteses, colecistocenteses, biópsias pulmonares, hepáticas, esplênicas e vesicais. A grande maioria dos exames observados consistiam em ecografias abdominais de cariz diagnóstico ou de monitorização.

### **Cirurgia**

Foram realizadas cerca de 152 horas neste serviço. Foi feita a receção dos animais, a sua pesagem e a sua condução até à sala de preparação pré-cirúrgica. Quando os animais o permitiam, era feita a sua cateterização. Caso contrário, era administrada a pré-medicação anestésica antes disto. Na preparação dos animais para a cirurgia, era feita a indução anestésica, entubação, acoplação do tubo endotraqueal ao sistema de anestesia volátil e, por fim, a tricotomia e desinfeção da área a interencionar. A administração de antibióticos e anti-inflamatórios era feita durante esta fase.

Uma vez dentro do bloco operatório, foram cumpridas as condições de assepsia necessárias. Quando circulante, foi feito o posicionamento do animal na mesa de cirurgia, a colocação do pulso-oxímetro, do termómetro esofágico e do medidor de pressão arterial. Auxiliou-se também na preparação do cirurgião e do ajudante de cirurgião e na abertura dos pacotes cirúrgicos. Quando anestesista, monitorizou-se a cor das membranas mucosas, o tempo de repleção capilar, a frequência cardíaca e a frequência respiratória, o pulso, a temperatura, o grau de estrabismo, a saturação de oxigénio, a capnografia e a pressão arterial. Enquanto teve a função de ajudante de cirurgião, auxiliou na exposição de órgãos, vasos ou acidentes ósseos a interencionar, na hemóstase e na realização de laqueações e suturas. Foi ainda possível realizar a gonadectomia de alguns animais como cirurgiã.

Após a cirurgia, foi feita a monitorização dos animais até à sua recuperação pós-anestésica. Procedeu-se ao contacto telefónico dos proprietários e à redação de fichas de alta cirúrgica de acordo com as indicações do médico-cirurgião responsável.

### **Internamento**

Foram realizadas no total 216 horas de Internamento ao longo do estágio curricular. Neste serviço, participou-se na passagem de casos feita no início de cada turno de trabalho, onde era feita a apresentação e discussão dos casos entre os médicos veterinários presentes. Após a passagem de casos, era feita a monitorização dos animais, onde era avaliada a cor das mucosas, o tempo de repleção capilar, os linfonodos, o grau de hidratação, a frequência cardíaca e a frequência respiratória, a palpação abdominal, o pulso arterial e a temperatura retal. Esta monitorização era feita, pelo menos, duas vezes por dia. Era também feito o registo da emissão de urina e da emissão de fezes assim como a alimentação dos animais, a qual, por vezes era realizada por meio de uma sonda nasoesofágica. Quando era necessário, fez-se a limpeza das jaulas e das caixas de areia no caso dos gatos, a realização de colheitas de sangue, colheitas de urina, medição da pressão arterial, algaliação, medição do volume de urina em animais algaliados, e o transporte dos animais internados para os serviços de Imagiologia ou de Cirurgia. Quando possível, era feita a preparação da medicação a administrar por animal num período de 8 horas, de modo a facilitar a sua administração na hora estipulada.

### **Unidade de Isolamento de Doenças Infecto-Contagiosas (UIDI)**

Na Unidade de Isolamento de Doenças Infecto-Contagiosas (UIDI) foram executadas 56 horas. Devido ao carácter contagioso, e por vezes zoonótico das doenças dos pacientes deste serviço, a manipulação destes implicava a utilização de equipamentos de proteção individual e a sua substituição entre animais. As doenças mais frequentes observadas neste serviço foram a panleucopénia felina, a parvovirose canina e a leptospirose. Os animais internados eram monitorizados três vezes ao dia por meio do exame físico, dum registo da frequência e aspeto quer da urina, quer das fezes emitidas e, ainda pela atitude face ao alimento oferecido. Quando foi necessário, transportou-se os animais aos serviços de Imagiologia ou Cirurgia. Durante o dia, era feita a preparação das medicações necessárias, sendo depois administradas às horas estipuladas. Participou-se também na realização de consultas de alta médica, ou, então, consultas onde era feita a explicação dos cuidados a ter, da medicação a administrar em casa e a monitorização da sua evolução clínica para determinada doença.

## II – Revisão bibliográfica

---

### 1. Diabetes mellitus no cão

#### 1.1. Epidemiologia

A diabetes mellitus (DM) é a doença mais comum do pâncreas endócrino no cão e no gato, com uma prevalência de 0,4 a 1,2% (Nelson & Reusch 2014). É mais frequentemente diagnosticada em cães entre os 5 e os 12 anos de idade, mas é mais comum entre os 7 e os 10 anos (Guptill et al. 2003).

#### 1.2. Fisiopatologia

A DM é um síndrome caracterizado por hiperglicemia crônica que tem como origem uma deficiência da produção de insulina (deficiência absoluta em insulina), uma diminuição da sensibilidade dos tecidos-alvo à insulina (deficiência relativa em insulina), ou uma combinação de ambos (American Diabetes Association 2013). Existem vários processos que podem levar ao desenvolvimento de DM, desde a destruição autoimune das células  $\beta$  do pâncreas da qual resulta uma deficiência absoluta em insulina, até doenças que causem insulinoresistência, como é o caso do hipersomatotropismo ou do hiperadrenocorticismo. É comum que a diminuição da produção de insulina e a resistência dos tecidos à sua ação coexistam no mesmo indivíduo, e por vezes é impossível determinar qual é a causa primária da hiperglicemia (Gilor et al. 2016).

A deficiência em insulina conduz a uma diminuição da captação da glucose, aminoácidos e ácidos gordos livres (AGL) pelas células, a um aumento da glicogenólise e gluconeogénese hepáticas e, conseqüentemente, hiperglicemia (Nelson 2015). Quando a glicémia ultrapassa o limiar de excreção renal (*renal threshold*), ocorre glicosúria. A glicosúria leva a diurese osmótica e ao aparecimento de poliúria (PU) e, com a perda de água, há ativação do mecanismo da sede, surgindo deste modo a polidipsia (PD). Devido à incapacidade das células em captar a glucose e à perda de glucose na urina, gera-se um balanço energético negativo, o que conduz à polifagia (Fracassi 2017).

No que diz respeito ao metabolismo proteico, há um aumento da proteólise e uma diminuição da síntese proteica, o que contribui, adicionalmente, para a hiperglicemia, mas que também leva a perda de massa muscular e possível caquexia (Nelson 2015).

A contínua deficiência em insulina e em glucose intracelular leva a um aumento do catabolismo lipídico e a um aumento da concentração de AGL em circulação. Estes são transportados para o fígado, onde passam pela  $\beta$ -oxidação e originam acetilcoenzima A (acetil-CoA), a qual é, por sua vez, direcionada para o ciclo de Krebs ou para a produção de

corpos cetónicos. O excesso de corpos cetónicos leva a cetoacidose diabética, uma complicação importante da DM. A mobilização de AGL em grandes quantidades para o fígado leva a um aumento da produção de triglicéridos, o que origina hipertrigliceridémia e lipidose hepática (Fracassi 2017).

### **1.3. Classificação da diabetes mellitus**

Na medicina veterinária, ao contrário do que ocorre na medicina humana, não existe um consenso internacional em relação à classificação da DM (Catchpole et al. 2008). Com efeito, houve uma tendência para adotar a classificação utilizada na medicina humana, mas esta tem sofrido alterações ao longo dos anos devido ao melhor entendimento das várias etiologias possíveis da DM. A classificação etiológica da DM aqui apresentada é a sugerida pelo projeto ALIVE da European Society of Veterinary Endocrinology, apoiada pela Society for Comparative Endocrinology.

#### **1.3.1. Diabetes mellitus tipo 1**

A DM tipo 1 corresponde a uma forma de DM onde existe uma deficiência em insulina permanente e uma necessidade absoluta de administração de insulina exógena de modo a controlar a glicémia, os sinais clínicos e prevenir a cetoacidose (Nelson & Reusch 2014; Gilor et al. 2016). Este tipo de DM pode estar associada a uma redução da secreção de insulina devido à destruição, à apoptose, à aplasia, à abiotrofia ou à hipoplasia das células  $\beta$ , ou ainda a uma secreção de insulina anómala (European Society of Veterinary Endocrinology 2018) (Tabela 1).

Nos cães, a DM tipo 1 é uma doença de etiologia multifatorial, para a qual contribuem vários fatores genéticos, factores ambientais e ainda a autoimunidade, para o início e progressão da doença. Atendendo ao facto de que a DM tipo I canina ocorre normalmente a partir dos 7 anos de idade, parece assemelhar-se à diabetes autoimune latente humana (*latent autoimmune diabetes in adults* ou LADA) (Nelson & Reusch 2014), que corresponde a uma forma de DM tipo 1 de desenvolvimento lento e progressivo que ocorre em adultos. Esta designação é utilizada para descrever os pacientes humanos adultos no momento do diagnóstico de DM, nos quais é possível detetar autoanticorpos contra a insulina ou contra os ilhéus pancreáticos, mas que ainda não necessitam de insulino-terapia (Tuomi et al. 1993). Também nos cães diabéticos está descrita a deteção de anticorpos contra as células dos ilhéus pancreáticos, contra a insulina e contra a pro-insulina (Hoenig and Dawe 1992; Davison et al. 2003; Davison et al. 2011).

### 1.3.2. Diabetes mellitus tipo 2

A DM tipo 2 corresponde a uma DM associada a insulinoresistência, com deficiência relativa em insulina. No Homem, pelo menos numa fase inicial, não existe necessidade de administração exógena de insulina (American Diabetes Association 2013).

A insulinoresistência pode ser devida a fatores endócrinos (hormona do crescimento (GH), glucocorticóides, progesterona e progestagêneos, catecolaminas, e hormonas tiroideias), obesidade, fármacos (diuréticos tiazídicos, agonistas  $\beta$ -adrenérgicos), mediadores inflamatórios ou alterações dos recetores e vias de sinalização intracelulares (European Society of Veterinary Endocrinology 2018) (Tabela 1).

**Tabela 1: Classificação etiológica da DM sugerida pelo projeto ALIVE (adaptado).**

<b>DM tipo 1</b> (deficiência na produção de insulina)	<b>DM tipo 2</b> (resistência à insulina)
<b>1. Redução da secreção</b> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Destruição<ul style="list-style-type: none"><li>• Imunomediada</li><li>• Destruição por doença do pâncreas exócrino (pancreatite, neoplasia, idiopática)</li><li>• Toxicidade (diazóxido)</li><li>• Infecção</li><li>• Idiopático</li></ul></li><li>b. Apoptose<ul style="list-style-type: none"><li>• Glucotoxicidade</li><li>• Lipotoxicidade</li><li>• Idiopática</li></ul></li><li>c. Aplasia/abiotrofia/hipoplasia</li></ul>	<b>1. Influência endócrina</b> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Hormona do crescimento (GH)<ul style="list-style-type: none"><li>i. Hipersecreção endógena<ul style="list-style-type: none"><li>• Origem pituitária</li><li>• Origem mamária</li></ul></li><li>ii. GH exógena</li></ul></li><li>b. Esteróides<ul style="list-style-type: none"><li>i. Glucocorticóides<ul style="list-style-type: none"><li>• Hipersecreção endógena</li><li>• Glucocorticóides exógenos</li></ul></li><li>ii. Progesterona/progestagêneos<ul style="list-style-type: none"><li>• Fase lútea<ul style="list-style-type: none"><li>▪ Gravidez</li><li>▪ Diestro (cão)</li></ul></li><li>• Progestagêneos exógenos</li></ul></li><li>iii. Outros</li></ul></li><li>c. Catecolaminas</li><li>d. Hormonas tiroideias<ul style="list-style-type: none"><li>i. Hipertiroidismo</li></ul></li></ul>
	<b>2. Obesidade</b>
	<b>3. Fármacos</b> <ul style="list-style-type: none"><li>a. Diuréticos tiazídicos</li><li>b. Agonistas <math>\beta</math>-adrenérgicos</li></ul>
	<b>4. Mediadores inflamatórios</b>
	<b>5. Alterações de recetores celulares e da comunicação intracelular</b>

No Homem, a maior parte dos pacientes com DM tipo 2 são obesos. No entanto, apesar da obesidade provocar resistência à insulina, não é por si só a causa de DM tipo 2. Em indivíduos obesos não diabéticos, há uma resposta compensatória das células  $\beta$  e um aumento da produção de insulina (Butler et al. 2003). A DM tipo 2 é consequente, então, de uma alteração intrínseca das células  $\beta$  que as impede de responder corretamente numa situação de resistência à insulina (Gilor et al. 2016). No caso dos cães, apesar do aumento da prevalência da obesidade nos últimos anos, não existe evidência de que tal resulte em DM, ao contrário do que ocorre nos gatos. Os cães obesos desenvolvem resistência à insulina, mas respondem apropriadamente com um aumento da sua produção (Verkest et al. 2012).

#### **1.4. História e sinais clínicos**

Os sinais clínicos clássicos incluem PU/PD, polifagia e perda de peso (PP) (Nelson and Reusch 2014). Os animais diabéticos podem ter uma condição corporal (CC) normal, baixa ou aumentada, dependendo do momento do diagnóstico e da causa que conduz à DM. À palpação abdominal, pode ser possível detetar hepatomegália. Também, podem ser observáveis repercussões oculares como a presença de cataratas em cães no momento do diagnóstico (Behrend et al. 2018), a presença de uveíte anterior e/ou queratoconjuntivite seca (Fracassi 2017). Pode também ser detetada hipertensão sistólica (Herring et al. 2014).

#### **1.5. Diagnóstico**

Em pacientes que se apresentem à consulta com sinais clínicos sugestivos de DM, é aconselhada a realização de um exame físico, hemograma, análises bioquímicas diversas, doseamento de eletrólitos, urina tipo II, urocultura, rácio proteína-creatinina urinário (RPCU), medição da pressão arterial sistémica (PAS) e medição da tiroxina (T4), de modo a confirmar o diagnóstico de DM e excluir outros diagnósticos diferenciais (Behrend et al. 2018).

O diagnóstico é feito quando a glicémia é igual ou superior a 200 mg/dl (11 mmol/L) na presença de sinais clínicos de hiperglicemia sem outra causa plausível (European Society of Veterinary Endocrinology 2018). Nos casos em que seja detetada hiperglicemia sem sinais clínicos de DM, é importante considerar a possibilidade de uma administração de glucocorticoides ou progestagénios, a presença de insulinoresistência e/ou hiperglicemia de stress (Behrend et al. 2018). A hiperglicemia devida a stress pode ser descartada através da medição seriada da glicémia em jejum num ambiente onde o animal se encontre calmo e confortável, da monitorização da glicosúria ou do doseamento de frutamina (European Society of Veterinary Endocrinology 2018). Caso todas estas possíveis causas sejam

eliminadas, num animal hiperglicémico e assintomático, o paciente pode ser classificado como em perigo de desenvolver DM (Behrend et al. 2018).

As alterações laboratoriais típicas da DM consistem em hiperglicemia persistente, em glicosúria, na presença de um leucograma de stress, em hipercolesterolemia e em hipertrigliceridemia. Nos cães, é frequente existir um aumento da fosfatase alcalina sérica (FAS) e da alanina aminotransferase (ALT). Na urina tipo II, pode existir glicosúria, mas, muitas vezes, também pode ser detetável a presença de proteinúria, cetonúria, bacteriúria e/ou cilindros. Devido à glicosúria, as infeções do trato urinário (ITU) são muito frequentes na DM, e como muitas vezes são assintomáticas, é importante realizar uma urocultura, por rotina (Behrend et al. 2018).

## **1.6. Tratamento**

O tratamento da DM clínica baseia-se em insulinoterapia, na modificação da dieta e no exercício moderado. Nos cães, a primeira escolha para a insulinoterapia deve ser uma insulina porcina de ação lenta, numa dose inicial de 0,25 UI/kg BID, arredondado à UI mais próxima. A administração de insulina deve ser feita em conjunto com a oferta de uma refeição de quantidade sempre idêntica (Behrend et al. 2018).

No que diz respeito à dieta, a sua modificação tem como objetivo a perda de peso em animais obesos ou, ao inverso, impedir a perda de peso nos restantes animais. Qualquer que seja a dieta recomendada para cães diabéticos, ela deve ser equilibrada e completa, oferecida em quantidade idêntica em todas as refeições e a intervalos regulares. Podem ser privilegiadas as dietas com quantidade elevada de fibras solúveis e insolúveis, pois estas reduzem a hiperglicemia pós-prandial e restringem o aporte calórico em cães diabéticos com CC normal ou obesos. Em cães com CC baixa, deve ser oferecida uma dieta de alta qualidade de manutenção, ou uma dieta formulada para animais diabéticos rica em fibra e não direcionada à perda de peso (Behrend et al. 2018).

## **2. Nefropatia diabética**

A nefropatia diabética (ND) é uma das complicações vasculares da DM, assim como a hipertensão sistémica e a retinopatia (Herring et al. 2014). A ND corresponde às alterações morfológicas e funcionais que ocorrem em consequência dos efeitos da hiperglicemia crónica no rim. A ND é a principal causa de doença renal crónica (DRC) no Homem, em países ocidentais (Bloom and Rand 2013).

## **2.1. Fisiopatologia**

### **2.1.1. Alterações bioquímicas**

#### **2.1.1.1. Stress oxidativo**

O stress oxidativo, provocado pela hiperglicemia, parece ser o ponto de partida para o desenvolvimento não só de ND, mas das restantes complicações microvasculares associadas à DM (Brownlee 2005).

Numa situação de hiperglicemia, há um aumento da glucose intracelular, nomeadamente nas células que possuem uma menor capacidade de controlar a entrada de glucose, como é o caso das células mesangiais do glomérulo renal. Este fenómeno provoca uma sobrecarga da cadeia de transporte de eletrões mitocondrial devido a um excesso da produção de NADH e FADH<sub>2</sub> no ciclo do ácido tricarboxílico, que é alimentado pela glucose. O excedente de eletrões é captado pelo oxigénio molecular, originando superóxido, uma espécie reativa de oxigénio (ERO) (Brownlee 2005).

Por sua vez, a lesão do ácido desoxirribonucleico (ADN) pelas ERO leva à ativação da poli (adenosina trifosfato-ribose) polimerase (PARP), uma enzima responsável por reparar lesões no material genético. Esta enzima vai interagir com uma enzima glicolítica fulcral para a glicólise, a gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase (GAPDH), e adicionar-lhe polímeros de ADP-ribose (Du et al. 2003), o que a torna inativa, interfere com o processo de glicólise e, por sua vez, leva a uma acumulação de todos os produtos intermediários da glicólise que se encontram a montante. Estes produtos intermediários vão alimentar 4 vias bioquímicas que contribuem para o desenvolvimento das lesões microvasculares que conduzem à ND: a via dos polióis, a via da hexamina, a via da proteína cinase C e a via dos produtos terminais de glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGE) (Brownlee 2005) (Figura 1).

#### **2.1.1.2. Via dos polióis**

A via dos polióis recai maioritariamente sobre a enzima aldose redutase. A principal função da aldose redutase é reduzir os aldeídos tóxicos na célula em álcoois inativos. No entanto, é também responsável por reduzir a glucose em sorbitol, o qual é depois oxidado e dá origem a frutose. Numa situação de hiperglicemia, a aldose redutase acaba por consumir NADPH ao reduzir a glucose, o qual é, também, um cofator na regeneração de um antioxidante intracelular crucial: a glutatona (Lee and Chung 1999). Assim, a hiperglicemia, por interferir na produção de glutatona, aumenta a suscetibilidade da célula a danos oxidativos através da via dos polióis (Brownlee 2001; Brownlee 2005).

### **2.1.1.3. Produtos terminais de glicação avançada (*advanced glycation end products* - AGE)**

Os AGEs constituem uma grande variedade de moléculas que advêm de reações não enzimáticas entre açúcares redutores ou lípidos oxidados e proteínas, aminofosfolípidos ou ácidos nucleicos (Barbosa et al. 2008; Silva & Costa 2008; Barbosa et al. 2009). Como esta reação não requer a participação de enzimas, a sua ocorrência depende apenas da concentração de glucose e de proteína, da semi-vida da proteína e da sua reatividade com os grupos amina (Júnior & Lemos 2007; Kanwar et al. 2008).

Os AGEs podem ser produzidos através de várias vias. A via clássica corresponde à reação de Maillard, que se inicia com a formação de base de Schiff que, sequencialmente, sofre rearranjos e origina os produtos iniciais da reação de Maillard: os produtos de Amadori. Dois exemplos destes produtos são a hemoglobina glicada e a frutossamina. Os produtos de Amadori possuem grupos carbonilo reativos, que se condensam com grupos amina, originando os AGEs (Bem & Kunde 2006; Silva & Costa 2008; Ferreira et al. 2011).

A via alternativa é chamada de via do “stress carboxílico”. Neste caso, a oxidação de lípidos ou de açúcares gera compostos dicarbonílicos intermediários altamente reativos, como o metilglioxal e o glioxal (Huebschmann et al. 2006). Estes compostos podem chegar a ser 20 mil vezes mais reativos do que a glucose, e correspondem aos principais intermediários da formação de AGEs (Meade et al. 2003). Adicionalmente, a estimulação inflamatória de neutrófilos, monócitos e macrófagos, que induz a produção de mieloperoxidase e da enzima NADPH oxidase, podem induzir a produção de AGEs por meio da oxidação de aminoácidos (Barbosa et al. 2008; Barbosa et al. 2009).

Durante algumas das reações que originam os AGEs, ocorre a formação de EROs que promovem, em conjunto com os primeiros, stress oxidativo e danos estruturais e funcionais em macromoléculas (Brownlee 2005).

A formação de AGEs ocorre lentamente em condições fisiológicas, estando associada ao processo de envelhecimento, mas é acelerada em condições de hiperglicemia ou stress oxidativo, como é o caso da DM (Barbosa et al. 2008).

Os AGEs podem exercer os seus efeitos através de 3 mecanismos principais (Brownlee 2005):

- a) Modificação de estruturas intracelulares e interferência na transcrição genética, interferindo na função celular;
- b) Interação com proteínas da matriz extracelular, modificando a sinalização entre as moléculas da matriz e a célula;
- c) Modificação das proteínas e lípidos circulantes, permitindo que estes se liguem a recetores específicos e causem a produção de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento.

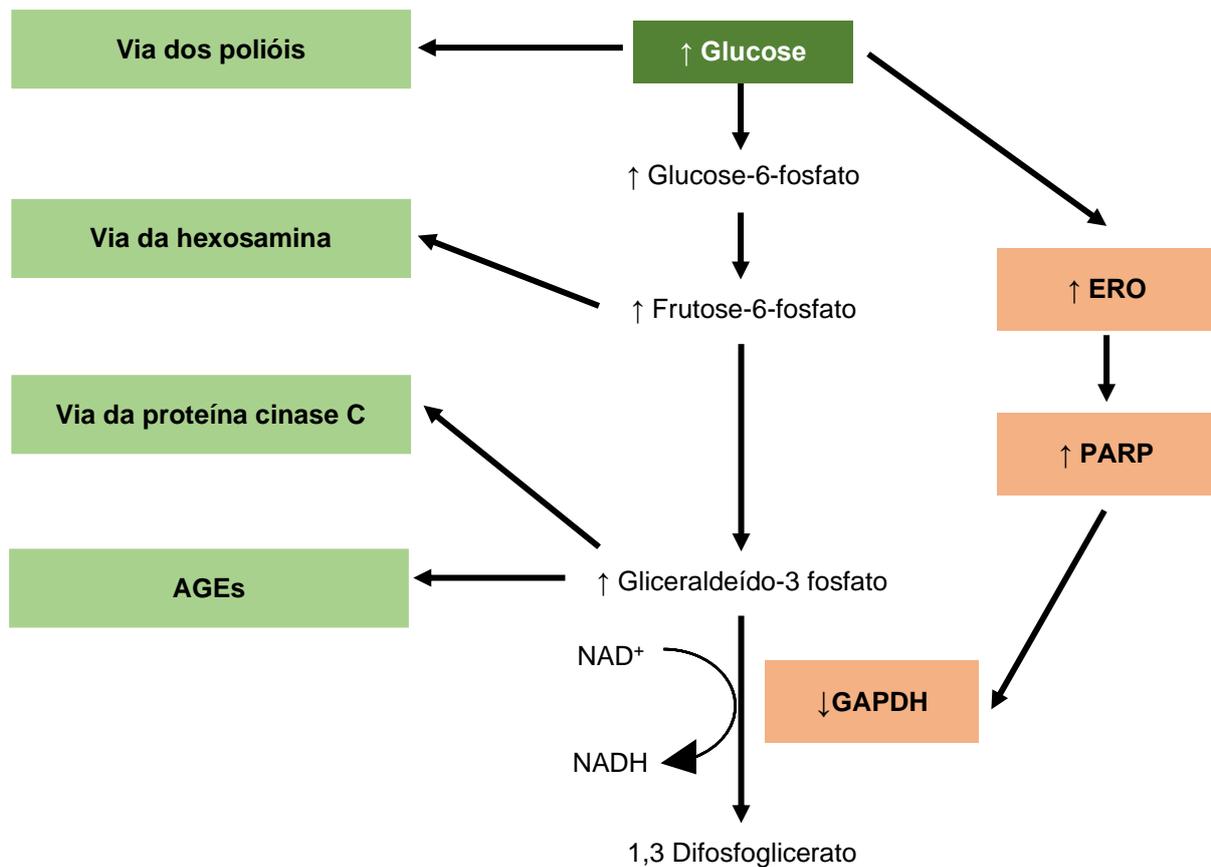
Os AGEs podem atuar através de recetores na superfície celular ou intracelularmente (Sakurai et al. 2003; Di Naso et al. 2010; Tan et al. 2010). Os recetores RAGE (*receptors for advanced glycation end products*) são provavelmente os mais bem caracterizados. O RAGE é minimamente expresso em condições fisiológicas mas, quando existe um excesso de AGEs, a sua expressão encontra-se aumentada em macrófagos, monócitos, células musculares lisas, células endoteliais e astrócitos (Lin 2006).

#### **2.1.1.4. Via da proteína cinase C**

A hiperglicemia aumenta a síntese de diacetilglicerol, que é um cofator ativador das isoformas da proteína cinase C,  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\alpha$  (Koya and King 1998). Quando a proteína cinase C é ativada, afeta a expressão génica de citoquinas, hormonas e outros fatores envolvidos na regulação de várias funções vasculares (Schaan 2003). Alguns dos efeitos conhecidos são a diminuição da produção de monóxido de azoto (NO), os aumentos da produção de *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), os quais conduzem à vasoconstrição, à oclusão capilar e à expressão de genes pró-inflamatórios (Brownlee 2005).

#### **2.1.1.5. Via da hexamina**

A maior parte da glucose intracelular é metabolizada através da glicólise (Figura 1). Parte da frutose-6-fosfato que é originada é utilizada noutra via bioquímica, onde a enzima glutamina:frutose-6 fosfato amidotransferase (GFAT) a converte em glucosamina-6 fosfato e, finalmente, em uridina difosfato (UDP)-N-acetil glucosamina (Brownlee 2005). Este produto final é adicionado a resíduos de serina e treonina de certos fatores de transcrição. No entanto, quando a UDP-N-acetil glucosamina é produzida em excesso, os resíduos sofrem uma modificação exacerbada e inadequada, conduzindo a alterações patológicas na expressão génica (Sayeski & Kudlow 1996; Kolm-Litty et al. 1998; Wells & Hart 2003). Por exemplo, sabe-se que a modificação do fator de transcrição Sp1 em humanos resulta num aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1 e do inibidor do ativador do plasminogénio-1, os quais são deletérios para os vasos sanguíneos (Du et al. 2000).



**Figura 1: O papel da hiperglicemia no stress oxidativo, o seu impacto na glicólise e as vias bioquímicas que conduzem à lesão microvascular na DM (adaptado de Brownlee 2001 e Brownlee 2005). Legenda: AGEs: produtos terminais de glicação avançada; ERO: espécies reativas de oxigênio; GAPDH: gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase; NAD<sup>+</sup>: nicotinamida adenina dinucleótido oxidado; NADH: nicotinamida adenina dinucleótido reduzido; PARP: poli(ADP-ribose) polimerase.**

### 2.1.2. Hiperfiltração

Um dos marcos iniciais do desenvolvimento de ND é a hiperfiltração glomerular. A hiperfiltração glomerular pode ser definida de três formas diferentes: um aumento da taxa de filtração glomerular (TFG) total (*“whole-kidney” hyperfiltration*), um aumento da TFG por nefrônio (*“single-nephron” hyperfiltration*), ou um aumento da fração de filtração (FF) (rácio entre a TFG e o fluxo efetivo de plasma no rim) (Helal et al. 2012). Este fenómeno é provocado por um conjunto de modificações ao nível do nefrônio em consequência de alterações hemodinâmicas no próprio rim, as quais ocorrem em resposta a estímulos metabólicos e (neuro)hormonais e/ou em resposta à redução do número de nefrônios funcionais. Estas modificações aumentam a pressão hidrostática glomerular assim como o fluxo transcapilar de ultrafiltrado e de macromoléculas, das quais se destaca a albumina. A hiperfiltração glomerular conduz a hipertensão glomerular, a lesão endotelial, das células

mesangiais e dos podócitos. Subsequentemente, ocorre glomerulosclerose e, conseqüentemente, existe uma diminuição do número de nefrónios funcionais com agravamento da hipertensão glomerular nos restantes. Este evento contribui para o início e a progressão de doença renal (Arima & Ito 2003; Oliveira et al. 2010; Tonneijck et al. 2017; Vaden 2017).

Os mecanismos específicos que conduzem à hiperfiltração não estão completamente esclarecidos no caso da DM, mas pensa-se que existam três conjuntos principais: as alterações ultraestruturais, as alterações hemodinâmicas glomerulares e, ainda, as alterações tubulares. Estes mecanismos sobrepõem-se e, assim, atuam como um todo (Tonneijck et al. 2017).

As alterações ultraestruturais incluem uma hipertrofia renal por hipertrofia dos nefrónios (particularmente do túbulo contornado proximal) (Vallon & Komers 2011), um aumento da produção de matriz extracelular pelas células mesangiais e a sua apoptose (Papadopoulou-Marketou et al. 2017) e, por fim, o espessamento da membrana glomerular basal (Umanath and Lewis 2018). Estas alterações comprometem a eficácia da barreira de filtração glomerular.

De facto, o stress oxidativo e as vias bioquímicas descritas anteriormente contribuem fortemente para estas alterações. A membrana basal glomerular, as células mesangiais, os podócitos e as células tubulares renais acumulam altos níveis de AGEs. Os AGEs, a proteína cinase C, e a via da hexamina, aumentam a produção de TGF- $\beta$ , o que favorece a síntese dos componentes da matriz de colagénio e contribui para o espessamento da membrana basal glomerular (Vlassara & Palace 2002). A formação de ligações cruzadas entre os AGEs e o colagénio tipo I ou a elastina, também contribui para o espessamento da membrana basal glomerular, o que vai provocar um aumento da rigidez vascular (Goldin et al. 2006). As células mesangiais, por sua vez, respondem aos níveis elevados de AGEs com um aumento da síntese de proteínas da matriz extracelular e de colagénio tipo IV, levando à expansão da sua matriz extracelular (Vlassara & Palace 2002).

Além destes factos, a interação dos AGEs com os RAGE nas células endoteliais aumenta a expressão de endotelina-1, de VEGF e de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL) 1 $\alpha$  e a IL-6, o que promove a transdiferenciação das células epiteliais em miofibroblastos e a ocorrência de fibrose tubulointersticial (Oldfield et al. 2001; Goldin et al. 2006). Verifica-se, também, uma “down-regulation” da expressão de nefrina pelo podócitos (Carranza et al. 2015).

Para além das alterações ultraestruturais, ocorrem, também, alterações hemodinâmicas importantes ao nível glomerular. De facto, existe um desequilíbrio dos mecanismos responsáveis pelo controlo do tónus arteriolar, isto é, prevalecem aqueles que favorecem a vasodilatação da arteríola aferente (disfunção dos canais de cálcio voltagem-

dependentes e aumento da expressão de canais de potássio nas células musculares lisas vasculares, aumento da sensibilidade ao NO, deficiência em insulina, excesso de péptido natriurético atrial, diminuição da resposta miogénica, AGEs, entre outros) e a vasoconstrição da arteríola eferente (angiotensina II, ERO). Deste modo surge hipertensão glomerular e consequente hiperfiltração (Arima and Ito 2003; Vallon and Komers 2011; Sasson and Cherney 2012; Tikellis et al. 2014).

A nível tubular, numa situação fisiológica, o aumento da TFG iria levar a um aumento do aporte de sódio e cloreto de sódio ao túbulo contornado distal e, consequentemente à mácula densa. A captação de uma maior quantidade de cloreto de sódio pelas células da mácula densa conduz à libertação de adenosina trifosfato (ATP) pelas mesmas, o que suprime a libertação de renina pelas células justaglomerulares e aumenta a resistência na arteríola aferente, de modo a reduzir a TFG ao nível do nefrónio e prevenir que haja um fluxo de fluido tubular que ultrapasse a capacidade de reabsorção dos túbulos renais. Este mecanismo tem o nome de *feedback* tubuloglomerular (Verlander 2013). Na presença de hiperglicemia, a elevada concentração de glucose presente no filtrado tubular conduz a um aumento da reabsorção de sódio e de glucose no túbulo contornado proximal. Deste modo, o filtrado tubular que alcança a macula densa apresentará uma baixa concentração em sódio e, consequentemente, cloreto de sódio. Esta ocorrência conduz a uma inativação do *feedback* tubuloglomerular e leva à vasodilatação da arteríola aferente, contribuindo para a hiperfiltração glomerular (Tonneijck et al. 2017). Por outro lado, a hiperplasia e hipertrofia tubular, induzida pela DM, e a hiper-reabsorção tubular proximal reduzem a pressão intratubular e a pressão hidrostática no interior da cápsula de Bowman, o que perpetua a hiperfiltração glomerular por aumentar o gradiente de pressão no nefrónio (Persson et al. 2010; Vallon & Komers 2011).

Estas alterações, quando persistentes, contribuem a longo prazo para a ocorrência de glomerulosclerose, albuminúria, hipertensão arterial sistémica e insuficiência renal (Umanath and Lewis 2018).

## **2.2. Formas clínicas de nefropatia diabética em humanos**

A primeira descrição clínica de desenvolvimento da ND foi feita no final dos anos 70 por Kussman, Goldstein e Gleason. Com base em vários relatórios de exame de autópsia de pacientes humanos com DM tipo 1, e cuja causa de morte tinha sido insuficiência renal, foi possível descrever a sequência de acontecimentos que conduzem a esta fase terminal da ND. Segundo este estudo, foi definido que a ND era caracterizada por uma progressão linear de normoalbuminúria para microalbuminúria (MA), proteinúria, aumento da creatinina sérica e, por fim, insuficiência renal terminal (Umanath and Lewis 2018). Atualmente, sabe-se que a incidência de ND é elevada durante os primeiros 10 a 20 anos desde o diagnóstico

de DM (Magee et al. 2017), e que, tipicamente, órgãos como os rins, os olhos e os nervos demoram cerca de 15 anos até serem afetados pelos efeitos da hiperglicemia. Entre 20 e 40% dos pacientes diabéticos acabam por desenvolver DRC (Nelson et al. 1996; Papadopoulou-Marketou et al. 2017), e um número significativo acaba por desenvolver mesmo insuficiência renal terminal com necessidade de realização de hemodiálise ou de um transplante renal. Por outro lado, caso não existam sinais de lesão renal ao fim de 20 a 25 anos após o diagnóstico de DM, a probabilidade de ocorrerem complicações renais é reduzida (Magee et al. 2017).

Apesar de inicialmente se considerar que a proteinúria antecedia o aumento da creatinina sérica, existem alguns indivíduos diabéticos que mostram sinais de perda de função renal sem que apresentem, no entanto, proteinúria (Silva et al. 2017). Deste modo, considera-se que a ND pode apresentar uma forma proteinúrica e uma forma não-proteinúrica, descritas abaixo.

### **2.2.1. Forma proteinúrica**

A forma proteinúrica da ND é considerada a apresentação clássica da ND, e é caracterizada por uma progressão linear de normoalbuminúria, para MA, e proteinúria, que culmina no desenvolvimento de insuficiência renal terminal (Pugliese 2014). A progressão da ND proteinúrica foi descrita em 5 fases por Mogensen, Christensen e Vittinghus em 1983. O intervalo de tempo, desde o diagnóstico de DM, até que cada uma das fases se instale está descrita por Caramori e Mauer (2009) e David J. Polzin (2017a):

- Fase pré-nefropatia: caracterizada por hipertrofia renal e hiperfiltração glomerular. As alterações são pelo menos parcialmente reversíveis com a insulino-terapia (0-5 anos);
- Fase silenciosa: corresponde a uma fase sem sinais clínicos de doença, mas onde já existem alterações ultraestruturais importantes. Há um aumento da TFG. Pode ocorrer MA transitória, nomeadamente durante o exercício. Esta fase pode prolongar-se durante vários anos, e alguns dos pacientes nunca chegam a progredir para as fases seguintes (3-7 anos);
- ND incipiente: caracterizada pela ocorrência de MA persistente e TFG aumentada ou normal (7-15 anos);
- ND patente: caracterizada por proteinúria persistente, hipertensão arterial sistémica e TFG diminuída (15-20 anos);
- Insuficiência renal terminal: urémia (após 15-25 anos).

No caso dos pacientes com DM tipo 2, é difícil fazer uma previsão do momento de desenvolvimento destas alterações, uma vez que nem sempre é possível determinar quando

surgiu a DM, para além do facto que muitos destes pacientes já apresentam sinais de lesão renal no momento do diagnóstico (Umanath and Lewis 2018).

Apesar de esta sequência de acontecimentos ser vista como a típica, existem estudos que mostram que a MA nem sempre evolui para proteinúria, e que, por vezes, ocorre remissão para normoalbuminúria, nomeadamente quando existe um bom controlo da glicémia e da PAS (Gaede et al. 2004; Araki et al. 2005).

### **2.2.2. Forma não-proteinúrica**

A possibilidade da existência de uma forma não-proteinúrica da ND foi proposta após vários estudos mostrarem a ocorrência de uma diminuição da TFG em pacientes com DM tipo 2, sem que, no entanto, apresentassem proteinúria (Silva et al. 2017).

A prevalência desta forma de ND em pacientes diagnosticados com DM tipo 2 varia entre estudos, e pode ir de 51% (Retnakaran et al. 2006) a 91,9% (Afghahi et al. 2011). Os fatores de risco associados ao desenvolvimento desta forma são a idade avançada, o sexo feminino, a obesidade, a hipertensão arterial sistémica, a hipertrigliceridémia, a doença cardiovascular e o tabagismo (Yokoyama et al. 2009).

Diferentes autores sugerem diferentes mecanismos que explicam a sua ocorrência, nomeadamente:

1. A possibilidade destes pacientes conseguirem reabsorver toda a proteína perdida no glomérulo renal, não sendo a mesma detetada na urina (Robles et al. 2015);
2. A perda de função renal observada pode dever-se a episódios de insuficiência renal aguda (IRA) devido a glomerulosclerose senil, a êmbolos lípidos e/ou isquémia não relacionados com a ND (Ninomiya et al. 2009);
3. Ou, ainda, devido ao facto destes pacientes desenvolverem preferencialmente lesões macroangiopáticas e não microangiopáticas (Penno et al. 2012).

O facto de o diagnóstico e tratamento da DM serem, agora, relativamente acessíveis podem, por isso, ser um fator importante para esta mudança de paradigma. Atualmente, é possível ter um bom controlo da glicémia, da colesterolémia e da PAS destes pacientes, e como tal, pode-se prevenir a ocorrência de proteinúria. Com efeito, já Dalla Vestra, Saller, Bortoloso, Mauer e Fioretto (2000) demonstraram que o aumento da hemoglobina glicada era um fator de risco para o aumento da albuminúria, mas não para a redução da TFG, razão pela qual o desenvolvimento deste quadro de perda de função renal sem albuminúria, pode ser independente da hiperglicemia e, assim, desenvolver-se, mesmo quando o controlo da mesma é ideal. Não obstante, Bash, Selvin, Steffes, Coresh e Astor (2008) mostraram que existe uma associação entre a incidência de DRC e a hemoglobina glicada mesmo quando a albuminúria está ausente.

A ND não-proteinúrica não é amplamente reconhecida pela comunidade médica, pelo que são necessários mais estudos de investigação de modo a esclarecer a sua epidemiologia, a patogénese, os fatores de risco, o tratamento e o prognóstico (Silva et al. 2017).

### **2.3. Alterações histopatológicas**

As lesões histopatológicas clássicas de ND foram descritas pela primeira vez em 1936 por Kimmelstiel e Wilson. O padrão clássico é descrito como maioritariamente glomerular e nodular (nódulos ou lesões de Kimmelstiel-Wilson). Apesar de este ser apresentado como o padrão típico, o padrão de lesão glomerular difuso é o mais comum no Homem, e é caracterizado por um espessamento da membrana basal glomerular e uma expansão da matriz mesangial. Também, pode ser visível hialinose, presença de microaneurismas e uma arteriosclerose das arteríolas aferentes e eferentes (Umanath & Lewis 2018), assim como tubulopatia. A tubulopatia diabética é caracterizada por hipertrofia das células tubuloepiteliais, com espessamento da membrana basal tubular, transdiferenciação epitelial-mesenquimatosa e acumulação de glicogénio. A expansão do espaço intersticial e infiltração de miofibroblastos e macrófagos também são outras lesões encontradas (Brownlee et al. 2011).

Tervaert et al. (2010), propuseram um esquema de classificação patológica da ND onde as lesões glomerulares eram o seu foco principal (Anexo 1). Atualmente, este método de classificação tem sido posto em causa, na medida em que existe a evidência de que, apesar de grande parte dos pacientes com DM tipo 1 apresentarem uma glomerulopatia, alguns pacientes com DM tipo 2 apresentam uma estrutura glomerular normal e lesões maioritariamente tubulointersticiais e vasculares (Brocco et al. 1997). Nestes indivíduos, pode ser utilizado o esquema de classificação proposto por Fioretto e Mauer (2007) para os casos de DM tipo 2, que os separa em estrutura normal ou quase normal, nefropatia diabética típica e em padrões de lesão renal atípicos (Anexo 2).

### **2.4. Diagnóstico**

Segundo a American Diabetes Association (2019), a monitorização da MA é considerado o melhor teste não invasivo para detetar e monitorizar a ND, em conjunto com a estimativa da TFG. No Homem, recomenda-se que estes procedimentos sejam feitos anualmente a partir dos 5 anos após o diagnóstico, desde o diagnóstico da DM tipo 1, e a partir do momento do diagnóstico na DM tipo 2. No caso do Homem, a TFG pode ser calculada a partir da concentração sérica de creatinina, pela fórmula baseada no estudo “Modification of Diet in Renal Disease” (MDRD) (Klahr 1989) ou no “Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration” (CKD-EPI) (Levey et al. 2009).

Tanto a MA como a redução da TFG podem ser devidas a outras causas que não a ND. Assim, de modo a contextualizar estes achados, é importante ter em conta a sequência de acontecimentos descrita por Mogensen et al. (1983), pelo menos para os casos de DM tipo 1. Nos casos de DM tipo 2, nem sempre se verifica esta sequência clássica de acontecimentos. Assim, deve-se ter em conta a história clínica, o exame físico e, caso seja oportuno, realizar outros exames complementares de diagnóstico. Um exame útil, mas pouco realizado, é a biópsia renal. No entanto, no caso da história e do momento de início da proteinúria apoiarem o diagnóstico de ND, não é necessário recorrer a este procedimento, dado que os achados histopatológicos não são patognomónicos de ND (Umanath & Lewis 2018).

A existência de uma forma não-proteinúrica de ND levanta a questão de a MA poder não ser o modo de rastreio ideal de ND, pois nestes casos existe uma diminuição da TFG e o desenvolvimento de DRC sem que a mesma seja precedida por MA. Alguns autores defendem que a diminuição da TFG é o sinal clínico mais predominante da ND, e não a MA, pelo que reduções da TFG, ainda que dentro dos limites de referência, devem ser tidas como relevantes (Krolewski 2015).

Atualmente, existem em estudo outros marcadores urinários e circulantes de ND, nomeadamente podocitúria, nefrinúria, WT1, VEGF-A, podocalixina, glicosaminoglicanos, citocinas do grupo *tumor necrosis factor* (TNF) e TGF, *liver-type fatty acid binding protein* (L-FABP), adiponectina urinária de alto peso molecular, microRNA, transferrina, colagénio de tipo IV, CKD273, KIM-1, NGAL,  $\alpha$ -1 microglobulina e a proteína transportadora do retinol (Ioannou 2017; Silva et al. 2017). Porém, até que estes novos biomarcadores sejam validados e incluídos nas “guidelines” de controlo dos pacientes diabéticos, é aconselhada a realização de avaliações anuais dos mesmos, com medição da MA, estimativa da TFG e medição da PAS (Vassalotti et al. 2016).

## **2.5. Contexto médico-veterinário**

A ocorrência de ND clínica em cães com DM não induzida experimentalmente é rara. Tal facto pode ser devido a que a DM seja uma doença de cães de idade mais avançada, muitos dos quais não vivem mais do que cinco anos após o diagnóstico e, deste modo, o intervalo de tempo pode não ser suficiente para o desenvolvimento deste tipo de complicações (Feldman & Nelson 2004; Polzin 2017a). Apesar de alguns dos sinais associados a ND terem sido relatados em cães diabéticos, como a hipertensão arterial sistémica e a proteinúria, assim como lesões glomerulares ultraestruturais, não existe evidência de que ocorra progressão para DRC nestes casos (Polzin 2017a).

Está descrita a ocorrência de hipertensão sistólica em 35 a 58,82% dos cães com DM não induzida experimentalmente, normalmente moderada (150-160 mmHg) (Mazzi et al.

2008; Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016; Priyanka et al. 2018). Por sua vez, a MA ocorre em 55% a 59% dos cães com DM não induzida experimentalmente (Mazzi et al. 2008; Herring et al. 2014). Já Herring et al. (2014) relataram que 2 dos 3 cães diabéticos com MA, no seu estudo, acabaram por desenvolver proteinúria. Assim, à semelhança do que ocorre na ND humana, a determinação da MA parece ser um possível indicador de lesão renal precoce (Mazzi et al. 2008).

A proteinúria está descrita em cães com DM não induzida experimentalmente, com uma prevalência que varia entre 30 e 55% consoante o estudo (Hess et al. 2000; Mazzi et al. 2008; Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016). Porém, Marynissen et al. (2016) não encontraram diferenças significativas entre o RPCU de cães diabéticos e o RPCU de cães saudáveis. Também, parece não existir evidência de uma variação significativa da proteinúria com a duração do diagnóstico de DM (Herring et al. 2014).

Até agora, os estudos realizados sobre ND em cães, não detetaram uma perda de função renal nestes animais, avaliada por meio do doseamento de ureia, creatinina e cistatina C séricas ou da determinação da TFG (Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016).

No que diz respeito às lesões histopatológicas, estão descritas alterações que se assemelham às encontradas nos humanos com ND. Com efeito, também foi observado, quer em animais com DM induzida experimentalmente (Engerman et al. 1977; Steffes et al. 1982), quer em animais com DM não induzida experimentalmente (Patz et al. 1965), lesões histopatológicas, nas quais se observaram espessamento da membrana basal glomerular e da membrana basal tubular, expansão da matriz mesangial, glomerulosclerose nodular e/ou difusa e hialinose das arteríolas glomerulares.

Mais recentemente, Priyanka et al. (2018), descreveram que em cães diabéticos, ecograficamente, existia um aumento significativo da resistência renovascular, avaliada através dos índices de resistência e pulsatilidade. Neste estudo, foi também observada uma correlação positiva entre o aumento da resistência renovascular e a glicémia em jejum e, ainda, com os níveis de hemoglobina glicada. Estes dados indicam o possível efeito deletério da hiperglicemia sobre o equilíbrio hemodinâmico renal nestes animais. Por outro lado, este estudo não detetou uma associação entre a resistência renovascular e a PAS, ou o RPCU nestes cães. Também, não foi encontrada uma correlação entre a PAS e o RPCU, ou a PAS e a glicémia.

A relevância clínica da ND na DM canina mantém-se ainda por esclarecer (Fracassi 2017).

### **3. Avaliação laboratorial do aparelho urinário**

#### **3.1. Função renal**

##### **3.1.1. Ureia e creatinina**

A ureia é um produto do metabolismo proteico. A síntese da ureia ocorre nos hepatócitos através do ciclo da ureia, o qual permite incorporar a amónia formada nos tecidos e no intestino em compostos azotados não proteicos passíveis de serem excretados (Salazar 2014). A ureia pode ser excretada através do aparelho digestivo ou do aparelho urinário. A porção eliminada pelo aparelho urinário é filtrada livremente pelo glomérulo e excretada na urina ou reabsorvida na ansa de Henle e no ducto colector (Stockham & Scott 2008). Uma das principais limitações da utilização da ureia como marcador da função renal é devida ao facto da sua concentração ser influenciada por vários fatores extra-renais, nomeadamente a quantidade de proteína ingerida, a capacidade do organismo em catabolizar a proteína e a presença de hemorragia digestiva alta (Syme & Jepson 2017).

A creatinina, também um composto azotado não proteico, é o produto da catabolização da fosfocreatina muscular, que pode ter origem no músculo do próprio indivíduo ou na carne ingerida. A concentração de creatinina é, então, influenciada pela massa muscular do indivíduo (Salazar 2014). A creatinina é filtrada livremente no glomérulo e não é reabsorvida nos túbulos renais. Também pode haver uma secreção de creatinina pelos túbulos contornados proximais caso esta se encontre em excesso no plasma, e a eliminação de uma pequena quantidade através do tubo digestivo (Stockham & Scott 2008). Em comparação com a ureia, a creatinina é menos afetada pela dieta e, assim, um indicador da função renal mais fiável (Salazar 2014).

A ureia e a creatinina são os indicadores de função renal mais frequentemente utilizados na prática clínica. O desenvolvimento de azotémia renal só se verifica quando pelo menos 65 a 75% dos nefrónios são afetados (Stockham & Scott 2008). No entanto, pode existir lesão renal sem que haja uma redução da TFG de magnitude suficiente para levar a azotémia, razão pela qual os valores de ureia e creatinina normais não são obrigatoriamente indicadores de uma função renal normal (Salazar 2014).

##### **3.1.2. Dimetilarginina simétrica (DMAS)**

A dimetilarginina simétrica (DMAS) é um derivado dimetilado da arginina produzido através da metilação intranuclear de resíduos de L-arginina pela proteína-arginina metiltransferase (Syme & Jepson 2017). A DMAS é excretada primariamente no rim, o que a torna um bom marcador endógeno da função renal, e diversos estudos sugerem que a

mesma não é influenciada pela massa muscular (Pedersen et al. 2006; Hall et al. 2014; Hall et al. 2015). A DMAS tem uma forte correlação com a variação da TFG em cães, detetando perdas de função renal na ordem dos 30%, e constituindo um indicador mais precoce que a creatinina (Nabity et al. 2015). Além disso, apresenta um menor índice de individualidade e menor variabilidade interindividual do que a creatinina. Isto torna-a num biomarcador mais sensível para a deteção de doença renal quando comparado com um intervalo de referência baseado numa população (Kopke et al. 2018).

As concentrações séricas de DMAS parecem não ser influenciadas por fatores extra—renais. Não obstante, estudos realizados no Homem demonstraram que a obesidade, o sexo e a idade podem influenciar, muito ligeiramente, os resultados (Marliss et al. 2006; Atzler et al. 2014).

### **3.1.3. Cistatina C**

A cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular que atua como um inibidor das proteases, sendo produzida a um ritmo constante (Ghys et al. 2014). A sua excreção é feita no rim, onde é filtrada livremente no glomérulo (Jacobsson et al. 1995), e é reabsorvida nos túbulos proximais, sendo completamente catabolizada (Ghys et al. 2014).

Existem inúmeros estudos feitos sobre a utilidade da cistatina C em cães e gatos na deteção da redução da TFG, mas os resultados não são consistentes no que diz respeito à sua vantagem em relação à creatinina (Ghys et al. 2014). Braun et al. (2002) identificaram variações da cistatina C com a idade e o peso corporal em cães, mas Wehner et al. (2008) não confirmaram este dado. Um estudo recente levado a cabo por Pelander et al. (2019) demonstrou que a cistatina C apresenta uma especificidade inferior (74%) quando comparada com a creatinina e a DMAS (90 e 87%, respetivamente) para a deteção de TFG<30,8 ml/min/l.

No Homem, a concentração plasmática de cistatina C é influenciada por alterações da função tiroideia, neoplasias, asma e inflamação (Cimerman et al. 2000). Assim, são necessários mais estudos para determinar quais são as doenças concomitantes que influenciam as concentrações plasmática de cistatina C em cães.

## **3.2. Proteinúria**

A urina de cães saudáveis contém sempre uma pequena quantidade de albumina (<1 mg/dl). Pode, no entanto, ocorrer um aumento da quantidade de proteína presente na urina, devido a causas pré-renais (hemólise, rabdomiólise, proteinúria de Bence Jones, hipertensão), causas renais fisiológicas (stress, exercício, estados convulsivos, febre) ou patológicas (glomerulonefrite, amiloidose, síndrome de Fanconi), ou causas pós-renais

(infecção, inflamação ou hemorragia do trato urinário inferior). Quando a concentração de proteína na urina ultrapassa os 30 mg/dl, estamos na presença de proteinúria (Stockham & Scott 2008; Harley & Langston 2012; Grauer 2016).

A proteinúria renal patológica é a causa mais frequente de proteinúria persistente, e aquela que tem maior magnitude. Este tipo de proteinúria está associado a defeitos na barreira de filtração glomerular, na reabsorção tubular de proteínas, ou a lesões intersticiais (Lees et al. 2005; Harley & Langston 2012). É importante considerar que, mesmo que na ausência de azotemia, a ocorrência de proteinúria é um sinal de lesão renal (Harley & Langston 2012).

Os animais com doença renal proteinúrica têm um pior prognóstico e menor sobrevivência do que animais com doença renal sem proteinúria (Littman 2011; Harley & Langston 2012; Polzin 2017b). Além deste dado, vários estudos sugerem uma associação entre a magnitude da proteinúria e o risco de progressão de DRC e de morte (Jacob et al. 2005). A proteinúria não só é uma consequência da doença renal, como também contribui para a sua progressão, ao promover a produção de substâncias pró-inflamatórias e vasoativas no nefrônio e, conseqüentemente, ao desenvolvimento de inflamação e fibrose intersticial (Syme 2003; Perico et al. 2005; Langston & Reine 2006; Vaden 2017).

### **3.2.1. Microalbuminúria (MA)**

Atualmente, define-se por microalbuminúria (MA) uma concentração de albumina na urina entre 1 mg/dl e 30 mg/dl, ajustada a uma densidade urinária de 1.010 (Stockham & Scott 2008; Grauer 2016). A MA, à semelhança do que ocorre em humanos, parece ser um bom indicador de doença renal precoce em cães, particularmente em doenças que envolvam o glomérulo renal (Vaden et al. 2001; Grauer et al. 2002; Lees et al. 2002; Grauer 2005).

### **3.2.2. Rácio Proteína-Creatinina Urinário (RPCU)**

O Rácio Proteína-Creatinina Urinário (RPCU) corresponde à relação entre a concentração de proteína e a concentração de creatinina na urina, e é um teste que apresenta uma boa correlação com a quantificação da proteinúria medida ao longo de 24 horas (Adams et al. 1992).

O RPCU baseia-se no facto de a excreção renal de creatinina ser considerada relativamente constante em animais saudáveis e de que, se a sua excreção estiver diminuída, então a taxa de perda de proteína no glomérulo também deve estar diminuída, pois a creatinina atravessa a barreira de filtração glomerular mais facilmente do que a proteína. No entanto, se houver uma maior quantidade de proteína na urina devido a causas

pré-renais, renais ou pós-renais, a taxa de excreção da proteína estará aumentada em relação à da creatinina. Além disso, a comparação da concentração de proteína urinária com a de creatinina urinária tem em conta a variabilidade causada pela quantidade de água excretada pelos rins. Desta forma, a comparação da proteína perdida na urina com a excreção de creatinina reflete variações reais da proteinúria (Stockham & Scott 2008).

Um RPCU superior a 0,5 no cão corresponde a concentrações de albumina na urina superiores a 30 mg/dl para uma densidade urinária de 1.010, e é considerado anormal desde que seja um dado persistente (isto é, em 2 ou mais amostras colhidas ao longo de pelo menos 2 semanas) (International Renal Interest Society 2019). Um RPCU superior a 0,5, depois de excluir causas pré e pós-renais, sugere a presença de DRC glomerular ou tubulointersticial. Por sua vez, um RPCU superior a 2,0 é fortemente sugestivo de doença glomerular, apesar de outras causas não poderem ser excluídas sem biópsia renal (Lees et al. 2005).

Também é de realçar que um RPCU superior a 0,2 tem uma sensibilidade de 47,9% e uma especificidade de 98,6% para a deteção de MA. Por outro lado, um RPCU superior a 0,5 apresenta uma sensibilidade de 28,7% e uma especificidade de 99,7% para a deteção de MA. Deste modo, o RPCU não é considerado um teste adequado para a pesquisa de microalbuminúria (Grauer 2011).

#### **4. Estadiamento IRIS**

A International Renal Interest Society (IRIS) criou um esquema de estadiamento da DRC em cães e gatos no sentido de facilitar o tratamento e monitorização destes animais quando diagnosticados com DRC (Elliott & Watson 2016). O estadiamento é feito com base na medição dos valores de creatinina, DMAS ou ambos, em jejum num animal hidratado, idealmente em duas ocasiões diferentes. Atualmente, este estadiamento ainda não tem em conta a CC do animal ou a sua massa muscular, tendo sido projetado para cães de tamanho médio (International Renal Interest Society 2019) (Anexo 3). O sub-estadiamento é depois feito com base na proteinúria e na PAS. A proteinúria e a hipertensão arterial sistémica são não só possíveis consequências da DRC, como também fatores que promovem a sua progressão (Elliott & Watson 2016).

A proteinúria é um importante indicador prognóstico em cães e gatos com DRC. Para considerar a proteinúria no sub-estadiamento, é importante garantir que esta seja de origem renal, sendo por isso crucial descartar a existência de ITU, inflamação ou hemorragia do trato urinário inferior, e disproteinémias. A avaliação da proteinúria deve ser feita através do RPCU, idealmente em duas ou mais amostras de urina, colhidas ao longo de pelo menos duas semanas, de modo a poder ser classificada como proteinúria persistente (Elliott &

Watson 2016; International Renal Interest Society 2019). O subestadiamento IRIS quanto à proteinúria pode ser consultado na Tabela 2.

**Tabela 2: Subestadiamento IRIS quanto à proteinúria (International Renal Interest Society 2019).**

Subestadio	RPCU	
	Cão	Gato
Não Proteinúrico (NP)	< 0,2	< 0,2
<i>Borderline</i> proteinúrico (BP)	0,2-0,5	0,2-0,4
Proteinúrico (P)	> 0,5	> 0,4

A proteinúria pode diminuir com a progressão da perda da função renal e ser menos frequente em animais nos estadios 3 e 4 devido a uma diminuição da carga proteica apresentada aos túbulos em consequência da redução da massa de nefrónios funcionais (Grauer 2016; International Renal Interest Society 2019).

A doença renal também interfere na regulação da PAS e conduz a hipertensão. Tal facto é, não só prejudicial para os próprios rins, como também para outros órgãos alvo tais como o coração, o olho e o cérebro, onde conduz a sinais extra-renais de hipertensão e morbilidade. Assim, o grupo IRIS recomenda a medição da PAS em todos os pacientes com DRC. O sub-estadiamento é feito com base nos valores da PAS e na presença ou risco de lesão extrarrenal derivada da hipertensão. Tal como na proteinúria, devem ser feitas múltiplas medições para comprovar que se trata de uma alteração persistente, idealmente em dias separados, mas aceitável se feitas com pelo menos duas horas de intervalo, e garantindo que o animal se encontra calmo na sala de consulta (International Renal Interest Society 2019).

Na ausência de lesão dos órgãos alvo, a persistência do aumento da PAS deve ser confirmada pela múltipla medição da mesma em diferentes intervalos de tempo consoante o subestadiamento. Em animais hipertensos, a PAS permanece entre 160 e 179 mmHg em múltiplas medições ao longo de 1 a 2 semanas e, em animais gravemente hipertensos, a PAS mantém-se acima de 180 mmHg ao longo de 1 a 2 semanas (International Renal Interest Society 2019) (Anexo 4).

### **III – Avaliação da função renal em cães diabéticos: análise de indicadores**

---

#### **1. Introdução e objetivos**

A DM canina é uma doença endócrina amplamente divulgada e reconhecida pela comunidade médica veterinária, maioritariamente associada a cães de idade adulta. Apesar do diagnóstico ser fácil de realizar, o tratamento, o controlo e a monitorização destes animais é exigente, muitas vezes devido a falta de colaboração dos donos. A esperança de vida destes animais normalmente não ultrapassa os cinco anos após o diagnóstico da doença (Feldman & Nelson 2004), o que limita a ocorrência das complicações vasculares da DM observadas no Homem, nomeadamente a ND.

Os estudos realizados no âmbito da ND canina são escassos, razão pela qual muita da informação disponível é obtida por extrapolação da ND humana. Apesar da sua existência estar documentada não é, contudo, uma consequência crónica da DM, à qual seja dado particular destaque devido à sua baixa expressão na prática clínica.

Apesar de existirem evidências de MA e proteinúria em cães diabéticos (Mazzi et al. 2008; Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016), não está descrito um decréscimo concomitante da função renal (Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016).

O aparecimento da DMAS como marcador precoce de perda de função renal veio permitir detetar a perda de nefrónios quando esta ainda se encontra na ordem dos 30% (Nabity et al. 2015). Porém, a sua utilização na medicina veterinária não é habitual no contexto da DM. Não é do conhecimento da autora da presente dissertação a existência de estudos que avaliem os valores de DMAS em cães diabéticos.

Este estudo teve como principal objetivo avaliar a função renal em cães com diagnóstico de DM, assim como a ocorrência de proteinúria, de modo a verificar se existem diferenças significativas quando comparados com cães saudáveis, e melhor entender o impacto da DM sobre a estrutura e a função renal em cães. Foi também avaliado se existia uma correlação entre estas variáveis e a duração do diagnóstico de DM ou a dose de insulina em curso.

#### **2. Materiais e Métodos**

##### **2.1. Animais**

###### **2.1.1. Grupo com diabetes mellitus (GDM)**

O grupo com diabetes mellitus (GDM) foi constituído por cães de qualquer idade, raça e sexo com diagnóstico prévio de DM e insulino-terapia em curso.

O projeto foi apresentado aos proprietários durante a consulta, por meio de contacto telefónico ou através das redes sociais. Os dois últimos grupos, quando interessados, foram convidados a dirigir-se às instalações dos seus veterinários assistentes ou ao HEV para recolha das amostras necessárias. Na sequência da participação no estudo, os proprietários preencheram um breve inquérito sobre o animal, o momento do diagnóstico da doença e o tratamento em curso (Anexo 5 e 6).

Atendendo ao efeito da massa muscular sobre os valores de creatinina sérica assim como à prevalência significativa de proteinúria em cães séniores e geriátricos aparentemente saudáveis, optou-se por agrupar os animais segundo a idade e o peso. Foram definidas as categorias de peso “miniatura” (1-5 kg), “pequeno” (6-15 kg), “médio” (16-25 kg) e “grande” (26-45kg). Em relação à idade, os animais foram divididos em “idade inferior a 7 anos” e “idade igual ou superior a 7 anos”.

### **2.1.2. Grupo Saudável (GS)**

O grupo Saudável (GS) foi constituído por cães de qualquer raça e sexo considerados saudáveis com base no exame físico e história clínica. A sua seleção foi feita no sentido de obter animais com uma distribuição pelas categorias de peso e idade idêntica à do GDM. Os proprietários foram informados sobre o projeto durante consultas de vacinação ou através de contacto telefónico, e convidados a dirigir-se às instalações dos seus veterinários assistentes ou ao HEV para recolha das amostras necessárias.

## **2.2. Critérios de exclusão**

Foram definidos critérios de exclusão com base na premissa de que, animais que se incluíssem numa destas situações poderem apresentar alterações nas variáveis em estudo decorrentes destas condições. Assim, foram excluídos os cães que apresentassem cetoacidose diabética, devido à possibilidade de azotémia pré-renal por desidratação. Por sua vez, esta última poderia dar origem a uma lesão mais grave a nível renal, nomeadamente insuficiência renal aguda intrínseca. Foram também excluídos os animais que apresentassem ITU ou sedimento ativo (piúria, hematúria e/ou presença de bacteriúria), uma vez que estas são causas conhecidas de proteinúria pós-renal. Por último, foram excluídos os animais que estivessem a ser sujeitos a tratamento crónico com corticosteroides ou que tivessem um diagnóstico de hiperadrenocorticism. Efetivamente, estas duas situações podem conduzir à ocorrência de proteinúria renal devido a hiperfiltração, a hipertensão glomerular, a alteração da barreira de filtração glomerular e a proteinúria tubular (Harley & Langston 2012; Smets et al. 2012; O'Brien 2017).

A aplicação destes critérios foi feita com base no exame físico, história clínica, exames complementares feitos previamente durante o acompanhamento do animal pelo veterinário assistente e no exame do sedimento urinário.

### **2.3. Colheita de sangue e urina e acondicionamento das amostras**

Todos os animais foram sujeitos à colheita de amostras de sangue por venopunção da veia safena ou jugular e de urina por cistocentese ecoguiada no período de Julho a Novembro de 2019. Assim, foram colhidos 2 ml de sangue para um tubo seco e 2 a 5 ml de urina para uma seringa de volume correspondente.

As amostras foram armazenadas a uma temperatura de 2-5°C e processadas no prazo de 1 a 48 horas após a colheita no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV – ULisboa.

O sangue em tubo seco foi centrifugado a 700g durante 5 minutos e o soro separado 1 a 48 horas após a colheita. Os parâmetros bioquímicos analisados foram a ureia, a creatinina e a DMAS. Na urina, foi feito o exame do sedimento urinário e a medição do RPCU.

### **2.4. Análises laboratoriais**

#### **2.4.1. Medição da ureia**

O doseamento da ureia sérica foi feito no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV – ULisboa no aparelho RX daytona+™ (*Randox Laboratories*) através do método enzimático da urease. Para a determinação, foi usado cerca de 1 ml de soro fresco ou refrigerado. Foi usado o intervalo de referência de 12,0 a 56,0 mg/dl.

#### **2.4.2. Medição da creatinina**

O doseamento da creatinina sérica foi feito no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV – ULisboa no aparelho RX daytona+™ (*Randox Laboratories*) através do método colorimétrico do ácido pícrico. Para a determinação, foi usado cerca de 1 ml de soro fresco ou refrigerado. Foi usado o intervalo de referência de 0,62 a 1,64 mg/dl.

#### **2.4.3. Medição da DMAS**

O doseamento da DMAS foi feito no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV – ULisboa com recurso a um teste comercial (Catalyst® SDMA Test, *Idexx Laboratories, Inc.*) no aparelho Catalyst One® por meio de um imunoensaio (*Idexx Laboratories, Inc.*). Para a determinação, foi usado aproximadamente 0,5 ml de soro fresco

ou refrigerado. Foi usado o intervalo de referência de 0 a 14 µg/dl, tal como é recomendado pelo fabricante.

#### **2.4.4. Medição do RPCU**

A determinação do RPCU foi feita no Laboratório de Análises Clínicas Dr. Braço Forte da FMV – ULisboa no aparelho RX daytona+™ (*Randox Laboratories*). A quantificação da proteína foi feita através do método colorimétrico do vermelho de pirogalol-molibdato e a quantificação da creatinina foi feita através do método colorimétrico do ácido pícrico. O RPCU foi calculado automaticamente pelo aparelho. Para a determinação, foi usado cerca de 1 ml de urina após ter sido centrifugada a 3900g durante 45 segundos. As amostras foram classificadas como “não-proteinúricas” (NP) ( $\text{RPCU} < 0,2$ ), “borderline proteinúricas” (BP) ( $0,2 \leq \text{RPCU} \leq 0,5$ ) e “proteinúricas” (P) ( $\text{RPCU} > 0,5$ ) (International Renal Interest Society 2019).

#### **2.5. Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada através do programa de análise estatística R (R Core Team 2019). Os dados recolhidos podem ser consultados nos Anexos 7 e 8. Foi realizada uma análise descritiva das variáveis, com a obtenção de médias, medianas, desvio-padrão, frequências relativas e absolutas, mínimos, e máximos, consoante a necessidade de caracterizar as variáveis. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para avaliar se as variáveis em estudo apresentavam uma distribuição normal e, quando tal se verificava, foi aplicado o F-test para verificar se existiam diferenças significativas entre as variâncias dos dois grupos de amostras. Quando eram reunidos os pressupostos de normalidade e de igualdade de variâncias, foi aplicado o *two-sample* t-test. Para a comparação de variáveis que não apresentavam distribuições normais, foi aplicado o teste não-paramétrico Mann-Whitney-Wilcoxon. Foi construída uma tabela de contingência de 2x2 com base na presença ou ausência de proteinúria nos dois grupos de animais e foi feito um teste de Fisher e o cálculo da razão de probabilidades (*Odds Ratio*, OR). A correlação entre a duração do diagnóstico e a dose de insulina com as restantes variáveis no GDM foi avaliada através do teste de correlação de Spearman. Apenas foram considerados como significativos valores de  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados**

#### **3.1. Caracterização da amostra**

##### **3.1.1. Grupo com diabetes mellitus (GDM)**

O GDM foi constituído por 18 animais. O grupo incluiu 10 fêmeas esterilizadas (FR=55,6%), 3 fêmeas inteiras (FR=16,7%), 1 macho castrado (FR=5,5%) e 4 machos inteiros (FR=22,2%) com uma média de idades de 9,94 ( $\pm 2,65$ ) anos de idade, sendo o mínimo 5 anos e o máximo 15 anos (Gráfico 1)(Tabela 3). Neste grupo, 16 animais (FR=88,9%) tinham 7 ou mais anos e 2 (FR=11,1%) tinham menos de 7 anos.

A média de peso foi de 17,32 ( $\pm 9,34$ ) kg, com um mínimo de 4,9 kg e um máximo de 32 kg (Tabela 3), com 2 animais na categoria “miniatura” (FR=11,1%), 8 na categoria “pequeno” (FR=44,5%), 4 na categoria “médio” (FR=22,2%) e 4 na categoria “grande” (FR=22,2%) (Gráfico 3).

A média da duração do diagnóstico de DM foi de 15,28 ( $\pm 15,75$ ) meses, com um mínimo de 2 meses e um máximo de 48 meses (Tabela 3).

A média da dose de insulina em curso foi de 0,53 ( $\pm 0,14$ ) UI/kg BID, com um mínimo de 0,34 UI/kg BID e um máximo de 0,86 UI/kg BID (Tabela 3). Um dos animais recebia duas administrações com volumes diferentes de insulina por dia. Nesse caso, foi determinada a média diária de insulina administrada.

##### **3.1.2. Grupo Saudável (GS)**

O GS foi constituído por 17 animais. O grupo incluiu 8 fêmeas esterilizadas (FR=47%), 2 fêmeas inteiras (FR=11,8%), 5 machos castrados (FR=29,4%) e 2 machos inteiros (FR=11,8%) (Gráfico 2).

A média de idades foi 9,52 ( $\pm 2,72$ ) anos de idade, sendo o mínimo 6 anos e o máximo 15 anos (Tabela 4). Neste grupo, 15 animais (FR=88,2%) tinham 7 anos ou mais e 2 (FR=11,8%) tinham menos de 7 anos.

A média de peso foi de 16,51 ( $\pm 10,77$ ) kg, com um mínimo de 5 kg e um máximo de 35 kg (Tabela 4), com 2 animais na categoria “miniatura” (FR=11,8%), 7 na categoria “pequeno” (FR=41,2%), 4 na categoria “médio” (FR=23,5%) e 4 na categoria “grande” (FR=23,5%) (Gráfico 4).

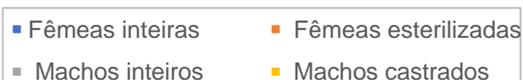
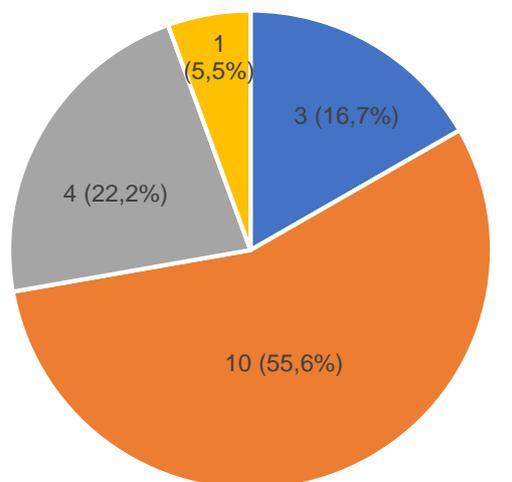
**Tabela 3: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no GDM considerando os parâmetros da idade, peso, duração do diagnóstico e dose de insulina em curso.**

Variável	Média e desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	9,94 ± 2,75	10	5	15
Peso (kg)	17,32 ± 9,34	14,95	4,90	32
Duração do diagnóstico (meses)	15,28 ± 15,75	8	2	48
Dose de insulina (UI/kg)	0,53 ± 0,14	0,53	0,34	0,86

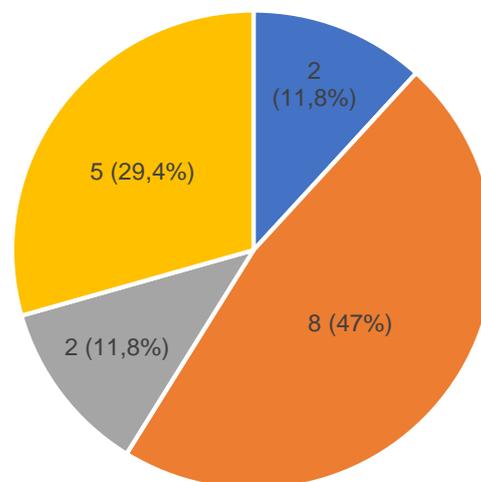
**Tabela 4: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada no grupo GS considerando os parâmetros da idade e peso.**

Variável	Média e desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
Idade (anos)	9,53 ± 2,71	10	6	15
Peso (kg)	16,51 ± 10,77	13	5	35

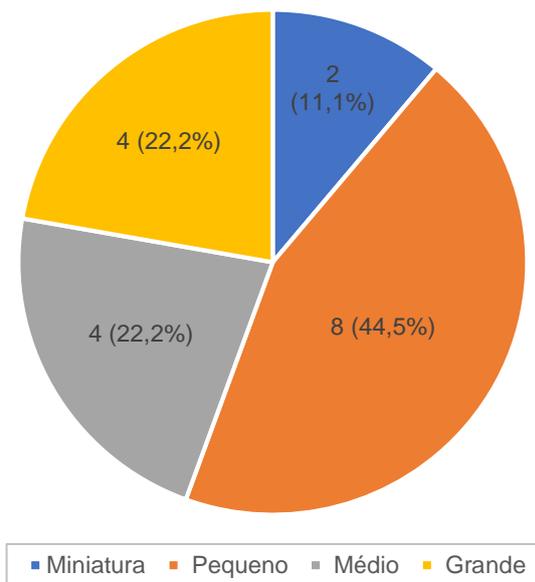
**Gráfico 1: Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo no GDM.**



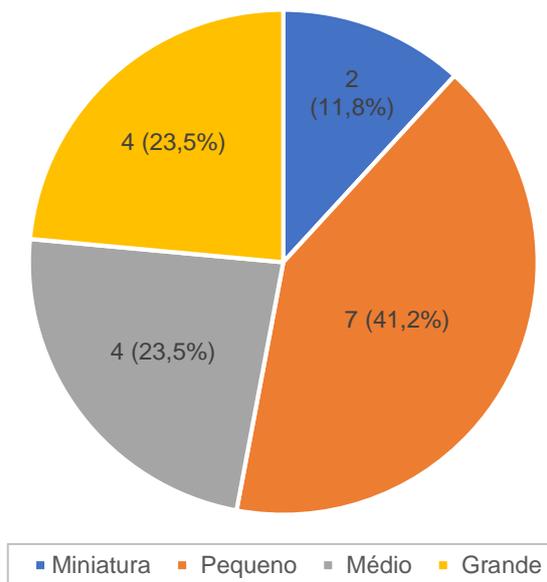
**Gráfico 2: Frequência relativa do sexo/estado reprodutivo no GS.**



**Gráfico 3: Frequência relativa das categorias de peso no GDM.**



**Gráfico 4: Frequência relativa das categorias de peso no GS.**



O GDM foi constituído maioritariamente por cães com mais de 7 anos, sendo mais frequentes cães “pequenos” (6-15kg), e fêmeas esterilizadas. Não existiram diferenças significativas entre as idades dos cães GDM e dos cães GS ( $p=0,651$ ). Também não foram observadas diferenças significativas entre os pesos dos cães dos dois grupos ( $p=0,813$ ), o que pode também ser constatado nos Gráficos 3 e 4, no que diz respeito às frequências relativas das categorias de peso definidas. Em relação ao sexo e estado reprodutivo dos cães GDM e dos cães GS, também não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos ( $p=0,840$ ), apesar de existir um número ligeiramente inferior de cães machos e de fêmeas inteiras no GDM.

## **3.2. Análise de biomarcadores de função renal**

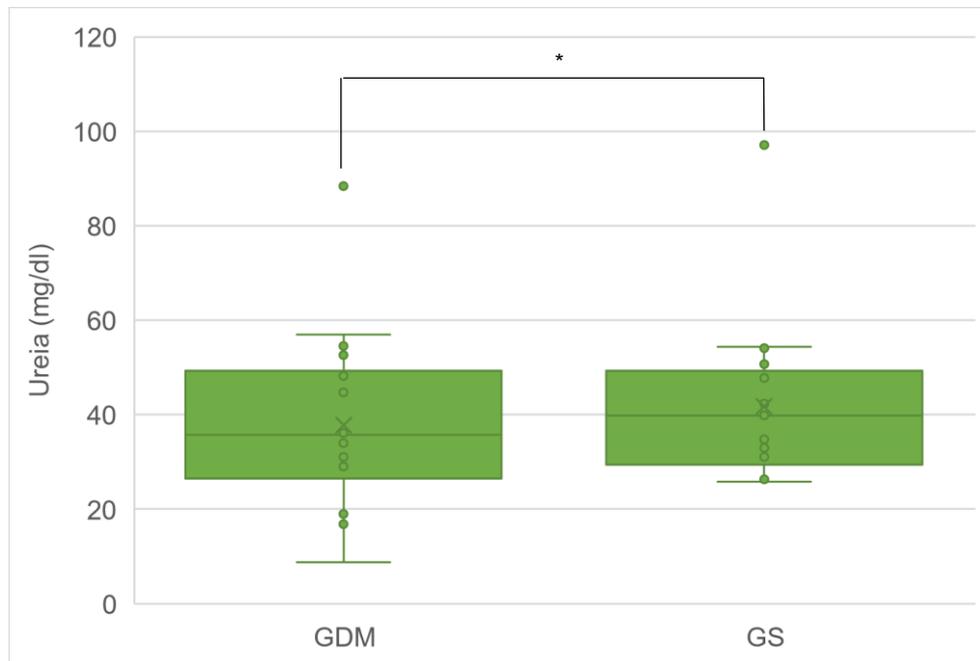
### **3.2.1. Ureia e creatinina**

No GDM, a concentração sérica de ureia teve uma média de 37,77 ( $\pm 18,42$ ) mg/dl, com um mínimo de 8,70 mg/dl e um máximo de 88,40 mg/dl e, 2 dos animais deste grupo (FR=11,1%) apresentaram valores de ureia sérica acima de 56,0 mg/dl, o qual é o limite superior do intervalo de referência (57 e 88,40 mg/dl) (Tabela 6).

No GS, a concentração sérica de ureia teve uma média de 41,72 ( $\pm 17,15$ ) mg/dl, com um mínimo de 25 mg/dl e um máximo de 97,10 mg/dl, e um dos animais deste grupo (FR=5,9%) apresentava valores de ureia sérica acima do intervalo de referência (97,10 mg/dl) (Tabela 6). Não foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa entre as

concentrações séricas de ureia dos dois grupos ( $p=0,668$ ). A distribuição das concentrações de ureia pode ser observada no Gráfico 5.

**Gráfico 5: Box Plot da distribuição da concentração de ureia sérica (mg/dl) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde. Dois outliers foram identificados pelo software, um em cada grupo.**



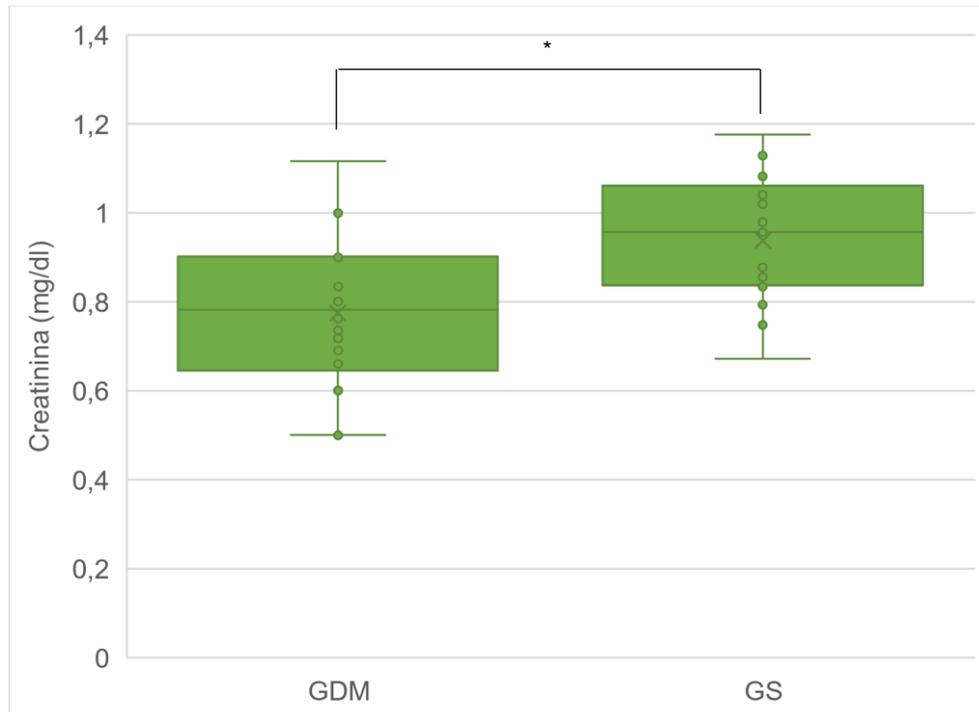
**Legenda:** \* significa  $p=0,668$  para a diferença entre os animais GDM e os animais GS.

No GDM, os valores séricos de creatinina apresentaram uma média de  $0,77 (\pm 0,18)$  mg/dl, com um mínimo de  $0,50$  mg/dl e um máximo de  $1,12$  mg/dl. Quatro dos animais deste grupo ( $FR=22,2\%$ ) apresentaram valores de creatinina abaixo do intervalo de referência ( $0,62$  a  $1,64$  mg/dl), entre os  $0,50$  mg/dl e  $0,60$  mg/dl. Os restantes encontravam-se dentro do intervalo de referência (Tabela 6).

No GS, a concentração sérica de creatinina apresentou uma média de  $0,94 (\pm 0,14)$  mg/dl, com um mínimo de  $0,67$  mg/dl e um máximo de  $1,18$  mg/dl. Todos os animais deste grupo apresentaram valores de creatinina sérica dentro do intervalo de referência (Tabela 6).

Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,006$ ), sendo que os animais do GDM apresentaram concentrações de creatinina inferiores às do GS. A distribuição das concentrações de creatinina sérica nos dois grupos pode ser consultada no Gráfico 6.

**Gráfico 6: Box Plot da concentração de creatinina sérica (mg/dl) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde.**

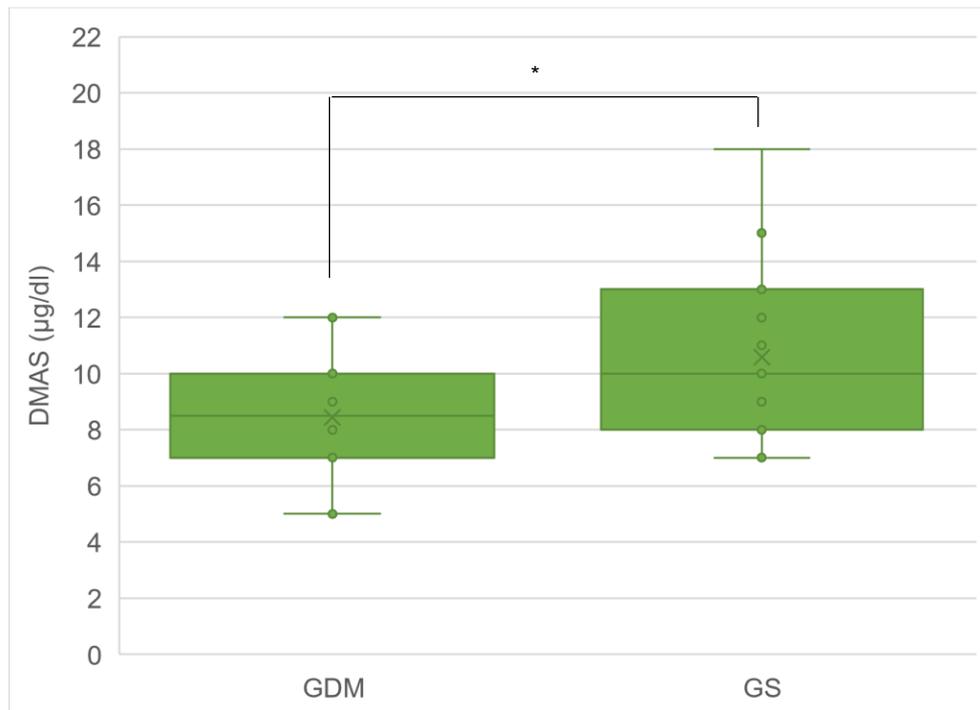


**Legenda:** \* significa  $p=0,006$  para a diferença entre os animais GDM e os animais GS.

### 3.2.2. DMAS

No GDM, a concentração de DMAS teve uma média de  $8,40 (\pm 1,98)$   $\mu\text{g/dl}$ , com um mínimo de  $5 \mu\text{g/dl}$  e um máximo de  $12 \mu\text{g/dl}$ . Todos os animais apresentaram valores dentro do intervalo de referência ( $0-14 \mu\text{g/dl}$ ) (Tabela 6). No GS, a concentração de DMAS teve uma média de  $10,60 (\pm 3,08)$   $\mu\text{g/dl}$ , com um mínimo de  $7 \mu\text{g/dl}$  e um máximo de  $18 \mu\text{g/dl}$ . Apenas um dos animais deste grupo ( $\text{FR}=5,9\%$ ) apresentou valores acima do intervalo de referência ( $18 \mu\text{g/dl}$ ) (Tabela 6). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,022$ ), sendo que os animais do GDM apresentaram concentrações séricas de DMAS inferiores às do GS (Gráfico 7).

**Gráfico 7: Box Plot da concentração sérica de DMAS ( $\mu\text{g/dl}$ ) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde.**

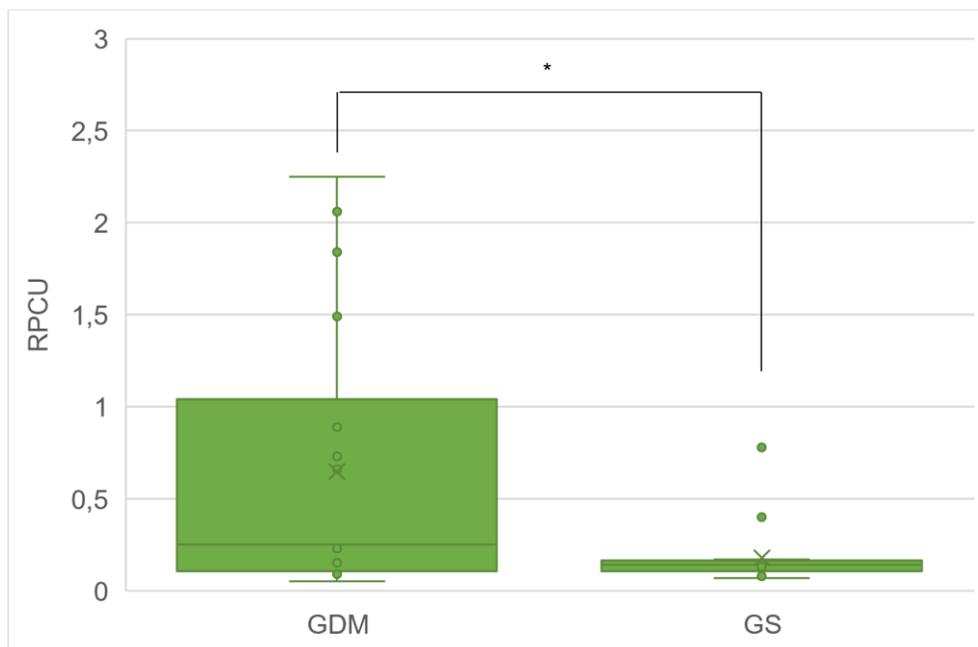


**Legenda:** \* significa  $p=0,022$  para a diferença entre os animais GDM e os animais GS.

### 3.2.3. RPCU

No GDM, o RPCU teve uma média de 0,65 ( $\pm 0,75$ ), com um mínimo de 0,05 e um máximo de 2,25. Neste grupo, 7 dos animais eram NP (FR=38,9%), 4 eram BP (FR=22,2%) e 7 eram P (FR=38,9%) (Tabela 5 e 6). No GS, o RPCU teve uma média de 0,18 ( $\pm 0,17$ ), com um mínimo de 0,07 e um máximo de 0,78. Neste grupo, 15 dos animais eram NP (FR=88,2%), 1 era BP (FR=5,9%) e 1 era P (FR=5,9%) (Tabela 5 e 6). A distribuição do RPCU nos dois grupos pode ser observada no Gráfico 8. Apesar de não ter sido observada uma diferença significativa entre o RPCU dos dois grupos ( $p=0,0716$ ), foi detetada uma associação estatisticamente significativa entre a ocorrência de DM e os estádios BP e P, existindo uma proporção superior destes animais no GDM em relação ao GS, como pode ser constatado na Tabela 5 (OR= 10,87, 95% IC 1,71-127,08,  $p=0,006$ ).

**Gráfico 8: Box Plot do Rácio proteína-creatinina urinário (RPCU) no GDM e no GS. A média é dada pela linha verde. Dois *outliers* foram identificados pelo software no grupo GS.**



**Legenda:** \* significa  $p=0,072$  para a diferença entre os animais GDM e os animais GS.

**Tabela 5: Número de animais e sua percentagem segundo o grupo e o grau de proteinúria.**

Grupo	Não-proteinúricos (NP)	Bordeline proteinúricos ou proteinúricos (BP+P)		Total
GDM	n=7 (38,9%)	n=11 (61,1%)		n=18 (100%)
GS	n=15 (88,2%)	n=2 (11,8%)		n=17 (100%)

**Tabela 6: Análise de estatística descritiva dos dados referentes à caracterização da amostra utilizada nos grupos GDM e GS considerando os parâmetros de concentrações de ureia, concentrações de creatinina e concentrações de DMAS, e RPCU.**

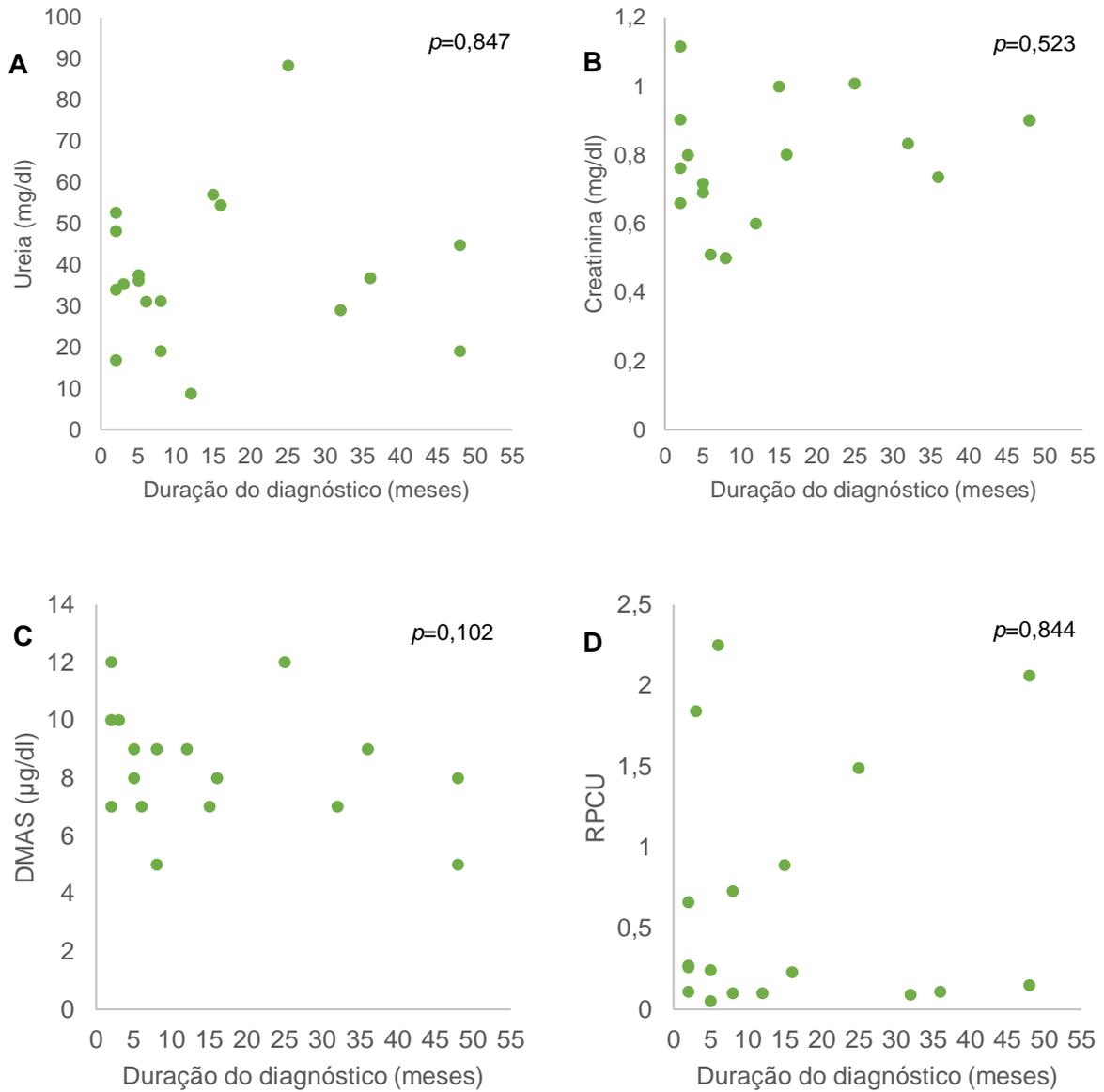
Variável	Grupo	Média e Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo	Intervalo de referência
Ureia (mg/dl)	GDM	37,77 ± 18,42	35,70	8,70	88,40	12-56 mg/dl
	GS	41,72 ± 17,15	39,80	25,80	97,10	
Creatinina (mg/dl)	GDM	<b>0,77 ± 0,18*</b>	0,78	0,50	1,12	0,62-1,64 mg/dl
	GS	<b>0,94 ± 0,14*</b>	0,97	0,67	1,18	
DMAS (µg/dl)	GDM	<b>8,44 ± 1,98**</b>	8,50	5	12	0-14 µg/dl
	GS	<b>10,59 ± 3,08**</b>	10	7	18	
RPCU	GDM	0,65 ± 0,74	0,25	0,05	2,25	NP: < 0,2 BP: 0,2-0,5 P: > 0,5
	GS	0,18 ± 0,17	0,14	0,07	0,78	

Legenda: \* significa  $p < 0,01$  animais GDM versus animais GS; \*\* significa  $p < 0,05$  animais GDM versus animais GS

### **3.3. Correlação entre a duração do diagnóstico de DM com as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e o RPCU**

Foi avaliada a correlação da duração do diagnóstico de DM com as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e, ainda, o RPCU. Não foi observada a existência de correlação entre a duração do diagnóstico e qualquer uma das variáveis ( $p=0,847$ ,  $p=0,523$ ,  $p=0,107$  e  $p=0,844$ , respectivamente), como pode ser constatado pela sua distribuição aleatória em relação à duração do diagnóstico (Gráfico 9).

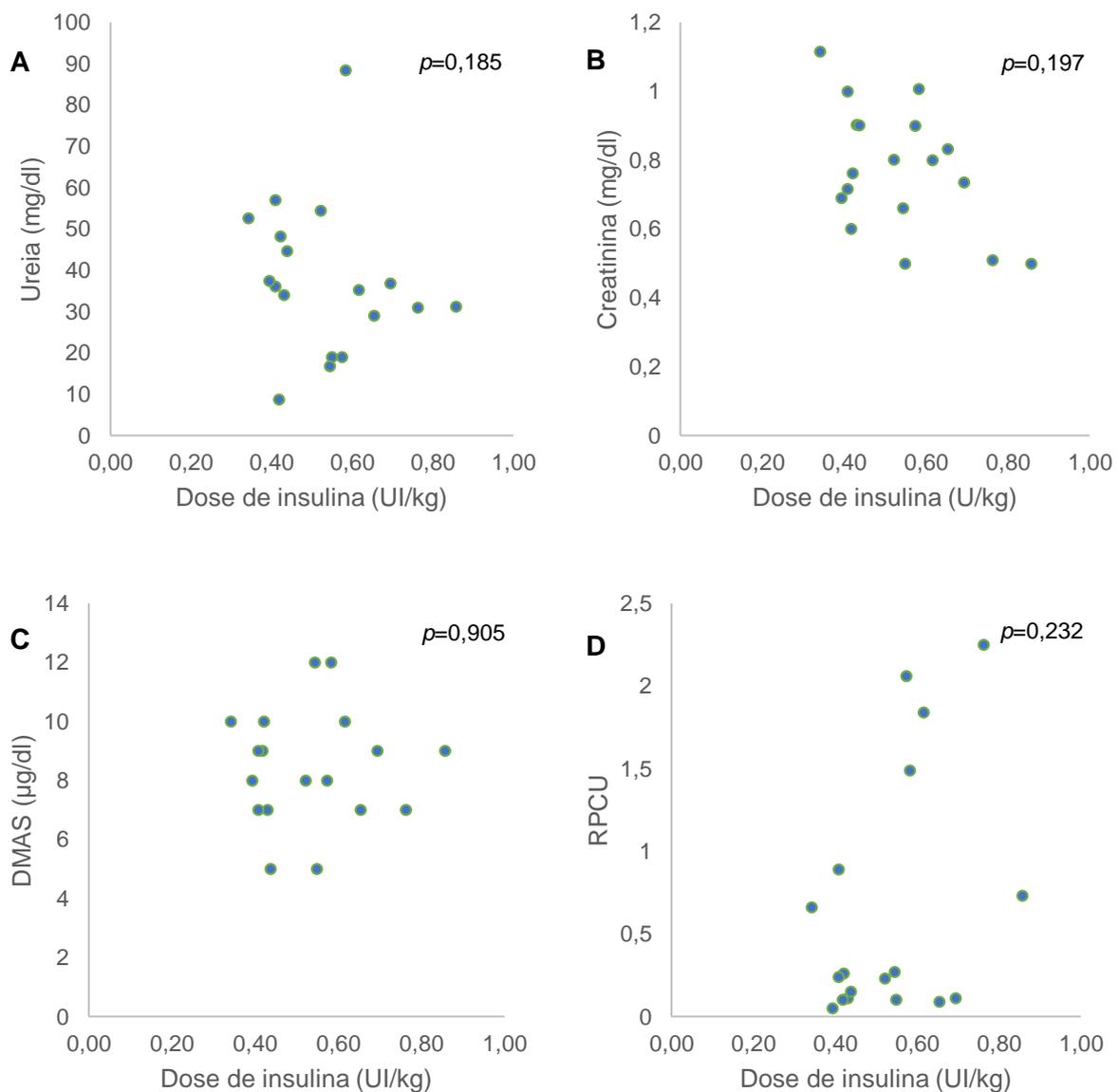
**Gráfico 9: Distribuição das variáveis ureia (A), creatinina (B), DMAS (C) e RPCU (D) em relação à duração do diagnóstico de DM no GDM.**



### 3.4. Correlação entre a dose de insulina e as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e o RPCU

Foi avaliada a correlação entre a dose de insulina em curso e as concentrações séricas de ureia, creatinina e DMAS e o RPCU. Não foi observada a existência de qualquer correlação entre a dose de insulina com qualquer uma das variáveis em causa ( $p=0,185$ ,  $p=0,197$ ,  $p=0,905$  e  $p=0,232$ , respetivamente), como pode ser constatado pela sua distribuição aleatória em relação à duração do diagnóstico (Gráfico 10).

**Gráfico 10: Distribuição das variáveis ureia (A), creatinina (B), DMAS (C) e RPCU (D) em relação à dose de insulina (UI/kg) no grupo DM.**



#### 4. Discussão

A ND canina é uma entidade clínica com pouca expressão na prática clínica veterinária e, como tal, pouco se sabe sobre o verdadeiro impacto da DM no rim nesta espécie. De facto, são escassos os estudos realizados sobre este tema. Do nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a avaliar as concentrações séricas de DMAS em cães diabéticos e a compará-las com as encontradas em cães saudáveis.

Quanto às concentrações de ureia sérica, não foram encontradas diferenças significativas entre o GDM e o GS. Dois dos 18 (11,1%) animais do GDM apresentaram concentrações acima do intervalo de referência, 57 e 88,40 mg/dl respetivamente, assim como 1 dos 17 (5,9%) animais do GS, com 97,10 mg/dl. Nenhum destes cães apresentava valores de creatinina acima do intervalo de referência. Deste modo, consideramos pouco provável que estes valores reflitam a existência de DRC, mas que antes se devam a outras causas, nomeadamente à ingestão de alimento nas últimas 8 a 12 horas, já que os cães não foram submetidos a jejum (Syme and Jepson 2017).

No caso da creatinina, foi detetada uma diferença significativa entre as suas concentrações séricas no GDM e no GS, sendo que 4 dos 18 (22,2%) cães do grupo GDM apresentavam valores abaixo do intervalo de referência. Tais dados não coincidem com aqueles observados por Marynissen et al. (2016), que não detetaram diferenças significativas entre os dois grupos.

Na medida em que a creatinina é um produto da degradação da fosfocreatina muscular e a sua concentração sérica é influenciada pela massa muscular do indivíduo, as concentrações mais baixas de creatinina podem refletir uma redução da massa muscular. No entanto, não se verificou uma diferença significativa entre os pesos dos cães dos dois grupos no presente estudo. Langhorn et al. (2018) relataram resultados semelhantes num estudo retrospectivo em gatos, no qual os gatos com DM apresentavam concentrações de creatinina mais baixas, não estando as mesmas relacionadas com o peso ou a massa muscular dos indivíduos.

A diminuição da concentração de creatinina sérica pode, no entanto, ser explicada pela existência de hiperfiltração glomerular. De facto, Pelander et al. (2019) relataram uma correlação negativa significativa entre as concentrações séricas de creatinina e a TFG estimada a partir de cintigrafia renal. A hiperfiltração é um dos fenómenos que caracteriza as primeiras fases de desenvolvimento da ND e antecede o desenvolvimento de MA, de proteinúria e de perda de função renal. Estima-se uma prevalência de 10 a 67% e 6 a 73% de hiperfiltração em pacientes humanos com DM tipo 1 e DM tipo 2, respetivamente (Tonnejck et al. 2017). No nosso estudo, a existência de hiperfiltração nos animais do GDM explicaria as diferenças observadas nos valores de creatinina dos dois grupos.

No que diz respeito à DMAS, os animais GDM apresentaram concentrações séricas significativamente inferiores aos animais GS. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Langhorn et al. (2018), onde, também, foi constatado que os gatos com DM apresentavam concentrações de DMAS significativamente mais baixas do que os saudáveis. Tal facto, também já foi relatado em humanos, quer em jovens com DM tipo 1 quer em adultos com DM tipo 2 (Marcovecchio et al. 2010; Can et al. 2011), ainda que a causa não seja clara. Suspeita-se que se trate de uma consequência de hiperfiltração glomerular, da diurese osmótica decorrente da glicosúria e/ou de uma diminuição da produção de DMAS por interferência da hiperglicemia na metilação da arginina (Can et al. 2011; Langhorn et al. 2018). De facto, Marcovecchio et al. (2010) detetaram uma correlação negativa entre a DMAS e a TFG em jovens com DM tipo 1. Também, Pelander et al. (2019) relataram uma correlação negativa significativa entre a DMAS e a a TFG, suportando a hipótese de ocorrência de hiperfiltração nestes cães.

Por outro lado, Can et al. (2011) descreveram uma correlação negativa entre a DMAS e a hemoglobina glicada e a frutossamina em humanos com DM tipo 2, sugerindo que existe uma relação entre o controlo glicémico e os níveis de DMAS. Os dados recolhidos no nosso estudo não permitem chegar a uma conclusão definitiva deste ponto de vista, dado não terem sido realizados doseamentos quer de frutossamina, quer de hemoglobina glicada.

Do nosso conhecimento, só existe um estudo realizado em cães diabéticos que utilizou outro marcador indireto da TFG, a cistatina C. Neste estudo, Marynissen et al. (2016) mediram também a TFG através da medição da depuração plasmática de creatinina exógena. Neste estudo não foi observada uma diferença significativa entre a concentração sérica de cistatina C em cães saudáveis e cães diabéticos numa avaliação inicial. Contudo,, apesar de não haver uma variação significativa da TFG ao longo dos 6 meses do estudo, verificou-se uma redução da cistatina C nos cães diabéticos. Estes autores consideraram este dado como de uma relevância clínica questionável. A avaliação da cistatina C não fez parte dos objetivos deste estudo e, atendendo aos resultados de Marynissen et al. (2016) e de Pelander et al. (2019), onde a especificidade da cistatina C é inferior à da creatinina e da DMAS na deteção de diminuições da TFG, consideramos que, apesar de se mostrar um marcador promissor da função renal, são necessárias mais investigações no sentido de identificar outros fatores que influenciem as concentrações séricas deste biomarcador em cães, à semelhança do que já foi descrito no Homem.

No presente estudo, dos 18 animais GDM, 4 encontravam-se no subestadio BP (22,2%) e 7 no subestadio P (38,9%). Estes resultados são semelhantes aos mencionados, por Mazzi et al. (2008), Herring et al. (2014) e Marynissen et al. (2016), nos quais 30%, 48,3% e 33% dos cães diabéticos apresentavam proteinúria, respetivamente. Relativamente aos 17 animais GS, 1 dos animais estava no subestadio BP (5,9%) e 1 no subestadio P

(5,9%), o que está de acordo com Marynissen et al. (2016), que também detectaram a ocorrência de proteinúria em cães saudáveis, porém, numa percentagem superior (29% era BP e 5% era P).

Está descrita a ocorrência de proteinúria em 18,6% a 25% dos cães geriátricos e sêniores aparentemente saudáveis (Marynissen et al. 2017; Willems et al. 2017). Nos humanos, a proteinúria também ocorre em cerca de 25% dos idosos, não sendo considerada uma mudança normal associada à idade, mas antes a consequência de uma doença subjacente não diagnosticada (Verma et al. 2012). Como causas sugeridas para esta proteinúria subclínica em cães, fazem parte a hipertensão arterial sistêmica, doenças vetoriais como a Leishmaniose, ou até mesmo situações que estimulem cronicamente o sistema imunitário (Glickman et al. 2011; Gizzarelli et al. 2019).

Tendo em conta que a DM se revelou um fator de risco para a entrada nos subestádios BP e P (OR=10,87, 95% IC 1,71-127,08,  $p=0,006$ ), podemos pressupor que a ocorrência de DM pode contribuir para o desenvolvimento de proteinúria renal nestes animais devido aos efeitos deletérios da hiperglicemia e da hiperfiltração sobre os glomérulos e túbulos renais, contribuindo para a perda de proteína no rim (Umanath & Lewis 2018). Também no Homem, a DM é um fator de risco importante para o desenvolvimento de proteinúria (Ong et al. 2013; Yokota et al. 2018; Duan et al. 2019).

É importante ter em conta que, neste estudo, não foram descartadas todas as possíveis causas de proteinúria, nomeadamente aquelas de origem pré-renal. A hipertensão arterial sistêmica, uma possível causa de proteinúria pré-renal, ocorre numa percentagem significativa dos cães com DM (Mazzi et al. 2008; Herring et al. 2014; Marynissen et al. 2016; Priyanka et al. 2018). A medição da PAS não foi feita neste estudo, na medida em que vários casos eram provenientes de centros de atendimento médico-veterinário externos, o que não permitia assegurar que as avaliações fossem feitas nas mesmas condições em termos de equipamento, local de medição e atitude do animal. Tais fatores limitariam a obtenção de resultados comparáveis entre animais, e entre grupos.

No Homem, existem múltiplos fatores que contribuem para o desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica na DM tipo 1. As principais são a expansão do volume circulante devido ao aumento da reabsorção de sódio no túbulo contornado proximal e a desregulação dos fatores intervenientes na resistência vascular periférica, como a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, o aumento da produção de endotelina-1, aumento das EROs, diminuição da produção de NO e o stress oxidativo (Van Buren & Toto 2011). Estes fatores estão também envolvidos no desenvolvimento da ND e, em humanos, é esta a principal causa de desenvolvimento de hipertensão arterial sistêmica na DM tipo 1 (Lago et al. 2007; Bloom and Rand 2013). Os mecanismos exatos que conduzem à hipertensão arterial sistêmica em cães diabéticos ainda não são totalmente conhecidos.

Efectivamente, os estudos conduzidos por Mazzi et al. (2008), Herring et al. (2014) e Priyanka et al. (2018) não encontraram uma associação entre o RPCU e a PAS em cães diabéticos. Como tal, não podemos descartar a existência de hipertensão arterial sistémica nos animais incluídos no nosso estudo. Contudo, podemos equacionar que esta poderá ser devida às alterações estruturais e hemodinâmicas a nível renal causadas pela hiperglicemia. Por outro lado, outras possíveis causas de proteinúria, como tumores plasmocelulares, reações a fármacos, doenças infecciosas ou imunomediadas foram descartadas apenas com base na história clínica e exame físico dos animais.

De facto, o único modo de confirmar a causa da proteinúria renal seria através da realização de uma biópsia renal. Este é um exame invasivo, que implica a sedação ou anestesia geral do paciente, e com possíveis complicações, ainda que pouco frequentes, nomeadamente hemorragia grave, hidronefrose ou mesmo morte (Vaden et al. 2005). Ademais, devido ao facto de se tratar de um procedimento dispendioso, é pouco realizado em Portugal.

Não foi detetada uma associação significativa entre o tempo desde o diagnóstico de DM e as concentrações de ureia ( $p=0,847$ ), creatinina ( $p=0,523$ ), DMAS ( $p=0,107$ ) ou RPCU ( $p=0,844$ ). Com efeito, também Herring et al. (2014) não detetaram qualquer relação entre a ocorrência de proteinúria e a duração do diagnóstico de DM em cães, assim como não detetaram uma variação significativa da concentração sérica de ureia, de creatinina ou de RPCU ao longo de 24 meses de acompanhamento. Nos estudos de Marynissen et al. (2016), também não foi detetada uma variação significativa nas concentrações de ureia, de creatinina, do RPCU ou da TFG ao longo de 6 meses de acompanhamento de indivíduos com DM.

Em humanos, a duração do diagnóstico de DM é um conhecido fator de risco para o desenvolvimento e progressão de ND, no que diz respeito ao desenvolvimento de proteinúria e diminuição da TFG (Zoppini et al. 2012; Ahmed et al. 2013; Tziomalos & Athyros 2015; Al-Shammak et al. 2019). No entanto, o tempo necessário para a sua ocorrência é muito superior à duração do diagnóstico dos cães GDM no presente estudo. De facto, a TFG em humanos diabéticos pode manter-se estável, ainda que aumentada, durante vários anos desde o diagnóstico, e o seu decréscimo abaixo de valores normais pode demorar desde 5 a 25-30 anos a verificar-se (De Boer et al. 2011; Krolewski 2015). Assim, é provável que os cães presentes na nossa amostra ainda não apresentem a doença há tempo suficiente para que se verifiquem variações nas concentrações dos indicadores de TFG avaliados, ou no RPCU.

No que diz respeito à insulino terapia, não foi detetada uma associação significativa entre a dose de insulina preconizada e as concentrações de ureia ( $p=0,185$ ), creatinina ( $p=0,197$ ), DMAS ( $p=0,905$ ) ou RPCU ( $p=0,232$ ). No Homem, o desenvolvimento de DRC,

independentemente da causa, e mesmo em estádios iniciais, está associado ao desenvolvimento de insulinoresistência, provavelmente devido à inflamação associada (Pecoits-Filho et al. 2003; Shoelson et al. 2006; Frankel & Kazempour-Ardebili 2016). Também, está descrita uma relação inversa entre a MA e a sensibilidade à insulina (Mykkanen et al. 1998; Whaley-Connell & Sowers 2017). Por outro lado, com a diminuição da TFG para valores mais baixos, há uma diminuição da *clearance* renal de insulina e um aumento da sua semi-vida, o que reduz as doses de insulina necessárias para o controlo da glicémia nestes indivíduos (Kulozik & Hasslacher 2013; Frankel & Kazempour-Ardebili 2016). Os nossos resultados não permitem constatar a ocorrência de nenhum dos fenómenos em cães, possivelmente devido à curta duração do diagnóstico de DM que, mais uma vez, deverá ser insuficiente para que estas alterações se verifiquem.

Extrapolando do descrito no Homem, será de considerar que estes animais se encontrem num estado de stress oxidativo associado a hiperglicemia. Em humanos, já foram publicados vários estudos que envolvem diversos marcadores de stress oxidativo, nomeadamente no que diz respeito à lipoperoxidação (8-iso-prostaglandina F<sub>2α</sub>, malondialdeído, substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico, e hidroxinonenal), à oxidação proteica (grupos carbonil, produtos avançados da oxidação proteica), aos AGEs (pentosidina e N-(carboximetil)-lisina), às lesões oxidativas do DNA (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina) e do RNA (8-hidroxiguanosina), à atividade de enzimas antioxidantes (catálase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e paraoxonase) e aos níveis de antioxidantes não-enzimáticos (ácido ascórbico, tocoferol, glutathione e *nuclear factor-E2-related factor 2*). Apesar de existir uma associação entre estes marcadores e a ocorrência de complicações vasculares na DM humana, os resultados não são coerentes entre estudos no que toca ao seu valor prognóstico, pelo que a sua utilização se cinge apenas à investigação (Bigagli & Lodovici 2019). Não é do nosso conhecimento a existência de estudos sobre estes marcadores em cães diabéticos, e a sua avaliação não fez parte dos objetivos da presente dissertação. A sua investigação num contexto médico-veterinário poderia, no entanto, provar-se um contributo importante para uma melhor compreensão das consequências da DM, nomeadamente no cão.

Apesar das limitações referidas, o presente estudo avaliou não só os valores de ureia, creatinina, DMAS e RPCU em cães diabéticos, como também os comparou com os de cães saudáveis, o que permitiu detetar diferenças importantes entre os grupos.

## 5. Conclusão

A literatura científica veterinária disponível sobre ND é ainda escassa. Com efeito, este é o primeiro estudo de que temos conhecimento que avalia a concentração sérica da DMAS em cães diabéticos e que demonstra uma diminuição da concentração sérica da mesma, assim como da creatinina, devido a, provavelmente, diurese osmótica, poliúria e hiperfiltração glomerular.

Todavia, apesar de os casos de ND canina em fase terminal serem improváveis devido ao intervalo de tempo que é necessário para o seu aparecimento, existem outras consequências da DM a nível renal que devem ser tidas em conta. Os resultados do presente estudo sugerem não só a ocorrência de hiperfiltração nestes animais, com possíveis consequências negativas a médio-longo prazo, como reforçam, também, o papel da DM como fator de desenvolvimento de proteinúria em cães, o que deve ser ponderado aquando da monitorização destes animais junto do médico veterinário.

Devido a restrições económicas não foi possível utilizar mais ferramentas clínicas para a avaliação da função renal em cães com DM, nomeadamente para a deteção precoce de ND.

Vários desígnios poderiam aqui ser colocados, nomeadamente termos relacionado o controlo glicémico, através do doseamento de frutamina, com as variáveis em estudo, particularmente com a DMAS, de modo a verificar se existia uma relação inversa entre o controlo glicémico e os valores de DMAS, à semelhança do descrito no Homem. Por outro lado, a medição direta da TFG teria sido importante, de modo a relacioná-la com as concentrações de creatinina e DMAS e, assim, poderíamos confirmar se estes animais se encontram, de facto, num estado de hiperfiltração glomerular, associado às primeiras fases de ND. Mesmamente, teria sido interessante avaliar a MA e verificar se a mesma antecede o desenvolvimento da proteinúria, à semelhança do descrito no Homem, pois a hiperfiltração glomerular e as alterações metabólicas decorrentes da hiperglicemia são conhecidos fatores que contribuem para a ocorrência de lesão endotelial, das células mesangiais, dos podócitos, e glomerulosclerose, o que compromete a eficácia funcional e estrutural do nefrónio e conduz à perda de proteína. Efetivamente, a confirmação desta hipótese poderia justificar considerar a intervenção terapêutica mais precocemente, antes da proteinúria se instalar.

Relativamente à histopatologia, a biópsia renal é considerada o *gold standard* para o diagnóstico de ND, pelo que teria sido útil para contextualizar os resultados obtidos. Apesar de estarem descritas lesões histopatológicas compatíveis com esta entidade em cães diabéticos, seria importante relacionar essas alterações ultraestruturais com os achados laboratoriais em questão.

Em suma, pensamos que seria importante a realização de estudos sobre uma maior amostra de animais e ao longo de intervalos de tempo mais longos, de modo a monitorizar a variação destes indicadores, e identificar as alterações funcionais e morfológicas renais durante a evolução da DM canina.

Realçamos, no entanto, que apesar das limitações acima mencionadas, os resultados obtidos nos cães com DM no nosso estudo sugerem que os mesmos se encontrem numa fase de pré-nefropatia diabética, numa fase silenciosa ou numa fase de nefropatia incipiente.

## IV - Bibliografia

---

- Adams LG, Polzin DJ, Osborne CA, O'Brien TD. 1992. Correlation of urine protein/creatinine ratio and twenty-four-hour urinary protein excretion in normal cats and cats with surgically induced chronic renal failure. *J Vet Intern Med.* 6(1):36–40.
- Afghahi H, Cederholm J, Eliasson B, Zethelius B, Gudbjörnsdóttir S, Hadimeri H, Svensson MK. 2011. Risk factors for the development of albuminuria and renal impairment in type 2 diabetes--the Swedish National Diabetes Register (NDR). *Nephrol Dial Transplant.* 26(4):1236–1243.
- Ahmed MA, Kishore G, Khader HA, Kasturirangan MN. 2013. Risk factors and management of diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transplant.* 24(6):1242–1247.
- Al-Shammak AA, Ali AD, Jermozy H Al. 2019. Prevalence of Proteinuria among Type 2 Diabetic Patients in Dhamar Governorate, Yemen. *Int J Diabetes Clin Res.* 6(2).
- American Diabetes Association. 2013. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 36(1):S67-74.
- American Diabetes Association. 2019. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care.* 42(1):S124–S138.
- Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A, Koya D. 2005. Factors associated with frequent remission of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes.* 54(10):2983–2987.
- Arima S, Ito S. 2003. The mechanisms underlying altered vascular resistance of glomerular afferent and efferent arterioles in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant.* 18(10):1966–1969.
- Atzler D, Schwedhelm E, Nauck M, Ittermann T, Böger RH, Friedrich N. 2014. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania. *Clin Chem Lab Med.* 52(12):1835–1842.
- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. 2008. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 52(6):940–950.
- Barbosa JHP, Oliveira SL, Seara LT. 2009. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. *Rev Nutr.* 22(1):113–124.
- Bash LD, Selvin E, Steffes M, Coresh J, Astor BC. 2008. Poor glycemic control in diabetes and the risk of incident chronic kidney disease even in the absence of albuminuria and retinopathy: Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Arch Intern Med.* 168(22):2440–2447.
- Behrend E, Holford A, Lathan P, Rucinsky R, Schulman R. 2018. 2018 AAHA Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats. *J Am Anim Hosp Assoc.* 54(1):1–21.

- Bem AF, Kunde J. 2006. A importância da determinação da hemoglobina glicada no monitoramento das complicações crônicas do diabetes mellitus. *J Bras Patol e Med Lab.* 42(3):185–191.
- Bigagli E, Lodovici M. 2019. Circulating oxidative stress biomarkers in clinical studies on type 2 diabetes and its complications. *Oxid Med Cell Longev.* 2019:1–17.
- Bloom CA, Rand JS. 2013. Diabetes and the Kidney in Human and Veterinary Medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 43(2):351–365.
- De Boer IH, Sun W, Cleary PA, Lachin JM, Molitch ME, Steffes MW, Zinman B. 2011. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *N Engl J Med.* 365(25):2366–2376.
- Braun JP, Perxachs A, Pechereau D. 2002. Plasma cystatin C in the dog: Reference values and variations with renal failure. *Clin Pathol.* 11:44–49.
- Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, Chiesura-Corona M, Bianchi L, Baggio B, Maioli M, et al. 1997. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int Suppl.* 63:S40-44.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865):813–820.
- Brownlee M. 2005. The Pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 54(6):1615–1625.
- Brownlee M, Aiello LP, Cooper ME, Vinik AI, Nesto RW, Boulton AJM. 2011. Diabetic Nephropathy. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. *Williams's Textbook of Endocrinology.* 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 1462–1551.
- Van Buren PN, Toto R. 2011. Hypertension in diabetic nephropathy: epidemiology, mechanisms, and management. *Adv Chronic Kidney Dis.* 18(1):28–41.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes.* 52(1):102–110.
- Can A, Bekpinar S, Gurdol F, Tutuncu Y, Unlucerci Y, Dinccag N. 2011. Dimethylarginines in patients with type 2 diabetes mellitus: Relation with the glycaemic control. *Diabetes Res Clin Pract.* 94(3):61–64.
- Caramori ML, Mauer M. 2009. Pathogenesis and pathophysiology of diabetic nephropathy. In: Greenberg A, editor. *Primer on Kidney Diseases.* 5th ed. Philadelphia: Saunders. p. 214–223.
- Carranza K, Veron Dolores, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A, Veron Delma. 2015. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A.

Nefrologia. 35(2):131–138.

Catchpole B, Kennedy LJ, Davison LJ, Ollier WER. 2008. Canine diabetes mellitus: from phenotype to genotype. *J Small Anim Pract.* 49(1):4–10.

Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. 2000. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases, is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta.* 300(1–2):83–95.

Davison LJ, Herrtage ME, Catchpole B. 2011. Autoantibodies to recombinant canine proinsulin in canine diabetic patients. *Res Vet Sci.* 91(1):58–63.

Davison LJ, Ristic JME, Herrtage ME, Ramsey IK, Catchpole B. 2003. Anti-insulin antibodies in dogs with naturally occurring diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol.* 91(1):53–60.

Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, Brownlee M. 2003. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest.* 112(7):1049–1057.

Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. 2000. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci.* 97(22):12222–12226.

Duan J, Wang C, Liu D, Qiao Y, Pan S, Jiang D, Zhao Z, Liang L, Tian F, Yu P, et al. 2019. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease and diabetic kidney disease in Chinese rural residents: a cross-sectional survey. *Sci Rep.* 9(1):1–11.

Elliott J, Watson ADJ. 2016. Overview of the IRIS staging system for CKD. *IRIS Staging Syst.* [accessed 2019 Apr 13]. [http://www.iris-kidney.com/education/staging\\_system.html](http://www.iris-kidney.com/education/staging_system.html).

Engerman R, Bloodworth JMJ, Nelson S. 1977. Relationship of microvascular disease in diabetes to metabolic control. *Diabetes.* 26(8):760–769.

European Society of Veterinary Endocrinology. 2018. Project ALIVE. [accessed 2019 Apr 4]. <https://www.esve.org/alive/intro.aspx>.

Feldman EC, Nelson RW. 2004. Canine Diabetes Mellitus. In: Feldman EC, Nelson RW, editors. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction.* 3rd ed. Missouri: Saunders. p. 486–538.

Ferreira LT, Saviolli IH, Valenti VE. 2011. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq Bras Ciências da Saúde.* 36(3):182–188.

Fioretto P, Mauer M. 2007. Histopathology of diabetic nephropathy. *Semin Nephrol.* 27(2):195–207.

- Fracassi F. 2017. Canine Diabetes Mellitus. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 1767–1780.
- Frankel AH, Kazempour-Ardebili S. 2016. Effect of Insulin Resistance in Chronic Kidney Disease. *Endocrinol Metab Syndr.* 5(5):1–6.
- Gaede P, Tarnow L, Vedel P, Parving H-H, Pedersen O. 2004. Remission to normoalbuminuria during multifactorial treatment preserves kidney function in patients with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 19(11):2784–2788.
- Ghys L, Paepe D, Smets P, Lefebvre H, Delanghe J, Daminet S. 2014. Cystatin C: A New Renal Marker and Its Potential Use in Small Animal Medicine. *J Vet Intern Med.* 28(4):1152–1164.
- Gilor C, Niessen SJ, Furrow E, DiBartola SP. 2016. What's in a Name? Classification of Diabetes Mellitus in Veterinary Medicine and Why It Matters. *J Vet Intern Med.* 30(4):927–940.
- Gizzarelli M, Roura X, Scarpa P, D'Ippolito P, Foglia Manzillo V, Oliva G, Tarducci A, Borrelli A, Melis G, Quintavalla F, et al. 2019. Prevalence of Proteinuria in Owned Dogs from Italy: A Multicentric Study. *Vet Med Int.* 2019.
- Glickman LT, Glickman NW, Moore GE, Lund EM, Lantz GC, Pressler BM. 2011. Association between chronic azotemic kidney disease and the severity of periodontal disease in dogs. *Prev Vet Med.* 99(2–4):193–200.
- Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. 2006. Advanced glycation end products: sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 114(6):597–605.
- Grauer GF. 2005. Early Detection of Renal Damage and Disease in Dogs and Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 35(3):581–596.
- Grauer GF. 2011. Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Top Companion Anim Med.* 26(3):121–127.
- Grauer GF. 2016. Proteinuria - Measurement and interpretation of proteinuria and albuminuria. *Int Ren Interes Soc.* [accessed 2019 Nov 7]. <http://www.iris-kidney.com/education/proteinuria.html>.
- Grauer GF, Oberhauser EB, Barasaba RJ, Lappin MR, Simpson DF, Jensen WA. 2002. Development of microalbuminuria in dogs with heartworm disease [abstract]. *J Vet Intern Med.* 16:352.
- Guptill L, Glickman L, Glickman N. 2003. Time trends and risk factors for diabetes mellitus in dogs: analysis of veterinary medical data base records (1970-1999). *Vet J.* 165(3):240–247.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Jewell DE. 2014. Comparison of serum

- concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 28(6):1676–1683.
- Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD, Jewell DE. 2015. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 29(3):808–814.
- Harley L, Langston C. 2012. Proteinuria in dogs and cats. *Can Vet J.* 53(6):631–638.
- Helal I, Fick-Brosnahan GM, Reed-Gitomer B, Schrier RW. 2012. Glomerular hyperfiltration: Definitions, mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Nephrol.* 8(5):293–300.
- Herring IP, Panciera DL, Werre SR. 2014. Longitudinal prevalence of hypertension, proteinuria and retinopathy in dogs with spontaneous DM. *J Vet Intern Med.* 28(2):488–495.
- Hess RS, Saunders HM, Winkle TJ Van, Ward CR. 2000. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993–1998). *J Am Vet Med Assoc.* 217(8):1166–1173.
- Hoenig M, Dawe DL. 1992. A qualitative assay for beta cell antibodies. Preliminary results in dogs with diabetes mellitus. *Vet Immunol Immunopathol.* 32(3–4):195–203.
- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JEB. 2006. Diabetes and Advanced Glycoxidation End Products. *Diabetes Care.* 29(6):1420–1432.
- International Renal Interest Society. 2019. IRIS Staging of CKD. :1–5. [accessed 2019 Oct 7]. [http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf).
- Ioannou K. 2017. Diabetic nephropathy: is it always there? Assumptions, weaknesses and pitfalls in the diagnosis. *Horm.* 16(4):351–361.
- Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, Kirk CA, Allen TA, Swanson LL. 2005. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *J Am Vet Med Assoc.* 226(3):393–400.
- Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim USR. 1995. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology.* 26:559–564.
- Júnior HPL, Lemos ALA. 2007. A reação de Maillard à mesa: mais um vilão para a sua saúde? *Diagnóstico e Trat.* 12(4):171–173.
- Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, Chugh S, Danesh FR. 2008. Diabetic Nephropathy: Mechanisms of Renal Disease Progression. *Exp Biol Med.* 233(1):4–11.
- Kimmelstiel P, Wilson C. 1936. Intercapillary Lesions in the Glomeruli of the Kidney. *Am J Pathol.* 12(1):83-98.7.

- Klahr S. 1989. The modification of diet in renal disease study. *N Engl J Med.* 320(13):864–866.
- Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann R, Schleicher ED. 1998. High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest.* 101(1):160–169.
- Kopke MA, Burchell RK, Ruaux CG, Burton SE, Lopez-Villalobos N, Gal A. 2018. Variability of Symmetric Dimethylarginine in Apparently Healthy Dogs. *J Vet Intern Med.* 32(2):736–742.
- Koya D, King GL. 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes.* 47(6):859–866.
- Krolewski AS. 2015. Progressive renal decline: The new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care.* 38(6):954–962.
- Kulozik F, Hasslacher C. 2013. Insulin requirements in patients with diabetes and declining kidney function: Differences between insulin analogues and human insulin? *Ther Adv Endocrinol Metab.* 4(4):113–121.
- Kussman MJ, Goldstein HH, Gleason RE. 1976. The Clinical Course of Diabetic Nephropathy. *J Am Med Assoc.* 236(16):1861–1863.
- Lago RM, Singh PP, Nesto RW. 2007. Diabetes and hypertension. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 3(10):667.
- Langhorn R, Kieler IN, Koch J, Christiansen LB, Jessen LR. 2018. Symmetric Dimethylarginine in Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy and Diabetes Mellitus. *J Vet Intern Med.* 32:57–63.
- Langston CE, Reine NJ. 2006. Hyperthyroidism and the Kidney. *Clin Tech Small Anim Pract.* 21(1):17–21.
- Lee AYW, Chung SSM. 1999. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 13(1):23–30.
- Lees GE, Brown SA, Elliott J, Grauer GE, Vaden SL, American College of Veterinary Internal Medicine. 2005. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med.* 19(3):377–385.
- Lees GE, Jensen WA, Simpson DF, Kashtan CE. 2002. Persistent albuminuria precedes onset of overt proteinuria in male dogs with X-linked hereditary nephropathy [abstract]. *J Vet Intern Med.* 16:353.
- Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F, Greene T, et al. 2009. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 150(9):604–612.

- Lin L. 2006. RAGE on the Toll Road? *Cell Mol Immunol.* 3(5):351–358.
- Littman MP. 2011. Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 41(1):31–62.
- Magee C, Grieve DJ, Watson CJ, Brazil DP. 2017. Diabetic nephropathy: a tangled web to unweave. *Cardiovasc Drugs Ther.* 31(5–6):579–592.
- Marcovecchio ML, Dalton RN, Turner C, Prevost AT, Widmer B, Amin R, Dunger DB. 2010. Symmetric dimethylarginine, an endogenous marker of glomerular filtration rate, and the risk for microalbuminuria in young people with type 1 diabetes. *Arch Dis Child.* 95(2):119–124.
- Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G. 2006. Elevations of plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia.* 49(2):351–359.
- Marynissen SJJ, Smets PMY, Ghys LFE, Paepe D, Delanghe J, Galac S, Meyer E, Lefebvre HP, Daminet S. 2016. Long-term follow-up of renal function assessing serum cystatin C in dogs with diabetes mellitus or hyperadrenocorticism. *Vet Clin Pathol.* 45(2):320–329.
- Marynissen SJJ, Willems AL, Paepe D, Smets PMY, Picavet P, Duchateau L, Daminet S. 2017. Proteinuria in Apparently Healthy Elderly Dogs: Persistency and Comparison Between Free Catch and Cystocentesis Urine. *J Vet Intern Med.* 31(1):93–101.
- Mazzi A, Fracassi F, Dondi F, Gentilini F, Famigli Bergamini P. 2008. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Vet Res Commun.* 32(1):299–301.
- Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA. 2003. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure–activity study. *Bioorg Med Chem.* 11(6):853–862.
- Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. 1983. The Stages in Diabetic Renal Disease: With Emphasis on the Stage of Incipient Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 32(2):64–78.
- Mykkanen L, Zaccaro DJ, Wagenknecht LE, Robbins DC, Gabriel M, Haffner SM. 1998. Microalbuminuria is associated with insulin resistance in nondiabetic subjects: the insulin resistance atherosclerosis study. *Diabetes.* 47(5):793–800.
- Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Rakitin A, Aguiar J, Relford R. 2015. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med.* 29(4):1036–1044.
- Di Naso FC, Dias AS, Marroni NAP. 2010. Aspectos Moleculares das Complicações Crônicas do Diabetes mellitus: Estudo de Revisão. *Ciência em Mov.* 24(2):7–15.

- Nelson RG, Bennett PH, Beck GJ, Tan M, Knowler WC, Mitch WE, Hirschman GH, Myers BD. 1996. Diabetic Renal Disease Study Group: development and Progression of Renal Disease in Pima Indians with Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med.* 335(22):1636–1642.
- Nelson RW. 2015. Diabetic Ketoacidosis. In: Feldman EC, Nelson RW, Reusch CE, Scott-Moncrieff JC, editors. *Canine & Feline Endocrinology.* 4th ed. Missouri: Elsevier. p. 315–347.
- Nelson RW, Reusch CE. 2014. Animal models of disease: classification and etiology of diabetes in dogs and cats. *J Endocrinol.* 222(3):T1-9.
- Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, Patel A, Cass A, Neal B, Poulter N, et al. 2009. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 20(8):1813–1821.
- O'Brien M. 2017. Diabetic Ketoacidosis and Hyperglycemic Hyperosmolar Syndrome. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 592–597.
- Oldfield MD, Bach LA, Forbes JM, Nikolic-Paterson D, McRobert A, Thallas V, Atkins RC, Osicka T, Jerums G, Cooper ME. 2001. Advanced glycation end products cause epithelial-myofibroblast transdifferentiation via the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *J Clin Invest.* 108(12):1853–1863.
- Oliveira FC, Campos ACS, Alves MDS. 2010. Autocuidado do nefropata diabético. *Rev Bras Enferm.* 63(6):946–949.
- Ong LM, Punithavathi N, Thurairatnam D, Zainal H, Beh ML, Morad Z, Lee SY, Bavanandan S, Kok LS. 2013. Prevalence and risk factors for proteinuria: The National Kidney Foundation of Malaysia Lifecheck Health Screening programme. *Nephrology.* 18(8):569–575.
- Papadopoulou-Marketou N, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. 2017. Diabetic nephropathy in type 1 diabetes: a review of early natural history, pathogenesis, and diagnosis. *Diabetes Metab Res Rev.* 33(2).
- Patz A, Berkow JW, Maumenee AE, Cox J. 1965. Studies on Diabetic Retinopathy: II. Retinopathy and Nephropathy in Spontaneous Canine Diabetes. *Diabetes.* 14(11):700–708.
- Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Bárány P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, Stenvinkel P. 2003. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis.* 41(6):1212–1218.
- Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. 2006. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Res Vet Sci.* 80(3):336–342.
- Pelander L, Häggström J, Larsson A, Syme H, Elliott J, Heiene R, Ljungvall I. 2019.

- Comparison of the diagnostic value of symmetric dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med.* 33(2):630–639.
- Penno G, Solini A, Zoppini G, Orsi E, Zerbini G, Trevisan R, Gruden G, Cavalot F, Laviola L, Morano S, et al. 2012. Rate and Determinants of Association Between Advanced Retinopathy and Chronic Kidney Disease in Patients With Type 2 Diabetes: The Renal Insufficiency And Cardiovascular Events (RIACE) Italian multicenter study. *Diabetes Care.* 35(11):2317–2323.
- Perico N, Codreanu I, Schieppati A, Remuzzi G. 2005. Pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. *Kidney Int Suppl.*(94):S79–S82.
- Persson P, Hansell P, Palm F. 2010. Tubular reabsorption and diabetes-induced glomerular hyperfiltration. *Acta Physiol (Oxf).* 200(1):3–10.
- Polzin DJ. 2017a. Effects on other endocrine diseases on kidney function. In: Elliott J, Grauer GF, Westropp JL, editors. *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology.* 3rd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association. p. 224–231.
- Polzin DJ. 2017b. Chronic Kidney Disease. In: Ettinger SJ, Feldman, E C, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 1938–1958.
- Priyanka M, Jeyaraja K, Thirunavakkarasu PS. 2018. Abnormal renovascular resistance in dogs with diabetes mellitus: correlation with glycemic status and proteinuria. *Iran J Vet Res.* 19(4):304–309.
- Pugliese G. 2014. Updating the natural history of diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* 51(6):905–915.
- R Core Team. 2019. The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
- Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR, UKPDS Study Group. 2006. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. *Diabetes.* 55(6):1832–1839.
- Robles NR, Villa J, Gallego RH. 2015. Non-Proteinuric Diabetic Nephropathy. *J Clin Med.* 4(9):1761–1773.
- Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H. 2003. The AGE-RAGE System and Diabetic Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 14(8 Suppl 3):S259-63.
- Salazar JH. 2014. Overview of Urea and Creatinine. *Lab Med.* 45(1):e19–e20.
- Sasson AN, Cherney DZ. 2012. Renal hyperfiltration related to diabetes mellitus and obesity in human disease. *World J Diabetes.* 3(1):1–6.
- Sayeski PP, Kudlow JE. 1996. Glucose Metabolism to Glucosamine Is Necessary for

- Glucose Stimulation of Transforming Growth Factor- $\alpha$  Gene Transcription. *J Biol Chem.* 271(25):15237–15243.
- Schaan BD. 2003. O papel da proteína quinase C no desenvolvimento das complicações vasculares do diabetes mellitus. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 47(6):654–662.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest.* 116(7):1793–1801.
- Silva NR, Costa CEM. 2008. A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares do Diabetes Mellitus. *Arq Ciências da Saúde da UNIPAR.* 12(3):265–270.
- Silva R, Meng C, Coentrão L. 2017. Diabetic Nephropathy and its two phenotypes: the proteinuric and non-proteinuric. *Port J Nephrol Hypertens.* 31(2):122–131.
- Smets PMY, Lefebvre HP, Kooistra HS, Meyer E, Croubels S, Maddens BEJ, Vandenabeele S, Saunders JH, Daminet S. 2012. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *Vet J.* 192(3):532–534.
- Steffes MW, Buchwald H, Wigness BD, Groppoli TJ, Rupp WM, Rohde TD, Blackshear PJ, Mauer SM. 1982. Diabetic nephropathy in the uninephrectomized dog: Microscopic lesions after one year. *Kidney Int.* 21(5):721–724.
- Stockham SL, Scott MA. 2008. Urinary System. In: Stockham SL, Scott MA, editors. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology.* 2nd ed. Iowa: Blackwell Publishing. p. 415–494.
- Syme H. 2003. Hypertension and hyperthyroidism. Is there a connection? [abstract]. In: *Proc. Annu Meet Euro Coll Vet Intern Med.*
- Syme HM, Jepson R. 2017. Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 1905–1918.
- Tan ALY, Sourris KC, Harcourt BE, Thallas-Bonke V, Penfold S, Andrikopoulos S, Thomas MC, O'Brien RC, Bierhaus A, Cooper ME, et al. 2010. Disparate effects on renal and oxidative parameters following RAGE deletion, AGE accumulation inhibition, or dietary AGE control in experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Physiol.* 298(3):F763–F770.
- Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, Ferrario F, Fogo AB, Haas M, de Heer E, et al. 2010. Pathologic classification of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 21(4):556–563.
- Tikellis C, Brown R, Head GA, Cooper ME, Thomas MC. 2014. Angiotensin-converting enzyme 2 mediates hyperfiltration associated with diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol.* 306(7):F773–780.
- Tonneijck L, Muskiet MHA, Smits MM, van Bommel EJ, Heerspink HJL, van Raalte DH,

- Joles JA. 2017. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol.* 28(4):1023–1039.
- Tuomi T, Groop LC, Zimmet PZ, Rowley MJ, Knowles W, Mackay IR. 1993. Antibodies to glutamic acid decarboxylase reveal latent autoimmune diabetes mellitus in adults with a non-insulin-dependent onset of disease. *Diabetes.* 42(2):359–362.
- Tziomalos K, Athyros VG. 2015. Diabetic Nephropathy: New Risk Factors and Improvements in Diagnosis. *Rev Diabet Stud.* 12(1–2):110–118.
- Umanath K, Lewis JB. 2018. Update on Diabetic Nephropathy: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 71(6):884–895.
- Vaden SL. 2017. Glomerular Diseases. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Côté E, editors. *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 8th ed. Missouri: Elsevier. p. 1959–1971.
- Vaden SL, Jensen WA, Longhofer SL, Simpson DF. 2001. Longitudinal study of microalbuminuria in soft-coated wheaten terriers [abstract]. *J Vet Intern Med.* 15(3):300.
- Vaden SL, Levine JF, Lees GE, Groman RP, Grauer GF, Forrester SD. 2005. Renal Biopsy: A Retrospective Study of Methods and Complications in 283 Dogs and 65 Cats. *J Vet Intern Med.* 19:794–801.
- Vallon V, Komers R. 2011. Pathophysiology of the diabetic kidney. *Comprehensive Physiol.* 1(3):1175–1232.
- Vassalotti JA, Centor R, Turner BJ, Greer RC, Choi M, Sequist TD, National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative. 2016. Practical Approach to Detection and Management of Chronic Kidney Disease for the Primary Care Clinician. *Am J Med.* 129(2):153-162.e7.
- Verkest KR, Rand JS, Fleeman LM, Morton JM. 2012. Spontaneously obese dogs exhibit greater postprandial glucose, triglyceride, and insulin concentrations than lean dogs. *Domest Anim Endocrinol.* 42(2):103–112.
- Verlander JW. 2013. Renal Physiology. In: Klein BG, editor. *Cunningham's Textbook of Veterinary Physiology.* 5th ed. Missouri: Elsevier Saunders. p. 460–494.
- Verma V, Kant R, Sunnoqrot N, Gambert SR. 2012. Proteinuria in the elderly: evaluation and management. *Int Urol Nephrol.* 44(6):1745–1751.
- Vestra MD, Saller A, Bortoloso E, Mauer M, Fioretto P. 2000. Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab.* 26(4):8–14.
- Vlassara H, Palace MR. 2002. Diabetes and advanced glycation endproducts. *J Intern Med.* 251(2):87–101.
- Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. 2008. Utility of serum cystatin C as a clinical

- measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc.* 44(3):131–138.
- Wells L, Hart GW. 2003. O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* 546(1):154–158.
- Whaley-Connell A, Sowers JR. 2017. Insulin Resistance in Kidney Disease: Is There a Distinct Role Separate from That of Diabetes or Obesity. *CardioRenal Med.* 8(1):41–49.
- Willems A, Paepe D, Marynissen S, Smets P, Van de Maele I, Picavet P, Duchateau L, Daminet S. 2017. Results of Screening of Apparently Healthy Senior and Geriatric Dogs. *J Vet Intern Med.* 31(1):81–92.
- Yokota F, Ahmed A, Islam R, Nishikitani M, Kikuchi K, Nohara Y, Okajima H, Kitaoka H, Nakashima N. 2018. The Relationships and Risk Factors Associated with Hypertension, Diabetes, and Proteinuria among Adults from Bheramara Upazila, Bangladesh: Findings from Portable Health Clinic Data, 2013-2016. *Int J Med Res Heal Sci.* 7(2):1–12.
- Yokoyama H, Sone H, Oishi M, Kawai K, Fukumoto Y, Kobayashi M, Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group. 2009. Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15). *Nephrol Dial Transplant.* 24(4):1212–1219.
- Zoppini G, Targher G, Chonchol M, Ortalda V, Negri C, Stoico V, Bonora E. 2012. Predictors of Estimated GFR Decline in Patients with Type 2 Diabetes and Preserved Kidney Function. *Clin J Am Soc Nephrol.* 7(3):401–408.

## V – Anexos

---

**Anexo 1:** Classificação histopatológica da nefropatia diabética (Tervaert et al. 2010).

- Classe I (espessamento da membrana basal glomerular): alterações glomerulares ligeiras ou não-específicas na microscopia ótica e não compatíveis com a classe II, III ou IV, com espessamento da membrana basal glomerular visível na microscopia eletrônica;
- Classe II (expansão mesangial): expansão mesangial, moderada (IIa) ou muito grave (IIb) mas sem esclerose nodular (nódulos de Kimmelstiel-Wilson) ou com outras alterações compatíveis com a classe III ou IV;
- Classe III (esclerose nodular): presença de pelo menos um nódulo de Kimmelstiel-Wilson, com menos de 50% de glomerulosclerose global, e sem alterações compatíveis com a classe IV;
- Classe IV (glomerulosclerose diabética avançada): lesões compatíveis com as classes I a III, e mais de 50% de glomerulosclerose global, associada a outras evidências clínicas ou patológicas de que a esclerose é devida a ND.

**Anexo 2:** Classificação histopatológica da nefropatia diabética em casos de DM tipo 2 (Fioretto and Mauer 2007).

- Categoria C I (estrutura normal ou quase normal): biópsias normais ou com expansão mesangial ligeira, alterações tubulointersticiais e/ou vasculares;
- Categoria C II (nefropatia diabética típica): lesões compatíveis com ND, com lesões glomerulares, tubulointersticiais e arteriolares de gravidade idêntica, semelhantes ao quadro típico observado em pacientes com DM tipo I com lesões óbvias de ND ao microscópio ótico;
- Categoria C III (padrão de lesão renal atípico): lesões glomerulares relativamente ligeiras quando comparadas com outras lesões desproporcionalmente mais graves:
  - a) Atrofia tubular, espessamento e hiperplasia da membrana basal tubular e fibrose intersticial (lesões tubulointersticiais);
  - b) Hialinose avançada das arteríolas glomerulares, comumente associada a aterosclerose dos grandes vasos;
  - c) Esclerose glomerular global.

Na categoria C III, estes padrões podem surgir em todas as combinações possíveis.

**Anexo 3:** Estadiamento IRIS com base na concentração plasmática de creatinina e DMAS (International Renal Interest Society 2019).

Estadio	Creatinina ( $\mu\text{mol/L}$ e $\text{mg/dl}$ )		Comentários
	DMAS ( $\mu\text{g/dl}$ )		
	Cão	Gato	
1	< 125 < 1,4 <18	< 140 < 1,6 <18	Creatinina sérica normal ou DMAS normal ou ligeiramente aumentada. Outras alterações renais podem estar presentes, como inadequada capacidade de concentração urinária sem causa não-renal observável (em gatos, não em cães), alterações imagiológicas ou à palpação do rim, proteinúria de origem renal, resultados de biópsia renal anormais e aumento da creatinina ou da DMAS em amostras seriadas. Um aumento persistente da DMAS acima de 14 $\mu\text{g/dl}$ pode ser usado para diagnosticar DRC precoce.
2	125-250 1,4-2,8 18-35	140-250 1,6-2,8 18-25	Creatinina normal ou ligeiramente aumentada, azotémia renal ligeira (o limite inferior está incluído no intervalo de referência de alguns laboratórios, mas a insensibilidade da creatinina como teste de <i>screening</i> significa que animais no limite superior do intervalo de referência muitas vezes apresentam diminuição da capacidade excretora renal). DMAS ligeiramente aumentada. Sinais clínicos ligeiros ou ausentes.
3	251-440 2,1-5,0 36-54	251-440 2,9-5,0 26-38	Azotémia renal moderada. Podem estar presentes vários sinais extra-renais, mas a sua magnitude e gravidade variam. Se os sinais forem ausentes, o caso pode ser classificado como um estadio 3 precoce, enquanto se os sinais clínicos forem muitos ou marcados, justifica-se a sua classificação como um estadio 3 avançado.
4	> 440 > 5,0 >54	> 440 > 5,0 >38	Risco acrescido de sinais clínicos sistémicos e de crises urémicas.

**Anexo 4:** Subestadiamento IRIS com base na pressão arterial sistêmica (PAS) (International Renal Interest Society 2019).

<b>Pressão sistólica (mmHg)</b>	<b>Subestadiamento</b>	<b>Risco de lesão futura dos órgãos alvo</b>
< 140	<b>Normotenso</b>	Mínimo
140-159	<b>Pré-hipertenso</b>	Baixo
160-179	<b>Hipertenso</b>	Moderado
≥ 180	<b>Gravemente hipertenso</b>	Alto

**Anexo 5:** Termo de consentimento de participação no estudo.

## Termo de consentimento do proprietário

*Eu, abaixo assinado*, Último nome, Primeiro nome \_\_\_\_\_

*morador* Morada \_\_\_\_\_

*Proprietário – Autorizado pelo proprietário* (suprimir como apropriado)

*Do animal* Nome e/ou identificação do animal \_\_\_\_\_

*Concordo que o meu animal participe no estudo clínico “Avaliação da função renal em cães diabéticos: análise de indicadores”. Este estudo é realizado no âmbito da Dissertação de Mestrado da aluna estagiária Sara Castanho Barbosa, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Teresa Mendes V. Brito.*

*Eu declaro que me informaram detalhadamente acerca de:*

- *O objectivo deste estudo;*
- *O facto de que todos os dados recolhidos durante este estudo podem fazer parte de uma base de dados importante para avaliação desta doença metabólica;*
- *O facto de que o presente estudo ter sido oficialmente autorizado pela FMV-ULisboa;*
- *O facto de que o meu animal receberá tratamento durante o estudo e de acordo com os procedimentos, os quais me foram explicados pelo(a) médico(a) responsável;*
- *O facto de que eu devo, imediatamente, informar o médico-veterinário de qualquer alteração que diga respeito à saúde do meu animal assim como informá-lo de algum tratamento extra que poderá ser administrado, e que o mesmo não esteja contemplado no protocolo;*
- *O facto de que estou autorizado a retirar o meu animal do estudo a qualquer momento, desde que eu informe médico-veterinário acerca da razão do mesmo e dando um motivo para esse abandono;*
- *O facto de que tratarei de toda a informação, que foi dada no protocolo e obtida neste estudo, como confidencial e que eu não revelarei os resultados em parte alguma que não esteja directamente envolvido neste estudo.*

*Preenchido a* Local \_\_\_\_\_, *Data* \_\_\_\_\_ *Assinatura*

*Em duplicado, do qual me deram uma cópia .*

*Eu, abaixo assinada, **Sara Castanho Barbosa**, sob a orientação da Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Teresa Mendes V. Brito, participante no estudo clínico “Avaliação da função renal em cães diabéticos: análise de indicadores”, confirmo que obtive este consentimento escrito após informar detalhadamente o proprietário do animal, ou a pessoa autorizada pelo proprietário, de todos os elementos deste estudo.*

*Preenchido a:* Local \_\_\_\_\_, *Data* \_\_\_\_\_

*Assinatura*

**Anexo 6:** Questionário preenchido pelos proprietários dos cães do GDM.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa

**Questionário**

"Avaliação Da Função Renal Em Cães Diabéticos: Análise De Indicadores"

Nome do proprietário: \_\_\_\_\_

Contacto telefónico/e-mail: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

Nome do animal: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

Sexo:  Macho  Fêmea

Estado reprodutivo:  Fértil  Castrado/Esterilizada

Raça: \_\_\_\_\_  Indeterminada

Peso: \_\_\_\_\_

Há quanto tempo foi diagnosticado com diabetes mellitus: \_\_\_\_\_

Tipo de insulina: \_\_\_\_\_

Dose de insulina e frequência de administração: \_\_\_\_\_

**Anexo 7: Resultados do GDM – Animais, anamnese, concentração de ureia, creatinina, DMAS e RPCU.**

Amostra	Idade	Cat. Idd	Sexo	Raça	Peso (kg)	Cat. P.	Dx (meses)	Insulina	Volume (ml)	Unidades (U)	Dose (UI/kg)	Freq.	Ureia	Creatinina	DMAS	RPCU	IRIS
1	11	≥7	M	SRD	9,8	P	36	Caninsulin	0,17	6,8	0,69	BID	36,8	0,735	9	0,11	NP
2	5	<7	F	SRD	22,3	M	2	Caninsulin	0,24	9,6	0,43	BID	34	0,903	7	0,11	NP
3	15	≥7	FC	Husky	30,6	G	32	Caninsulin	0,5	20	0,65	BID	29	0,833	7	0,09	NP
4	13	≥7	FC	Caniche	8,12	P	3	Caninsulin	-	5	0,62	BID	35,3	0,8	10	1,84	P
5	9	≥7	F	x Yorkshire	5,25	m	8	Caninsulin	-	4,5	0,86	BID	31,2	0,5	9	0,73	P
6	7	≥7	F	SRD	15,2	P	2	Caninsulin	0,16	6,4	0,42	BID	48,2	0,762	10	0,26	BP
7	10	≥7	FC	Labrador	32	G	48	Caninsulin	0,35	14	0,44	BID	44,7	0,901	5	0,15	NP
8	9	≥7	FC	SRD	23	M	12	Caninsulin	0,24	9,6	0,42	BID	8,7	0,6	9	0,1	NP
9	8	≥7	FC	Epagnol Breton	10,2	P	8	Caninsulin	0,14	5,6	0,55	BID	19	0,5	5	0,1	NP
10	12	≥7	M	Schnauzer	12,2	P	48	Caninsulin	-	7	0,57	BID	19	0,9	8	2,06	P
11	10	≥7	M	x Pinscher	4,9	m	5	Caninsulin	0,05	2	0,41	BID	36,1	0,717	9	0,24	BP
12	8	≥7	FC	Labrador	24,5	M	15	Caninsulin	0,25	10	0,41	BID	57	0,999	7	0,89	P
13	10	≥7	FC	x Labrador	28,1	G	2	Caninsulin	0,24	9,6	0,34	BID	52,6	1,116	10	0,66	P
14	10	≥7	MC	SRD	14,7	P	2	Caninsulin	-	8	0,54	BID	16,8	0,66	12	0,27	BP
15	9	≥7	M	SRD	7,87	P	6	Caninsulin	-	6	0,76	BID	31	0,51	7	2,25	P
16	12	≥7	FC	Labrador x Boxer	30,5	G	5	Caninsulin	-	12	0,39	BID	37,5	0,69	8	0,05	NP
17	15	≥7	FC	SRD	10,3	P	25	Caninsulin	0,15	6	0,58	BID	88,4	1,007	12	1,49	P
18	6	<7	FC	English Springer Spaniel	22,25	M	16	Caninsulin	0,29	11,6	0,52	BID	54,5	0,801	8	0,23	BP

**Legenda:** BID - *bis in die*; Cat. Idd – categoria de idade; Cat. P. – categoria de peso (m – miniatura, P – pequeno, M – médio, G – grande); Dx – duração do diagnóstico de DM; F – fêmea inteira; FC – fêmea esterilizada; Freq. – frequência de administração; IRIS – classificação do International Renal Interest Society (2019) quanto à proteinúria (NP – não proteinúrico, BP – *borderline* proteinúrico, P – proteinúrico); M – macho inteiro; MC – macho castrado; SRD – sem raça definida; x – cruzamento.

Parâmetros	Intervalo de referência
Ureia	12-56 mg/dl
Creatinina	0,620-1,640 mg/dl
DMAS	0-14 µg/dl
RPCU	NP: < 0,2; BP: 0,2-0,5; P: > 0,5

**Anexo 8:** Resultados do GS – Animais, anamnese, concentração de ureia, creatinina, DMAS e RPCU.

Amostra	Idade	Cat. Idd	Sexo	Raça	Peso (kg)	Cat. P.	Ureia	Creatinina	DMAS	RPCU	IRIS
A	10	≥7	F	Pastor de Shetland	8	P	39,8	1,128	13	0,11	NP
B	6	<7	MC	SRD	21	M	43,7	0,971	10	0,13	NP
C	8	≥7	MC	Golden Retriever	35	G	33	0,956	9	0,4	BP
D	7	≥7	MC	West Highland Terrier	10	P	31	0,877	8	0,14	NP
E	8	≥7	FC	Yorkshire Terrier	5	m	32,4	0,861	8	0,14	NP
F	7	≥7	FC	SRD	6,3	P	27,9	0,833	9	0,07	NP
G	10	≥7	M	Labrador x Perdigueiro	27,8	G	27,9	1,04	12	0,1	NP
H	10	≥7	FC	SRD	20,65	M	34,8	0,979	15	0,09	NP
I	10	≥7	F	SRD	7,35	P	26,3	0,671	7	0,14	NP
J	10	≥7	MC	SRD	5	m	40,2	0,747	10	0,17	NP
L	15	≥7	FC	SRD	18,5	M	97,1	1,176	18	0,15	NP
M	10	≥7	FC	Golden Retriever	34,5	G	42,3	1,019	13	0,78	P
N	12	≥7	FC	SRD	7	P	47,8	0,841	7	0,12	NP
O	7	≥7	FC	Pug	7,5	P	50,7	1,082	13	0,17	NP
P	11	≥7	FC	Labrador	32	G	54,4	0,855	10	0,08	NP
Q	15	≥7	M	SRD	13	P	25,8	0,793	7	0,11	NP
R	6	<7	MC	Cão d'Água Português	22	M	54,1	1,097	11	0,16	NP

**Legenda:** Cat. Idd – categoria de idade; Cat. P. – categoria de peso (m – miniatura, P – pequeno, M – médio, G – grande); F – fêmea inteira; FC – fêmea esterilizada; IRIS – classificação do International Renal Interest Society (2019) quanto à proteinúria (NP – não proteinúrico, BP – borderline proteinúrico, P – proteinúrico); M – macho inteiro; MC – macho castrado; SRD – sem raça definida; x – cruzamento.

Parâmetros	Intervalo de referência
Ureia	12-56 mg/dl
Creatinina	0,620-1,640 mg/dl
DMAS	0-14 µg/dl
RPCU	NP: < 0,2; BP: 0,2-0,5; P: > 0,5