



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**



## **Vitamina D e Inflamação na Leishmaniose Visceral**

**GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA**

Campo Grande – MS  
2023

**GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA**

## **Vitamina D e Inflamação na Leishmaniose Visceral**

*Vitamin D and Inflammation in Visceral Leishmaniasis*

**GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alda Izabel de Souza**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciências Veterinárias com ênfase em Patologia Clínica Veterinária.

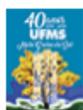
Campo Grande – MS  
2023



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Vitamina D e inflamação na Leishmaniose Visceral", registrada com o nº 1.192/2021, sob a responsabilidade de Alda Izabel de Souza - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 23/09/2021.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/11/2021 a 03/12/2024
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Canis lupus familiaris</i> / Cão
Nº de animais	80 (40 machos e 40 fêmeas)
Peso/Idade	>3kg / 1 - 8 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Hospital Veterinário da FAMEZ



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria**, **Presidente de Comissão**, em 27/10/2021, às 10:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



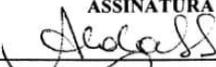
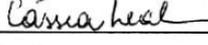
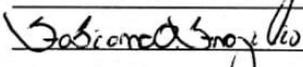
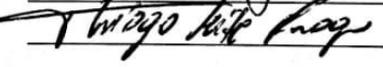
A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2872294** e o código CRC **A04DD4E9**.

### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária  
Fone: (67) 3345-7925  
CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**  
**Doutorado**

Aos doze dias do mês de janeiro do ano de dois mil e vinte e três, às nove horas, na sala A da pós-graduação da FAMEZ/UFMS, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Alda Izabel de Souza (UFMS), Carlos Alberto do Nascimento Ramos (UFMS), Cassia Rejane Brito Leal (UFMS), Fabiano de Oliveira Frazilio (UFMS) e Thiago Leite Fraga (UNIGRAN), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **GUSTAVO GOMES DE OLIVEIRA**, CPF 02291367102, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Vitamina D e Inflamação na Leishmaniose Visceral**" e orientação de Alda Izabel de Souza. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Alda Izabel de Souza (Interno)		Aprovado
Dr. Carlos Alberto do Nascimento Ramos (Interno)		APROVADO
Dra. Cassia Rejane Brito Leal (Interno)		Aprovado
Dr. Danilo Carloto Gomes (Interno) (Suplente)		
Dr. Fabiano de Oliveira Frazilio (Externo)		Aprovado
Dra. Kelly Cristina da Silva Godoy (Externo) (Suplente)		
Dr. Thiago Leite Fraga (Externo)		Aprovado

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação                       Aprovação com revisão                       Reprovação

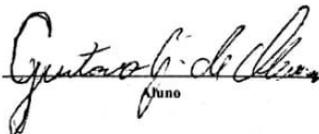
**OBSERVAÇÕES:**

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

  
 Presidente da Banca Examinadora

  
 Aluno

## RESUMO

OLIVEIRA, G. G. Vitamina D e Inflamação na Leishmaniose Visceral. 2023. DOUTORANDO - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2023.

A vitamina D ativada (VitD) possui diversas funções no organismo que vão muito além do seu papel na homeostase dos minerais cálcio e fósforo. A ação desse hormônio no sistema imunológico foi amplamente explorada nas últimas décadas revelando a sua relação com doenças infecto parasitárias e autoimunes. Baixos níveis de VitD foram observados em cães infectados com leishmaniose visceral (LV) demonstrando relação com a gravidade da doença. Contudo, não foi estabelecido se há relação da hipovitaminose D com marcadores inflamatórios nesses animais. Logo o objetivo com este projeto é verificar a relação entre a inflamação em cães com LV e as alterações nos níveis de VitD. Para isso foram utilizados 23 cães, oito saudáveis para o grupo controle (GC) e 15 positivos para LV em exame parasitológico ou exame sorológico, sem apresentarem azotemia para formar o grupo doente (GD). Os níveis de VitD, creatinina, albumina, proteína C reativa e hemoglobina foram dosados e comparados entre os grupos por meio do teste de Mann-Whitney. As correlações entre a vitamina D e albumina, proteína C reativa e hemoglobina foram realizadas pelo teste de Spearman. O nível de significância utilizado foi de 0,05. Todos os marcadores inflamatórios avaliados na presente pesquisa demonstraram diferença estatística em suas concentrações nos grupos estudados. O GD apresentou maior prevalência de deficiência da vitamina D (46%) quando comparados ao GC (0%). Correlação moderada foi observada entre a vitamina D e a Proteína C reativa (rs:-0,48; p:0,03). Todos os animais com deficiência de vitamina D apresentaram hipoalbuminemia. A inflamação possui relação com a deficiência de vitamina D, podendo levar a um ciclo de inflamação e hipovitaminose D agravando o quadro do paciente.

**Palavras-chave:** Calcidiol, proteína C reativa, albumina.

## ABSTRACT

Activated vitamin D (VitD) has several functions in the body that go far beyond its role in the homeostasis of calcium and phosphorus minerals. The action of this hormone on the immune system has been widely explored in recent decades, revealing its relationship with infectious, parasitic and autoimmune diseases. Low levels of VitD were observed in dogs infected with visceral leishmaniasis (VL), demonstrating a relationship with the severity of the disease. However, it has not been established whether there is a relationship between hypovitaminosis D and inflammatory markers in these animals. Therefore, the objective of this project is to verify the relationship between inflammation in dogs with VL and changes in VitD levels. For this, 23 dogs were used, eight healthy for the control group (CG) and 15 positives for VL in parasitological or serological tests, without showing azotemia to form the sick group (SG). VitD, creatinine, albumin, C-reactive protein and hemoglobin levels were measured and compared between groups using the Mann-Whitney test. Correlations between vitamin D and albumin, C-reactive protein and hemoglobin were performed using the Spearman test. The significance level used was 0.05. All inflammatory markers showed statistical difference in their concentrations in the studied groups. The SG had a higher prevalence of vitamin D deficiency (46%) when compared to the CG (0%). Moderate correlation was observed between vitamin D and C-reactive protein (rs:-0.48; p:0.03). All animals with vitamin D deficiency had hypoalbuminemia. Inflammation is related to vitamin D deficiency, which can lead to a cycle of inflammation and hypovitaminosis D, aggravating the patient's condition.

**Keywords:** Calcidiol, C-reactive protein, albumin.

---

## SUMÁRIO

---

<b>RESUMO</b> .....	IV
<b>Abstract</b> .....	V
<b>1. Introdução</b> .....	7
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	8
<b>3. Objetivos</b> .....	11
<b>4. Materiais e métodos</b> .....	12
<b>5. Resultados</b> .....	13
<b>6. Discussão</b> .....	16
<b>7. Conclusão</b> .....	19
<b>8. Impacto econômico, social, tecnológico e/ou inovação</b> .....	19
<b>9. Referências bibliográficas</b> .....	20

## 1.Introdução

A vitamina D ativada ou calcitriol é um hormônio que possui grande importância no metabolismo dos minerais cálcio e fósforo. Esse hormônio produzido nos rins por ação enzimática leva à estimulação da absorção de cálcio e fósforo no intestino, além da inibição da liberação de paratormônio (PTH) pela glândula paratireoide. Fisiologicamente é produzido em situações de hipocalcemia e hipofosfatemia sendo sua produção estimulada pelo PTH e inibida por cálcio livre circulante e pelo fator de crescimento de fibroblasto – 23 (FGF-23) (GALVÃO et al., 2013).

Nas últimas décadas vários estudos demonstraram a relação da vitamina D com a regulação do sistema imunológico. Baixos níveis desse hormônio foram relacionados com maior incidência e quadros mais graves em várias infecções. Muitas células do sistema imunológico apresentam receptores para a Vitamina D, entretanto o linfócito T helper (TH) em particular tem mostrado grande resposta a esse hormônio, modificando a sua diferenciação no tipo 1 e 2 e com isso mudando a resposta imunológica (BOONSTRA et al., 2001; ARANOW, 2011; NANYANG et al., 2021).

A leishmaniose visceral (LV) apresenta diferença clínica significativa dependendo da resposta imunológica apresentada pelo paciente. A resposta humoral relacionada ao linfócito TH2 apresenta pior prognóstico quando comparada a resposta celular TH1. Quadros clínicos mais graves de leishmaniose em cães já foram associados a menores níveis de vitamina D, contudo não foi estabelecido associação dessa deficiência com marcadores inflamatórios (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; RODRIGUEZ-CORTES et al., 2017).

A influência do FGF-23 na produção de vitamina D foi observada recentemente. Além da diminuição da massa funcional dos rins, a elevação constante do FGF-23 em pacientes com doença renal crônica (DRC) tem sido associado com a diminuição dos níveis de calcitriol e surgimento do hiperparatireoidismo secundário renal (HPs) (WOLF, 2010; SILVER; NAVEH-MANY, 2013). A inflamação tem mostrado potencial de elevar a produção de FGF-23 e com isso interferir na produção de calcitriol (DAVID et al., 2016). Logo, pacientes inflamados, principalmente os que apresentam DRC concomitante,

33 como na LV, podem sofrer elevada inibição da produção de calcitriol implicando  
34 na desregulação do sistema imunológico e favorecendo o desenvolvimento da  
35 infecção.

36 Verificar a relação da inflamação com os níveis de vitamina D ativada  
37 podem revelar alvos terapêuticos importantes para o tratamento de doenças como  
38 a leishmaniose.

39

## 40 **2. Revisão Bibliográfica**

41 A vitamina D possui papel fundamental no metabolismo do cálcio e fósforo.  
42 Esse hormônio, erroneamente chamado de vitamina, pode ser produzido  
43 inicialmente na pele por meio da enzima 7-dihydrocholesterol- $\Delta$ 7-redutase que  
44 quando exposta a raios ultravioletas B na pele produz a vitamina D<sub>3</sub>, forma inativa  
45 da vitamina. Contudo os cães e gatos não produzem de forma significativa a  
46 vitamina D<sub>3</sub> na pele, sendo necessário sua ingestão já sintetizada (ZAFALON et  
47 al., 2019).

48 A vitamina D<sub>3</sub>, pode ser armazenada no tecido adiposo ou transformada  
49 em vitamina D ou calcidiol (25-hydroxyvitamin D) no fígado. O calcidiol possui  
50 ação como vitamina D, porém quando convertido em calcitriol, ou vitamina D  
51 ativada (1,25-dihydroxyvitamin D), possui afinidade 500 vezes maior aos seus  
52 receptores, aumentando drasticamente seu efeito (JENKINSON, 2019; ZAFALON  
53 et al., 2019).

54 O calcitriol é produzido nos rins, mais especificamente nos túbulos  
55 contorcidos proximais. Inicialmente o calcidiol é filtrado nos glomérulos e depois  
56 reabsorvido pelos túbulos para então ser transformado em calcitriol pela enzima  
57 1 $\alpha$ -hydroxylase. Logo a produção de calcitriol é dependente da função renal  
58 (CHEW et al., 2011; RIELA, 2014).

59 A produção de calcidiol e calcitriol é estimulada pelo PTH e inibida pelo  
60 FGF-23. O FGF-23 diminui a ação da 1 $\alpha$ -hydroxylase nos rins além de aumentar  
61 a degradação tanto do calcidiol quanto do calcitriol pela enzima 24-hydroxylase  
62 (SHIMADA et al., 2004; JENKINSON, 2019).

63 A vitamina D possui a função de elevar o cálcio, e por consequência o  
64 fósforo, sérico do indivíduo. O hormônio atua no intestino aumentando a absorção



83 imunológico nesses pacientes (JENKINSON, 2019; ALLISON et al., 2020;  
84 NANYANG et al., 2021).

85 A vitamina D exerce função na diferenciação do linfócito T helper (TH)  
86 estimulando a formação de TH do tipo 2 e reduzindo do tipo 1, diminuindo  
87 assim a resposta adaptativa mediada por células (BOONSTRA et al., 2001).  
88 Porém atua também em linfócitos B diminuindo sua diferenciação para  
89 plasmócitos e reduzindo a produção de anticorpos. Logo, resulta em um  
90 controle do sistema imunológico adaptativo tanto humoral quanto celular  
91 (CHEN et al., 2007; GIL et al., 2018).

92 No sistema imune inato a vitamina D atua como antagonista do INF- $\gamma$ ,  
93 diminuindo o poder de apresentador de antígeno das células dendríticas,  
94 desestimulando a fagocitose de macrófagos e diminuindo a produção de oxido  
95 nítrico das células fagocíticas (HELMING et al., 2005; EHRCHEN et al., 2007).

96 Em enfermidades infecciosas a deficiência da vitamina D é considerada  
97 um fator de risco, não apenas aumentando a incidência, mas agravando o  
98 quadro da doença (NANYANG et al., 2021). Para infecções crônicas como na  
99 tuberculose e leishmaniose a hipovitaminose D parece favorecer a inflamação  
100 e acelerar o processo de doença (ARANOW, 2011; RODRIGUEZ-CORTES et  
101 al, 2017).

102 Davi et al. (2011) relataram que camundongos apresentaram maiores  
103 níveis de FGF-23 após sofrerem indução de um processo inflamatório  
104 sugerindo uma relação entre inflamação e esse hormônio. Aparentemente o  
105 FGF-23 possui a função de perpetuar a resposta inflamatória, uma vez que  
106 sua produção é estimulada por citocinas inflamatórias como a IL-6 e age no  
107 fígado estimulando a produção da própria IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (CZAYA; FAUL,  
108 2019). Além disso o FGF-23 é um inibidor da vitamina D, tanto o calcidiol  
109 quanto o calcitriol, o que ajudaria a exacerbar e prolongar o processo  
110 inflamatório (SHIMADA et al., 2004).

111 A leishmaniose visceral canina (LV) é endêmica no Brasil e apresenta  
112 grandes semelhanças com uma doença autoimune, uma vez que leva a uma  
113 resposta de hipersensibilidade do tipo III. Logo existe, nos casos sintomáticos,  
114 uma produção exagerada de anticorpos que se acumulam na forma de  
115 imunocomplexos em diversos tecidos resultando em inflamação. Essa

116 inflamação ocorre com frequência nos glomérulos, levando ao  
117 desenvolvimento do quadro de glomerulonefrite. Essa, por sua vez, leva ao  
118 desenvolvimento de doença renal crônica (DRC), complicação frequente em  
119 animais com LV (SOLANO-GALLEG0 et al., 2011; CACHEIRO-LLAGUNO et  
120 al., 2021).

121 Logo, em cães com LV que apresentam com frequência DRC e  
122 inflamação, a produção de vitamina D pode ser deficiente já nos quadros  
123 iniciais da doença, levando a formação de um círculo vicioso entre inflamação,  
124 produção de FGF-23, inibição da produção de vitamina D, elevação de PTH e  
125 inflamação. Esse ciclo resultaria na progressão acelerada da DRC e morte do  
126 paciente.

127 Clinicamente o calcitriol (vitamina D ativada) não é dosado por  
128 apresentar meia-vida curta, aproximadamente sete horas, e concentrações  
129 extremamente pequenas, exigindo dessa forma metodologias mais onerosas e  
130 de difícil acesso. O calcidiol, por sua vez, possui meia-vida de até três  
131 semanas, além de possuir maior concentração no sangue, facilitando a sua  
132 mensuração. Devido ao calcidiol possuir mecanismos de estimulação e  
133 controle semelhantes ao do calcitriol, dosar esse hormônio pode demonstrar  
134 uma boa alternativa principalmente em indivíduos que possuem função renal  
135 adequada (ARANOW, 2011; ZAFALON et al., 2019).

136

### 137 **3. Objetivos**

#### 138 **Objetivo geral**

139 Estabelecer a relação entre vitamina D e marcadores inflamatórios em cães  
140 com LV.

#### 141 **Objetivos específicos**

142 1. Comparar os níveis de Fósforo, Vitamina D, Proteína C reativa, albumina,  
143 hemoglobina UP/C e densidade urinária de cães saudáveis com cães positivos  
144 para LV não azotêmicos.

145 2. Correlacionar os níveis de Vitamina D com a Proteína C reativa de cães  
146 com LV.

147 3. Correlacionar os níveis de Vitamina D com a albumina de cães com LV.

148 4. Correlacionar os níveis de Vitamina D com a hemoglobina de cães com  
149 LV.

#### 150 **4. Materiais e métodos**

151 O presente trabalho foi aprovado pela CEUA/UFMS (Comissão de ética no  
152 uso de animais da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) com o certificado  
153 1192/2021.

154 Cães sem predileção de raça e sexo foram utilizados na pesquisa. A  
155 amostragem ocorreu por conveniência no hospital veterinário da Universidade  
156 Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e na clínica veterinária do Centro  
157 Universitário da Grande Dourados (UNIGRAN). Os critérios de inclusão utilizados  
158 foram: (1) apresentar diagnóstico de LV por exame parasitológico de  
159 linfonodo/medula óssea ou dois testes sorológicos positivos (teste  
160 imunocromatográfico/ELISA ou ELISA/RIFI); (2) não apresentarem doença  
161 concomitante. Os critérios de exclusão foram: (1) idade inferior a oito meses; (2)  
162 gestação ou lactação; (3) uso de suplementos vitamínicos e/ou minerais que  
163 podem interferir no metabolismo ósseo; (4) tratamento para LV ou outra doença;  
164 (5) azotemia segundo os critérios definidos pela IRIS (2019). Animais sem  
165 alterações clínicas, laboratoriais e com teste imunocromatográfico negativo para  
166 leishmaniose (TR DDP®) foram utilizados como grupo controle (GC).

167 Amostras de sangue e urina de todos os animais foram coletadas. As  
168 amostras de sangue foram obtidas por punção da veia jugular ou cefálica e  
169 alocadas em tubos sem aditivo e com EDTA. A urina foi coletada por sondagem  
170 uretral ou cistocentese. As amostras de sangue foram utilizadas para realização  
171 de hemograma, mensuração sérica de creatinina, albumina, fósforo, vitamina D e  
172 proteína C reativa (PCR). Já a urina foi utilizada para a realização de urinálise e  
173 razão proteína/creatinina urinária (UP/C). Os exames de rotina foram analisados  
174 no mesmo dia da coleta e para as análises hormonais e de PCR o soro foi  
175 armazenado a 30°C negativos até o momento das mensurações.

176 O hemograma foi realizado utilizando equipamento automatizado  
177 (HumanCount80TS®) segundo a metodologia de Stockham e Scott (2011). Os

178 exames bioquímicos de rotina foram realizados em equipamento automatizados  
179 (InviStar150®), com Kits Invitro®. A PCR foi realizada em equipamento Labmax  
180 Plenno® com kit Labtest®. A vitamina D foi mensurada por método de  
181 quimiluminescência (Cobas e411®) em laboratório de apoio. A urinálise foi  
182 realizada segundo Chew et al. (2011) e a proteína urinária mensurada em  
183 equipamento semiautomático (Bioplus-200®) com kit Gold analisa®.

184 Posteriormente os valores de vitamina D, PCR, fósforo, creatinina sérica,  
185 hemoglobina, albumina, UP/C e densidade urinária foram comparados entre os  
186 grupos utilizando o teste de Mann-Whitney. Os níveis séricos de vitamina D foram  
187 correlacionados com as concentrações de PCR, hemoglobina e albumina  
188 utilizando o teste de Spearman. A frequência de animais fora do intervalo de  
189 referência para a Vitamina D foi comparada pelo teste exato de Fisher. Para todas  
190 as estatísticas o nível de significância utilizado foi de 0,05.

## 191 **5. Resultados**

192 Vinte e três animais foram incluídos na pesquisa, oito no GC e 15 no grupo  
193 doente (GD). O GC foi composto por quatro fêmeas e quatro machos, enquanto o  
194 GD oito machos e sete fêmeas. A idade dos GC variou de um a quatro anos, já o  
195 GD apresentou variação de um a oito anos. Em relação a raça, o GD foi formado  
196 por 12 animais sem raça definida (SRD), um Dachshund, um Boxer e um Pitbull.  
197 No GC foram seis animais SRD, um Buldogue Francês e um Blue Heeler.

198 Dos animais do GD 93,3% apresentaram sinais clínicos (14/15), com maior  
199 prevalência para alterações no sistema tegumentar (seborreia, lesões em pina,  
200 descamação, onicogrifose e pododermatite) (100%), linfadenomegalia (78,5%) e  
201 emagrecimento ou caquexia (35,7%). A hipoalbuminemia (93%) e a anemia se  
202 destacam (73,3%) como as alterações laboratoriais com maior frequência. Os  
203 valores das medianas para a vitamina D, UP/C, fósforo, creatinina e densidade  
204 urinária nos dois grupos estudados assim como a diferença estatística existente  
205 entre eles são apresentados na Tabela 1.

206  
207  
208  
209

210 Tabela 1- Comparação estatística e valores de mediana e amplitude dos níveis  
 211 séricos de Vitamina D, creatina e fósforo e UP/C, densidade urinária séricos em cães  
 212 saudáveis e positivos para leishmaniose visceral não azotêmicos

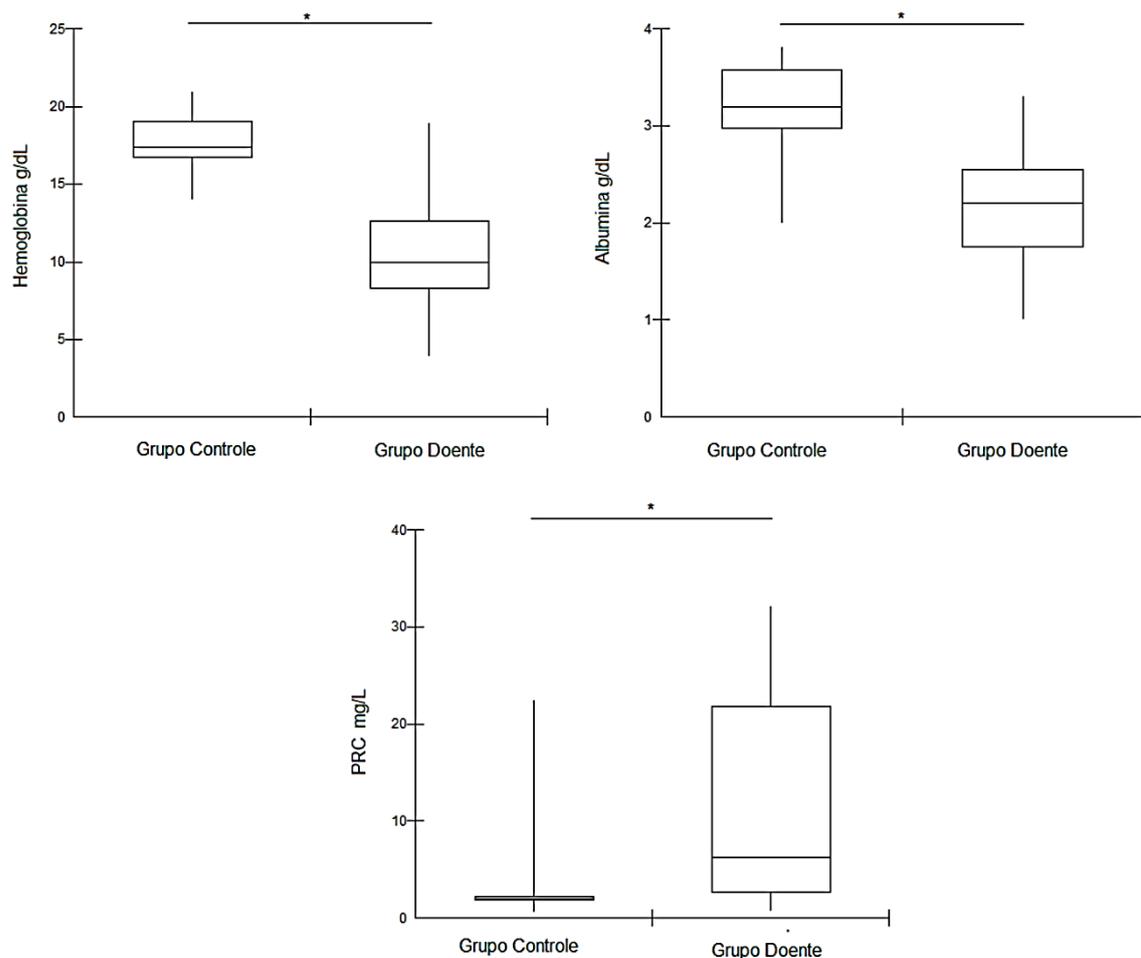
	Grupo Controle			Grupo Doente		
	n	Med	Amp	n	Med	Amp
Vitamina D	6	37,90	30,10	13	22,20	73,10
ng/mL						
UP/C	8	0,12	0,13	15	0,62*	0,43
DU	8	1,040	0,048	15	1,040	0,034
Creatinina	8	1,20	0,72	15	0,6*	1,0
mg/dL						
Fósforo	8	4,30	3,8	15	4,0	4,1
mg/dL						

213 UP/C – Razão proteína creatinina urinária; DU – Densidade urinária. O símbolo \* na  
 214 mesma linha indica diferença estatística pelo teste Mann-Whitney com 0,05 de nível  
 215 de significância; Med – mediana; Amp – amplitude; n – número de animais.

216 Quanto aos níveis de vitamina D não foi constatado diferença estatística  
 217 entre os grupos testados, contudo foi possível observar que 46,15% (6/13) dos  
 218 animais do GD apresentaram valores de vitamina D abaixo do intervalo de  
 219 referência (20 ng/dL) de acordo com, Zafalon et al., (2019) se diferenciando  
 220 estatisticamente da prevalência do GC (0%) para hipovitaminose D.

221 Já a PCR apresentou diferença estatística entre o GC e o GD (Figura 2).  
 222 Porém apenas 57,14% dos animais doentes apresentaram valores que indicariam  
 223 inflamação, mesmo apresentando sinais clínicos evidentes, anemia e proteinúria.  
 224 Correlação inversamente proporcional moderada foi verificada entre a PCR e a  
 225 vitamina D nos animais doentes (Figura 3).

226 A albumina sérica apresentou diferença estatística entre os grupos  
 227 estudados (Figura 2). A correlação com a vitamina D (Figura 3) se mostrou  
 228 moderada, contudo, todos os animais com hipovitaminose apresentaram  
 229 hipoalbuminemia. Já para a hemoglobina foi observado diferença estatística entre  
 230 os grupos (Figura 2), porém sem apresentar correlação com a vitamina D (Figura  
 231 3).

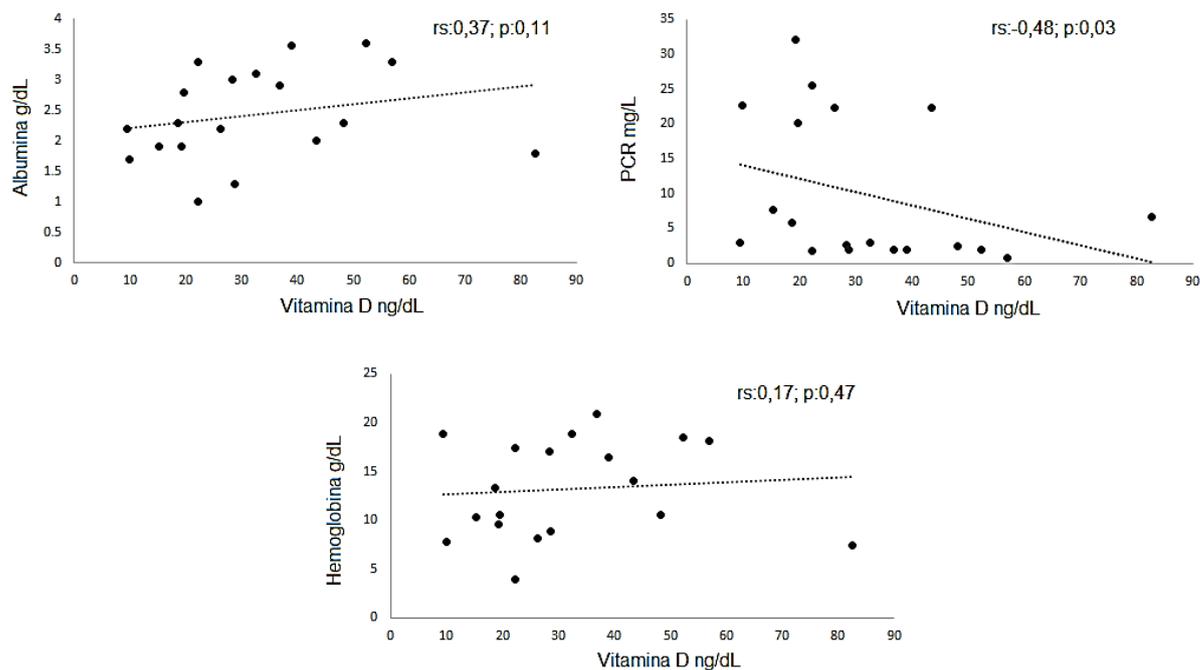


232

233            Figura 2 – Comparação estatísticas, mediana, quartis e valores máximos e  
 234 mínimos de albumina, proteína C reativa (PCR) e hemoglobina de cães sadios e com  
 235 leishmaniose visceral. O símbolo \* indica diferença estatística  $p < 0,05$  pelo teste de Mann-  
 236 Whitney.

237            Os pacientes do GD apresentaram maiores níveis de UP/C quando  
 238 comparados com o GC, além disso 54% dos animais desse grupo confirmaram  
 239 proteinúria ( $>0,5$ , IRIS, 2019). A densidade urinária não demonstrou diferença  
 240 estatística entre os grupos, contudo 20% dos animais do GD apresentaram  
 241 densidade urinária abaixo de 1,030.

242



243

244 Figura 3- Correlação dos valores de marcadores inflamatórios, proteína C reativa (PCR),  
 245 hemoglobina e albumina, e concentração de vitamina D em cães saudáveis e com  
 246 leishmaniose não azotêmicos.

247

## 248 6. Discussão

249 Rodriguez-Cortes et al. (2017) e Martori et al. (2021) já observaram valores  
 250 reduzidos da vitamina D em cães com LV, contudo não realizaram a mensuração  
 251 de marcadores inflamatórios específicos. Ambas as pesquisas citadas  
 252 apresentaram valores de vitamina D semelhante ao presente trabalho, tanto para  
 253 animais doentes (média/mediana próximo a 20ng/dL) quanto em animais  
 254 saudáveis (média/mediana próximo a 40ng/dL).

255 Rodriguez-Cortes et al. (2017) sugerem que os baixos níveis de vitamina D  
 256 podem contribuir para o avanço e a suscetibilidade da LV, uma vez que  
 257 verificaram menores níveis da vitamina em animais que apresentaram sinais  
 258 clínicos mais graves. Contudo Martori et al. (2021) indicaram que a vitamina D  
 259 diminuí como consequência da enfermidade, já que antes do diagnóstico da LV os  
 260 animais não apresentaram diferença significativa dos níveis dessa vitamina em  
 261 relação aos animais saudáveis com redução de aproximadamente 30% nos  
 262 valores após contraírem a doença.

263 No presente trabalho a vitamina D foi mensurada após o diagnóstico de LV  
264 revelando valores variáveis e com, aproximadamente, 46 % dos animais com  
265 baixos níveis da vitamina corroborando o encontrado por Martori et al. (2021) que  
266 observaram 1/3 dos animais com LV e hipovitaminose D. Contudo como não foi  
267 possível estabelecer, com certeza, o prazo de início da doença nos animais  
268 estudados no presente trabalho, a assertiva quanto a origem da deficiência, citada  
269 por Martori et al. (2021), não pode ser confirmada.

270 Entretanto a observação da correlação negativa moderada verificada entre  
271 a PCR e a vitamina D e a correlação positiva da vitamina D com a albumina, além  
272 da provada ação da vitamina D no controle do sistema imunológico,  
273 principalmente macrófagos e linfócitos, pode contribuir com a ideia de que a  
274 inflamação leva a diminuição do hormônio. (BOONSTRA et al., 2001; HELMING  
275 et al., 2005; EHRCHEN et al, 2007; ALISON et al., 2020).

276 O animal positivo para *Leishmania* sp. começa a apresentar sinais clínicos  
277 após desenvolver uma reação de hipersensibilidade do tipo III com produção de  
278 imunocomplexos que se acumulam nos tecidos estimulando uma resposta  
279 inflamatória (SOLANO-GALLEGO et al. 2011; TIZARD, 2019; CACHEIRO-  
280 LLAGUNO et al., 2020). A resposta inflamatória leva a produção de FGF-23  
281 (DAVID et al.,2016; CZAYA; FAUL, 2019), esse, por sua vez, inibe a síntese e  
282 aumenta a degradação de vitamina D (SHIMADA et al., 2004; JENKINSON,  
283 2019). Com a redução da vitamina D no organismo a resposta TH1, celular,  
284 aumenta assim como a produção de anticorpos pelos plasmócitos (BOONSTRA  
285 et al., 2001; CHEN et al, 2007). Com a resposta celular e humoral exacerbada  
286 mais inflamação é gerada criando um ciclo que resulta em hipovitaminose D e  
287 inflamação. Todos os animais que apresentaram hipovitaminose D no presente  
288 trabalho possuíam sinais clínicos e 66,66% apresentavam valores de PRC  
289 elevados e 100% deles com hipoalbuminemia.

290 Ainda em relação a vitamina D, nenhum animal do GD ou GC apresentou  
291 valores considerados ideais para cães (entre 100ng/dL - 120ng/dL). Contudo  
292 esses valores são extrapolados de humanos e devem ser interpretados com  
293 cuidado (ZAFALON et al., 2019).

294 A PCR se mostrou mais elevada no GD quando comparado ao GC com  
295 57,15% dos animais doentes com aumento nas concentrações de PCR (>6,0

296 mg/dL). Esses resultados diferem do encontrado por Braz et al. (2018) que  
297 observaram valores elevados de PCR em 38% dos animais positivos para LV,  
298 porém os pesquisadores utilizaram um teste qualitativo diferente do presente  
299 trabalho que utilizou um teste quantitativo. Os dados apresentados por Silvestrini  
300 et al. (2013) corroboram os do presente trabalho, com valores de PCR em cães  
301 com LV superiores aos de animais saudáveis, porém com níveis mais elevados  
302 (mediana de 27,5mg/L). A diferença entre esses resultados pode ser atribuído  
303 principalmente as diferentes metodologias utilizadas para a mensuração da  
304 proteína.

305 A PCR é produzida no fígado estimulado pela IL-6. Essa proteína de fase  
306 aguda da inflamação atua ativando o sistema p''''- complemento na via clássica  
307 relacionada, principalmente, a inflamações agudas (AGUIAR et al., 2013)  
308 justificando as elevações em animais com LV.

309 A concentração de albumina sérica foi significativamente menor nos  
310 animais doentes, achado que corrobora o encontrado por outros pesquisadores  
311 (FERREIRA et al., 2021). A albumina é conhecida como uma proteína de fase  
312 aguda negativa, com redução dos valores séricos durante quadros inflamatórios,  
313 pois serve de fonte de aminoácidos para que as células, principalmente hepáticas,  
314 produzam outras proteínas e interleucinas durante o processo (TIZAND, 2019).  
315 No presente trabalho todos os animais com hipovitaminose D apresentaram  
316 hipoalbuminemia, enquanto 50% dos animais com diminuição da albumina não  
317 apresentaram diminuição nas concentrações de vitamina, o que pode sugerir que  
318 a hipoalbuminemia antecede a hipovitaminose D.

319 A hemoglobina apresentou menor concentração nos animais doentes  
320 quando comparados aos animais do GC. A hemoglobina pode diminuir nos  
321 animais com leishmaniose pela presença da anemia de doença inflamatória  
322 ocasionada pela ação de várias citocinas pró-inflamatórias (STOCKHAM; SCOTT,  
323 2011). Contudo na leishmaniose outras causas de anemia ocorrem, como  
324 hemorragias originadas de distúrbios coagulativos ou por lesões vasculares,  
325 anemia hemolítica imunomediada e aplasia de medula óssea (SOLANO-  
326 GALLEGO et al., 2011).

327 A proteinúria observada em 53% dos animais do GD corrobora os trabalhos  
328 de Cordetellas et al. (2009), Frazilio et al. (2018); Oliveira et al., 2020. A

329 glomerulonefrite causada pelo acúmulo de imunocomplexos nos glomérulos,  
330 resulta em inflamação e lesão glomerular que permite a passagem de proteínas,  
331 como a albumina, elevando a razão UP/C (SOLANO-GALLEGO et al, 2011;  
332 CHEW et al., 2011; CACHEIRO-LLAGUNO et al., 2021).

333 A densidade urinária não se diferenciou entre os grupos. Isso pode ser  
334 explicado pelo critério de seleção da amostra, que incluiu apenas animais sem  
335 alterações graves na função renal. A densidade urinária se altera por lesão nos  
336 túbulos contorcidos proximais e por resistência a vasopressina nos túbulos distais,  
337 porém só surge após lesão de aproximadamente 70% dos néfrons na DRC  
338 (CHEW et al., 2011),

339 A concentração de creatinina sérica foi significativamente inferior no GD. A  
340 redução da creatinina nos animais com leishmania em estágios iniciais já foi  
341 notada em outros trabalhos, porém sem apresentar diferença estatística com os  
342 animais saudáveis (CORDETELLAS et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2020). A  
343 redução da creatinina pode ser explicada pela maior frequência de animais  
344 magros e caquéticos nos animais doentes, uma vez que a creatinina é originada  
345 do metabolismo muscular e possui relação direta com a quantidade de massa  
346 muscular (STOCKHAM; SCOTT, 2011).

347 O fósforo sérico não apresentou diferença entre os grupos. Isso era  
348 esperado, uma vez que o fósforo só se altera em estágios finais da DRC ou na  
349 injúria renal aguda (CHEW et al. 2011) mantendo-se nos intervalos de referência  
350 pela ação de outros hormônios como o FGF-23 e o PTH (GALVÃO et al., 2013;  
351 BAR et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2020).

## 352 **7. Conclusão**

353 Conclui-se que os marcadores inflamatórios estão relacionados com a  
354 redução de vitamina D, mesmo em estágios iniciais da leishmaniose. O processo  
355 inflamatório aparentemente antecede a hipovitaminose.

## 356 **8. Impacto econômico, social, tecnológico e/ou inovação**

357 A leishmaniose pode ser tratada, contudo o atual protocolo terapêutico  
358 possui alto custo, efeitos colaterais frequentes e eficiência variável. Conhecer as

359 deficiências hormonais encontradas em pacientes com LV pode contribuir para  
360 revelar novos alvos terapêuticos para o tratamento de cães e humanos com  
361 leishmaniose.

362

## 363 9. Referências bibliográficas

364 AGUIAR, F. J. B.; FERREIRA-JUNIOR, M.; SALES, M. M. *et al.* C-reactive  
365 protein:clinical applications and proposals for a rational use. **Rer. Assoc. Med.**  
366 **Bras.**, v.59, p.85-92, 2013.

367 ALLISON, L. N.; JAFFEY, J. A.; BRADLEY-SIEMENS, N. *et al.* Immune function  
368 and serum vitamin D in shelter dogs: A case-control Study. **The veterinary**  
369 **Journal**. v. 261, n.105477, p.1-8, 2020.

370 ARANOW, C. Vitamin D and the Immune System. **Journal of Investigative**  
371 **Medicine**, v.59, n. 6,2011, p.881-886.

372 BAR, L.; STOURNARAS, C.; LANG, F. *et al.* Regulation of fibroblast growth factor  
373 (FGF23) in health and disease. **FEBS Letters**, V593, p.1879-1900, 2019.

374 BOONSTRA, A.; BARRAT, F. J.; CRAIN, C. *et al.* 1 $\alpha$ , 25- Dihydroxyvitamin D3  
375 Has a Direct Effect on Naive CD4+T Cells to Enhance the Development of Th2  
376 Cells. **The journal of Immunology**, v. 167, p. 4974-4990, 2001.

377 BRAZ, P. H.; LIMA, G. L.; SARTORETTO, M. C. *et al.* Alterações da proteína C  
378 reativa e fatores reumatoide em cães naturalmente infectados por *Leishmania*  
379 spp.. **Pesq. Vet. Bras.**, v.9, p.1829-1833, 2018.

380 CACHEIRO-LLAGUNO, C.; PARODY, N.; ESCUTIA, M. R. *et al.* Role of  
381 circulating Immune Complexes in the Pathogenesis of Canine Leishmaniasis: New  
382 Players in Vaccine Development. **Microorganisms**, v. 9, p.2-9, 2021.

383 CHEN, S.; SIMS, G. P.; CHEN, X. X. *et al.* Modulatory effects of 1,25-  
384 Dihydroxyvitamin D3 on Human B cell differentiation. **J. Immunol.**, v.179, p.1634-  
385 1647, 2007.

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

388 CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ-DEL PALACIO, M. J.; TALAVERA, J. *et al.*  
389 Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniosis at different stages  
390 of chronic kidney disease. **Veterinary Record**, v. 164, p. 487-490, 2009.

391 CZAYA, B.; FAUL, C. The Role of Fibroblast Growth Factor 23 in Inflammation  
392 and Anemia. **International journal of Molecular Sciences**. v.20, n.4195, p.1-30,  
393 2019.

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

397 EHRCHEN, J.; HELMING, L.; VARGA, G. *et al.* Vitamin D receptor signaling  
398 contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. **The FASEB Journal**.  
399 v.21, p.3208-3219, 2007.

400 FERREIRA, T. M.; OLIVEIRA, A. T. C.; CARVALHO, V. M. *et al.* Leukocytes and  
401 Albumin in Canine Leishmaniasis. **Acta scientiae veterinariae**. V. 49. 2021.  
402 Disponível em:  
403 <https://www.seer.ufrgs.br/ActaScientiaeVeterinariae/article/view/111869>. Acesso  
404 em: 05 de jan de 2023.

405 FRAZILIO, F. O.; BORGES, F. A.; SOUZA, A. I. *et al.* Biomarkers and renal arterial  
406 resistive index in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. **Parasitology  
407 Research**. v.117,p.3399-3405, 2018.

408 GALVÃO, J.F.B.; NAGODE, L.A.; SCHENCK, P.A. *et al.* Calcitriol, calcidiol,  
409 parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney  
410 disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.23, n.3, p.134-  
411 162, 2013.

412 GIL, A.; PLAZA-DIAZ, J.; MESA, M. D. Vitamin D: Classic and Novel Actions.  
413 **Ann. Nutr. Metab.**, v.72, p.87-95, 2018.

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

416 HELMING, L.; BOSE, J.; EHCHEN, J. *et al.* 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 is a potent  
417 suppressor of interferon  $\gamma$ -mediated macrophage activation. **Blood**. v. 106, n.13,  
418 p.4351-4359, 2005.

419 **IRIS – Internacional Renal Interest Society**. IRIS Staging of CKD. 2019.  
420 Disponível em [http://iris-kidney.com/pdf/IRIS\\_Staging\\_of\\_CKD\\_modified\\_2019.pdf](http://iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf). Acesso em 01 de agosto de 2022.  
421

422 JENKINSON, C. The vitamin D metabolome: Na update on analysis and function.  
423 **Cell Biochem. Funct**, p.1-16, 2019.

424 LIN, J.; LIN, L.; CHEN, S. *et al.* Serum fibroblast growth factor 23 (Fgf-23):  
425 associations with hyperphosphatemia and clinical staging of feline chronic kidney  
426 disease. **Full Scientific Report**, v.33, p.288-293, 2021.

427 MARTORI, C.; VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. *et al.* Vitamin d and leishmaniasis:  
428 Neither seasonal nor risk factor in canine host but potential adjuvant treatment  
429 through cbd103 expression. **Plos neglected tropical diseases**. 2021. Disponível  
430 em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34398874/>. Acesso em: 05 de jan de 2023.

431 NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K. *et al.* C-Reactive Protein  
432 Concentration in Dogs with Various Diseases. **J. Vet. Med. Sci.**, v.70, p.127-131,  
433 2008.

434 NANYANG, L.; SUN, J.; WANG, X. *et al.* Low vitamin D status is associated with  
435 coronavirus disease 2019 outcomes: a systematic review and meta-analysis.  
436 **International Journal of Infectious Diseases**. V. 102, p. 58-64, 2021.

437 OLIVEIRA, G.G.; CASTILHO, M. O.; SOUZA, A.I. Calcium, phosphorus, urinary  
438 fractional excretion of phosphorus and parathormone in dogs with visceral  
439 leishmaniasis. **Acta Vet. Bras.**, v.14, p.180-184, 2020.

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

442 RODRIGUEZ-CORTES, A.; MARTORI, C.; MARTINEZ-FLOREZ, A. *et al.* Canine  
443 Leishmaniasis Progression is Associated with Vitamin D Deficiency. **Scientif**  
444 **Reports**, 2017. Disponível em :< [https://www.nature.com/articles/s41598-017-](https://www.nature.com/articles/s41598-017-03662-4)  
445 [03662-4](https://www.nature.com/articles/s41598-017-03662-4)> acesso em 31 de out de 2019.

446 SHIMADA, T.; HASEGAWA, H.; YAMAZAKI, Y. *et al.* FGF-23 Is a Potent  
447 Regulator of Vitamin D Metabolism and PhosphateHomeostasis. **Journal of bone**  
448 **and mineral research**. v.19, n. 3, p.429-436, 2004.

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

451 SILVESTRINI, P.; ZOIA, A.; PLANELLAS, M. *et al.* Iron status and C-reactive  
452 protein in canine leishmaniasis. **Journal of Small Animal Praticce**, v.55, p. 95-  
453 101, 2013.

454 SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for  
455 the practical management of canine leishmaniosis. **Parasit Vectors**, v.86, n.4,  
456 2011.

457 STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia clínica**  
458 **Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara, 2011, p.724.

459 TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária**. 10ªed. Rio de Janeiro: GEN, 2019. p.539.

460 WOLF, M. Forging Forward with 10 Burning Questions on FGF23 in Kidney  
461 Disease. **Journals of the American Society of Nephrology**, v. 21, p.1427–1435,  
462 2010.

463 ZAFALON, R. V. A.; RISOLIA, L. W.; PEDRINELLI, V. *et al.* Vitamin D metabolism  
464 in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism.  
465 **Animal physiology and nutrition animal**. v. 104, p322-342, 2020.

466

467

468

469

470