



TESIS DOCTORAL

***“Estudio de la cistatina C plasmática y urinaria en
medicina canina: enfermedades renales y no
renales”***

D. José Muñoz García

Programa de Doctorado Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

2018

Los Doctores D. Rafael Barrera Chacón y D. Francisco Javier Duque Carrasco, Profesor Titular y Ayudante Doctor del Departamento de Medicina Animal, respectivamente, de la Universidad de Extremadura,

INFORMAN:

Que la memoria titulada ***“Estudio de la cistatina C plasmática y urinaria en medicina canina: enfermedades renales y no renales”***, presentada por el licenciado en Veterinaria D. José Muñoz García, para la obtención del Grado de Doctor, se ha realizado bajo nuestra dirección desde 2015 y, considerándola satisfactoriamente finalizada, autorizamos su presentación para que sea evaluada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste a los efectos que sean oportunos, firmamos el presente informe en Cáceres, a 16 julio 2018.

Fdo: Rafael Barrera Chacón

Fdo: Francisco Javier Duque Carrasco

A mis padres.

A Don Rafael Barrera Chacón.

*Y a todas esas personas que forman, o han formado,
parte de mi vida y que han hecho de mí
la persona que soy en la actualidad.*

AGRADECIMIENTOS

La educación es uno de los pilares fundamentales de nuestra sociedad. Es fácil caer en el error de pensar que ésta es sinónimo de conocimiento. El término educación, desde mi punto de vista, lleva asociado muchos valores fundamentales como respeto, solidaridad, cooperación y empatía.

Le agradezco enormemente a mis padres que me educaran, no solo en la búsqueda de conocimientos, sino en el esfuerzo y la comprensión. Han intentado siempre guiarme por el camino que han considerado mejor, enseñándome la importancia de ayudar y colaborar en la medida de mis posibilidades. Tengo que agradecer a mis hermanos que me escucharan en mis momentos grises y la infancia tan fastástica que vivimos.

Durante mi educación académica he tenido muchos profesores, algunos de ellos muy buenos, que han sabido realmente enseñar y motivar. He de agradecer especialmente a D. Rafael Barrera Chacón por haber formado parte de mi educación, no solo como maestro, sino como compañero y amigo. Además de ser una gran ayuda académica, siempre ha logrado motivarme haciendo que, algo que en un principio parecía incomprensible, tomara sentido y lógica. Igualmente, he podido contar con su apoyo en mis malos momentos, no permitiéndome caer en el desánimo.

Me gustaría agradecer a mis amigos por su paciencia en estos años de dedicación a este trabajo. De una u otra forma han sido un apoyo fundamental.

Para finalizar, me gustaría dar las gracias a todos los perros que formaron parte del estudio puesto que sin ellos hubiera sido imposible su realización.

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante”

Miguel de Unamuno (1864-1936)

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
ÍNDICE DE FIGURAS	XIX
I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	5
III. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN	9
IV. OBJETIVOS	15
V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	19
V.1 Cistatina C: generalidades	21
V.1.1 Perspectiva histórica	21
V.1.2 Estructura	23
V.1.3 Clasificación	23
V.1.4 Distribución en tejidos	24
V.1.5 Papel fisiológico y metabólico	27
V.2 Métodos analíticos (petia y penia)	28
V.3 Cistatina C y enfermedad renal	29
V.3.1 Recuerdo fisiopatológico de la enfermedad renal	29
V.3.1.1 Daño renal agudo.....	30
V.3.1.2 Enfermedad renal crónica.....	37
V.3.2 Contextualización de la cistatina C en el diagnóstico laboratorial de la enfermedad renal ...	43
V.3.2.1 Marcadores de función glomerular	44
V.3.2.2 Marcadores de función tubular	56
V.4 Concentración en sangre de cistatina C en otras enfermedades	66
V.4.1 Leishmaniosis.....	66
V.4.2 Hipotiroidismo	68
V.4.3 Enfermedad cardíaca congestiva.....	69
V.4.4 Neoplasias.....	73
V.4.5 Influencia de los corticoides sobre la cistatina C plasmática	77
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	81
VI.1 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C plasmática.....	83
VI.2 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C urinaria.	86
VI.3 Población objeto de estudio.....	87
VI.3.1 Grupo control.....	87
VI.3.2 Daño renal agudo.....	88
VI.3.3 Enfermedad renal crónica.....	89
IV.3.4 Leishmaniosis canina	90
IV.3.4.1 Presencia de azoemia	90

IV.3.4.2 Clasificación LeishVet.....	92
VI.3.4 Hipotiroidismo	93
VI.3.5 Enfermedad cardiaca congestiva	94
VI.3.6 Neoplasias	95
VI.3.7 Hiperadrenocorticismo	96
VI.3.8 Meningitis que responde a los corticoides	96
VI.4 Hematología y bioquímica sanguínea.....	97
VI.5 Análisis de orina	99
VI.6 Diagnóstico de leishmaniosis.....	101
VI.7 Diagnóstico hormonal	101
VI.8 Estudio estadístico de los datos	102
VII RESULTADOS.....	105
VII.1 Verificación del método de cuantificación de cistatina C plasmática	107
VII.2 Verificación del método de cuantificación de cistatina C en orina	111
VII.3 Grupo control	113
VII.3.1 Hematología	113
VII.3.2 Bioquímica plasmática	114
VII.3.3 Análisis de orina.....	115
VII.4 Daño renal agudo	116
VII.4.1 Hematología	117
VII.4.2 Bioquímica plasmática	118
VII.4.3 Análisis de orina.....	120
VII.5 Enfermedad renal crónica	122
VII.5.1 Hematología	124
VII.5.2 Bioquímica plasmática	124
VII.5.3 Análisis de orina.....	127
VII.6 Leishmaniosis canina	131
VII.6.1 Presencia de azoemia	131
VII.6.1.1 Hematología.....	132
VII.6.1.2 Bioquímica plasmática	135
VII.6.1.3 Análisis de orina	138
VII.6.2 Clasificación LeishVet.....	142
VII.6.2.1 Hematología.....	143
VII.6.2.2 Bioquímica plasmática	144
VII.6.2.3 Análisis de orina.....	146
VII.6 Hipotiroidismo	149
VII.6.1 Hematología	149
VII.6.2 Bioquímica plasmática	149
VII.7 Enfermedad cardiaca congestiva.....	150
VII.7.1 Hematología	151

VII.7.2 Bioquímica sanguínea	151
VII.8 Neoplasias	152
VII.8.1 Hematología	152
VII.8.2 Bioquímica plasmática	154
VII.9 Influencia de los corticoides en la concentración de cistatina C plasmática	156
VII.9.1 Hematología	156
VII.9.2 Bioquímica plasmática	158
VIII DISCUSIÓN	161
VIII.1 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C plasmática y urinaria	163
VIII.2 Perros sanos	164
VIII.2.1 Análisis de sangre	164
VIII.2.2 Análisis de orina	164
VIII.2.3 Cistatina C en sangre y en orina	165
VIII.3 Perros enfermos	166
VIII.3.1 Análisis de sangre	166
VIII.3.2 Análisis de orina	172
VIII.3.3 Cistatina C	176
VIII.3.3.1 Cistatina C en sangre	177
VIII.3.3.2 Cistatina C en orina	187
IX. CONCLUSIONES	193
X. BIBLIOGRAFÍA	197
ANEXO I	217

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP: alanina-aminopeptidasa.

ADMA: dimetilarginina asimétrica.

aGST: A-glutación S-transferasa.

ALT: alanina-aminotransferasa.

Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina urinaria.

CVh: Coeficiente de variación de Horwitz.

CVr: Coeficiente de variación.

DRA: daño renal agudo.

EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

ERC: enfermedad renal crónica.

FA/c: ratio fosfatasa alcalina/creatinina urinaria.

FA: fosfatasa alcalina.

FEIgG: excreción fraccional de IgG.

FEIgM: excreción fraccional de IgM.

GGT/c: ratio gamma-glutamyl-transpeptidasa/creatinina urinaria.

GGT: gamma-glutamyl transpeptidasa.

GM-CSF: granulocyte-macrophage colony stimulating factor.

HAC: Hiperadrenocorticismo.

HCV: Hospital Clínico Veterinario.

HFG: factor de crecimiento de hepatocito.

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución.

IBD: enfermedad inflamatoria intestinal crónica.

IFCC: Federación Internacional de Química Clínica.

IgA: inmunoglobulina A.

IgG: inmunoglobulina G.

IgM: inmunoglobulina K.

LC: valor crítico.

LDH/c: ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina urinaria.

LDH: lactato deshidrogenasa.

LOD: Límite de detección.

LOQ: límite de cuantificación.

MCP-1: péptido quimioatrayente de monocitos.

NAG/c: ratio N-acetil- β -D-glucosamina/creatinina urinaria.

NAG: N-acetil- β -D-glucosamida.

NGAL: lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos.

nGST: N-glutación S-transferasa.

PAPM: proteínas de alto peso molecular.
PBPM: proteínas de bajo peso molecular
PPMI: proteínas de peso molecular intermedio
RBP/c: ratio proteína de unión al retinol/creatinina urinaria.
RBP: proteína transportadora de retinol.
RSD: desviación estándar relativa.
SDMA: dimetilarginina simétrica.
Tc-99m-DTPA: Tc99m-ácido dietilnetrieminepentacético.
TFG: tasa de filtración glomerular.
TGF- β : transforming growth factor-beta.
TTR: Transtiterina
UEx: Universidad de Extremadura.
UP/C: cociente proteína/ creatinina.
XLHN: X-linked hereditary nephropathy.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de la cistatina.....	23
Tabla 2: Distribución de la cistatina C en fluidos biológicos humanos.....	24
Tabla 3: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C sérica (mg/L), expresados en media \pm desviación estándar.....	26
Tabla 4: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C urinaria.	26
Tabla 5: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C urinaria/c. ...	27
Tabla 6: Causas de DRA intrínseco.	33
Tabla 7: Concentración plasmática normal de cistatina C (media \pm SD) obtenida en estudios previos. ...	47
Tabla 8: Sensibilidad y especificidad en plasma de la concentración de cistatina C, creatinina y urea para el diagnóstico de enfermedad renal. Resultados con 95% de intervalo de confianza.	48
Tabla 9: Sensibilidad y especificidad sérica de la concentración de cistatina C y creatinina para el diagnóstico de enfermedad renal crónica.....	48
Tabla 10: Concentración plasmática de cistatina C (media \pm SD) obtenida en estudios previos en perros con insuficiencia renal.....	48
Tabla 11: Clasificación de las proteínas urinarias atendiendo a su peso molecular.	52
Tabla 12: Biomarcadores estudiados de daño renal agudo en medicina humana.	57
Tabla 13: Valores correspondientes a las curvas de calibración obtenidas (y su correspondiente media) utilizando diferentes estándares de concentración conocida de cistatina C.	107
Tabla 14: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en un plasma con concentración conocida de la misma (0,06 mg/L).	107
Tabla 15: Prueba de Kolmogorov-Smirnov obtenida de 10 medidas realizadas en un plasma de concentración de cistatina C conocida (0,06 mg/L; concentración comprendida en el LOD esperado). .	108
Tabla 16: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un plasma de concentración conocida (0,06 mg/L).	108
Tabla 17: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en un estándar de concentración conocida de la misma (3 mg/L).....	108
Tabla 18: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (3 mg/L).	109
Tabla 19: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en 10 días consecutivos, de un estándar de concentración conocida de la misma (1,5 mg/L).	109
Tabla 20: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,5 mg/L).	109
Tabla 21: Cálculo del sesgo correspondiente a los resultados obtenidos en la Tabla 17.	110

Tabla 22: Valores estadísticos de la prueba (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (3 mg/L).....	110
Tabla 23: Distribución del sesgo utilizando la prueba t- Student.....	111
Tabla 24: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresadas en mg/L) de una muestra de orina con concentración conocida de la misma (0,04 mg/L).	111
Tabla 25: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en una orina de concentración conocida (0,04 mg/L).	111
Tabla 26: Determinaciones seriadas de una muestra de orina con concentración de cistatina C de 1,5 mg/L (expresadas en mg/L).	112
Tabla 27: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,5 mg/L).	112
Tabla 28: Resultados de la determinación seriada de cistatina C (expresadas en mg/L), en 10 días consecutivos, de una muestra de orina con concentración conocida de la misma (1,3 mg/L).....	112
Tabla 29: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,3 mg/L).	113
Tabla 30: Hematología de los perros del grupo control, expresada como media \pm desviación estándar.	113
Tabla 31: Bioquímica plasmática de los perros del grupo control, expresada como media \pm desviación estándar.....	114
Tabla 32: Análisis de orina de los perros del grupo control, expresado como media \pm desviación estándar.....	115
Tabla 33: Hematología del grupo de perros con DRA, expresado como media \pm desviación estándar...117	117
Tabla 34: Bioquímica plasmática del grupo de perros con DRA, expresado como media \pm desviación estándar.....	118
Tabla 35: Análisis de orina del grupo de perros con DRA, expresado como media \pm desviación estándar.	121
Tabla 36: Hematología del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar. ..124	124
Tabla 37: Bioquímica plasmática del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar.....	125
Tabla 38: Análisis de orina del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar.	128
Tabla 39: Hematología de los grupos de perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.	133
Tabla 40: Hematología de los perros control y con leishmaniosis y azoemia, expresado como media \pm desviación estándar.....	134
Tabla 41: Hematología del grupo de perros control y con ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.....	134

Tabla 42: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.	135
Tabla 43: Bioquímica plasmática del grupo de perros control, con leishmaniosis y azoemia expresado como media \pm desviación estándar.	136
Tabla 44: Bioquímica plasmática de los grupos de perros con ERC sin leishmaniosis expresado como media \pm desviación estándar.	137
Tabla 45: Análisis de orina de los grupos de perros control y con leishmaniosis sin azoemia, ERC con leishmaniosis y ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.	139
Tabla 46: Análisis de orina de los perros control y con leishmaniosis y azoemia, expresado como media \pm desviación estándar, según la clasificación IRIS.	139
Tabla 47: Análisis de orina de los perros control y con ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar, según la clasificación IRIS.	140
Tabla 48: Hematología del grupo de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media \pm desviación estándar.	144
Tabla 49: Bioquímica plasmática del grupo de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media \pm desviación estándar.	145
Tabla 50: Análisis de orina de de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media \pm desviación estándar.	147
Tabla 51: Hematología de los grupos de perros control y con hipotiroidismo, expresado como media \pm desviación estándar.	149
Tabla 52: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con hipotiroidismo, expresado como media \pm desviación estándar.	150
Tabla 53: Hematología de los grupos de perros control y con enfermedad cardiaca congestiva, expresado como media \pm desviación estándar.	151
Tabla 54: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con enfermedad cardiaca congestiva, expresado como media \pm desviación estándar.	152
Tabla 55: Hematología de los grupos de perros control y con tumores mamarios, expresado como media \pm desviación estándar.	153
Tabla 56: Hematología de los grupos de perros control y con linfoma multicéntrico, expresado como media \pm desviación estándar.	153
Tabla 57: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con tumores mamarios, expresado como media \pm desviación estándar.	154
Tabla 58: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con linfoma multicéntrico, expresado como media \pm desviación estándar.	155
Tabla 59: Hematología de los grupos de perros control y con hiperadrenocorticismo, expresado como media \pm desviación estándar.	157
Tabla 60: Hematología de los grupos de perros control y con meningitis que responde a los corticoides en los diferentes días de tratamiento, expresado como media \pm desviación estándar.	157

Tabla 61: Bioquímica sanguínea de los grupos de perros control y con hiperadrenocorticismo, expresado como media \pm desviación estándar158

Tabla 62: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con meningitis que responde a los corticoides en los diferentes días de tratamiento, expresado como media \pm desviación estándar.159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución histórica de la cistatina C.	22
Figura 2: Estructura de la cistatina C humana (http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3GAX).	23
Figura 3: Concentración de cistatina C plasmática canina según la edad	49
Figura 4: Representación gráfica de las curvas de calibración obtenidas (y su correspondiente media) utilizando diferentes estándares de concentración conocida de cistatina C.	107
Figura 5: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con DRA en las diferentes fases IRIS.	119
Figura 6: Gráfica de correlación entre las concentraciones plasmáticas de cistatina C y de creatinina en los perros con DRA.	119
Figura 7: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con DRA, clasificados según IRIS.	119
Figura 8: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con DRA, clasificados según IRIS.	121
Figura 9: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la creatinina plasmática en los perros con DRA.	121
Figura 10: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de cistatina C en los perros con DRA.	121
Figura 11: Incidencia de presentación de los perros con DRA que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.	122
Figura 12: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con ERC en las diferentes fases IRIS.	125
Figura 13: Gráfica de correlación entre la concentración plasmática de cistatina C y creatinina en los perros con ERC.	126
Figura 14: Gráfica de correlación entre la concentración plasmática de cistatina C y fósforo en los perros con ERC.	126
Figura 15: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con ERC, clasificados según IRIS.	126
Figura 16: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros control, con DRA y con ERC.	127
Figura 17: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la cistatina C plasmática de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.	127
Figura 18: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con ERC, clasificados según IRIS.	128
Figura 19: Representación gráfica del valor medio de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros control, con DRA y con ERC.	129

Figura 20: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.	129
Figura 21: Incidencia de presentación de los perros con ERC que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.	129
Figura 22: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de cistatina C en los perros con ERC	130
Figura 23: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de creatinina en los perros con ERC.	130
Figura 24: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de fósforo en los perros con ERC.	130
Figura 25: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio FA/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.....	131
Figura 26: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio NAG/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.....	131
Figura 27: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio GGT/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.....	131
Figura 28: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio LDH/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS.....	131
Figura 29: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis.	137
Figura 30: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros con leishmaniosis y azoemia y ERC sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.	137
Figura 31: Incidencia de presentación de los perros con leishmaniosis y azoemia que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.	140
Figura 32: Incidencia de presentación de los perros con ERC sin leishmaniosis que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.	141
Figura 33: Representación gráfica del valor medio de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros control, con ERC y leishmaniosis, y con ERC sin leishmaniosis.	141
Figura 34: Representación gráfica del valor medio de cistatina C/c de los perros con ERC y leishmaniosis, y con ERC sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.....	141
Figura 35: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio LDH/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.	142
Figura 36: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio FA/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.	142
Figura 37: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio NAG/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.	142
Figura 38: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio GGT/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS.	142

Figura 39: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.	145
Figura 40: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.	146
Figura 41: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.	147
Figura 42: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.	148
Figura 43: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de las ratios LDH/c, FA/c, NAG/c y GGT/c urinaria de los perros con leishmaniosos, clasificados según LeishVet.	148
Figura 44: Incidencia de presentación de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.	148
Figura 45: Representación gráfica del valor medio de la cistatina C plasmática de los perros control, DRA, ERC, hipotiroidismo (HT), enfermedad cardiaca congestiva (ECC), tumores mamarios (TM), linfoma multicéntrico (LM) e hiperadrenocorticismos (HAC).	155
Figura 46: Incidencia de presentación de los perros con hipotiroidismo (HT), enfermedad cardiaca congestiva (ECC), tumores mamarios (TM), linfoma multicéntrico (LM) e hiperadrenocorticismos (HAC), que presentan un incremento de la concentración de cistatina C plasmática.	155
Figura 47: Evolución de la concentración de cistatina C plasmática en el grupo de perros con meningitis que responde a los corticoides, a lo largo del tratamiento.....	159

I. RESUMEN

Introducción: La cistatina C es una proteína de bajo peso molecular y de producción constante, caracterizada por ser completamente filtrada por el glomérulo y reabsorbida casi en su totalidad a nivel tubular, donde es metabolizada. Se ha investigado como marcador de alteraciones en la tasa de filtración glomerular en medicina humana, en la que se utiliza como marcador adicional sin reemplazar a la creatinina. En medicina canina su utilidad aún no está bien definida. Con el fin de contribuir al conocimiento de su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad renal en el perro, se ha diseñado el presente trabajo.

Material y métodos: Se ha realizado un estudio de verificación del método utilizado en sangre y en orina. Se han estudiado 342 perros divididos en diferentes grupos: control (N = 43), daño renal agudo (N = 40), enfermedad renal crónica (N = 131), con leishmaniosis clasificados según el desarrollo de azoemia (N = 98) y según la clasificación LeishVet (N = 97), hipotiroidismo (N = 10), enfermedad cardiaca congestiva (N = 10); neoplasias (N = 35), hiperadrenocorticismo (N = 20) y meningitis que responde a los corticoides (N = 10). En los perros con enfermedad renal y en los que padecían leishmaniosis se determinó la concentración de cistatina C en plasma y en orina mediante inmunoturbidimetría. En los que padecían otras enfermedades sólo en plasma.

Resultados: La verificación del método demostró su utilidad en el perro. En los perros sanos se ha encontrado una concentración en plasma superior en los de más de 20 Kg de peso y en orina en los mayores de 5 años. En perros con enfermedad renal presenta un comportamiento en sangre semejante al de la creatinina, con un valor superior en la enfermedad renal crónica, aunque no se encontraron diferencias estadísticas con la aguda. No se encontraron diferencias significativas respecto al grupo control en los perros con leishmaniosis no azoémicos ni en la Fase I de la clasificación LeishVet. Sin embargo, manifiesta incremento en la Fase II de esta clasificación, formada por perros con proteinuria incipiente no azoémicos. En los perros con azoemia no se han encontrado diferencias entre animales con ERC debida a leishmaniosis o por otras causas. En cuanto a enfermedades no renales, sólo se encontró una disminución significativa en perros con hipotiroidismo, y un incremento en los tratados con 4 mg/Kg/día de prednisona. Se ha detectado mayor concentración de la ratio cistatina

C/creatinina urinaria en daño renal agudo que, en enfermedad renal crónica, atribuido al mayor daño tubular, significativo estadísticamente a partir de IRIS II, paralelo al de la ratio NAG/creatinina. En el caso de enfermedad renal crónica se detecta aumento estadístico desde IRIS 1. Se observa también un incremento en los perros con leishmaniosis sin azoemia y en los integrantes de la Fase I de LeishVet.

Conclusiones: El sexo, la edad y el peso no influyen de forma importante en la interpretación de la concentración de cistatina C en plasma y en orina de perros con enfermedad renal. Su concentración está escasamente influida por enfermedades no renales (cardíacas, neoplásicas e hiperadrenocorticismos dependientes de hipófisis). Sin embargo, debe interpretarse con precaución en perros hipotiroideos o en tratamiento con dosis inmunosupresoras de corticoides. La concentración de cistatina C plasmática y, sobre todo, la urinaria, es más sensible para detectar enfermedad renal crónica que aguda en perros. Este hallazgo, unido a un incremento del UP/C y de la ratio NAG/c, puede utilizarse como indicador precoz de la enfermedad.

II. SUMMARY

Introduction: Cystatin C is a low molecular weight protein that is produced at a constant rate. An important characteristic is that it is completely filtered by the glomerulus and it is reabsorbed almost completely at the distal convoluted tubules where it is totally metabolized. This protein has been studied as a marker of glomerular filtration rate alteration in human medicine, where it has been used as a marker without replacing creatinine. In veterinary (canine) medicine its utility is not well defined. The following study has been developed with the purpose of contributing to achieve a better understanding of the diagnostic utility in the kidney diseases in veterinary (canine) medicine,

Material and method: A verification study of the method used in blood and urine has been carried out. We studied 342 dogs divided into different groups: control (N = 43), acute kidney injury (N = 40), chronic kidney disease (N = 131), with leishmaniasis classified according to the development of azotemia (N = 98) and according to the LeishVet classification (N = 97), hypothyroidism (N = 10), congestive heart disease (N = 10); neoplasms (N = 35), hyperadrenocorticism (N = 20) and meningitis that responds to corticosteroids (N = 10). Concentration of cystatin C in plasma and urine was determined by immunoturbidimetry in all dogs with kidney disease and in those suffering from leishmaniasis (with or without kidney disease). In those who suffered other diseases it only has been determined in plasma.

Results: The verification of the method demonstrates its usefulness in the dog. In healthy dogs a higher plasma concentration has been found in those animals that weigh over 20 kg and in urine in those older than 5 years. In dogs with kidney disease cystatin C has a blood behavior similar to creatinine, with a higher value in chronic kidney disease, although no statistical differences were found in the acute kidney disease group. There were no significant differences between the control group and dogs with non-azotemic leishmaniasis or in Phase I of the LeishVet classification. However, it shows an increase in Phase II of this classification, formed by dogs with incipient non-azotemic proteinuria. In dogs with azotemia no differences have been found between animals with CKD due to leishmaniasis or other causes. Regarding non-renal diseases, only a significant decrease was found in dogs with hypothyroidism, and an increase in those treated with 4 mg / kg / day of prednisone. A higher concentration of the urinary

cystatin C / creatinine ratio has been detected in acute kidney disease than in chronic kidney disease, attributed to the greater tubular damage, statistically significant from IRIS II, parallel to that of the NAG / creatinine ratio. In the case of chronic kidney disease, statistical increase is detected from IRIS 1. An increase is also observed in dogs with leishmaniasis without azotemia and in the members of Phase I of LeishVet.

Conclusions: Sex, age and weight do not have an important influence on the cystatin C concentration interpretation in plasma and urine of dogs with kidney disease. Its concentration is hardly influenced by non-renal diseases (cardiac, neoplastic and hyperadrenocorticism dependent on pituitary gland). However, it should be interpreted with caution in hypothyroid dogs or in treatment with immunosuppressive doses of corticosteroids. The concentration of plasma and, above all, urinary cystatin C is more sensitive to detect chronic kidney disease than acute kidney disease in dogs. This finding, together with an increase in UP / C and the NAG / c ratio, can be used as an early indicator of the disease.

III. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN

La enfermedad renal es una de las enfermedades más frecuentes en medicina canina. Un estudio de prevalencia media realizado en Estados Unidos sobre la enfermedad renal crónica en esta especie estimó que oscilaba entre el 0,5 y el 7%¹⁹². Aunque en la actualidad no existen datos objetivos al respecto publicados en España, en el Servicio de Medicina Interna del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Extremadura esta patología constituye el 7,2% de los pacientes recibidos (datos aportados por el propio Hospital).

El parámetro ideal de medida de la funcionalidad renal es la tasa de filtración glomerular. Sin embargo, su determinación es cara, laboriosa y no está al alcance de la mayoría de hospitales veterinarios. Desde un punto de vista práctico, el diagnóstico de enfermedad renal es fácil, pero en muchas ocasiones también es tardío. Fácil porque en cualquier laboratorio de diagnóstico clínico, por modesto que sea, se pueden determinar marcadores indirectos de la tasa de filtración glomerular, como la concentración plasmática de creatinina y de urea (o de BUN). Tardío porque, en el caso de enfermedad crónica, cuando estas alteraciones se manifiestan, al menos el 75% de las nefronas ya no son funcionales. Para intentar completar el diagnóstico, también se ha convertido en rutinario la determinación de la densidad urinaria y la estimación de la proteinuria (mediante el cálculo de la relación proteína/creatinina urinaria o UP/C). Sin embargo, su capacidad de detección de la enfermedad no es mucho más precoz. Estos parámetros analíticos están tan generalizados que, en función de la creatinina plasmática, UP/C y presión arterial, se puede caracterizar la fase en la que se encuentra la enfermedad, gracias a una clasificación mundialmente aceptada propuesta por la International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴².

La enfermedad renal crónica es irreversible, por lo que llegar al diagnóstico de forma más precoz supondría iniciar antes el tratamiento más apropiado, lo que repercutiría en una mayor supervivencia y calidad de vida del animal. Por ello, la investigación sobre biomarcadores de funcionalidad renal en medicina veterinaria es muy activa. Se intentan encontrar biomarcadores plasmáticos y urinarios que permitan realizar un diagnóstico más temprano, así como diferenciar entre enfermedad renal crónica y

daño renal agudo, sin olvidar que sean económicamente accesibles, fáciles de determinar, y con menos influencias extrarenales que los biomarcadores utilizados habitualmente. En la actualidad, se está dando especial importancia a los biomarcadores urinarios frente a los plasmáticos, ya que se ha planteado la hipótesis de que, como la orina es el producto de la funcionalidad renal, una alteración en su composición reflejará, de forma más directa y evidente, una función renal deficiente. Adicionalmente, los marcadores urinarios de enfermedad renal pueden ayudar a localizar la región del riñón afectada¹³².

La cistatina C es una proteína de bajo peso molecular y de producción constante, descubierta en los años sesenta en líquido cefalorraquídeo⁵² y en orinas proteinúricas de personas⁴⁰. Se caracteriza porque no se une a las proteínas plasmáticas, por lo que es completamente filtrada por el glomérulo. Además, es reabsorbida casi en su totalidad a nivel tubular, donde es metabolizada, lo que quiere decir que no vuelve al torrente sanguíneo y su presencia en orina es prácticamente inapreciable^{146,153}. Por todo ello se ha investigado como un potencial marcador de la tasa de filtración glomerular en medicina humana, puesto que presenta una mejor correlación con ella que otras proteínas de bajo peso molecular³⁰⁴. En 1994 se consiguió diseñar un método inmuniturbidimétrico automatizado de determinación laboratorial en suero¹⁷⁰ y en orina³¹². A partir de ese momento, han sido numerosas las investigaciones realizadas al respecto en medicina humana, tanto en casos de enfermedad renal crónica como aguda, caracterizándose sus valores en sangre y orina, influencias no renales y su utilidad diagnóstica. En la actualidad se utiliza como un marcador adicional de la tasa de filtración glomerular sin reemplazar a la creatinina.

En medicina canina su utilidad aún no está definida completamente. En primer lugar, a día de hoy no existen test analíticos específicos para la especie, sino que se tienen que utilizar métodos diseñados para medicina humana previamente validados⁸. Aunque no son muchos los trabajos publicados al respecto, la mayoría se refieren a perros con enfermedad renal crónica, incluidos perros con leishmaniosis, mientras que son pocos los referidos a perros no azoémicos, con enfermedad renal aguda y a la influencia de enfermedades no renales o de diferentes tratamientos¹⁰². No se han encontrado

estudios en poblaciones extensas de perros con enfermedades de génesis natural y, además, es escasa la investigación sobre su utilidad en la orina.

Por todo ello, y con el fin de contribuir al mejor conocimiento de la utilidad diagnóstica de la cistatina C en la enfermedad renal en la especie canina, así como la influencia que pueden ejercer en ella otras enfermedades, se ha diseñado el presente trabajo.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la utilidad diagnóstica de la determinación laboratorial de la cistatina C en sangre y en orina en la enfermedad renal en el perro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1º.- Establecer valores normales en el perro de la concentración de cistatina C en plasma y orina utilizándose un método de inmunturbidimetría fabricado para la especie humana, y validado para la especie canina. Estudiar posibles variaciones fisiológicas.

2º.- Estudiar el comportamiento de la concentración de cistatina C en el plasma y en la orina de perros con daño renal agudo. Compararlo con el de otros biomarcadores de enfermedad renal.

3º.- Estudiar el comportamiento de la concentración de cistatina C en el plasma y en la orina de perros con enfermedad renal crónica. Compararlo con el de otros biomarcadores de enfermedad renal. Comprobar si hay diferencias con los resultados obtenidos en los perros con daño renal agudo.

4º.- Estudiar el comportamiento de la concentración de cistatina C en el plasma y en la orina de perros con leishmaniosis, azoémicos y no azoémicos, y compararlo con el de perros con enfermedad renal crónica azoémica por causas diferentes a leishmaniosis.

5º.- Estudiar el comportamiento de la concentración de cistatina C en el plasma de perros con enfermedades no renales, y que en medicina humana se ha descrito previamente que pueden producir cambios en la misma.

6º.- Estudiar la influencia de los corticoides sobre la concentración de cistatina C plasmática en la especie canina.

V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

V.1 Cistatina C: generalidades

Las cistatinas son proteínas con una secuencia particular de aminoácidos que les otorgan una estructura específica, la cual les permite unirse reversiblemente a las proteasas de cisteína, formando así un complejo inactivo reversible²⁶, inhibiendo su acción y protegiendo a los tejidos de la proteólisis³⁴⁰.

Estas proteínas están ampliamente distribuidas en plantas, animales y protozoos. Se estima que hace más de mil millones años las plantas y los animales divergieron de un ancestro común que tenía el mismo tipo de cistatina²¹¹.

V.1.1 Perspectiva histórica

La cistatina C se identificó por primera vez en 1961, cuando Jorgen Clausen describió la aparición en el líquido cefalorraquídeo (LCR) humano de una proteína específica que mostró un patrón de migración electroforético en la región γ ⁵². Durante ese mismo año, Butler y Flynn identificaron una proteína con las mismas características en la orina humana de pacientes proteinúricos⁴⁰.

En 1962, Hochwald y Thorbecke aislaron la misma proteína en otros líquidos biológicos, como líquido ascítico, efusión pleural y saliva¹³⁰. En 1979 se determinó que la mayor concentración de cistatina C se encontraba en LCR, seguida del plasma, saliva y, por último, de la orina¹⁹⁰. Esta diferencia en la concentración de cistatina C sugirió en un principio que la proteína fuera producida a nivel del sistema nervioso central y catabolizada a nivel renal^{55,113,208}.

Entre 1961 y 1981 se determinó su secuencia parcial de aminoácidos. Aunque se le han asignado diferentes nombres en los últimos años (Figura 1)²¹¹, finalmente se la designó como cistatina C, debido a su similitud con la actividad de las cistatinas A y B¹⁵

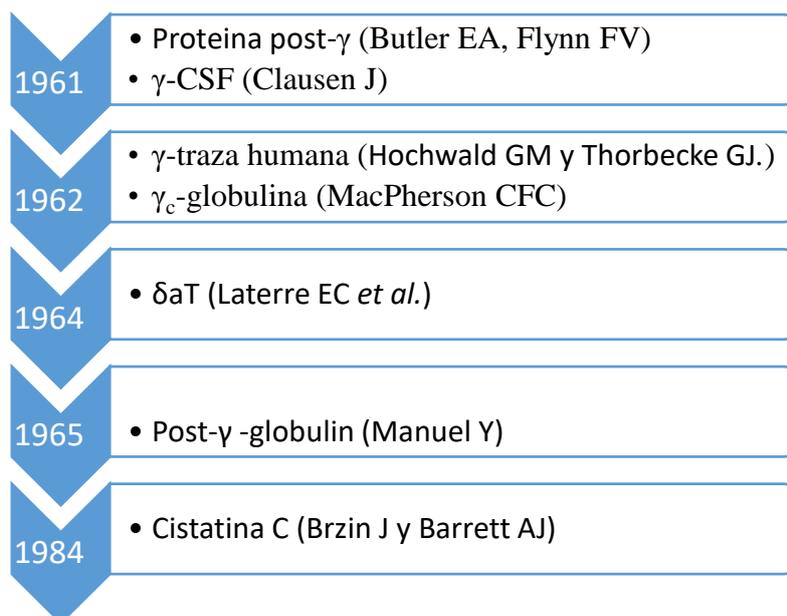


Figura 1: Evolución histórica de la cistatina C.

No fue hasta 1981, cuando Grubb A y Löfberg H¹¹³ demostraron la presencia de dicha proteína en la glándula pituitaria humana, determinándose su secuencia de aminoácidos completa, compuesta por una única cadena de 120 aminoácidos con un peso molecular de 13,260 KDa¹¹³.

En 1990, Abrahamson M *et al.*¹ observaron la presencia de esta molécula en todos los tejidos examinados, que incluían riñón, hígado, páncreas, intestino, estómago, pulmón, placenta, vesículas seminales, glándulas salivares y glándula pituitaria. En 1985, Turk V *et al.*³⁴¹ aislaron, a partir del suero de un paciente con una enfermedad autoinmune, un inhibidor que se parecía a los γ -traza en su secuencia de aminoácidos, y establecieron una relación con la secuencia presente en la cistatina de huevo. En este mismo año se publicaron los primeros estudios sobre la correlación de la cistatina C sérica como un marcador potencial de la tasa de filtración glomerular (TFG), puesto que parecía mostrar una mayor correlación que otros biomarcadores séricos como la β -2-microglobulina, proteína de unión al retinol (RBP) y el factor D¹¹⁴.

En 1992, Bobek LA y Levine MJ²⁶ realizaron diversos estudios para identificar las funciones de la cistatina C en base a su similitud con las cistatinas A y B, estableciéndose que esta proteína presenta una importante función como inhibidor de las proteinasas de cisteína, lo que le concede un papel protector de los tejidos ante la proteólisis.

V.1.2 Estructura

La cistatina C humana es una proteína no glicosilada, de cadena sencilla (Figura 2), compuesta por 120 aminoácidos con dos puentes disulfuro, con un peso molecular bajo (13,343 kDa en su forma no hidroxilada). Esta molécula está compuesta de cinco β -hojas paralelas y una breve α -hélice ($\alpha 2$), formando bucles (L1) entre hojas $\beta 2$ y $\beta 3$ y entre hojas $\beta 4$ y $\beta 5$. Finalmente, en el extremo N-terminal de la hoja $\beta 1$, está alineada en forma de una cuña. Es esta forma de cuña la que permite enlazar con el sitio catalítico de la enzima, inhibiendo su acción²¹¹.

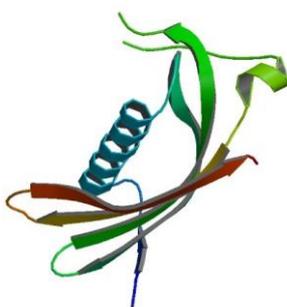


Figura 2: Estructura de la cistatina C humana.
(<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3GAX>)

V.1.3 Clasificación

Novo F²²⁵, en 2009, defiende que todas las cistatinas conservan tres porciones que se han mantenido intactas durante la evolución, siendo estas porciones las que forman el sitio de unión con las enzimas. Esta característica ha permitido realizar una clasificación de la superfamilia cistatina, que se subdivide en cuatro grupos principales (Tabla 1)^{225,243}.

Tabla 1: Clasificación de la cistatina.

TIPO	CARACTERÍSTICAS
Tipo 1 (estefinas) A y B	Predominantemente intracelulares.
Tipo 2 C, S, SN, SA, D, E/M, F	Proteínas no-glicosiladas extracelulares.
Tipo 3 Quinínógenos	Proteínas glicosiladas intravasculares.
Tipo 4 Fetuínas	Importante en la osteogénesis, resorción ósea compatible con una tasa de producción estable por la mayoría de células nucleadas.

Las cistatinas están codificadas por genes de limpieza constitutivos, que son los encargados de mantener la función de la célula básica con normalidad¹.

La cistatina C pertenece a la familia 2 de la superfamilia de los inhibidores de cisteína-proteasas, constituida por 11 miembros, de los cuales se puede considerar que la cistatina C es el inhibidor endógeno de cisteína proteasa más importante¹¹⁵.

V.1.4 Distribución en tejidos

La cistatina C es el producto de un gen de mantenimiento, localizado en el cromosoma 20, lo que explicaría su síntesis de forma constante por la mayoría de las células nucleadas y su amplia distribución tisular (Tabla 2)⁹⁹.

Tabla 2: Distribución de la cistatina C en fluidos biológicos humanos.

FLUIDO BIOLÓGICO	CONCENTRACIÓN CISTATINA C (mg/L)
Plasma sanguíneo	0,57 – 1,79
Orina	0,03 – 0,29
Semen	41,2 – 61,8
Líquido cefalorraquídeo	3,2 – 12,5
Lágrimas	1,3 – 7,4
Saliva	0,36 – 4,8
Leche	2,2 – 3,9
Líquido sinovial	≈2,0
Líquido amniótico	0,8 – 1,4

Al tratarse de un gen de mantenimiento el grado de homología entre especies es alto, concretamente del 68% al 73% para la secuencia completa de la cistatina C entre los seres humanos y otras especies, tales como ratas, ratones y ganado vacuno. En los perros se determinó sólo una secuencia corta de los 27 aminoácidos terminales, que muestra homología con la cistatina C humana (formada por 120 aminoácidos), es decir que se estima una homología de entre un 46% y un 79% para la especie canina según describió Poulik MD *et al.*²⁵³ en 1981, y entre un 22% y un 63% según refiere Pearson WR *et al.*²⁴⁰ en 1997. Esto podría indicar que las determinaciones de cistatina C realizadas en medicina canina no reflejan la concentración exacta de dicho parámetro en esta especie¹⁰².

Se ha descrito que, en la especie canina, se encuentra principalmente en suero (Tabla 3), LCR, glándulas parótidas, riñón y sistema nervioso central. En humanos, también se ha identificado en placas de amiloide en depósitos del cerebro. En cuanto a su distribución intracelular, se encuentra predominantemente en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi³⁵, en forma de dímeros inactivados. Los dímeros se forman a partir del cambio de tres subdominios ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$) entre dos monómeros de la cistatina C. Como consecuencia, el bucle L1 desaparece y, por lo tanto, el dímero no es capaz de inhibir la acción de las proteasas de cisteína. Las vesículas secretoras disocian los dímeros de forma que sean secretados como monómeros activos²²⁵.

La presencia de cistatina C en orina en condiciones fisiológicas debería ser mínima, puesto que, al tratarse de una proteína de bajo peso molecular, se filtra libremente por el glomérulo y se reabsorbe en el túbulo proximal, donde es catabolizada prácticamente en su totalidad por las células del epitelio tubular. Debido a esto, no se reincorpora al flujo sanguíneo ni aparece en la orina de forma significativa y, por tanto, resulta prácticamente imposible la medida de su aclaramiento. La presencia de cistatina C en orina refleja, por lo tanto, una disfunción de las células tubulares⁶⁸.

Diferentes autores han determinado cistatina C urinaria (Tablas 4 y 5), y debido a su baja concentración en este líquido biológico, no hay un consenso respecto a la mejor unidad de medida para su correcta interpretación. Algunos autores han medido la cantidad "bruta" de cistatina C urinaria, mientras que otros han realizado una ratio con la creatinina (cistatina C urinaria/c).

Además, en 2014, Sasaki A *et al.*²⁸⁶ midieron los niveles de cistatina C urinaria en forma de ratio con la creatinina para un grupo de perros control y otro al que se le administraba gentamicina, para producir un daño renal a nivel tubular. Se comprobó que tras 4 y 8 días de tratamiento los niveles urinarios de cistatina C se incrementaban (día 4 = $0,28 \pm 0,07$ mg/g y día 8 = $84,5 \pm 17,5$ mg/g).

Tabla 3: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C sérica (mg/L), expresados en media \pm desviación estándar.

AUTOR	ENFERMEDAD	EDAD (AÑOS)	N	CISTATINA C SÉRICA (mg/L)
Jensen AL et al.¹⁴⁹, 2001	Sanos	1 - 9	17	1,06 (0,4 - 1,38)
	Sin enfermedad renal	0,5 - 13	12	1,62 (0,4 - 2,24)
	ERC	0,5 - 9	8	5,01 (3,39 - 7,35)
Almy FS et al., 2002⁸	Sanos	Adultos	25	1,08 \pm 0,16
	ERC	Adultos	25	4,37 \pm 1,79
Braun JP et al.³⁵, 2002	Sanos		179	0,6 \pm 0,31
	ERC		27	0 - 8,6
	Con signos de ERC pero sin azoemia		7	0,2 - 1,2
	Azoemia sin signos de ERC		13	0 - 1,2
Gonul R et al.¹⁰⁶, 2004	Sanos	1 - 9	10	1,2 \pm 0,42
	ERC	2 - 13,5	20	2,96 \pm 1,09
Wehner H et al.³⁵⁹, 2008	Sanos	0,25 - 13	99	0,68 - 1,6
	Disminución ECPC	0,5 - 15	15	> 1,6
Miyagawa Y et al.²⁰⁵, 2009	Sanos		76	0,85 \pm 0,15
	ERC		88	1,23 \pm 0,21
	Neoplasias		5	0,93 \pm 0,13
	ICC		5	0,8 \pm 0,12
Pasa S et al.²³⁷, 2009	Sanos		10	0,56 \pm 0,15
	Leishmania sin ERC		16	1,07 \pm 0,62

ERC = enfermedad renal crónica; ECPC = aclaramiento exógeno de la creatinina plasmática; ICC = insuficiencia cardiaca congestiva.

Tabla 4: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C urinaria.

AUTOR	ENFERMEDAD	CISTATINA C URINARIA (mg/L)
Randers E y Erlandsen EJ²⁶³ 1999	Sanos	0,03 - 0,3
Grubb A¹¹⁵, 2001	Sanos	0,03 - 0,29
Monti P et al.²⁰⁹, 2012	Sanos	< 0,02 - 0,26
	Sin enfermedad renal	< 0,02 - 0,18
	ERC	2,05 - 10,45

Tabla 5: Resultados de diferentes estudios realizados en perros que analizan la cistatina C urinaria/c.

AUTOR	ENFERMEDAD	CISTATINA C URINARIA/C (mg/g)
Monti P <i>et al.</i> ²⁰⁹ , 2012	Sanos	0,01 - 0,32
	Sin ER	0,1 - 0,11
	ERC	3,43 - 26,45
García-Martínez JD <i>et al.</i> ¹⁰⁰ 2015	No proteinúrico ni azotémico	0,036 - 0,067
	En el borde de la proteinuria y no azotémico	0,086 - 0,173
	Proteinúrico no azotémico	0,127 - 0,326
	Proteinúrico y azotémico	0,723 - 1,451
Martineau AS <i>et al.</i> ²⁰⁰ , 2016	Sanos	0,002 - 0,036

V.1.5 Papel fisiológico y metabólico

La cistatina C desempeña una función protectora mediante inhibición de las catepsinas (B, H, L y S), enzimas con actividad proteolítica que catalizan la hidrólisis de proteínas a polipéptidos. En concreto, actúa sobre estas enzimas intracelulares, proporcionando protección frente al catabolismo del colágeno y degradación de la matriz celular^{115,298,221}. Se considera el inhibidor fisiológico más importante de las cisteínas proteasas endógenas³⁰¹.

Como ya se ha descrito anteriormente, al ser el producto de un gen de mantenimiento, se explica que sea sintetizada y secretada constantemente por todas las células nucleadas, por lo que se encuentra en gran cantidad de tejidos y líquidos biológicos⁹⁹, con concentraciones claramente más altas en el LCR, debido a su mayor expresión por el plexo coroideo. La cistatina C está implicada en muchas funciones biológicas, como la reabsorción ósea, modulación de la respuesta inflamatoria, acción antiviral y antibacteriana, proliferación y crecimiento celular y acción anti-metástasica^{26,122,184,263,331,356}. Su concentración sérica depende fundamentalmente de la TFG y no está influenciada por la masa muscular, el estado nutricional o la fiebre³⁰¹.

Debido a su pequeño peso molecular y a que su punto isoelectrico de 9,3 le confiere una carga positiva a pH fisiológico, la cistatina C se filtra libremente por los glomérulos, para ser reabsorbida totalmente a nivel de túbulo contorneado proximal. Aquí, es catabolizada casi completamente por las células tubulares donde se produce una

degradación enzimática y la reabsorción casi completa (99%) por las células tubulares dentro de los lisosomas^{273,282}. Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, la concentración de cistatina C urinaria es mínima, de 0,03 a 0,3 mg/L, creyéndose en un principio que no sería útil su uso para determinar el aclaramiento o TFG²⁹⁴.

V.2 Métodos analíticos (PETIA y PENIA)

Para el uso clínico, los métodos de ensayo de cistatina C en suero deben ser automatizados y libres de interferencias conocidas por compromiso de la creatinina sérica. El primer ensayo de cistatina C fue desarrollado por Löfberg H y Grubb AO¹⁹⁰ en 1979, cuando a esta proteína todavía se la llamaba γ -traza. Este primer proceso de determinación resultaba tedioso y largo, siendo necesarios 2 días para su realización. El ensayo tenía una sensibilidad aproximadamente de 300 mg/L, con un coeficiente medio de variación alrededor del 11%. En el mismo trabajo, estos autores describieron el desarrollo de un tipo de inmunoensayo enzimático. Dicho proceso también era un procedimiento largo, puesto que requería un período de 8 horas de incubación, aunque presentaba una mejor sensibilidad (aproximadamente 0,3 mg/L) y, por lo tanto, podría medir cistatina C en la orina. No obstante, el procedimiento seguía siendo aún demasiado largo y complejo para su uso en el diagnóstico clínico. Todavía era demasiado complejo para ser utilizado con cualquier otro fin que no fueran estudios clínicos retrospectivos o investigación.

No fue hasta 1994 cuando se introdujo una nueva tecnología de ensayo adecuada para la determinación de cistatina C como parámetro clínico diagnóstico. La técnica se basaba en inmunoturbidimetría de látex (PETIA, “particle enhanced turbidimetric immunoassay”). Dos equipos de trabajo estudiaron la misma técnica con diferentes partículas, pero con idénticos anticuerpos y calibradores. Los resultados fueron excelentes en ambos estudios^{91,170,222}. Esta investigación fue continuada con el desarrollo de un método de inmunoensayo nefelométrico (PENIA, “Particle enhanced nephelometric immunoassay”), utilizando sistemas nefelométricos de Behring⁹¹.

Los métodos analíticos PENIA⁹¹ y PETIA¹⁷⁰ constituyen la base de los cuatro métodos de ensayo más empleados para la determinación de cistatina C comercialmente

disponibles, y en la actualidad la mayoría de las determinaciones clínicas han sido realizadas con ellos.

Se considera que la técnica PENIA es la más precisa, en un entorno clínico, para la determinación de cistatina C en un rango entre 0,5 y 11 mg/L⁹¹. Sin embargo, estudios posteriores mostraron que, utilizando un volumen de muestra mayor en proporción a las partículas de reactivo, aumentaban considerablemente su sensibilidad, existiendo por lo tanto muy poca diferencia de imprecisión entre ambas técnicas^{108,186,323}. Se ha realizado un estudio en perros con función renal normal usando PENIA y un intervalo de referencia bajo ($0,25 \pm 0,15$ mg/L)¹¹.

El manejo de muestras para el análisis de cistatina C tiene ventajas prácticas sobre la creatinina debido a su mayor estabilidad. Según estudios en medicina humana, la concentración de cistatina C es estable durante 2 días a temperatura ambiente, una semana a una temperatura comprendida entre de -20 y 20°C, y 6 meses a -80°C. Se sigue manteniendo estable después de 10 ciclos de congelación^{84,91}. Sin embargo, algunos autores sugieren una menor estabilidad^{170,222}.

V.3 Cistatina C y enfermedad renal

V.3.1 Recuerdo fisiopatológico de la enfermedad renal

La principal función de los riñones es regular el volumen y composición del líquido extracelular mediante la formación de orina. Esta regulación se consigue mediante la formación de un ultrafiltrado del plasma por el paso de solutos, pequeñas proteínas y otros constituyentes no celulares de la sangre a través de la barrera de filtración glomerular. El volumen de ultrafiltrado producido es determinado principalmente por el número de nefronas funcionales, pero también se ve afectado por la presión hidrostática glomerular. La composición del filtrado se verá modificada atendiendo a las necesidades fisiológicas del animal, mediante la secreción o reabsorción de solutos y agua a medida que pasa por la nefrona. En un animal sano, menos del 1% del volumen filtrado por los glomérulos será eventualmente excretado como orina³²⁹.

Algunas enfermedades pueden influir sobre este proceso mediante distintos mecanismos, desencadenándose una enfermedad renal. La forma más frecuente de diagnosticarla es mediante la detección de azoemia, reflejo de una disminución de la funcionalidad de los riñones. Existen otras alteraciones laboratoriales clásicas en el diagnóstico, tales como proteinuria, debido a un daño de la barrera de filtración glomerular, o alteraciones en la composición de la orina secundarias a defectos en los túbulos renales o a urolitiasis³²⁹.

Dependiendo de la persistencia de la lesión renal se puede diferenciar entre daño renal agudo (DRA) y enfermedad renal crónica (ERC).

V.3.1.1 Daño renal agudo

Los riñones son órganos especialmente susceptibles de sufrir daño isquémico o nefrotoxicidad. Esto es debido a diversos factores, entre los que destacan el alto gasto cardiaco que presentan estos órganos (20%) en comparación con su pequeño peso (0,5% del peso corporal total), su alta demanda metabólica, y a su alto potencial para concentrar nefrotoxinas en las células epiteliales tubulares. Todos estos factores hacen del DRA una patología con una alta incidencia, estimándose que podría constituir entre el 1% y el 4 % de las causas de ingreso hospitalario en medicina humana, teniendo estos casos, además, una alta probabilidad de complicaciones graves^{5,13,127,154,164} (7-36%)^{219,367}. En medicina veterinaria la incidencia es desconocida, pero su presentación o desarrollo en animales hospitalizados puede ser devastador; una lesión renal, incluso menor, eleva considerablemente la mortalidad^{121,134,156,334,345}.

El DRA se ha definido clásicamente como un incremento súbito (en horas o días) de la concentración sérica de urea y creatinina, debido a la disminución del filtrado glomerular. Además, cursa con incapacidad para regular la homeostasis (equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base). Si no se resuelve en un corto periodo de tiempo, la función renal, e incluso la vida del individuo, pueden verse seriamente comprometidos⁴⁵.

La International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴² ha realizado una clasificación para el DRA basada en los niveles séricos de creatinina. Esta clasificación agrupa a los animales afectados en 5 grados:

- Grado I: perros con concentración de creatinina sérica inferior a 1,6 mg/dL. También se pueden incluir en este grupo a todos aquellos animales que, aun no siendo azoémicos, presenten evidencias contrastadas de DRA y/o un incremento de más de 0,3 mg/dL de creatinina en menos de 48 horas y/u oliguria inferior a 1 mL/kg/hora o anuria de más de 6 horas.
- Grado II: perros con niveles de creatinina sérica comprendidos entre 1,7 y 2,5 mg/dL, así como un DRA documentado con azoemia estática o progresiva, con un incremento de más de 0,3 mg/dL de creatinina en menos de 48 horas y/u oliguria inferior a 1 mL/kg/hora o anuria de más de 6 horas.
- Grado III: Perros con niveles de creatinina sérica comprendidos entre 2,6 y 5 mg/dL.
- Grado IV: Perros con niveles de creatinina sérica comprendidos entre 5 y 10 mg/dL.
- Grado V: Perros con niveles de creatinina sérica superiores a 10 mg/dL.

El DRA se ha clasificado, etiológicamente, en hemodinámico (pre-renal), intrínseco (renal) y postrenal.

DRA hemodinámico

El DRA hemodinámico o prerrenal es el resultado de una perfusión renal disminuida en ausencia de enfermedad y/o lesión renal existente² y de la consiguiente retención de productos de desecho nitrogenados y solutos⁷⁴. Una caída sustancial de la presión hidrostática del glomérulo disminuye la TFG y la retención de solutos. Inicialmente, al reducirse la volemia renal, la autorregulación del riñón conserva la capacidad excretora y continúa la excreción de los productos de desecho. Eventualmente, la autorregulación puede ser superada y se desarrolla la azoemia. Cualquier proceso que disminuya el flujo sanguíneo renal tiene el potencial de desencadenar un DRA prerrenal. Las causas más comunes son: deshidratación, hipotensión, shock y

reducción del volumen cardiaco. Aunque también está descrito en cirrosis hepática, anestésias, hipoadrenocorticismo o hipoalbuminemia.

El riñón detecta la disminución de la perfusión renal mediante barorreceptores periféricos y reacciona incrementando la reabsorción de sales y agua de la filtración glomerular. Una hipoperfusión grave y prolongada produce una lesión primaria renal (nefrosis isquémica o necrosis tubular aguda isquémica)⁴⁵.

El DRA hemodinámico se caracteriza por azoemia, así como por incremento de la densidad urinaria. La excreción fraccional de sodio es baja, excepto en el caso de fallo cardiaco congestivo, fallo hepático o síndrome nefrótico²⁷⁹.

DRA intrínseco (renal)

Es el resultado directo de la enfermedad sobre el parénquima renal². Las causas (Tabla 6) incluyen procesos isquémicos o hemodinámicos de larga duración (extendidos de una causa prerrenal), enfermedades infecciosas, toxinas o enfermedades sistémicas con manifestaciones renales^{173,174}.

La lesión estructural intrínseca del riñón generalmente aumenta la gravedad del DRA y no se invierte por completo tras la restauración de las deficiencias de volumen de fluido o hemodinámico. El daño renal puede desarrollarse como una continuación de deficiencias funcionales hemodinámicas, por sucesos isquémicos, o por la exposición a fármacos o toxinas exógenas que afectan directamente a los riñones. Las enfermedades renales intrínsecas o sistémicas con manifestaciones renales secundarias también promueven DRA⁶¹.

DRA postrenal

El DRA postrenal es debido a la obstrucción o desvío del flujo urinario, incluyendo obstrucción uretral, obstrucción bilateral ureteral, obstrucción unilateral con el riñón contralateral afuncional y salida de orina a la cavidad abdominal¹⁷⁴. La obstrucción urinaria disminuye el aclaramiento renal por una combinación de factores tanto neurohumorales como de compresión por incremento de presión renal. Un aumento de la presión en el sistema colector después de una obstrucción modifica el equilibrio

entre la presión hidrostática y oncótica, y disminuye la TFG. Por lo tanto, al resolverse la obstrucción, la azoemia se normaliza con rapidez, aunque obstrucciones prolongadas pueden llevar a un daño renal intrínseco que perdura. El uroabdomen aparece por reciclado de los productos de desecho a través del peritoneo⁴⁵.

Tabla 6: Causas de DRA intrínseco.

CAUSAS DE ISQUEMIA	ENFERMEDADES RENALES PRIMARIAS	ENFERMEDADES SECUNDARIAS CON MANIFESTACIONES RENALES	NEFROTOXINAS
Shock (hipovolémico, hemorrágico, hipotensivo, séptico)	Infecciones (pielonefritis, leptospirosis, borreliosis)	Infecciones (babesiosis, leishmaniosis, endocarditis bacteriana)	Toxinas exógenas
Disminución del gasto cardiaco (fallo cardiaco congestivo, arritmias, taponamiento cardiaco)	Inmunomediadas (glomerulonefritis aguda, lupus eritematoso sistémico, rechazo de trasplante renal, vasculitis)	Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, sepsis, fallo multiorgánico, coagulación intravascular diseminada	Fármacos
Anestesia profunda / cirugías extensas	Neoplasias (linfoma)	Pancreatitis	Toxinas endógenas
Trauma		Síndrome hepatorenal	
Hipertermia/hipotermia		Hipertensión maligna	
Quemaduras cutáneas extensas			
Reacción transfusional			
Trombosis de vasos renales / Coagulación intravascular diseminada			
Policitemia / hiperviscosidad			
Antiinflamatorios no esteroideos			

Diagnóstico de laboratorio:

Hematología

El DRA rara vez presenta modificaciones hematológicas específicas, aunque a veces puede indicar la causa primaria. En la mayoría de ocasiones, el recuento de eritrocitos, así como el hematocrito, volumen corpuscular medio y hemoglobina, son normales, salvo en casos de sobrehidratación⁴⁵ o pérdida aguda de sangre⁶¹.

La presencia de anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa suele ser típica de ERC. Sin embargo, puede presentarse en fases iniciales de perros con DRA, debido a que los signos de regeneración no aparecen hasta 3-5 días después de la pérdida masiva de sangre, cuando los reticulocitos entran en circulación. Además, la función

eritropoyética puede verse disminuida por el propio DRA o por inflamación coexistente^{81,135,187}.

Por otro lado, cuando la causa del DRA es infecciosa, puede aparecer leucocitosis²⁷⁸.

Bioquímica sanguínea

El hallazgo bioquímico más característico es la azoemia, de mayor o menor intensidad, en función de la intensidad del daño renal^{34,61}. Sin embargo, su ausencia no descarta la presencia de daño renal²⁷⁸.

Por lo general, cambios en la concentración de electrolitos, calcio, potasio y bicarbonato son más marcados en el DRA que en la ERC. Entre estos cambios es importante remarcar que más de un 75% de los perros presentan hiperfosfatemia³⁴⁷, y al menos un 25% hipocalcemia, aunque esta proporción puede incrementarse a un 50% en casos de intoxicación aguda con etilenglicol^{335,347}. Sin embargo, no existen publicaciones científicas sobre las concentraciones de calcio ionizado en perros y gatos con DRA.

El potasio es un parámetro que se modifica considerablemente según el estadio del DRA o la etiología del mismo. Es común encontrar hiperkalemia, con valores que oscilan entre 5,5 y 9 mEq/L, atendiendo al grado de enfermedad. Estos valores tienden a aumentar en animales con obstrucción urinaria o anúricos. Por regla general, la concentración sérica de bicarbonato se encuentra disminuida, viéndose acentuado según progresa el DRA, pudiendo llegar a causar alcalosis metabólica a consecuencia de la aparición de vómitos, deshidratación o incluso la administración previa de bicarbonato⁶¹.

Análisis de orina

En estos pacientes es fundamental realizar un análisis de orina, ya que en sus fases iniciales o en casos de DRA intrínseco pueden afectarse las distintas funciones renales⁶¹. Se incluyen los métodos habituales usados en medicina veterinaria: aspecto físico, bioquímica (tira reactiva), densidad (refractometría) y estudio del sedimento. También deben incluirse otras determinaciones como cociente proteína/ creatinina (UP/C),

excreción fraccional de electrolitos, así como la detección de la actividad de enzimas urinarias⁶¹.

- **Densidad**

En fases iniciales o en casos de DRA intrínseco se ven afectadas tanto la capacidad de concentrar la orina como la de diluirla, hecho que se refleja en una densidad urinaria que se mantiene estable en un rango comprendido entre 1,008 y 1,018⁶¹. Una densidad superior a 1,030 en un paciente con azoemia, indica fallo hemodinámico y, por lo tanto, prerrenal²³².

- **Bioquímica urinaria**

Las características químicas de la orina suelen medirse con métodos semicuantitativos, como las tiras reactivas. Para la interpretación de los diferentes parámetros, salvo el pH, debe tenerse en cuenta la densidad urinaria, siendo más representativas las reacciones detectadas en orinas de baja densidad que en las de elevada densidad²³². Algunos parámetros incluidos no son de utilidad en medicina veterinaria, como la densidad o los leucocitos. Los parámetros que mayor información aportan, además del pH, son la presencia de proteínas y/o de glucosa⁹⁸.

La presencia de glucosuria en ausencia de hiperglucemia es indicativa de disfunción tubular proximal. Además, puede predecir la presencia de necrosis tubular y es útil para discriminar entre DRA intrínseco y otras uremias agudas o crónicas³⁴⁷.

La proteinuria está patente en la mayoría de pacientes con DRA. Sin embargo, su determinación por tiras de orina presenta escaso valor predictivo, siendo más exactos otros métodos cuantitativos²⁹⁶.

- **Sedimento**

En todo análisis de orina se debe realizar el estudio microscópico del sedimento urinario, ya que puede ofrecer información sobre la etiología de la uremia. En dicho sedimento se pueden observar eritrocitos, leucocitos, cilindros, cristales, hongos o

bacterias⁶¹. En un 30% de los perros con DRA se observa la presencia de cilindros. Sin embargo, su ausencia no descarta un daño agudo del parénquima renal³⁴⁷.

La mayoría de los cristales urinarios pueden observarse en perros sin sintomatología. Sin embargo, a veces aparecen en patologías concretas como, por ejemplo, intoxicación por etilenglicol, en la que se observan cristales de oxalato cálcico¹¹¹.

- **Ratio proteína/creatinina urinaria (UP/C)**

Es el método de elección para la cuantificación de la proteinuria. Se trata de un valor numérico obtenido al dividir la cantidad de proteína urinaria, que se verá incrementada en casos de daño glomerular y/o tubular, entre la creatinina urinaria, que se mantiene más o menos constante³⁶⁰. Sin embargo, aunque en el DRA se produce una pérdida de proteínas urinaria, no existen estudios en los que relacionen la cantidad de proteínas perdidas y la fase de la enfermedad en la que se encuentra el paciente, aunque teóricamente cuanto mayor es el valor numérico de U P/C, existe mayor daño glomerular y/o tubular⁶¹.

- **Otros biomarcadores de función renal**

Se están estudiando biomarcadores de función renal que sean más sensibles que la creatinina, y que puedan identificar una disfunción renal antes. La cistatina C se correlaciona con la TFG mejor que la creatinina en el perro, y probablemente se ve incrementada antes en enfermedad renal temprana³⁵⁹. Sin embargo, no existen suficientes estudios que evalúen a esta proteína en perros con DRA. La gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) y la N-acetil-beta-D-glucosamida (NAG) son algunos marcadores urinarios de daño tubular e intersticial que se pueden ver incrementados durante las primeras etapas del DRA³⁸. La lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL) también se ve incrementada antes que la creatinina en el caso de DRA, y ayuda a diferenciar entre DRA y ERC^{136,179,297,319}. El factor de crecimiento 23 fibroblástico y la dimetilarginina simétrica (SDMA) también están siendo evaluados como marcadores tempranos de enfermedad renal³²⁹.

V.3.1.2 Enfermedad renal crónica

Como se ha comentado anteriormente, las enfermedades renales afectan a menudo a la especie canina, y con frecuencia se asocian a malos resultados en sus últimas etapas¹⁷. La prevalencia global de la ERC, por ejemplo, oscila entre un 0,5 y un 7% en esta especie^{199,251}, pero en los últimos años se ha sugerido que una estimación razonable para la prevalencia de ERC en Estados Unidos sería entorno al 0,5% - 1,5%³⁷. Otro estudio sugiere que la prevalencia en Reino Unido es muy similar a la estimada en Estados Unidos, en torno al 0,02% - 1,44%²²⁸. Esta prevalencia aumenta al 15% en perros de más de 10 años de edad^{191,228,251}.

La ERC es la enfermedad renal más diagnosticada en el perro. Se define como la presencia de anormalidades funcionales y/o estructurales en uno o en ambos riñones, que se presenta de forma continuada durante 3 o más meses. Los riñones de estos perros presentan una reducción permanente del número de nefronas funcionales, y aunque la estructura y la funcionalidad renal no se alteran paralelamente, las enfermedades renales primarias generalmente muestran evidencia de trastornos tanto estructurales como funcionales. La mayoría de las lesiones se manifiestan como cambios histológicos del tejido renal, pudiendo ser observadas con técnicas de microscopía. Sin embargo, otras alteraciones como defectos en el transporte celular, únicamente son detectables a nivel molecular o bioquímico, y no en todas las ocasiones generan cambios morfológicos observables con las técnicas anteriormente mencionadas¹⁸². Por otro lado, no siempre la pérdida de funcionalidad se correlaciona con una pérdida de masa renal¹⁷.

La ERC es irreversible y progresiva, incluso con tratamiento. Sin embargo, es común encontrar azoemias prerrenales, postrenales o enfermedades renales agudas que en cierto momento coexistan con la ERC, componente de la enfermedad que sí puede ser reversible²⁵⁰.

Los mecanismos compensadores del riñón, entre los que destaca la gran capacidad de hipertrofia del tejido renal, pueden ocultar las consecuencias clínicas e incluso laboratoriales que se producen en el caso de enfermedad renal incipiente. Las alteraciones laboratoriales convencionales se detectan cuando más del 75% de las

nefronas pierden su funcionalidad. La sintomatología compatible con la enfermedad es detectada después de que se alteren estos parámetros bioquímicos⁸.

La International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴² ha realizado una clasificación para el ERC basada en los niveles séricos de creatinina. Esta clasificación agrupa a los animales afectados en 5 grados:

- En riesgo: Perros con la concentración de creatinina plasmática inferior a 1,4 mg/dL, con propensión a desarrollar una ERC (estar bajo tratamiento nefrotóxico, raza predispuestas, enfermedades infecciosas asociadas a daño renal en el área y/o la edad del animal).
- Grado 1: Perros que presentan una concentración de creatinina plasmática menor de 1,4 mg/dL. No azoemicos que presenten alguna abnormalidad renal (concentración urinaria inadecuada sin poder identificar una causa no renal, palpación o imagen renal anómala, proteinuria de origen renal, resultados de biopsia renal anormales, incremento de los niveles séricos de creatinina en muestras seriadas).
- Grado 2: Perros que presentan una concentración de creatinina plasmática entre 1,4 y 2,0 mg/dL. Azoemia moderada, con o sin signos de enfermedad renal.
- Grado 3: Perros que presentan una concentración de creatinina plasmática entre 2,1 y 5,0 mg/dL. Azoemia moderada, con signosclínicos de enfermedad renal.
- Grado 4: Perros que presentan una concentración de creatinina plasmática superior a 5,0 mg/dL. Azoemia intensa, se incrementa el riesgo de ayazgos sistémicos y crisis uremicas.

Diagnóstico de laboratorio:

Hematología

En el hemograma se puede observar anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa (hipoproliferativa), que será más o menos grave en función del daño renal. Esta anemia se produce como consecuencia de la alteración renal en la

producción de eritropoyetina, y de la presencia de toxinas urémicas a consecuencia de la disminución de la funcionalidad renal. Todo ello conlleva a una disminución de la vida media de los eritrocitos, llegando a ser ésta la mitad que la que se presentaría en un individuo sano¹⁵⁸. Además, puede presentarse neutrofilia y linfopenia, como consecuencia del estrés ocasionado por una enfermedad crónica. Otra de las consecuencias de la uremia es la posibilidad de desarrollar una disfunción plaquetaria, que no modifica el recuento de plaquetas, pero si la funcionalidad de las mismas⁴⁶.

Bioquímica sanguínea

Tradicionalmente, para la evaluación de la gravedad de la nefropatía, se han utilizado diversos parámetros bioquímicos. Los más empleados y conocidos son la concentración sérica de urea y de creatinina. En la enfermedad renal la concentración de ambos parámetros se encuentra elevada (azoemia). Normalmente ambos aumentan de forma simultánea, aunque se pueden presentar situaciones en las que uno de estos parámetros puede estar incrementado debido a causas extrarenales, sin que el otro parámetro sufra alteración alguna, como, por ejemplo, el incremento de la creatinina ante un ejercicio intenso o el de urea en hemorragias gastrointestinales²⁷⁸.

Otros parámetros bioquímicos que se alteran frecuentemente son los electrolitos. En pacientes con ERC compensada, los niveles plasmáticos de sodio pueden ser normales, aunque también puede aparecer hipernatremia o hiponatremia cuando el paciente sufre deshidratación o retención de líquidos^{69,249}. Los niveles de potasio séricos suelen ser normales, aunque en casos de oliguria o anuria puede desarrollarse una hiperkalemia. Además, entre un 10% y un 30% de los casos, y debido a la anorexia, a la pérdida de masa muscular, a los vómitos y/o a la poliuria, pueden presentar hipokalemia²⁹⁵.

En fases IRIS 1 y 2, la concentración de fósforo en sangre puede ser normal. En fases más avanzadas, cuando se pierde más de un 85% de las nefronas, suele desarrollarse hiperfosfatemia⁴⁶. En la mayoría de los perros con ERC los niveles de calcio son normales; sin embargo, se puede desarrollar hipocalcemia en aproximadamente un 19% de los casos e hipercalcemia en un 22%^{290,291}.

La hipoalbuminemia puede ser bastante común en la ERC. Además, en perros con síndrome nefrótico puede desarrollarse, además de hipoalbuminemia, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia, asociado a hipernatremia, junto con un incremento del UP/C y de la presión sanguínea¹⁵⁹.

Análisis de orina

El análisis de orina es de vital importancia ante la sospecha de enfermedad renal, puesto que aporta gran cantidad de información, que ha de estudiarse junto con la hematología y la bioquímica sanguínea. Su realización debe ser lo más estandarizada posible, recogiendo la técnica de recolección, descripción del aspecto físico, bioquímica urinaria mediante tira reactiva, densidad urinaria y sedimento urinario. Si fuera necesario, puede ser ampliado con la determinación de marcadores urinarios y la cuantificación de proteínas mediante electroforesis⁹⁸.

- **Densidad**

Es muy importante determinar la densidad urinaria mediante refractometría, puesto que puede considerarse como una estimación de la concentración total de solutos⁴⁵. Puede advertir de un deterioro renal antes que se manifieste azoemia, ya que la capacidad para concentrar la orina se ve afectada cuando un 67% de las nefronas no son funcionales⁴⁶. En la ERC la orina es isostenúrica, con densidad comprendida entre 1,007 y 1,015. Sin embargo, este dato se ha de interpretar con cautela, puesto que puede verse modificado por otros factores, como el grado de hidratación o la dieta ingerida por los perros, que pueden afectar directamente a la densidad urinaria debido a los mecanismos de adaptación fisiológica del animal. Además, sus resultados, pueden verse falseados por la presencia de diversos solutos, tales como glucosa y/o proteínas³²¹.

- **Sedimento urinario**

Es muy importante realizarlo siempre que sea posible²³². Al examinarlo se debe prestar especial atención a todos los elementos formes visibles: células (eritrocitos, leucocitos y células epiteliales), cilindros, microorganismos (bacterias u hongos), cristales o moco,

así como diversos artefactos que pudieran hallarse en la muestra (fibras vegetales y pelos, entre otros). Otro hecho importante a tener en cuenta es el método de obtención de la muestra (micción voluntaria, cateterización o cistocentesis), ya que puede influir en el recuento celular, así como en los artefactos que se pueden encontrar en la misma¹⁸.

Dentro de los hallazgos encontrados en el sedimento, los eritrocitos son células que se pueden observar con relativa frecuencia. Cuando forman parte de cilindros celulares su origen es renal. La aparición de hematuria, macro o microscópica, puede deberse a traumatismos del sistema urinario, urolitiasis, neoplasias, infartos renales, nefritis o nefrosis y hematoma de la pelvis renal, entre otros⁹⁸.

El incremento en el número de leucocitos puede ser debido, principalmente, a infección o inflamación del tracto urinario²³².

En cuanto a las células epiteliales, se debe diferenciar entre células escamosas (que no tienen importancia diagnóstica), transicionales (pueden proceder de cualquier parte del urotelio, que va desde la pelvis renal hasta la uretra, aumentando progresivamente su tamaño en su transcurso) y renales (pequeñas células de origen tubular o de la pelvis renal). Estas últimas suelen presentarse con mayor frecuencia en pacientes con DRA, aunque también en pacientes con enfermedad renal isquémica, en casos de nefrotoxicidad o en las últimas fases de la enfermedad renal²⁶⁴.

La presencia de cilindros celulares puede ofrecer información sobre el tipo de nefropatía. Los cilindros hialinos aparecen en enfermedades glomerulares con marcada proteinuria o en nefropatías tubulares. Por otro lado, dependiendo de la célula predominante en los cilindros celulares, se pueden deducir las posibles causas de la enfermedad renal. Por ejemplo, los cilindros celulares de leucocitos se encuentran predominantemente en casos de pielonefritis, aunque también pueden hallarse en nefritis intersticiales, nefrosis y glomerulonefritis exudativa. Los cilindros de células epiteliales renales predominan en pacientes con un daño tubular severo, aunque también está descrito en infartos renales, nefritis intersticiales agudas por leptospirosis y pielonefritis^{232,335}.

- **Proteinuria**

En casos de ERC se puede producir una pérdida elevada de proteínas plasmáticas a través de la orina (proteinuria) y está relacionado con una progresión más rápida de la enfermedad renal. Además, también se ha comprobado que su presentación incrementa el riesgo de mortalidad, incluso en perros que no padecen nefropatía alguna¹⁸⁰. Algunos autores sustentan que la proteinuria puede ser, además de consecuencia, la causa del daño glomerular y tubulointerstitial en pacientes con una nefropatía instaurada, así como influir en su evolución^{155,266,378}. Por estos motivos, es muy importante confirmar su existencia y cuantificar el grado de proteinuria. Para ello existen diferentes métodos: semicuantitativos, utilizados en un análisis de orina rutinario, determinación del UP/C o la determinación de la concentración de albúmina urinaria¹⁸⁰.

- **Ratio proteína/creatinina urinaria (UP/C)**

Es el método de elección para la cuantificación de la proteinuria. Es un valor que se mantiene más o menos constante³⁶⁰. Según la International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴² se considera que un perro no presenta proteinuria cuando el UP/C es menor de 0,2, clasificándose como en el límite de proteinuria con UP/C comprendido entre 0,2 y 0,5, y como proteinúrico cuando éste aumenta por encima de 0,5. En aquellos perros con azoemia y UP/C > 1 se incrementa el riesgo de padecer una crisis urémica e, incluso, de morir¹⁴⁵. Otros autores modifican esta clasificación estableciendo que valores de UP/C comprendidos entre 1 y 3 pueden corresponderse con pérdida de proteína tubular o con la existencia de proteínas de bajo peso molecular, como proteínas de Bence-Jones, mioglobina o dímeros de hemoglobina, y que, cuando la pérdida de proteínas es glomerular, los valores obtenidos son superiores a 3. En casos de glomerulonefritis el coeficiente se encuentra entre 5 y 15, mientras que en perros con amiloidosis renal puede llegar a ser superior a 18. En casos de piuria y hematuria, en los que se podría sospechar de proteinuria por la presencia de proteína bacteriana o dímeros de hemoglobina, se ha demostrado que, normalmente, los valores de UP/C son menores de 0,5, indicando que tienen un efecto mínimo sobre la proteinuria y, por lo tanto, sobre el UP/C como medida de la misma³⁶⁰.

- **Microalbuminuria**

Cuando la concentración de albúmina urinaria está por encima de lo normal (> 1 mg/dL), se denomina microalbuminuria¹⁸². Sin embargo, este método diagnóstico presenta inconvenientes, ya que se ve incrementado no sólo en nefropatías, sino también en otras patologías, como hiperadrenocorticismo²³⁰, enfermedades neoplásicas, enfermedades de las vías urinarias bajas³⁶³ y en terapias con glucocorticoides³⁵⁷. Además, también se incrementa conforme aumenta la edad debido al incremento de padecer enfermedades sistémicas³⁶³.

V.3.2 Contextualización de la cistatina C en el diagnóstico laboratorial de la enfermedad renal

El riñón tiene una notable capacidad para soportar agresiones durante un largo periodo de tiempo. La sensibilidad de cada célula renal para dañarse varía en función del tipo, posición en la nefrona, vascularización local, y naturaleza del daño. El resultado de esta agresión renal es un conjunto de interacciones entre células disfuncionales, células muertas, proliferación, inflamación y recuperación³.

En la actualidad se considera como el mejor indicador de la funcionalidad renal la medida de la TFG^{89,188}. Sin embargo, las técnicas actuales para su determinación presentan utilidad clínica limitada por ser costosas, requerir mucho tiempo para el clínico o detectar la enfermedad renal en fases avanzadas. A la hora de analizar la TFG, y debido a que los valores normales están poco definidos, es importante que cada laboratorio establezca su propio rango de referencia. Esto es así debido a la variación de los protocolos descritos, sobre los que ejercen influencias determinados factores como el ciclo circadiano, el estado de hidratación del paciente, la concentración de proteínas en la dieta y el uso de protocolos de sedación durante su determinación³⁵³.

Para entender en qué consisten las medidas de la TFG es necesario conocer el término aclaramiento, referido al volumen de un fluido completamente limpio de una sustancia. El aclaramiento no mide la cantidad de sustancia eliminada, sino la velocidad de limpieza del fluido. Por otro lado, el aclaramiento plasmático total es la

suma de todas las rutas de aclaramiento¹²⁵ mientras que el aclaramiento urinario es el volumen de plasma limpio de una sustancia, la cual aparece en la orina²⁴⁵. Ambos pueden diferir porque no todas las sustancias aclaradas en el riñón aparecen en la orina.

V.3.2.1 Marcadores de función glomerular

Marcadores directos de la TFG:

Inulina (aclaramiento urinario)

La inulina es el marcador más utilizado para llevar a cabo el aclaramiento urinario²⁴⁵. Es un polímero de fructosa que se elimina mediante filtración glomerular, no es reabsorbido ni metabolizado por el riñón. Durante el procedimiento se administra inulina vía intravenosa y se recoge toda la orina producida en las 24 h siguientes.

$$\text{Aclaramiento de inulina} = (\text{producción de orina} \times [\text{inulina urinaria}]) / [\text{inulina plasmática}]$$

Los valores de referencia descritos en perros oscilan entre $3,39 \pm 0,73$ y $4,6 \pm 0,15$ mL/kg/min^{144,166}. Su principal limitación es que requiere que el paciente esté sondado o en una jaula metabólica. Por ello, este tipo de técnicas no se usa en la clínica habitual.

Creatinina (aclaramiento plasmático y urinario)

La determinación de la TFG se puede llevar a cabo midiendo la creatinina endógena y exógena, en plasma y en orina. El aclaramiento de creatinina endógeno se ve afectado por la secreción tubular proximal activa⁹¹.

Para llevar a cabo esta prueba se han propuesto varios protocolos^{88,358} pero, tanto administrada en infusión constante como en bolo de creatinina, se correlaciona muy bien con el aclaramiento urinario de inulina⁸⁸. Esta prueba ofrece ciertas ventajas, como por ejemplo que puede realizarse en la práctica clínica porque es un método fácil y sencillo. Sólo es necesario extraer un pequeño volumen de sangre en cada determinación, no se precisa contar con un laboratorio externo ya que la determinación de la creatinina se puede llevar a cabo en la clínica y los resultados

están disponibles inmediatamente. Como único inconveniente está que el paciente tiene que permanecer en ayunas las 24 horas previas a la realización de la prueba y debe permanecer hospitalizado durante ese día, ya que la última muestra de sangre ha de tomarse seis horas después de la inyección⁶⁷.

Otros biomarcadores

Además de la inulina y la creatinina, se han empleado otras sustancias como marcadores para determinar la TFG, como contrastes con iohexol o gadolinio y radioisótopos.

El iohexol es un contraste iodado no iónico, muy estable en plasma, que se elimina intacto en orina durante un periodo de 74 minutos²¹². Goy-Thollot I y colaboradores¹⁰⁹, en 2006, realizaron la técnica tomando dos muestras, a los 5 y 12 minutos después de inyectar el marcador, permitiendo determinar la TFG con un margen de error aceptable. El análisis del marcador se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), siendo los valores normales descritos para el perro de $2,9 \pm 0,3$ mL/kg/min¹⁷⁵ y $1,56 - 2,96$ mL/kg/min²⁰⁶. Entre otros compuestos iodados iónicos empleados se encuentran el iotalamato de sodio [125I] y el iodohipurato de sodio [131I].

Uno de los radioisótopos que se han empleado para monitorizar la TFG es Tc99m-ácido dietilnetrieminepentacético [Tc-99m-DTPA]. El uso de estas sustancias requiere contar con instalaciones especiales y un periodo de aislamiento posterior a la prueba de 24h. También se ha medido en perros y gatos a través de la piel la eliminación renal de sinistrina marcada con fluoresceína³¹⁹.

Marcadores indirectos de la TFG:

Urea

La urea es sintetizada en el hígado a partir del amoníaco procedente del catabolismo de los aminoácidos, en el ciclo de la ornitina. Los aminoácidos provienen del catabolismo proteico tanto endógeno como exógeno. Como su peso molecular es sólo de 60 Da, es filtrada en su totalidad por el glomérulo, pero su reabsorción a nivel

tubular es variable. La reabsorción de la urea a nivel de los túbulos colectores medulares está muy ligada a la reabsorción de agua. Por este motivo, cuando existe un descenso del volumen intravascular, disminuye el flujo tubular urinario y se produce un incremento de la hormona antidiurética, produciendo una reabsorción de urea mayor. Este es el principal motivo por el cual el aclaramiento de urea no puede emplearse como estimador de la TFG. La concentración plasmática de urea puede estar influenciada por diversos factores extrarenales, tales como sangrado digestivo, dietas hiperproteicas, o algunos fármacos. Por otro lado, también se puede apreciar una disminución en animales con insuficiencia hepática o shunt portosistémico¹⁴³.

Creatinina

La creatinina es una molécula que se genera de forma constante por medio de la deshidratación de la creatina y de la desfosforilación de la creatina fosfato. Esta pequeña molécula, de tan solo 113 Da, está ligada con la masa muscular²⁶⁵. Se puede apreciar un incremento de su concentración plasmática hasta 12 horas después de la ingesta, y puede verse modificada por el estado de hidratación del animal. Su eliminación es renal, filtrándose a nivel glomerular, existe una mínima secreción a nivel tubular, y sufre escaso metabolismo extrarenal³⁴. La escasa sensibilidad de la creatinina para la detección precoz de disfunción renal se debe a que la relación entre su concentración sérica y la TFG, en el perro y en el gato, es de tipo hiperbólico⁹⁰, de manera que una gran reducción en una de las variables supone un cambio muy pequeño en la otra³⁴.

Cistatina C

La cistatina C es una proteína de pequeño peso molecular (13KDa). Debido a esto y a su carga positiva a pH fisiológico, se filtra libremente por los glomérulos, eliminándose casi completamente de la circulación. Su metabolismo se produce en los túbulos proximales distales donde se produce su degradación enzimática y la reabsorción casi completa (99%) por las células tubulares dentro de los lisosomas²⁸². Por lo tanto, en condiciones fisiológicas, la concentración de cistatina C urinaria es mínima, creyéndose en un principio que no sería útil su uso para determinar el aclaramiento o la TFG²⁹⁴.

La cistatina C empezó a estudiarse en medicina canina en 1997, cuando se demostró su presencia en plaquetas³⁴⁴. Posteriormente, en 2001, se demostró que existía una reactividad cruzada entre la cistatina C sérica canina y los anticuerpos anti-cistatina C humana de conejo en la técnica PETIA¹⁴⁹. Sin embargo, actualmente no existe un consenso sobre los valores normales en perros adultos sanos (Tabla 7).

Tabla 7: Concentración plasmática normal de cistatina C (media \pm Desviación estandar) obtenida en estudios previos.

	Almy FS <i>et al.</i> , 2002 ⁸	Braun JP <i>et al.</i> ³⁵ , 2002	Antognoni MT <i>et al.</i> , 2005 ¹⁰	Antognoni MT <i>et al.</i> , 2007 ¹¹	Pasa S <i>et al.</i> ²³⁸ , 2008	Pasa S <i>et al.</i> ²³⁷ , 2009	Miyagawa Y <i>et al.</i> ²⁰⁵ , 2009
Cistatina C (mg/L)	1,08 \pm 0,16	0,6 \pm 0,31	0,25 \pm 0,14	0,25 \pm 0,15	0,46 \pm 0,05	0,56 \pm 0,15	0,85 \pm 0,15

En medicina canina la medida de la concentración plasmática de cistatina C ha estado orientada principalmente al diagnóstico de la enfermedad renal^{8,10,35,149,205}. De hecho, su utilidad clínica como marcador de daño renal canino no se vislumbró hasta 2002, cuando se estudió su utilidad y la de la creatinina para detectar la enfermedad renal en el perro, comparando ambos parámetros con la medida de la TFG mediante el aclaramiento con creatinina exógena. Se demostró una correlación entre el aumento de la TFG y la concentración de cistatina C sérica, presentando una correlación mayor que la creatinina. Sin embargo, en el mismo estudio, se describe que en pacientes con DRA parece no ser un buen marcador, ya que la creatinina presentó una mayor correlación con la TFG⁸.

Aunque en 2002 Almy FS⁸ y colaboradores mostraban que la cistatina C parecía no ser un buen marcador temprano de DRA, Pasa S *et al.*, en 2008, evaluaron su concentración sérica en perros críticos con DRA (politraumatizados, pacientes en estado de shock y pacientes con enfermedad del tracto urinario). Obtuvieron como resultados que, en animales con shock y con enfermedad del tracto urinario como consecuencia de la afectación de la funcionalidad renal por hipoperfusión o por disfunción renal, había un incremento significativo de cistatina C respecto al grupo control. En el grupo de politraumatizados, y al igual que ocurre en medicina humana²⁰⁰⁵, también se producía un incremento, aunque no era estadísticamente significativo.

En 2002, Braun JP *et al.*³⁵ también establecieron una mayor sensibilidad y especificidad de la cistatina C plasmática frente a la urea y creatinina para el diagnóstico de enfermedad renal (Tabla 8).

Tabla 8: Sensibilidad y especificidad en plasma de la concentración de cistatina C, creatinina y urea para el diagnóstico de enfermedad renal. Resultados con 95% de intervalo de confianza.

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Cistatina C plasmática	0,78 (0,64/0,92)	0,98 (0,96/1)
Creatinina plasmática	0,66 (0,5/0,82)	0,94 (0,91/0,97)
Urea plasmática	0,72 (0,56/0,88)	0,98 (0,96/1)

En 2008, se realizaron nuevos estudios (Tabla 9) para establecer la sensibilidad y especificidad de la cistatina C sérica para detectar disminución de la TFG (< 3,0 mL/min/Kg)³⁵⁹.

Tabla 9: Sensibilidad y especificidad sérica de la concentración de cistatina C y creatinina para el diagnóstico de enfermedad renal crónica.

	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
Cistatina C sérica	0,76	0,87
Creatinina sérica	0,65	0,91

Los valores descritos de este parámetro en perros con enfermedad renal son muy variables, como se puede comprobar en la Tabla 10, debido a la enfermedad responsable y al método laboratorial de diagnóstico principalmente.

Tabla 10: Concentración plasmática de cistatina C (media ± SD) obtenida en estudios previos en perros con insuficiencia renal.

	Almy FS <i>et al.</i> ⁸ , 2002	Antognoni MT <i>et al.</i> ¹⁰ , 2005	Antognoni MT <i>et al.</i> ¹¹ , 2007	Miyagawa Y <i>et al.</i> ²⁰⁵ , 2009
Cistatina C (mg/L)	4,37 ± 1,79	0,89 ± 0,68	0,59 ± 0,34	1,23 ± 0,21

Por otro lado, y a diferencia de medicina humana, en medicina veterinaria existen pocos estudios en los que se demuestre la influencia o no de otros factores en la concentración plasmática de cistatina C. La edad parece que podría tener cierta influencia sobre ella. Un estudio de 2002 (Figura 3) mostraba que tenía un rango menor en cachorros (< 1 año) y perros seniors (8 - 16,2 años) comparada con perros adultos (1 - 8 años). El mismo estudio mostraba también que los perros de peso

corporal inferior a 15 Kg presentaban valores de cistatina C plasmática menores que los de peso superior³⁵. Es importante mencionar que en este estudio no se realizó hematología, bioquímica ni análisis de orina, por lo que es imposible determinar si los animales presentaban alguna enfermedad.

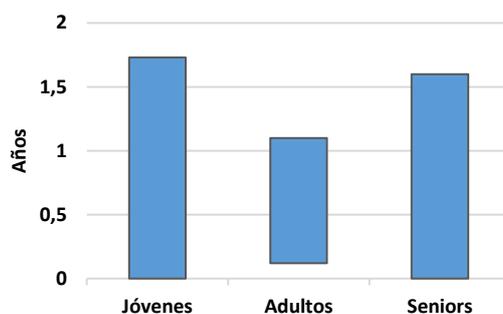


Figura 3: Concentración de cistatina C plasmática canina según la edad.

Otros estudios no mostraron ninguna correlación entre la edad o el peso con los niveles séricos de cistatina C^{234,359}, pero sí que una pérdida de peso significativa puede influir en la función renal, hallándose concentraciones menores de cistatina C plasmática tras dicha pérdida³⁴². Tampoco se ha encontrado correlación entre los niveles séricos de cistatina C con el sexo o los ritmos circadianos^{35,359}.

En contraste con lo que sucede con los niveles de creatinina plasmáticos, la concentración de cistatina C plasmática parece sufrir un drástico descenso durante las primeras horas tras la ingesta de alimentos. Esta disminución permanece durante 9 horas, y retorna a niveles normales tras 12 horas³⁵. Por este motivo se recomienda que toda muestra destinada a la determinación de cistatina C se debe obtener de perros tras un mínimo de 12 horas de ayuno. Debido a que la concentración plasmática de cistatina C está determinada principalmente por la TFG, y se ha demostrado que la comida provoca un aumento significativo de la misma²²⁶. La mayor eliminación de cistatina C podría explicar la disminución de la concentración, pero esto aún no ha sido confirmado.

La ingesta proteica es un factor que puede alterar los niveles séricos de urea y creatinina. Sin embargo, parece que la cistatina C sérica no se afecta por el contenido

de proteína de la dieta ni por los niveles de masa muscular, independientemente de los cambios en la TFG, lo que indica que puede proporcionar estimaciones más precisas de la TFG que la creatinina en pacientes con reducida ingesta de proteínas, o disminución de la masa muscular⁹⁹.

La cistatina C también ha sido estudiada en animales con enfermedades infecciosas que cursan con daño renal, tales como babesiosis y leishmaniosis. Para el caso de la babesiosis, se realizó un estudio que intentaba averiguar qué marcador de la TFG sería mejor en el caso de dicha enfermedad, si la cistatina C o la creatinina. Pero no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos parámetros⁷⁰.

Al igual que en el caso de la babesiosis, se estudió la influencia de la leishmaniosis visceral canina, pero no se realizó una comparativa con la TFG, sino una apreciación de los valores de cistatina C plasmática entre un grupo control y otro con leishmaniosis. Se obtuvieron valores superiores a los mostrados para el grupo control, aunque la mayoría se encontraban dentro del rango de valores normales. Se atribuyó al depósito de inmunocomplejos en la membrana del glomérulo. Por este motivo, y aunque sería recomendable disponer de más estudios, la leishmaniosis debería tenerse en cuenta como un factor extrarenal que puede incrementar la concentración de cistatina C²³⁷.

Otro estudio realizó una comparativa de los valores plasmáticos de cistatina C en perros con diabetes mellitus (con diabetes compensada y con cetoacidosis diabética), leishmaniosis y ERC¹¹, obteniéndose resultados que mostraban cómo en la ERC se presentan las concentraciones más elevadas de cistatina C. Asimismo, los animales con leishmaniosis presentaban una concentración de cistatina C superior a los animales con diabetes mellitus compensada, siendo por tanto estos más propensos al desarrollo de enfermedad renal.

En 2013, Iglesias R¹⁴⁰, en un Trabajo de Grado llevado a cabo en la Universidad de Extremadura, determinó los niveles de cistatina C en perros con ERC, y los correlacionó con las diferentes fases de la enfermedad establecidos en la clasificación IRIS. Para ello, analizó 92 perros enfermos, encontrando valores de $0,16 \pm 0,02$ mg/L en perros sanos, $0,37 \pm 0,41$ mg/L en el estadio 1, $0,4 \pm 0,31$ mg/L en el estadio 2, $0,91 \pm 0,61$ mg/L en el estadio 3 y $2,38 \pm 2,81$ mg/L en el estadio 4. Los valores obtenidos

mostraron también una alta correlación con la concentración de creatinina y con el grado de daño renal.

Dimetilarginina simétrica (SDMA)

La SDMA es un derivado dimetilado de la arginina producida por la metilación intranuclear de los residuos de arginina por la proteína-arginina metiltransferasa, junto con su estereoisómero dimetilarginina asmétrica (ADMA). La SDMA se excreta mediante filtración glomerular^{117,265}, lo que indica que cumple con las características necesarias para un marcador endógeno de la función renal. Ciertos estudios sugieren que su concentración está menos influenciada por la masa muscular que la creatinina plasmática^{64,118,119,241}. La evaluación de la SDMA no parece estar afectada por la alimentación de una dieta renal suplementada con aceite de pescado o L-carnitina en el perro^{118,265}. Se ha demostrado que su incremento en sangre, en caso de ERC, se produce antes que el de la creatinina^{117,213}. Sin embargo, todavía se requiere trabajo adicional para determinar el efecto de la enfermedad concurrente en este nuevo marcador. Recientemente, se ha desarrollado una nueva técnica en el perro para su determinación, el test IDEXX ASDMA[®], incluido en la clasificación IRIS. Sin embargo, Torrent E *et al.*³³⁹, en 2018, en un estudio realizado sobre su capacidad para detectar de forma temprana disfunción renal excretora en perros con leishmaniosis, llegan a la conclusión de que, al menos en esta enfermedad, no muestra ventajas en comparación con la creatinina y con el UP/C.

Proteinuria:

En pacientes sanos es normal encontrar una pequeña cantidad de proteínas en la orina como resultado del paso de proteínas de bajo peso molecular a través del glomérulo y proteínas adicionadas en el túbulo renal (proteína de Tamm-Horsfall), pero cualquier proteinuria mantenida es perjudicial para la función renal y promueve la progresión de la enfermedad renal¹⁶. Las células de los túbulos proximales son las encargadas de la reabsorción proteica, pero cuando la concentración de proteínas es excesiva, se acumulan en los lisosomas de estas células tubulares pudiendo causar la rotura de los mismos, y por consiguiente un daño celular. Este aumento de la concentración de

proteínas a nivel de los túbulos proximales puede deberse tanto a hiperproteinemia, que promueve un mayor paso de proteínas a nivel glomerular, como por un daño en el glomérulo *per se*, que permitiría un aumento de la entrada de sustancias hacia los túbulos renales³³.

La proteinuria se puede clasificar tanto atendiendo a su etiología como al peso molecular de la misma. Atendiendo a la etiología se subclasifica en: prerenal, renal funcional, renal patológica (glomerular, tubular, intersticial) y postrenal¹⁸⁰.

La clasificación atendiendo al peso molecular se relaciona en la Tabla 11:

Tabla 11: Clasificación de las proteínas urinarias atendiendo a su peso molecular.

PROTEÍNAS DE ALTO PESO MOLECULAR (PAPM)	PROTEÍNAS DE PESO MOLECULAR INTERMEDIO (PPMI)	PROTEÍNAS DE BAJO PESO MOLECULAR (PBPM)
Proteína C reactiva e IgG (150 kDa)	Albúmina (67 KDa)	Proteína transportadora de retinol (PTR) (21 kDa)

Otras proteínas que se han estudiado en la orina de los perros son GGT, NAG, α 1 microglobulina, β 2 microglobulina, lisozima, proteína ligada a la vitamina D, transtiretina y tromboxano B2^{22,196,260,364}.

Ante la presencia de lesión glomerular, la proteinuria presente es debida principalmente a PPMI, pero a medida que evoluciona la enfermedad y se daña el glomérulo aparecen mayor cantidad de PAPM^{63,374,375}. Ante lesiones tubulares, más típicas de daños agudos, suelen presentarse proteinurias con presencia de PBPM³⁷⁶.

Por lo tanto, clasificar la proteinuria e identificarla podría ayudar a descifrar la localización de la lesión renal.

Cociente proteína/creatinina en orina (UP/C)

Como se ha mencionado anteriormente, el UP/C se emplea para obtener un valor objetivo de las pérdidas de proteínas urinarias. Más específicamente, en medicina humana miden el grado de lesión glomerular mediante el cociente IgG/transferrina o albúmina, de manera que, si el cociente es elevado, la fórmula indicará que se están filtrando proteínas de alto peso molecular, asociado a mal pronóstico y a ausencia de remisión de la lesión glomerular⁶³.

En estudios recientes, se ha comprobado que existen ciertos factores ambientales que pueden producir variaciones significativas en los valores de proteinuria obtenidos. Un estudio de 2015 revela que existen diferencias significativas en los UP/C dependiendo del lugar físico en el que recoja la muestra. Para un mismo paciente, las orinas recogidas en el hospital pueden presentar UP/C más altos que las recogidas en casa. Dicho estudio encontró que esta diferencia fue más notable en orinas con UP/C > 0,5 y afectó fundamentalmente a la cantidad de proteína, pero no a la creatinina. Debido a dichas discrepancias, se podría dar el caso de pacientes que dependiendo del lugar de recogida de la muestra presentarían diferente estadiaje IRIS, y afectar la decisión clínica y farmacológica. Por ello se recomienda tomar siempre la muestra en la misma ubicación de cara a monitorizar la evolución del tratamiento¹⁵.

Durante años, se ha recomendado la obtención de muestras de orina mediante cistocentesis para la determinación de proteínas. Esta recomendación se basaba en que las muestras obtenidas mediante cistocentesis evitan la contaminación de la muestra con secreciones del tracto urinario inferior. No obstante, estudios recientes han demostrado que orinas obtenidas por micción espontánea son válidas para la determinación de UP/C, y pueden ser clasificadas correctamente según la clasificación IRIS, siempre y cuando estas muestras no presenten sedimento activo (ausencia de celularidad incluyendo bacterias)¹⁸.

El UP/C es el método más empleado comúnmente para la cuantificación objetiva de la proteinuria. Se estima que un UP/C > 0,5 en el perro se corresponde con una albuminuria superior a 30 mg/dL, que se considera como anormal si se presenta en más de 3 muestras separadas en un periodo de 2 o más semanas¹⁸⁰. Un UP/C \geq 0,2 tiene un buen nivel de especificidad (98,6%) para detectar microalbuminuria (> 1 mg/dL). Sin embargo, su sensibilidad para detectar microalbuminurias discretas es bastante bajo (47,9%)¹⁹⁴. UP/C > 2 son indicativos de enfermedad glomerular, pero no se pueden excluir otras etiologías sin realizar una biopsia renal^{180,189,293}.

Valores de UP/C \geq 2 podrían ser indicativos de proteinuria glomerular, mientras que valores inferiores a 2 a menudo están presentes en la proteinuria tubular. No obstante, se ha observado que algunos perros proteinúricos con UP/C < 2 tenían daño

glomerular primario confirmado por biopsia renal. En consecuencia, los valores de UP/C no siempre pueden diferenciar el daño glomerular del tubular⁵⁰. Recientemente, se ha informado que una variabilidad analítica dependiente del método utilizado para la medición de las proteínas urinarias (molibdato rojo de pirogalol versus azul brillante de Coomassie) podría afectar a la interpretación final del UP/C, y reducir la capacidad de clasificar correctamente perros con UP/C < 0,2²⁸¹.

Albuminuria

En medicina canina se ha comprobado que la microalbuminuria (< 0,3 mg/dL) persistente precede a la proteinuria. Puede estar producida por cualquier enfermedad que curse con proteinuria con albuminuria; por lo tanto, no es específica de enfermedad glomerular¹⁸¹.

Estudios realizados en el perro demuestran que la sensibilidad y especificidad de la microalbuminuria para detectar enfermedad sistémica, en comparación con el UP/C y la albúmina/creatinina urinaria, son superiores. Por ello, la valoración de la microalbuminuria junto a otras pruebas de cribado puede incrementar el diagnóstico de la enfermedad sistémica^{363,364}.

Un estudio reciente en perros Beagle determinó el daño causado en los túbulos renales de la nefrona durante el tratamiento con gentamicina, utilizándose biomarcadores clásicos y más actuales. De los actuales, los niveles de albúmina en la orina, junto con otros biomarcadores, mostraron una exactitud y elevaciones de su valor mucho más sensibles y específicas que otros biomarcadores clásicos como la creatinina sérica³⁵⁴.

En otro estudio reciente⁴³ se utilizaron varios biomarcadores renales en perros divididos en dos grupos: uno control, formado por 9 perros sanos, y otro problema, formado por 40 perros con ERC, subdividido a su vez en dos grupos, uno con ERC en IRIS 1 y 2, y otro con ERC más grave, en IRIS 3 y 4. La determinación de la albúmina en orina mostró resultados significativamente más elevados en aquellos perros con ERC en IRIS 3 y 4, lo que demuestra que dicho biomarcador es de utilidad para determinar

ERC. Otros biomarcadores daban positivos en IRIS 1 y 2, lo que permite anticiparse a la enfermedad.

Inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas están involucradas en la defensa del hospedador mediada por anticuerpos. Son glicoproteínas de alto peso molecular, producidas por células plasmáticas en la médula ósea, ganglios linfáticos y bazo. La forma monomérica de las inmunoglobulinas M (IgM), G (IgG) y A (IgA) pesa 900 kDa, 150 kDa y 160 kDa respectivamente. Estas inmunoglobulinas no pueden atravesar la barrera de filtración glomerular normal debido a su alto peso. Cuando ocurre una lesión glomerular, comienzan a aparecer en el filtrado urinario¹³².

Se han demostrado altas concentraciones de IgG e IgM en la orina de perros con ERC¹³¹. La proporción IgG/creatinina urinaria aumentó progresivamente en perros con ERC secundaria a *X-linked hereditary nephropathy* (XLHN), en comparación con perros sanos de la misma edad. Además, la ratio IgG/creatinina tenía tendencia a aumentar antes que el UP/C, al contrario de otras nefropatías donde se detectaba al mismo tiempo que la proteinuria. La IgG tiene una fuerte correlación con los valores de UP/C, y muestra su capacidad para indicar una disfunción en la permeabilidad glomerular. La ratio IgG/creatinina también se ha correlacionado positivamente con los hallazgos histopatológicos de daño glomerular y túbulo-intersticial en perros con XLHN²¹⁵.

Del mismo modo, los incrementos en la ratio IgG/creatinina e IgM/creatinina se han correlacionado positivamente con la glomerulonefritis mediada por complejos inmunitarios^{131,214}. Además, los aumentos en la concentración de la ratio IgM/creatinina proporcionó una mejor indicación de daño glomerular ultraestructural en comparación con otros biomarcadores de enfermedad renal, y se ha relacionado con un aumento del riesgo de insuficiencia renal y muerte en humanos y perros. Se ha observado una menor ratio en nefropatías juveniles, en glomerulonefropatías mediadas por complejos no inmunes y en enfermedad tubular primaria¹³¹.

También se han evaluado la excreción fraccional de IgM (FEIgM) e IgG (FEIgG) en perros con proteinuria debida a ERC, demostrándose que la excreción fraccional de

inmunoglobulinas fue mejor que su concentración en orina para evaluar el daño tubular. La FEIgG ha mostrado tener una fuerte correlación con la disfunción tubular histológica, mientras que la FEIgM se correlacionó igualmente con el daño histológico glomerular y tubular¹³¹.

En otros estudios, se ha encontrado un incremento de la concentración de IgG³¹⁶ y de IgA^{337,374} en perros proteinúricos con infección por leishmaniosis. La presencia de anticuerpos en la orina en estos animales se debe principalmente a la filtración libre de inmunoglobulinas secundarias al daño glomerular³¹⁶. En el caso de la IgA, se ha propuesto que una pequeña proporción corresponde a la producción local asociada con nefritis tubulointersticial o lesiones en otros órganos urinarios o genitales (vejiga, uretra y/o próstata)³³⁷.

Se han encontrado concentraciones menores en orina de IgA que de IgG en perros con leishmaniosis, incluso en presencia de daño glomerular grave, probablemente debido a niveles más bajos de IgA que de IgG³⁷⁴. Se ha informado una menor correlación de esta inmunoglobulina con la proteinuria, creatinina y urea séricas en comparación con la correlación de la IgG urinaria, que muestra una menor sensibilidad para evaluar el daño renal en estos animales³³⁷.

En uno de los últimos estudios, se ha informado que la ratio IgG/creatinina urinaria aumenta de acuerdo con el desarrollo de la enfermedad renal²³⁶, y que se correlaciona positivamente con la progresión de la proteinuria en perros con leishmaniosis^{236,316}. Además, la disminución del cociente IgG/creatinina se ha asociado con la mejoría de la proteinuria después de un mes de tratamiento en casos sin cambios en las concentraciones séricas de creatinina y SDMA. La magnitud de su disminución fue más alta que otros biomarcadores de daño glomerular, como el cociente entre la proteína C reactiva urinaria y la creatinina²³⁶.

V.3.2.2 Marcadores de función tubular

El biomarcador ideal de DRA debería ser asequible, rápido, medible, preciso y exacto, con pronóstico capaz de definir la gravedad del daño renal, específico para el riñón, incrementarse en las etapas iniciales de la disfunción, con alta sensibilidad y

especificidad³. La orina, debido a que es producida por los riñones y a su facilidad de extracción, es un fluido biológico ideal para encontrar biomarcadores tempranos de fallo renal²⁷⁷. Son muchos los biomarcadores estudiados o en fase de estudio (Tabla 12)²³³.

Tabla 12: Biomarcadores estudiados de daño renal agudo en medicina humana.

Biomarcadores de DRA	Origen	Papel del riñon	Tipo de muestra	Tiempo de detección post-lesion renal	Factores que pueden afectar su medida
Lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (NGAL)	Glicoproteína de 25 kDa producida por el tejido epitelial del organismo.	El NGAL plasmático es excretado via glomerular, y reabsorbido completamente a nivel tubular. También es producido por los segmentos distales de los tubulos renales.	Plasma y orina.	De 2-4 horas post-DRA.	Sepsis, tumores malignos, ERC, pancreatitis, EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), hiperplasia endometrial.
Cistatina C	Proteína de 13 kDa inhibidora de las cistein-proteinasas. Producida por la mayoría de las células nucleadas de forma constante.	Filtrada libremente por el glomérulo y, posteriormente, completamente reabsorbida y metabolizada a nivel de túbulos proximales. No existe secreccion tubular y sus niveles en orina son practicamente indetectables en individuos sanos.	Plasma y orina.	12-24 horas post daño renal.	Inflamación sistémica, tumores malignos, desórdenes tiroideos, exceso o aumento de glucocorticoides, tabaquismo.
IL-18	Citokina proinflamatoria de 18 kDa.	Liberada por las células de los túbulos proximales después de ser dañadas.	Plasma y orina.	6-24 horas después del daño renal.	Inflamación, sepsis, fallo cardiaco.
Molécula de daño renal 1 (KIM-1)	Glicoproteína transmembrana generada por células tubulares proximales después de daño isquémico o nefrotóxico; ninguna fuente sistémica.	Presente en orina tras daño isquémico o nefrotóxico de células tubulares proximales.	Orina.	12-24 horas tras el daño renal.	Carcinoma renal, proteinuria crónica, ERC.
Proteína hepática de unión a ácidos grasos (L-FABP)	Chaperonas, lípidos intracelulares de 14 kDa que se produce en hígado, intestino, páncreas, lengua, sistema nervioso, estómago y células del túbulo proximal.	Libremente filtrada en el glomérulo y reabsorbida en las células del túbulo proximal; incrementa la excreción urinaria después del daño tubular.	Plasma y orina.	1 hora después del daño tubular isquémico.	ERC, riñon poliquístico, enfermedad hepática, sepsis.
N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG)	>130 kDa de enzima lisosomal; se produce en muchas células incluidas las del túbulo proximal y distal.	Demasiado grande para filtrarse en el glomérulo; la elevación en orina implica daño tubular.	Plasma y orina.	12 horas.	Nefropatía diabética.

Tabla 12 (continuación): Biomarcadores estudiados de daño renal agudo en medicina humana.

Biomarcadores de DRA	Origen	Papel del riñón	Tipo de muestra	Tiempo de detección post-lesion renal	Factores que pueden afectar su medida
Proteína unida a retinol (RBP)	Glicoproteína de cadena única de 21 kDa; portadora específica de retinol en la sangre (entrega retinol del hígado a los tejidos periféricos).	Totalmente filtrada en el glomérulo y reabsorbida pero no se secreta en los túbulos proximales; una disminución en la función tubular conduce a la excreción de RBP en la orina.	Plasma y orina.	< 12 horas	Diabetes tipo 2, obesidad, enfermedad aguda crítica.
α Glutación S-transferasa (α GST)	Enzima citoplasmática de 47 a 51 kDa producida en los túbulos proximales.	Filtración glomerular limitada; se incrementa en los niveles urinarios tras el daño tubular.	Orina.	12 horas.	
n-Glutación Stransferasa (nGST)	Enzima citoplasmática de 47 a 51 kDa producida en los túbulos distales.	Filtración glomerular limitada; se incrementa en los niveles urinarios tras el daño tubular.	Orina.	12 horas.	
Gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) Fosfatasa alcalina (FA) Alanina aminopeptidasa (AAP)	Enzimas localizadas en las vellosidades del borde en cepillo de las células tubulares proximales.	Liberados en orina después de un daño tubular.	Orina.		
Hepcidina	Hormona péptida de 2,78 kDa producida mayoritariamente en los hepatocitos; alguna producción en riñón, corazón y cerebro.	Se filtra libremente con la absorción tubular y el catabolismo (excreción fraccional 2%).	Plasma y orina.	-	Inflamación sistémica.
Factor de crecimiento de hepatocito (HGF)	Marcador ligado a la regeneración de células epiteliales de túbulos renales.		-	-	
Netrina	Molécula unida a lámina, mínimamente expresada en las células epiteliales del túbulo proximal de riñones normales.	Altamente expresada en daño tubular proximal.	Orina.	-	
Péptido quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1)	Péptido expresado en podocitos y células mesangiales renales.	Detectable en orina.	Orina.	-	Enfermedades renales primarias.
Calprotectina	Complejo de dos proteínas del grupo S100 (S100A8/S100A9) unido al calcio; derivado de neutrófilos y monocitos; actúa como activador el sistema inmune innato.	Medidora de actividad inflamatoria local; detectada en orina en DRA intrínseca.	Orina.	-	Enfermedad inflamatoria intestinal crónica (IBD), infecciones del tracto urinario, ERC.

Enzimas:

La enzimuria se empezó a estudiar durante los años 60 y 70, como posible marcador de DRA. Se investigó tanto en seres humanos como en modelos de roedores^{31,368}. El estudio de las enzimas urinarias estaba encaminado a encontrar algún marcador temprano de DRA. Durante las últimas décadas se han realizado estudios en animales domésticos, la mayoría como modelos para seres humanos. Aunque actualmente existen estudios que muestran el significado clínico de ciertas enzimas, el uso de estas técnicas es todavía limitado para el clínico veterinario⁴⁵.

Fosfatasa alcalina

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima que se encarga de eliminar fosfato de proteínas y nucleótidos, funcionando de manera óptima a pH alcalino. Está constituida por un grupo de isoenzimas producidas por las células de varios órganos: hígado, hueso, intestino, riñón y placenta. El aumento de la concentración plasmática de esta enzima, al contrario que en muchas otras, no se produce por una liberación debida a daño celular, sino por incremento de la actividad plasmática y por lo tanto de su síntesis³⁹. La FA también se localiza en los lisosomas de las vellosidades del borde en cepillo de las células del túbulo proximal y, al contrario de lo que sucede en el plasma, se libera a la orina después del daño tubular renal^{68,233}.

La ratio FA urinaria/creatinina urinaria, se ha estudiado como posible marcador de daño renal en perras con piometra, en las que se comprobó que sus niveles disminuyen después de la cirugía. En dicho trabajo se consideraban como valores normales a una ratio < 10 UI/mmol, valores intermedios 10-20 UI/mmol y valores altos > 20 UI/mmol¹²⁴. También se ha utilizado como marcador de daño renal a largo plazo en patologías que producen ERC²²⁷.

Lactato deshidrogenasa

La lactato-deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se localiza en el citosol de gran variedad de tejidos, por lo que su especificidad plasmática es bastante limitada. Las mayores concentraciones se encuentran en corazón, hígado, riñones, músculos,

glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Por este motivo es un parámetro laboratorial que forma parte de los perfiles bioquímicos rutinarios⁵⁴ y que, aunque por sí sola proporciona escasa información clínica, junto con la determinación de otros parámetros puede ayudar a definir la localización de una patología restringiéndola a ciertos territorios orgánicos³².

Respecto a la presencia de LDH urinaria, pertenece a la categoría de las oxidorreductasas, y se localiza en el citoplasma de las células del túbulo proximal⁶⁸. En 2016, McDuffie LA y Aufforth RD²⁰² observaron que la ratio LDH urinaria/creatinina urinaria aumentaba en perros con DRA inducido con cisplatino.

Gamma-glutamyl transpeptidasa

La gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) transfiere la fracción glutamyl del glutati6n o L-g-glutamyl-Lcisteinil-glicina (GSH) y otros péptidos γ -glutamyl a una variedad de aminoácidos y péptidos¹⁰⁴. El producto de esta reacci6n es un péptido γ -glutamyl. La existencia de esta enzima se demostr6 por primera vez por Hanes CS y Hird FJR¹²⁰ en 1950 en el ri6n de ovejas. Se ha sugerido que desempeña un papel importante en el transporte de aminoácidos en la c6lula^{23,129}. Es com6nmente utilizada en la evaluaci6n diagn6stica de los perros y gatos con enfermedad hepática o del tracto biliar.

La GGT se puede encontrar en altas concentraciones en las células del borde en cepillo, plexo coroideo y otros tejidos^{104,229,275,280}. Tiene gran actividad en el lumen del cepillo de las células tubulares, por lo que, si estas células sufren alg6n tipo de daño, la enzima pasa a la orina, siendo por lo tanto su concentraci6n urinaria un indicador de daño y necrosis tubular⁴⁶. Los valores de referencia en perros sanos oscilan entre una ratio GGT urinaria/creatinina urinaria de 1,93 y 28,57 UI/g. Varios son los estudios experimentales realizados en perros que demuestran que su concentraci6n urinaria podría ser un marcador precoz y sensible de lesi6n tubular, puesto que con frecuencia se detecta antes que los aumentos de creatinina plasmática²⁵⁵. Se realiz6 un estudio en el que se producía un daño renal específico a nivel de t6bulos contorneados distales mediante la administraci6n de gentamicina, mostrando que la GGT urinaria aumentaba incluso antes que apareciera azoemia, y considerándose por lo tanto un m6todo m6s sensible y fiable para detectar un posible DRA asociado a tratamiento con

gentamicina¹¹² En 2001, Heiene R *et al.*¹²⁴, midieron la ratio GGT urinaria/creatinina urinaria en perras con piometra antes y después de la ovariectomía, observando que se encontraba elevado y que disminuía después de la castración.

Otro estudio demostró que altos niveles de la ratio urinaria GGT/creatinina podrían predecir la presencia de proteinuria en perros con ERC secundaria a leishmaniosis y podría ser útil para diferenciar entre proteinuria tubular y mixta determinada por SDS-AGE urinaria. Se ha sugerido que el aumento de sus niveles podría ser útil para evaluar la progresión de la enfermedad renal en esta enfermedad¹³⁹.

Se han estudiado varios factores que podrían interferir en su medición, no encontrándose diferencias significativas entre sexos. Se ha observado que los valores difieren significativamente según el pH de la orina, puesto que al parecer se desnaturaliza a pH de 4,7¹⁵¹.

N-acetil-β-D-glucosaminidasa

El N-acetil-β-D-glucosaminidasa (NAG) es una enzima lisosomal que se encuentra principalmente en las células de los túbulos proximales y distales renales. Es una proteína con un peso molecular > 130 KDa^{233,288}. Al ser una proteína con un considerable peso molecular, no se filtra a nivel glomerular. Este hecho, combinado con el que se encuentra en gran cantidad en las células epiteliales tubulares, hace del NAG un posible marcador de daño tubular²³³. Se tiene constancia de que su actividad urinaria aumenta en condiciones de daño renal tanto en seres humanos^{65,169,254,256,361} como en animales^{6,110,287}. Se ha propuesto como un marcador sensible de progresión de la enfermedad renal^{65,169,254,256} y de rechazo de aloinjertos renales²⁸⁴. Su actividad se incrementa antes que otros parámetros de funcionalidad renal²⁵⁴.

Como se considera un marcador específico de daño epitelial renal, ayuda a reconocer el tipo de daño renal^{61,131}. La ratio NAG urinaria/creatinina urinaria se ve incrementada en DRA, como se pudo comprobar en un estudio con Beagles en el que obtuvieron valores elevados de NAG antes que de los marcadores tradicionales. Además, se incrementa en perros con ERC^{193,288,311}, pielonefritis³¹¹, diabetes mellitus no controlada, piometra²⁸⁸ y nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X²¹⁴. Aunque

existe escasa información en enfermedades renales caninas²⁸⁸, se ha descrito su utilidad en perros con daño tubular proximal inducido por drogas¹¹⁰. En este sentido, previamente se habían realizado estudios experimentales en perros para determinar su capacidad de predecir el DRA induciendo daño tubular mediante la toxicidad de cloruro de mercurio⁸².

Frecuentemente se ha determinado conjuntamente con la GGT urinaria en estudios experimentales¹¹⁰, así como en enfermedad renal de origen natural en perros²⁸⁸. Un estudio llevado a cabo en medicina humana mostró que las enzimas urinarias GGT y NAG detectaron DRA entre 12 horas y 4 días antes que el desarrollo de azoemia en pacientes de UCI³⁶².

Sin embargo, no existen valores basales normales para la especie canina en orina debido a que, en los diversos estudios realizados, los valores obtenidos en los grupos controles son muy diferentes^{53,110,112,288}. Sí se ha demostrado que los valores de NAG urinarios varían significativamente entre hembras y machos, pero no en función del pH, como ocurre con la GGT. En machos se ha demostrado que el semen es una importante fuente de NAG²¹⁶. En la orina se inactiva a pH > 8¹⁹⁷.

Proteínas de bajo peso molecular:

El hallazgo de un incremento en la concentración de proteínas de bajo peso molecular en la orina, puede estar asociado a un defecto primario por parte de los túbulos proximales, que puede ocurrir tanto por daño celular como por sobrecarga proteica en el filtrado glomerular. Las proteínas de bajo peso molecular son filtradas libremente por el glomérulo y se reabsorben a nivel tubular, pero no son secretadas por las células tubulares proximales. La lesión en el epitelio tubular proximal conduce a la disminución de superficie de las microvellosidades de la membrana del borde en cepillo, y consecuentemente se ve reducida su capacidad de absorción⁸⁶. La proteinuria tubular resultante ha sido ampliamente estudiada como índice de lesión tubular^{86,338}.

Cistatina C

Como se ha comentado anteriormente, la cistatina C es una proteína de bajo peso molecular (13 KDa) que se filtra libremente por el glomérulo para ser reabsorbida en el túbulo proximal, donde es catabolizada casi en su totalidad (99%) por las células del epitelio tubular. Gracias a estas propiedades su concentración urinaria puede reflejar un daño tubular, ya que una vez filtrada por el glomérulo no retorna como tal al torrente sanguíneo (es metabolizada a nivel tubular), y tampoco debería aparecer en la orina, al metabolizarse a nivel lisosomal de dichas células tubulares²⁸². La cantidad de cistatina C urinaria puede ser tan baja en condiciones fisiológicas, que en un principio se creyó que no sería útil para la determinación del aclaramiento o TFG²⁹⁴. Sin embargo, otros autores afirman que su presencia en orina refleja la disfunción de las células tubulares⁶⁸. Su concentración normal en orina en ausencia de daño tubular es de 0,03 – 0,3 mg/L^{115,263}.

En la actualidad existen muy pocos estudios acerca de la cistatina C urinaria en el perro. En 2012 Monti P y colaboradores²⁰⁹ validaron la técnica PETIA para la determinación de cistatina C urinaria canina. AL mismo tiempo, compararon los niveles de cistatina C urinaria en forma de ratio con la creatinina urinaria, a fin de determinar si existían diferencias de este valor, entre un grupo control y otro con enfermedad renal, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Por otro lado, García-Martínez y colaboradores en 2015 concluyen que, en una población de perros con leishmaniosis, tan sólo en la fase más avanzada (IRIS 4) es cuando existe un incremento significativamente apreciable.

Debido a su alto potencial como marcador de daño renal prematuro, autores como Martineau AS *et al.*²⁰⁰, en 2016, que evidenciaron que el consumo de extractos de uva y frambuesa es saludable para los perros, utilizaron la cistatina C urinaria como uno de los marcadores de daño renal.

Proteína transportadora de retinol

La proteína transportadora de retinol (RBP), como su propio nombre indica, es la principal encargada del transporte de retinol (vitamina A) por el organismo, se sintetiza

a nivel hepático, y es de bajo peso molecular (21 kDa)³⁰⁶. El complejo RBP-retinol está unido a la transtiretina (transportadora de tiroxina y retinol) en el plasma, y esta unión impide su filtración glomerular²⁵. Una vez que el retinol ha sido entregado a sus tejidos diana, su afinidad por la transtiretina disminuye³⁷³, lo que permite que la molécula de RBP se filtre libremente por el glomérulo y sea reabsorbido por las células de los túbulos proximales donde es catabolizada⁴⁹. Por este motivo, el RBP urinario se ha propuesto como un posible indicador de daño tubular proximal, en personas y perros, puesto que su presencia en la orina mostraría una disfunción o daño de las células encargadas de su reabsorción y metabolismo, que se encuentra en concreto en esta porción de los túbulos renales^{257,258,259,260,261}.

Se han observado aumentos de las concentraciones de RBP urinario en perros con ERC^{131,176,257,262,311} y en otros en los que no se normalizaron los resultados con el volumen de la orina²⁶², urolitiasis (normalizado a creatinina urinaria)²⁶⁰, hiperadrenocorticismos sin tratar³¹⁰, nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X (XLHN)^{214,351} y glomerulonefropatía familiar ligada al Dogo de Burdeos¹⁷⁶. Las determinaciones se llevaron a cabo mediante análisis Western blot, ELISA, o ambos en comparación con perros sanos^{257,260,262,351}.

Existen varios estudios que han evaluado la capacidad del RBP para identificar la disfunción renal en una fase temprana. En dos estudios se detectó antes un aumento de los niveles de RBP en orina que la aparición de azoemia en perros con nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X (XLHN)^{215,214} y los datos adicionales también apoyan la correlación entre las concentraciones de RBP y la progresión de la ERC. Existe otro estudio en el que se investigó la influencia de la función renal en la excreción urinaria de RBP en perros con enfermedad renal de origen natural. Al contrario de lo que ocurría en los estudios antes mencionados, las concentraciones de RBP urinario no eran diferentes entre perros normales y perros no azoémicos con disminución del aclaramiento de creatinina exógena en plasma²⁵⁸. En consecuencia, los autores concluyeron que el RBP urinario no era útil en el diagnóstico para la detección de ligeras disminuciones de la TFG en las primeras etapas de la enfermedad renal. Además, Lavoué R *et al.*¹⁷⁶, en 2015, y Hokamp JA *et al.*¹³¹, en 2016, no observaron un aumento evidente en enfermedades que cursan con ERC. Por lo tanto, estos datos

indican que el RBP urinario podría ser un marcador prometedor de disfunción tubular en perros, pero son necesarios la realización de más estudios en DRA⁶⁸.

Lipocalina-gelatinasa neutrófila urinaria

La lipocalina-gelatinasa neutrófila (NGAL) es una proteína de 25 kDa covalentemente unida a la gelatinasa de los neutrófilos. En condiciones fisiológicas se encuentra en baja concentración en la orina, pero se puede ver aumentado en caso de daño tubular. Diversos estudios han puesto de manifiesto que el valor en orina de NGAL puede predecir la existencia de lesión renal aguda antes de que el valor de creatinina plasmática aumente por encima del rango de referencia²⁹⁷. Otros estudios concluyen que el NGAL en plasma podría servir para diferenciar la lesión renal aguda (DRA) de la ERC³¹⁹ teniendo una mejor relevancia pronóstica en pacientes con ERC¹³⁶.

Otros marcadores de función tubular:

Densidad y osmolalidad urinaria

Una de las principales funciones del riñón es reabsorber parte del agua filtrada a medida que el ultrafiltrado glomerular pasa por los túbulos renales. Por este motivo, la densidad de la orina que se excreta es superior a la del ultrafiltrado glomerular⁹⁰. Por otro lado, la osmolalidad del ultrafiltrado glomerular es idéntica a la del plasma³³.

La osmolalidad urinaria es una medida de la concentración de solutos en la orina. Se puede considerar como un parámetro más fiable que la densidad urinaria, puesto que cuando existe proteinuria o glucosuria marcada, la densidad urinaria, determinada mediante refractométrica, sobreestima la concentración de solutos y, por tanto, la capacidad de concentración renal. No obstante, y debido a la sencillez de su determinación, se sigue utilizando más frecuentemente la densidad urinaria en el ámbito clínico⁴⁶. La osmolalidad máxima de la orina de un perro puede llegar a ser de 2.400 mOsm/kg³³.

La valoración de la densidad urinaria permite diagnosticar más precozmente la lesión renal que la creatinina plasmática, ya que la isostenuria ocurre cuando el 66% de las

nefronas no son funcionales⁴⁶. Sin embargo, este parámetro puede verse modificado con facilidad, y en ocasiones puede ser de difícil interpretación.

Excreción fraccionada de electrolitos

La mayoría de los iones se filtran libremente a nivel glomerular, y es en los túbulos proximales donde sufren el proceso de reabsorción. Es debido a este principio fisiológico por el que cuando aumenta su excreción urinaria se pueden considerar como marcadores de daño de los túbulos proximales.

La excreción urinaria de iones se recomienda que se realice a partir de la orina recogida durante 24 horas, lo cual es impracticable en la mayoría de los casos en medicina veterinaria. Por este motivo se determina la excreción fraccionada (EF) a partir de una muestra de orina obtenida en cualquier momento y simultáneamente con una muestra de sangre¹⁸³.

La EF de un ion refleja la tasa relativa de excreción del mismo, comparada con la de creatinina; por tanto, depende de la concentración del ion en orina y en plasma, así como de la concentración urinaria y plasmática de creatinina²⁰, está fuertemente influenciada por factores extrarrenales que intervienen en la concentración de iones en plasma, fundamentalmente la composición de la dieta³⁵⁵. Un estudio presentado en 2015 revela que la excreción fraccional de sodio (EFNa) muestra diferencias estadísticamente significativas entre pacientes que sobreviven o no a un DRA, mostrando además que estos cambios de mejoría aparecen más precozmente que la resolución de la azoemia³⁶.

V.4 Concentración en sangre de cistatina C en otras enfermedades

V.4.1 Leishmaniosis

La leishmaniosis es una enfermedad parasitaria causada por protozoos del género *leishmania*. La respuesta inmune frente a este parásito produce una estimulación policlonal de linfocitos B, que hace que aumente la producción de inmunoglobulinas específicas e inespecíficas, uniéndose a los antígenos del parásito y a fracciones del complemento⁴¹. Los inmunocomplejos circulantes formados por esta reacción se

depositan en las paredes vasculares, favoreciendo fenómenos inflamatorios en distintos tejidos: bazo, hígado, piel, así como en barreras naturales de filtración (riñón, cuerpos ciliares del ojo, plexos coroideos)¹⁶⁰.

En el riñón, específicamente, se produce una glomerulonefritis como consecuencia del depósito de inmunocomplejos, que desemboca finalmente en una insuficiencia renal. Este aumento en la producción de inmunoglobulinas explica la mayor proteinemia de los perros con esta patología, debida principalmente a una hipergammaglobulinemia, que favorecerá el desarrollo de una glomerulonefritis y dará como resultado que estos animales presenten valores más altos en su UP/C, así como la aparición de hipoalbuminemia (al ser esta proteína de bajo peso molecular, es una de las más afectadas por el daño glomerular)^{41,160}. Por ello, la cistatina C también presenta gran interés clínico en perros con leishmaniosis visceral.

En medicina humana los niveles séricos de cistatina C presentan una correlación positiva con la cantidad de inmunocomplejos circulantes y con la producción de factor estimulante de colonias granulocito-macrófago (granulocyte-macrophage colony stimulating factor o GM-CSF), dos de los factores productores de disfunción glomerular en leishmaniosis⁸³.

En un estudio realizado en perros con leishmaniosis visceral, se encontró un valor medio de cistatina C sérica significativamente mayor que la obtenida en un grupo control. Sin embargo, los niveles séricos de creatinina en los animales enfermos eran menores que los del control, pero sin llegar a alcanzar nivel de significación estadística²³⁷. No obstante, los niveles de cistatina C sérica, aun siendo estadísticamente significativos mayores respecto al grupo control, se podrían incluir dentro de valores de normalidad aportados por otros autores^{11,35}. Es importante señalar que en este estudio no se calculó la TFG de los animales, ni se realizó biopsia renal, por lo que es difícil establecer si el posible incremento de cistatina C sérica encontrado es debido al daño renal causado por los inmunocomplejos, a un factor extrarenal aún desconocido o a una combinación de ambos¹⁰². Un estudio llevado a cabo en 2015 estudió la concentración de cistatina C en un grupo de perros con leishmaniosis, proteinuria y azoemia (UP/C > 0,5 y creatinina > 1,2 mg/dL) con

leishmaniosis pero sin azoemia ni proteinuria (UP/C < 0,2), así como con un grupo de perros con leishmaniosis y en el límite de la proteinuria (UP/C entre 0,2 y 0,5) y un cuarto grupo de perros proteinúricos pero sin azoemia (UP/C > 0,5). Sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de cistatina C sérica entre el grupo con azoemia y proteinuria respecto al no proteinúrico y no azoémico¹⁰⁰.

V.4.2 Hipotiroidismo

En medicina humana se ha comprobado que el hipertiroidismo produce un incremento del flujo renal y, por lo tanto, un aumento de la TFG³⁴⁸. El aumento de la TFG puede producir una disminución de la concentración sérica de creatinina, enmascarando pacientes con ERC⁹⁵. Un comportamiento contrario se ha apreciado en casos de hipotiroidismo^{105,167}.

Diversos estudios han demostrado que en los pacientes con tratamiento de hipertiroidismo disminuye la concentración de cistatina C sérica, mientras que en pacientes tratados de hipotiroidismo se veía incrementada^{97,148,365}. Pero otros autores no encontraron modificaciones en los niveles de cistatina C sérica en pacientes con hipertiroidismo o hipotiroidismo no tratados¹⁹⁸.

La función de la TSH y hormonas tiroideas también pueden estar alteradas debido a enfermedades no tiroideas (*síndrome del enfermo eutiroideo*) o, con menos frecuencia, a la utilización de diferentes medicamentos^{322,327}. En estas situaciones, aún no está claro si la concentración de cistatina C se ve afectada. Las hormonas tiroideas pueden influir alterando su tasa de producción³⁶⁵. Se considera que la tasa de producción de cistatina C por la mayoría de las células nucleadas es constante¹, y que las hormonas tiroideas pueden influir en dicha tasa de producción. Sin embargo, se desconoce en estos momentos si todas las células formadoras de cistatina C se ven afectadas del mismo modo³⁶⁵.

No se han descrito valores de cistatina C en el hipotiroidismo canino, una de las principales patologías endocrinas en esta especie. Se desconoce la verdadera incidencia de la enfermedad debido a la dificultad en confirmar el diagnóstico. Tanto la

enfermedad en sí, como su tratamiento están descritos desde hace más de 100 años¹⁵².

V.4.3 Enfermedad cardíaca congestiva

En medicina humana se ha demostrado que la cistatina C sérica es un marcador de riesgo de insuficiencia cardíaca^{76,210,285}. En 2005 se publicó un estudio en el que se mostraba una cohorte de un estudio de salud cardiovascular compuesto por 4.384 personas adultas, sin clínica de insuficiencia cardíaca, a las que se les determinaron los niveles séricos de creatinina y cistatina C, realizándose un seguimiento de estos pacientes durante 8 años. El objetivo del estudio fue intentar encontrar un marcador de riesgo de padecimiento de enfermedad cardiovascular. Tras ajustar los resultados a los factores de riesgos cardiovasculares tradicionales, el estado cardiovascular al comienzo del estudio y las medicaciones empleadas, se demostró que el aumento de la concentración de cistatina C sérica se acompañaba de un incremento paralelo del riesgo de tener insuficiencia cardíaca. Por el contrario, la creatinina sérica no resultó predictiva²⁸⁵. Se demostró por vez primera que la cistatina C era un marcador de riesgo independiente de la función renal para el desarrollo de insuficiencia cardíaca.

En un análisis posterior de la misma cohorte del estudio de salud cardiovascular, pero que incluía algunos pacientes más, se demostró que la relación entre concentraciones de cistatina C sérica e incidencia de insuficiencia cardíaca era de carácter lineal para los pacientes con disfunción sistólica, mientras que entre los que tenían una disfunción diastólica sólo los percentiles más elevados de cistatina C se asociaron con un incremento del riesgo de insuficiencia cardíaca incidente²¹⁰. Por el momento, no se conoce con certeza la consistencia de esta observación ni los mecanismos subyacentes, que son dependientes de la afectación cardiovascular general y, más específicamente, renal²⁴³.

En este contexto, no se conoce con certeza si la cistatina C es un mero marcador pronóstico o un factor de riesgo independiente para el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Se ha argumentado que podría ser un marcador de la duración e intensidad de algunos factores de riesgo ya conocidos para el desarrollo de la misma. Por ejemplo, podría existir una relación de la cistatina C con un mayor daño renal

secundario a una hipertensión arterial más grave o peor controlada²⁴². Existe, de hecho, un estudio que indica que la asociación entre la cistatina C sérica y el riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca se restringiría exclusivamente a los sujetos con hipertensión arterial⁷⁶. También es posible que las concentraciones de cistatina C estuvieran asociadas a otros factores de riesgo no tradicionales, como la hiperhomocisteinemia o la hiperfibrinogenemia. Por último, tampoco podría descartarse que la reducción de la función renal, medida por la concentración de cistatina C, condujese a la retención de sodio y agua con la consiguiente aceleración del proceso de remodelado ventricular y el desarrollo de insuficiencia cardiaca⁷⁷.

Además de comportarse como un marcador del riesgo cardiovascular en las personas de edad avanzada antes de enfermar, y como un marcador del riesgo de desarrollar insuficiencia cardiaca, la concentración de cistatina C es un potente predictor de riesgo en aquellos otros sujetos que ya han desarrollado una insuficiencia cardiaca sintomática. Su valor predictivo es especialmente alto entre aquellos sujetos sin antecedentes de enfermedad cardiovascular previa⁷².

En 2008, Shlipak MG *et al.*³⁰¹, publicaron el primer estudio que investigó la capacidad predictiva de mortalidad de la cistatina C en pacientes ancianos con insuficiencia cardiaca. En este estudio se determinó su concentración en 279 pacientes mayores de 70 años, diagnosticados previamente de insuficiencia cardiaca, seguidos durante una media de 6,5 años. La concentración media de cistatina C fue de 1,26 mg/L y, por cada aumento de la desviación estándar (0,35 mg/L), la mortalidad se incrementaba en un 31%. El valor predictivo de la cistatina C se mantenía independientemente de las concentraciones de creatinina y de que la TFG estimada fuera mayor o menor de 60 mL/min. En pacientes con insuficiencia cardiaca descompensada y función renal moderadamente reducida (TFG entre 44 y 79 mL/min) las concentraciones de cistatina C son más predictivas de mortalidad de origen cardiaco que la estimación de la TFG tras ajustarlo a las distintas variables que pueden confundir la relación²¹⁸.

La capacidad predictiva de episodios mortales de la cistatina C se mantiene tanto en la insuficiencia cardiaca con función sistólica disminuida³³⁰ como preservada¹⁹⁹. En la primera, la concentración de cistatina C sérica se asocia, además, con un mayor

deterioro de la función diastólica del ventrículo izquierdo y de la función sistólica del ventrículo derecho³³⁰. La cistatina C ofrece, además, información pronóstica complementaria a la de otras variables, como la fracción de eyección o la concentración de péptidos natriuréticos^{4,199,330}.

Es indudable que la función renal es un factor pronóstico en la insuficiencia cardiaca y que la cistatina C es un marcador sensible de ésta, especialmente en los grados más leves de disfunción, en los que los marcadores clásicos están distorsionados y ofrecen una información más confusa. No obstante, no es ésta la única información que puede proporcionar. Una primera hipótesis, obviamente, es que se trata de un marcador más sensible de disfunción renal incipiente, reflejo de cambios preclínicos en la estructura cardiovascular²⁴³. En segundo lugar, se puede especular que se asocia de modo primario a un fenotipo hipertensivo con hipertrofia ventricular⁷⁶ y, por tanto, sería un mero marcador subrogado de ésta. Por último, es posible que sea un marcador sensible y directo del remodelado ventricular, independientemente de la función renal, directamente implicada en la patogenia de éste²⁴³.

Se ha analizado la relación de la cistatina C con la estructura y función del ventrículo izquierdo, mediante resonancia magnética, en una cohorte multiétnica de 2.548 participantes del Dallas Heart Study (DHS), con edades comprendidas entre 30 y 65 años²³⁹. Se asoció de modo independiente con un fenotipo cardíaco específico de hipertrofia concéntrica del ventrículo izquierdo, y por consiguiente con aumento de la masa ventricular, el grado de distribución concéntrica de la pared y el grosor de ésta, que persistía incluso después de ajustarlo a la función renal medida por varios métodos tradicionales. Esta asociación era particularmente consistente en sujetos de raza negra. Por el contrario, no se asoció con la función sistólica ni con el volumen del ventrículo izquierdo. Los autores indican que la cistatina C puede ser un factor potencial de predicción de la presencia o desarrollo de anomalías estructurales del corazón³²⁶. Esta última posibilidad es ciertamente atractiva, ya que la cistatina C puede estar implicada primariamente en el remodelado ventricular.

El equilibrio entre las cisteinaproteasas, como las catepsinas B, S y K, y sus inhibidores, como la cistatina C, se ha involucrado en la patogenia del remodelado y la hipertrofia

ventricular del corazón insuficiente^{44,326}. Las catepsinas son las causantes del proceso fisiológico de digestión de determinadas proteínas a nivel celular que pudieran influir en la hipertrofia miocárdica²⁸³. El desequilibrio de otras proteasas, las metaloproteinasas, y sus antagonistas, las TIMP, también desempeñan un papel activo en la patogenia de la insuficiencia cardiaca y la posible diferenciación hacia formas con preservación o deterioro de la función sistólica³⁰⁰.

El empleo combinado de biomarcadores en la estratificación pronóstica de la insuficiencia cardiaca es muy atractivo. Se puede plantear la hipótesis de que los distintos marcadores son, en realidad, una expresión medible de los mecanismos fisiopatológicos que intervienen en la insuficiencia cardiaca y que, por tanto, pueden aportar información complementaria, reflejo del deterioro funcional, más o menos intenso, de cada paciente^{79,199}.

En conclusión, el uso de biomarcadores en la evaluación de los pacientes con insuficiencia cardiaca puede añadir ventajas al examen clínico habitual. Por un lado, permitiría profundizar en las alteraciones fisiopatológicas subyacentes en cada caso, lo que, a su vez, contribuiría a mejorar la estratificación del riesgo de estos pacientes y, por otro lado, la identificación precoz de los sujetos más frágiles (aquellos que precisan medidas de supervisión, seguimiento y tratamiento más estrictas) puede facilitarse mediante estrategias que combinen junto con el examen físico y las pruebas de imagen, la determinación de los biomarcadores que hayan demostrado más utilidad. De entre éstos, a la luz de la bibliografía actual, la cistatina C emerge como uno de los más atractivos y probablemente más precoces²⁴³.

A pesar de su evidente utilidad y potencialidad, la determinación de cistatina C en la insuficiencia cardiaca todavía no se ha extendido y quedan interrogantes a los que se debe dar respuesta. No se conoce si existe un momento óptimo para su detección, durante las agudizaciones o en la fase de compensación. Tampoco si su determinación seriada es de mayor utilidad que una única medición. No se conoce con precisión si existen diferencias en su valor pronóstico entre los pacientes con insuficiencia renal en función del grado de preservación de la fracción de eyección. Aunque se ha estudiado en la cardiopatía coronaria, la hipertensión arterial y la diabetes, por ejemplo, se

desconoce su valor en otras enfermedades prevalentes, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en la que existe activación inflamatoria y aumento de la actividad proteásica en el pulmón. También se desconocen cuáles son las causas de por qué los pacientes con elevación de los valores de cistatina C sérica tienen un índice de mortalidad mayor. No hay información sobre la relación entre la cistatina C y otros marcadores de remodelado vascular, y existen muchas otras incógnitas por resolver de este marcador²⁴³.

El incremento de riesgo vascular en relación con la función renal no tiene un umbral preciso, ya que no se trata de una relación de tipo lineal. Esto quiere decir que sujetos con aclaramientos de creatinina discretamente reducidos pueden tener incrementos significativos del riesgo vascular³²⁰. Y es precisamente en este intervalo donde la cistatina C se comporta de un modo más predecible que la creatinina²⁰³.

Por último, las concentraciones de creatinina sérica se elevan hasta un 15–30% tras la administración de inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina o antagonistas de la angiotensina. La cistatina C parece que no se incrementa, o si se ve incrementada, lo hace en un grado menor, por lo que sería un mejor indicador de la función renal en pacientes tratados con fármacos antagonistas del sistema renina-angiotensina-aldosterona²⁰³.

V.4.4 Neoplasias

En general, un gran número de procesos normales y anormales son controlados por un equilibrio entre las proteinasas y sus inhibidores³⁰⁹. Se conoce que varias proteasas lisosomales, incluyendo la cisteína proteasa y la catepsina B, están implicadas en la progresión de tumores malignos²²⁰. La cistatina C podría estar implicada en la regulación de estos procesos, puesto que es considerada el inhibidor más fuerte de la catepsina B, con una constante de inhibición muy baja, de 0,25¹⁵.

Los principales estudios sobre la relación de la cistatina C y el cáncer se llevaron a cabo en la década de los 90 y en los primeros años de la década siguiente. La cistatina C tiene dos grandes propiedades antitumorales. En primer lugar, es uno de los principales inhibidores de las catepsinas, que son las enzimas tumorales que causan degradación

de las membranas basales, por lo que disminuye el potencial metastásico²⁹⁸. En segundo lugar, inhibe al transforming growth factor-beta (TGF- β)^{313,314}. Sin embargo, aún se desconoce el papel exacto que juega la cistatina C en la oncogénesis.

Un desequilibrio entre catepsinas y cistatinas, que puede estar asociado con el fenotipo de células tumorales metastásicas, puede facilitar la invasión de células tumorales (metástasis) y ser responsable de recaída temprana en la enfermedad después de la eliminación del tumor primario. El complejo de la catepsina B-cistatina C fue encontrado en concentraciones menores en el suero de pacientes con tumores malignos que en aquellos con enfermedades benignas o en los sujetos control sanos, lo que sugiere la importancia de este complejo para el control de la capacidad metastásica y de recidiva de las neoplasias¹⁶².

En pacientes con cáncer de pulmón y cáncer colorrectal, se demostró que el nivel sérico del complejo catepsina B-cistatina C disminuye a medida que avanza la neoplasia de estirpe maligna³⁷⁹. Esta disminución podría ser causada por una menor capacidad de unión entre la enzima y el inhibidor de unión reversible. Existen varios estudios que postularon una serie de factores asociados a tumores, que afectan a la afinidad entre catepsina B-cistatina C, incluyendo cambios en la glicosilación¹³⁸, la presencia de los activadores de la proteinasa de cisteína³⁰², o la unión de glicosaminoglucanos⁷. Una observación similar fue descrita en otro estudio en el que los niveles de catepsina B y cistatina C fueron evaluados en tipos de células que constituyen los adenomas hipofisarios humanos y en tejido adenohipofisario normal³⁷².

Se ha demostrado una correlación significativa entre el aumento de la actividad de la catepsina B y el aumento de la capacidad metastásica de los tumores de animales, así como la malignidad de los tumores humanos. Estos incrementos en la actividad de la catepsina B corresponden en parte al aumento de las cantidades de transcripciones de ARNm de la catepsina B y en parte a la reducción de la regulación endógena por un inhibidor Mr-cisteína proteinasa³⁰⁸. Su concentración *in vivo* podría influir en la metástasis en algunos tejidos.

En un estudio, se pensó que la disminución de la diseminación metastásica de las células B16-F10 en ratones homocigotos para un alelo nulo de la cistatina C es el resultado de reducciones tanto en la siembra tumoral como en el crecimiento tumoral en pulmón¹³⁷. Por el contrario, las células de glioma humano (SNB19) que sobreexpresa la cistatina C no formaron tumores tras la inyección en el cerebro de ratón¹⁶¹. A pesar de estos resultados contradictorios, la medición de cisteína proteinasas y sus inhibidores en los tejidos tumorales pueden ser útiles en la predicción de la supervivencia y la recaída en los tumores de mama¹⁷¹, de pulmón³⁴⁶, cerebro³²⁵, colorrectal¹²⁸ y tumores en cuello y cabeza³²⁴. También resultaron ser indicadores pronósticos significativos cuando se mide de forma extracelular, por ejemplo, en los fluidos corporales de pacientes con melanoma¹⁶³ y con tumores de ovario¹⁷² de útero o colorrectales¹⁶².

En el cáncer de mama humano, la expresión de ARNm para la catepsina B es mayor en el tejido canceroso en comparación con el no canceroso, mientras que la expresión de ARNm para la cistatina C es menor en el tejido canceroso en comparación con el tejido sano³⁷⁰. Estas diferencias no son estadísticamente significativas; sin embargo, la relación de la cistatina C/catepsina B difiere significativamente ($P < 0,05$) lo que demuestra un desequilibrio entre la catepsina B y la cistatina C entre el tejido canceroso (2,54) y los tejidos no cancerígenos (5,69) en las primeras etapas de la progresión y el crecimiento del cáncer³⁷⁰.

El carcinoma anaplásico de tiroides tiene células gigantes tipo osteoclasto que expresan cisteína proteinasas y cistatina C. La expresión de la catepsina B y K en el carcinoma anaplásico de tiroides puede contribuir al comportamiento invasivo de este tipo de tumor, la metástasis y la promoción de la destrucción del cartílago traqueal¹⁰¹.

En un estudio sobre la catepsina B y la cistatina C en el cáncer de colon humano, se demostró que la actividad de la primera era totalmente neutralizada por la cistatina C recombinada, sugiriendo una interacción potencial la catepsina B secretada extracelular y la cistatina C. Esta interacción puede participar en la modulación del fenotipo de invasibilidad del cáncer de colon⁵⁸. Posteriormente, se observó que una forma latente de la catepsina B secretada por las células tumorales del cáncer de

colon, podía estar activada por la elastasa de neutrófilos *in vivo*, más que estar controlada por la secreción de inhibidores de la cistatina C¹⁵⁷. Finalmente se postuló que la cistatina C puede verse inactivada en fases iniciales, y reactivada por un mecanismo de dimerización²⁰⁴. Kos J y colaboradores¹⁶² en 2000, encontraron una correlación entre niveles extracelulares altos de inhibidores de cisteína proteasa y esperanza de vida reducida en pacientes con cáncer colorrectal, en particular si presentaban niveles elevados de cistatina C plasmática (> 0,68 mg/L, correspondiente al percentil 50), demostrando un riesgo de muerte mayor que en aquellos pacientes con niveles plasmáticos de cistatina C < 0,68 mg/L.

Un aumento en la expresión de cistatina C se ha demostrado que inhibe la motilidad y la capacidad de invasión del melanoma *in vitro* en un 50% en células estimuladas con factores de motilidad autocrinos y en células no estimuladas²⁹⁹. La sobreexpresión de cistatina C en el melanoma B16 afecta a las propiedades metastásicas del mismo⁶².

Combinaciones de cistatinas cuantitativamente diferentes son los principales constituyentes de la inhibición de la catepsina B en cáncer de pulmón de células escamosas y el tejido pulmonar normal¹⁶⁸. Sin embargo, no se ve incrementada significativamente en el tejido pulmonar tumoral con respecto al normal⁸⁰.

En las líneas celulares del glioma humano, la cantidad de cistatina C disminuye al aumentar las de catepsina B y, por lo tanto, la malignidad del proceso. La sobreexpresión de cistatina C en las líneas celulares malignas del glioma por transferencia de un vector que contiene cADN de cistatina C, resulta en una disminución de la invasibilidad del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiriendo que la cistatina C podría ser utilizada como un marcador diagnóstico además de como un agente coadyuvante terapéutico en el glioma maligno¹⁶¹.

En el mieloma múltiple, un estudio realizado en 60 pacientes demostraba una ausencia de correlación entre los niveles de cistatina C plasmática y la carga tumoral⁹². Este resultado fue confirmado por otro estudio, en el que se observó que los niveles de cistatina C no eran significativamente superiores en pacientes con desórdenes hematológicos proliferativos (mieloma múltiple y leucemia crónica y aguda) y función renal normal en comparación con el grupo de individuos sanos^{9,207}. Sin embargo, otros

estudios apreciaron niveles significativamente superiores en los valores de cistatina C sérica en el caso de carcinomas y leucemias no tratadas^{71,324}. De todas formas, los niveles plasmáticos de cistatina C miden mejor los cambios en la TFG que los de creatinina plasmática en pacientes oncológicos, independientemente de la presencia de metástasis o tratamiento quimioterápico³¹⁸.

V.4.5 Influencia de los corticoides sobre la cistatina C plasmática

Los corticoesteroides son fármacos antiinflamatorios empleados con frecuencia en diversas patologías, y concretamente en nefrología de medicina humana³⁰. En muchas ocasiones es necesario monitorizar la función renal de pacientes que siguen un tratamiento con estos fármacos, y una posible interacción entre la administración de corticoides y la concentración plasmática de cistatina C sería de vital importancia si se emplea esta proteína como marcador de funcionalidad renal. En medicina humana se pueden encontrar diversas publicaciones sobre la influencia de los corticoides en la concentración de cistatina C plasmática. En la mayoría de los casos se observa una relación entre la administración de estos fármacos y un aumento significativo de cistatina C. Sin embargo, no en todos se han obtenido los mismos resultados.

Bjarnadottir M *et al.*²⁴ (1995) publicaron el primer estudio *in vitro* que hace referencia a esta interacción. Estos autores afirmaron que la dexametasona producía un incremento significativo (80%) y dosis-dependiente, de los niveles de cistatina C en células cultivadas HeLa, tras 48 horas de tratamiento. Este incremento se produjo también con dosis bajas de dexametasona, lo que sugiere que los glucocorticoides podrían jugar un papel fisiológico en la producción de cistatina C. Además, se investigó la influencia de la dexametasona en la expresión del gen de la cistatina y finalmente se propuso que el efecto de los corticoides sobre la cistatina C se debe a un aumento del promotor que participa en la transcripción del gen de la cistatina C.

En el año 2000 se realizó un estudio sobre la cistatina C en pacientes asmáticos tratados con corticoides (metilprednisolona, dosis de 40 mg/24h) y ciclosporina A. Tras una semana de terapia, se observó un incremento de la concentración plasmática de cistatina C en los sujetos que habían recibido metilprednisolona. Sin embargo, se

observó el mismo incremento en el 50% de los pacientes que no habían recibido corticoides⁵¹.

Un año más tarde, Risch L *et al.*²⁷⁰ evaluaron el efecto de los corticoides sobre la cistatina C en individuos que habían sufrido un trasplante renal. Para ello establecieron 4 grupos de pacientes en función del tratamiento pautado (dosis bajas de prednisona, dosis altas de metilprednisolona durante 3 días, ciclosporina A y ciclosporina A junto con azatioprina). Al comparar la concentración plasmática de cistatina C entre ellos observaron que aquellos pacientes que habían recibido glucocorticoides presentaban niveles más altos de cistatina C que los otros 2 grupos. Además, los pertenecientes al grupo que había recibido dosis altas de metilprednisolona (500 mg) tenían valores de cistatina C significativamente más altos que aquellos que seguían un tratamiento con prednisona a dosis bajas (< 10 mg/kg), lo que sugiere una influencia dosis dependiente de los corticoides sobre la cistatina C^{268,270}. Estos hallazgos corroboran los resultados de otro estudio previo realizado con pacientes pediátricos, en el que se observó un incremento de casi un 30% en los niveles plasmáticos de cistatina C entre los días 2 y 6 post-trasplante²⁹. Un estudio posterior confirmó estos resultados en adultos tratados con 500 mg/24h de metilprednisolona intravenosa durante 3 días. Según los autores, existe un incremento dosis dependiente de cistatina C tras la administración de metilprednisolona, pero este se produce a las 24 horas del tratamiento, antes de lo que se ha publicado previamente, y alcanza el nivel máximo dos días después²⁴⁷. En 2005 Risch L²⁶⁹ realizó otro estudio con resultados similares en pacientes con hemorragia subaracnoidea.

Un estudio posterior realizado en niños con síndrome nefrótico idiopático que mantenían una función renal normal, concluyó que las concentraciones séricas de cistatina C no se veían afectadas por un tratamiento con dosis altas de corticoides en niños con síndrome nefrótico³⁰. Las diferencias entre estos resultados y los obtenidos por Bjarnadóttir M²⁴ en 1995 pueden deberse a un incremento en la eliminación de cistatina, como consecuencia del aumento de la TFG asociado al síndrome nefrótico. Otra posible explicación es la diferencia en el potencial biológico de la dexametasona empleada *in vitro* y la prednisona empleada para el tratamiento del síndrome

nefrótico, de forma que no se pueden extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a los cambios bioquímicos observados *in vivo*³⁰.

Estos mismos autores, llevaron a cabo otro estudio en niños que presentaban enfermedad renal o tumores malignos y seguían un tratamiento con corticoides (prednisona a dosis media de 33 mg/m², durante un mínimo de 5 días consecutivos, o 10 días de forma discontinua). Los resultados mostraron un débil pero significativo aumento de la cistatina C durante el tratamiento, por lo que los autores concluyeron que la terapia con glucocorticoides lleva a una infraestimación de la TFG si se emplea la cistatina C para determinarla. Además, afirmaron que los corticoides afectan al metabolismo extrarrenal de la cistatina C, lo que limita el uso de esta proteína como marcador de la TFG en distintas situaciones clínicas²⁸.

También se ha investigado la influencia de los corticoides sobre la cistatina C en pacientes pediátricos con púrpura trombocitopénica idiopática aguda y leucemia linfoblástica aguda. En el primer caso se administró 6-metilprednisolona en infusión intravenosa a una dosis de 100 mg/m²/24h durante 3 días, y posteriormente se redujo de forma progresiva en un periodo mínimo de 4 semanas. En el segundo caso se administró prednisona vía oral a una dosis inicial de 30 mg/m², que se fue incrementando de forma gradual hasta llegar a los 60 mg/m² el día 6. Los resultados mostraron un aumento significativo de la cistatina C en los pacientes que habían seguido el tratamiento con metilprednisolona, mientras que no se observaron variaciones reseñables en los pacientes que habían recibido prednisona. Los autores explican esta diferencia de resultados proponiendo un efecto doble de los corticoides en individuos con leucemia. Por un lado, estos fármacos inmunosupresores provocan una reducción de la carga leucémica y de la infiltración renal, lo que conlleva una mejora de la función glomerular, y por lo tanto unos valores menores de cistatina C. Por otro lado, los corticoides provocan un incremento de la cistatina C independientemente de la función renal. De esta forma, la ausencia de cambios en la concentración sérica de cistatina C en pacientes con leucemia se debe al resultado de estos dos efectos biológicos opuestos¹⁴. Finalmente se ha realizado un estudio en 42 pacientes con nefritis asociada a lupus eritematoso sistémico, tratados con glucocorticoides vía intravenosa y vía oral. Los individuos se dividieron en dos grupos

en función de la dosis de corticoides administrada: alta (metilprednisolona y prednisona > 0,5 mg/kg/24h) y baja (prednisona < 0,5 mg/kg/24h). En este caso los resultados no mostraron ninguna relación entre los corticoides y los niveles séricos de cistatina C, como ya había sucedido en un estudio previo³⁰. Esta ausencia de relación entre ambas sustancias puede deberse, entre otras causas, al uso previo y concurrente de glucocorticoides. Se puede especular que el gen que codifica la cistatina C ya estaba activado por la inducción del promotor, determinado por el uso previo del fármaco, y por lo tanto no se producirían cambios en la activación ni alteraciones en los niveles de cistatinaC³⁵².

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el objeto de proceder al estudio de la cistatina C plasmática y urinaria en el perro se ha procedido, en primer lugar, a la verificación de un método inmunturbidimétrico para su determinación, fabricado y diseñado para el diagnóstico en medicina humana, y validado previamente para la especie canina por Almy FS *et al.*⁸ en 2002, ya que constituye el método de laboratorio más utilizado. Posteriormente, se ha estudiado la concentración de cistatina C plasmática y urinaria en diferentes grupos de perros, clasificados en función del proceso patológico que padecen, tanto renal como no renal, para comprobar su comportamiento y utilidad diagnóstica.

VI.1 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C plasmática.

Para la verificación del método inmunturbidimétrico de determinación en plasma de cistatina C utilizado en los perros del estudio (previamente validado por Almy FS *et al.*⁸ en 2002), se han evaluado los siguientes parámetros: linealidad, límites, precisión, veracidad y aplicabilidad.

Para ello, se utilizaron los siguientes reactivos y muestras:

- Estándares de cistatina C de concentraciones conocidas: 0,5 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L y 10 mg/L (Spinreac[®], España).
- Plasma sanguíneo canino procedente de una hembra esterilizada, sana y de 4 años de edad, paciente del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Universidad de Extremadura (UEx), con una concentración de cistatina C de 0,06 mg/L.

Linealidad

La linealidad se define como la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del parámetro que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio. Para determinar la linealidad del método se realizaron tres curvas de calibración con cuatro estándares de concentración conocida, determinándose el valor del coeficiente de correlación promedio de las tres curvas.

Límites

Para el cálculo de los límites se deben tener en consideración los siguientes parámetros:

Valor crítico (LC): se define como la concentración o cantidad neta que, en el caso de superarse, da lugar, para una probabilidad de error dada α , a la decisión de que la concentración o cantidad del analito presente en el material analizado es superior a la contenida en el material testigo.

$$LC = t(1-\alpha; v) \times S_0 \quad \text{Si: } t(0,05, \infty) \rightarrow 1,645 \quad LC = 1,645 \times S_0$$

Donde: t = t-Student; $1-\alpha$ = probabilidad b ; v = grados de libertad; S_0 = desviación estándar de las lecturas del blanco matriz o testigo reactivo.

Límite de detección (LOD): se define como la concentración o cantidad real del analito presente en el material objeto de análisis que llevará, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración o cantidad del analito es mayor en el material analizado que en el material testigo.

$$LOD = 2t(1-\alpha; v) \times S_0 \quad \text{Si: } t(0,05, \infty) = 1,645 \quad LC = 1,645 \times S_0$$

$LOD = 3,29 \times S_0$, cuando la incertidumbre del valor medio esperado del material testigo es insignificante, $\alpha = \beta = 0,05$ y el valor estimado tiene una distribución normal con una varianza constante conocida.

Límite de cuantificación (LOQ): se define como una característica del método que suele expresarse como señal del valor verdadero de la medición que producirá estimaciones con una desviación estándar relativa (RSD), generalmente del 10%. El LOQ se calcula mediante la siguiente fórmula: $LOQ = 10 \times S_0$.

Para el cálculo de los límites se realizaron diez ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración al LOD esperado. Para ello se utilizó un plasma con concentración de cistatina C de 0,06 mg/L. Es necesario que la muestra presente una distribución normal. Por ello, previamente al cálculo de los límites mencionados,

se comprobó la distribución de normalidad de la muestra mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Precisión

La precisión puede establecerse en términos de repetitividad y reproducibilidad. El grado de precisión se expresa habitualmente en términos de imprecisión y se calcula como desviación estándar de los resultados.

Repetitividad: precisión bajo condiciones de repetitividad, es decir, condiciones donde los resultados de análisis independientes se obtienen con el mismo método en ítems de análisis idénticos, en el mismo laboratorio y por el mismo operador, utilizando el mismo equipamiento dentro de intervalos cortos de tiempo. Para calcular la repetitividad se realizaron diez ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración medio de la curva. Para ello, se utilizó una muestra certificada con concentración de cistatina C de 3 mg/L. Seguidamente, se calcularon la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Reproducibilidad: precisión bajo condiciones de reproducibilidad, es decir, condiciones donde los resultados de los análisis se obtienen con el mismo método en ítems idénticos de análisis en condiciones diferentes: de laboratorio, realización por diferentes operadores, uso de distintos equipos u otras condiciones. Para calcular la reproducibilidad se realizaron en un total de 10 días consecutivos 10 ensayos de medición por distintos operadores de una matriz de muestra en un nivel de concentración medio de la curva. Para ello, se utilizó una muestra certificada con concentración de cistatina C de 1,5 mg/L.

Veracidad

La veracidad determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. En el presente trabajo se ha determinado el sesgo, definido como la diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o medición y el valor verdadero. En la práctica, el valor convencional de cantidad puede sustituir al valor verdadero. Para calcular el

sesgo se determinó la concentración de cistatina C de un material de referencia certificado con una concentración de 3 mg/L, realizando en un mismo día 10 mediciones del mismo material.

Seguidamente, se evaluó el sesgo utilizando la prueba t-Student, comparando el t calculado (tcal) con el t teórico o crítico (tcrit). Para calcular el tcal se utilizó la siguiente fórmula:

$$tcal = [X - Xa] / S \times \sqrt{n}$$

Donde: X = media; Xa = concentración conocida de cistatina C; S = desviación estándar; n = número de mediciones.

VI.2 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C urinaria.

Con el objetivo de comprobar si la validación realizada previamente por Almy FS *et al.*⁸ en 2002 sobre el método inmunoturbidimétrico de determinación de cistatina C utilizado en perros es adecuado para la determinación de cistatina C en orina, se han evaluado los siguientes parámetros: límites y precisión. El resto del estudio de verificación (linealidad y veracidad) es aplicable al realizado para el plasma.

Para ello, se utilizaron las siguientes muestras:

- Orina procedente de una perra esterilizada, sana y de 4 años de edad, paciente del HCV de la UEx, con una concentración de cistatina C = 0,04 mg/L.
- Orina procedente de una perra esterilizada, sana y de 5 años de edad, paciente del HCV de la UEx, con una concentración de cistatina C = 1,5 mg/L.
- Orina procedente de una perra esterilizada, sana y de 3 años de edad, paciente del HCV de la UEx, con una concentración de cistatina C = 1,3 mg/L.

Límites

Para el cálculo de los límites se utilizó el planteamiento descrito para el plasma. Se realizaron diez ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración al LOD esperado. Para ello, se utilizó la orina extraída de una hembra con una concentración de cistatina C de 0,04 mg/L. Es necesario que la muestra

presente una distribución normal. Por ello, previamente al cálculo de los límites mencionados, se comprobó la distribución de normalidad de la muestra mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

Precisión

Para el estudio de la precisión se utilizó el planteamiento descrito para el plasma.

Repetitividad: se realizaron diez ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración en el nivel medio de la curva. Para ello, se utilizó una muestra de concentración de cistatina C de 1,5 mg/L. Seguidamente se calcularon la media, desviación estándar y coeficiente de variación.

Reproducibilidad: Se realizaron en un total de 10 días consecutivos 10 ensayos de medición de una matriz de muestra en un nivel de concentración en el nivel medio de la curva. Para ello se utilizó una muestra de una concentración de cistatina C de 1,3 mg/L.

VI.3 Población objeto de estudio

Se ha realizado un estudio prospectivo de 342 perros, pacientes de la Unidad de Medicina Interna de Pequeños Animales del HCV de la UEx, en un periodo de tiempo comprendido entre enero de 2014 y abril de 2017.

Puesto que todos los animales son pacientes del HCV y no se realizó ningún acto considerado como experimentación animal por la legislación vigente (Real Decreto 53/2013), no fue necesario el permiso del Comité de Ética de Experimentación Animal de la UEx.

Los animales fueron distribuidos en grupos para facilitar su estudio de la siguiente forma:

VI.3.1 Grupo control

Formado por 43 perros sanos, que habían acudido al hospital para una revisión clínica o dentro de un programa de esterilización. Los propietarios fueron debidamente

informados sobre el uso de los datos clínicos de sus animales y otorgaron el correspondiente consentimiento. Para ser admitidos en este grupo, todos ellos cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Procedencia de particulares, con el fin de conocer el historial médico.
- Estar sanos, demostrado mediante la correspondiente anamnesis y exploración clínica.
- Estar correctamente desparasitados y vacunados.
- No presentar anomalías en los análisis de sangre (hematología y bioquímica plasmática) y de orina.
- Ser negativos en las pruebas de leishmaniosis.

VI.3.2 Daño renal agudo

Constituido por 40 animales. Este grupo se ha subdividido, a su vez, en 4 subgrupos, atendiendo a los criterios establecidos por la International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴².

- **IRIS I:** 10 perros con concentración de creatinina plasmática comprendida entre 1,3 y 1,6 mg/dL. Criterios de inclusión: animales con anamnesis, signos clínicos, hallazgos laboratoriales (glucosuria, cilindruria y/o proteinuria) y/o diagnóstico por imagen compatibles con DRA; presencia de oliguria, de origen reciente, con respuesta a la producción de orina rápidamente tras tratamiento con fluidoterapia (incremento en la producción de orina > 1 mL/Kg/h) en un plazo máximo de 6 horas; disminución de la creatinina sanguínea a valores normales en 48 horas.
- **IRIS II:** 10 perros con concentración de creatinina plasmática comprendida entre 1,7 y 2,5 mg/dL. Criterios de inclusión: anamnesis, signos clínicos, hallazgos laboratoriales (glucosuria, cilindruria y/o proteinuria) y/o diagnóstico por imagen compatibles con DRA; presencia de oliguria, de origen reciente, con respuesta a la producción de orina rápidamente tras tratamiento con fluidoterapia (incremento en la producción de orina > 1 mL/Kg/h) en un plazo

máximo de 6 horas; disminución de la creatinina sanguínea a valores normales en 48 horas.

- **IRIS III:** 10 perros con concentración de creatinina plasmática comprendida entre 2,6 y 5 mg/dL. Criterios de inclusión: DRA moderado y evidente según anamnesis, signos clínicos, hallazgos laboratoriales (glucosuria, cilindruria y/o proteinuria) y/o diagnóstico por imagen, acompañado de oliguria/anuria; signos clínicos y laboratoriales proporcionales al daño renal (uremia).
- **IRIS IV:** 10 perros con concentración de creatinina plasmática comprendida entre 5,1 y 10 mg/dL. Criterios de inclusión: DRA severo y evidente según anamnesis, signos clínicos, hallazgos laboratoriales (glucosuria, cilindruria y/o proteinuria) y/o diagnóstico por imagen, acompañado de oliguria/anuria; signos clínicos y laboratoriales proporcionales al daño renal (uremia).

No se ha incluido ningún perro en IRIS V.

VI.3.3 Enfermedad renal crónica

Constituido por 131 animales. Este grupo se ha subdividido, a su vez, en 4 subgrupos, atendiendo a los criterios establecidos por la International Renal Interest Society (IRIS)¹⁴².

- **IRIS 1:** 31 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,2 y 1,4 mg/dL. Criterios de inclusión: evidencia de ERC mediante el diagnóstico de enfermedad responsable de la misma, o bien mediante los datos aportados por la anamnesis, estudio radiológico, estudio ecográfico y presión arterial; sedimento urinario no activo; UP/C en valores límites de normalidad (0,2-0,4; persistente en un intervalo de tiempo que osciló entre 2 semanas y 2 meses) o patológicos (0,5-2; persistente en un intervalo de tiempo que osciló entre 2 y 4 semanas).
- **IRIS 2:** 32 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,4 y 2 mg/dL. Criterios de inclusión: evidencia de ERC mediante el diagnóstico de enfermedad responsable de la misma, o bien mediante los datos aportados por la anamnesis, estudio radiológico, estudio ecográfico y presión arterial;

sedimento urinario no activo; densidad urinaria < 1,030; UP/C en valores límites de normalidad (0,2-0,4; persistente en un intervalo de tiempo que osciló entre 2 semanas y 2 meses) o patológicos (0,5-6; persistente en un intervalo de tiempo que osciló entre 2 y 4 semanas).

- **IRIS 3:** 33 perros con creatinina plasmática comprendida entre 2,1 y 5 mg/dL. Criterios de inclusión: evidencia de ERC mediante el diagnóstico de enfermedad responsable de la misma, o bien mediante los datos aportados por la anamnesis, estudio radiológico, estudio ecográfico y presión arterial; sedimento urinario no activo; densidad urinaria < 1,030; UP/C en valores patológicos (> 0,5; persistente en un intervalo de tiempo de al menos 4 semanas).
- **IRIS 4:** 35 perros con creatinina plasmática superior a 5 mg/dL. Criterios de inclusión: evidencia de ERC mediante el diagnóstico de enfermedad responsable de la misma, o bien mediante los datos aportados por la anamnesis, estudio radiológico, estudio ecográfico y presión arterial; sedimento urinario no activo; densidad urinaria < 1,030; UP/C en valores patológicos (> 0,5; persistente en un intervalo de tiempo de al menos 4 semanas).

VI.3.4 Leishmaniosis canina

Se ha realizado un estudio de perros con leishmaniosis atendiendo a dos clasificaciones:

VI.3.4.1 Presencia de azoemia

Constituido por 166 animales. Este grupo se ha subdividido, a su vez, en 3 subgrupos, atendiendo a la presencia o no de azoemia y al padecimiento de leishmaniosis.

- **Leishmaniosis sin azoemia:** en este grupo se han incluido 35 perros positivos en las pruebas de leishmaniosis, y que no han desarrollado azoemia (rango de referencia de urea = 21,4 - 51,3 mg/dL; rango de referencia de creatinina = 0,7 - 1,2 mg/dL). Aunque no hay confirmación histológica del daño renal, se acepta

que los perros con leishmaniosis están en riesgo de padecer la enfermedad, presentando algún grado de lesión del riñón²¹.

- **Leishmaniosis con azoemia:** 63 perros enfermos de leishmaniosis y con ERC (incluidos en el Grupo IV.3.3 de ERC). Los criterios de inclusión utilizados han sido, además de los descritos según la clasificación IRIS para los perros con ERC, los siguientes: presentar signos clínicos y/o analíticos compatibles con leishmaniosis, incluyendo azoemia en todos los casos; confirmación de la enfermedad mediante visualización del parásito en muestras de citología de ganglio linfático y/o médula ósea o mediante técnicas de enzimoimmunoensayo en suero/plasma; comprobar la ausencia de otras enfermedades sistémicas que pudieran ser responsables de la ERC. Este grupo se ha subdividido, a su vez, siguiendo los criterios establecidos por IRIS (descritos en el grupo de ERC general), en:
 - IRIS 1: 16 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,2 y 1,4 mg/dL.
 - IRIS 2: 14 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,4 y 2 mg/dL.
 - IRIS 3: 17 perros con creatinina plasmática comprendida entre 2,1 y 5 mg/dL.
 - IRIS 4: 16 perros con creatinina plasmática superior a 5 mg/dL.

- **Enfermedad renal crónica debida a causas diferentes a leishmaniosis:** 68 perros (incluidos en el Grupo IV.3.3 de ERC), que fueron negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis. Los criterios de inclusión fueron los descritos según la clasificación IRIS en el grupo general de perros con ERC. También en este caso fueron subdivididos según esta clasificación en:
 - IRIS 1: 15 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,2 y 1,4 mg/dL.
 - IRIS 2: 18 perros con creatinina plasmática comprendida entre 1,4 y 2 mg/dL.
 - IRIS 3: 16 perros con creatinina plasmática comprendida entre 2,1 y 5 mg/dL.

- IRIS 4: 19 perros con creatinina plasmática superior a 5 mg/dL.

IV.3.4.2 Clasificación LeishVet

Se han incluido 97 perros positivos en las pruebas de leishmaniosis clasificados, a su vez, en 4 subgrupos, siguiendo las recomendaciones realizadas por el grupo de expertos LeishVet en 2011³¹⁵:

- **Fase I (enfermedad leve):** formado por 19 perros que cumplían los siguientes criterios de inclusión: ser positivos en las pruebas de serología de leishmaniosis (titulación baja). No manifestar signos clínicos o presentar sólo linfadenomegalia periférica y/o dermatitis pustular. No presentar anomalías en los análisis de sangre y de orina. Perfil renal normal (creatinina < 1,4 mg/dl; UP/C < 0,5).
- **Fase II (enfermedad moderada):** formado por 30 perros que cumplían los siguientes criterios de inclusión: ser positivos en las pruebas de serología de leishmaniosis (titulación baja-alta). Signos clínicos descritos en la Fase I y que además pueden presentar alguna de las siguientes alteraciones: lesiones cutáneas difusas o simétricas, ulceraciones, anorexia, pérdida de peso, fiebre y epistaxis. Anomalías en los análisis de sangre (anemia discreta no regenerativa, hiperglobulinemia y/o hipoalbuminemia). Se consideran a su vez dos subgrupos:
 - a) perfil renal normal (creatinina < 1,4 mg/dl y UP/C < 0,5)
 - b) creatinina < 1,4 mg/dl y UP/C = 0,5-1. 6 perros de este grupo están también incluidos en el Grupo VI.3.3 de ERC.
- **Fase III (enfermedad grave):** formado por 15 perros que cumplían los siguientes criterios de inclusión: ser positivos en las pruebas de serología de leishmaniosis (titulación media-alta). Signos clínicos descritos en las Fases I y II y que además pueden presentar signos producidos como consecuencia de las lesiones producidas por efecto de la formación de inmunocomplejos: vasculitis, artritis, uveítis y/o glomerulonefritis. Anomalías en los análisis de sangre relacionados en la Fase II. ERC en IRIS 1 (creatinina = 1,2 – 1,4 mg/dl) y

UP/C > 1, o en IRIS 2 (creatinina = 1,4 – 2 mg/dl). Todos los perros de este grupo están también incluidos en el Grupo VI.3.3 de ERC.

- **Fase IV (enfermedad muy grave):** formado por 33 perros que cumplían los siguientes criterios de inclusión: ser positivos en las pruebas de serología de leishmaniosis (titulación media-alta). Signos clínicos descritos en las Fases III y que además pueden presentar tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótico o enfermedad renal en su fase final. Anomalías en los análisis de sangre relacionados en la Fase II. ERC en IRIS 3 (creatinina = 2 – 5 mg/dl), en IRIS 4 (creatinina > 5 mg/dl) y/o síndrome nefrótico con proteinuria marcada (UP/C > 5). Todos los perros de este grupo están también incluidos en el Grupo VI.3.3 de ERC.

VI.3.4 Hipotiroidismo

Este grupo está formado por 10 perros. Se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar anamnesis y signos clínicos compatibles con la enfermedad: obesidad y manifestaciones cutáneas (incluyendo piel seca y escamosa, seborrea, pelaje reseco, alopecia e hiperpigmentación). En ocasiones se observó pioderma, otitis externa recurrente, debilidad e intolerancia al ejercicio.
- Presentar alteraciones analíticas compatibles con hipotiroidismo, caracterizada principalmente por la elevación de la concentración plasmática de colesterol total.
- Confirmación mediante diagnóstico hormonal.
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).
- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.

VI.3.5 Enfermedad cardíaca congestiva

Este grupo está formado por 10 perros (5 perros con cardiomiopatía dilatada y 5 perros con insuficiencia crónica de la válvula mitral). Se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar anamnesis y signos clínicos compatibles con la enfermedad, entre los que destacan ser perros de razas grandes en el caso de la miocardiopatía dilatada, de razas pequeñas en el de insuficiencia de la válvula mitral y, en general, intolerancia al ejercicio y disnea.
- En el caso de cardiomiopatía dilatada, presentar imagen radiográfica de tórax consistente en cardiomegalia (índice vertebral del corazón $> 10,5$), dilatación de la aurícula izquierda, congestión venosa pulmonar, edema pulmonar y dilatación de la vena cava, así como imagen ecocardiográfica consistente en incremento del diámetro sistólico ventricular izquierdo, ventrículo izquierdo globoso, aumento del diámetro diastólico ventricular izquierdo, reducción de la fracción de acortamiento, aumento de la distancia del punto E mitral al septo interventricular, dilatación de la aurícula izquierda y fracción de eyección (método de Simpson) disminuida.
- En el caso de degeneración de la válvula mitral, imagen radiográfica de tórax consistente en cardiomegalia (índice vertebral del corazón $> 10,5$), dilatación de la aurícula izquierda y compresión de ésta sobre el bronquio principal izquierdo y otros signos de insuficiencia cardíaca congestiva izquierda, así como imagen ecocardiográfica consistente en engrosamiento nodular de las cúspides valvulares, dilatación de la aurícula izquierda y del ventrículo izquierdo y flujo de regurgitación detectable en la ecocardiografía Doppler.
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).
- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.

VI.3.6 Neoplasias

Este grupo está formado por 16 perras con adenocarcinoma mamario y 19 perros con linfoma multicéntrico.

Para la selección de las perras con adenocarcinoma mamario se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Visualización de una o varias masas en la zona mamaria mediante exploración física, detallándose la localización y el tamaño aproximado de cada masa y confirmación de la presencia o ausencia de posible metástasis mediante estudio radiológico del tórax y ecográfico del abdomen.
- Caracterización de la lesión mamaria, realizada en el Servicio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria de la UEx. Las muestras fueron recogidas mediante punción-aspiración con aguja fina (PAAF) y, en los casos en los que se procedió a la extirpación de la masa, ésta fue enviada entera para su estudio histopatológico.
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).
- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.

Para la selección de los perros con linfoma multicéntrico se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar nodos linfáticos palpables externamente aumentados de tamaño (nodos linfáticos retrofaríngeos, preescapulares, poplíteos y/o inguinales), con una consistencia dura y generalmente sin adherencias a tejidos adyacentes.
- Confirmación citológica de la enfermedad, realizada en el Servicio de Histopatología de la Facultad de Veterinaria de la UEx, a partir de muestras procedentes de nodos linfáticos, extraídas mediante PAAF.
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).

- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.

VI.3.7 Hiperadrenocorticismo

Con el objetivo de estudiar cómo influyen los corticoides endógenos sobre la concentración plasmática de cistatina C en la especie canina, se ha estudiado un grupo formado por 20 perros con hiperadrenocorticismo hipofisario (Anexo 1). Se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar anamnesis y signos clínicos compatibles con la enfermedad: lesiones cutáneas, polifagia, PD/PU y/o abdomen péndulo.
- Presentar alteraciones analíticas compatibles con hiperadrenocorticismo: linfopenia e incremento de la concentración plasmática de FA, ALT y colesterol.
- Confirmación mediante diagnóstico hormonal.
- Presentar aumento del tamaño de las glándulas adrenales, y ausencia de imágenes compatibles con neoplasias de las mismas, en el estudio ecográfico del abdomen, según protocolo establecido por Choi J *et al.*⁴⁸ en 2011 (longitud máxima de 7,5 mm en perros de más de 10 Kg y de 6 mm en perros de menos de 10 Kg).
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).
- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.

VI.3.8 Meningitis que responde a los corticoides

Con el objetivo de estudiar cómo influyen los corticoides exógenos sobre la concentración plasmática de cistatina C en el perro, se ha estudiado un grupo de 10 perros en tratamiento con prednisona (Prednisona Alonga®, Famar Health Care Services Madrid, S.A.U., España) debido a que padecían meningitis que responde a los corticoides (Anexo 1). Se siguieron los siguientes criterios de inclusión:

- Presentar anamnesis y signos clínicos compatibles con la enfermedad: animales de razas medianas-grandes (peso corporal superior a 15 Kg), menores de 2 años, con fiebre, letargia, anorexia, rigidez cervical y/o hiperestesia espinal aguda.

- No presentar signos de deshidratación.
- Presentar leucocitosis (recuento total de leucocitos superior a 14.000/ μ L) debida a neutrofilia y un perfil bioquímico en sangre normal.
- Presentar análisis de orina normal.
- Presentar análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) con aumento en el recuento de neutrófilos (> 10 células nucleadas/ μ L, consistentes predominantemente en neutrófilos maduros) y en la concentración de proteínas (> 20 mg/dL).
- Ausencia de crecimientos en el cultivo bacteriano del LCR.
- Ausencia de alteraciones indicadoras de enfermedad renal (en función de la exploración física, hematología, bioquímica sanguínea y tantas pruebas de diagnóstico complementarias como fueron necesarias).
- Ser negativos en las pruebas diagnósticas de leishmaniosis.
- No haber recibido anteriormente tratamiento con corticoides.
- Respuesta positiva al tratamiento con corticoides.

Con el objetivo de observar la relación entre la concentración plasmática de cistatina C y la dosis de prednisona administrada (Anexo 1), se ha procedido a la administración oral del corticoide a los perros enfermos como único tratamiento, a dosis de 4 mg/kg/24 horas durante 7 días, reduciéndose la dosis a 2 mg/kg/24 horas durante los 7 días siguientes. Transcurridos 14 días de tratamiento, la prednisona fue retirada. Las muestras de sangre fueron recogidas en estos animales los días 1, 7, 14 y 21, tras el comienzo del tratamiento, y se procesaron inmediatamente. Los resultados obtenidos fueron comparados con los de un grupo control, formado por 16 perros sanos incluidos dentro del grupo control general del trabajo y elegidos aleatoriamente.

VI.4 Hematología y bioquímica sanguínea

Las muestras de sangre, analizadas en el Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx, corresponden a las obtenidas el día del diagnóstico de la enfermedad, y siempre antes del comienzo del tratamiento correspondiente (excepto en el estudio de la influencia de los corticoides exógenos sobre la concentración de cistatina C plasmática). Se obtuvieron mediante punción de las venas cefálica, safena o yugular, según el caso, y utilizando como anticoagulantes EDTA-K3 (para la hematología) y

heparina sódica (para la bioquímica sanguínea). La sangre heparinizada fue inmediatamente centrifugada a 2.000 g durante 10 minutos. El plasma fue separado y almacenado en cuatro alícuotas adecuadamente etiquetadas e identificadas:

- Alícuota 1: determinaciones bioquímicas.
- Alícuota 2: determinación de cistatina C y de RBP.
- Alícuota 3: diagnóstico serológico.
- Alícuota 4: determinación de hormonas.

La muestra de la alícuota 1 fue procesada inmediatamente en el laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx. Las alícuotas 2 y 3 fueron congeladas a -22°C hasta el momento de su análisis. La alícuota 4 fue enviada mediante transporte urgente el mismo día de su extracción al laboratorio donde se realizaron las determinaciones hormonales (Laboratorios Laborti Veterinaria; Barcelona, España).

Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

Hemograma

Se realizó inmediatamente tras la extracción de la sangre, y consistió en el recuento total de hematíes, valor hematocrito, concentración de hemoglobina, volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), recuento total y diferencial de leucocitos y recuento total de plaquetas. Para su procesado se utilizó un analizador automático de sangre para cinco poblaciones (Mindray® BC-5300, Vet Spinreact®, España).

Bioquímica plasmática

Consistió en la determinación de la concentración plasmática de urea, creatinina, ALT, FA, proteínas totales, albúmina, colesterol, calcio, fósforo, GGT y LDH mediante kits comerciales (Spinreact®, España) para analizador automático de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia). Las concentraciones de sodio, potasio y cloro se determinaron mediante analizador automático de electrolitos (EasyElectrolytes, Medica Corporation®, USA).

En el plasma congelado se determinaron las concentraciones plasmáticas de cistatina C y RBP. La concentración de cistatina C se determinó mediante el kit comercial “cistatina C turbilátex” (turbidimetría látex; Spinreact®, España) para analizadores automatizados de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia), validado para plasma canino⁸. Se trata de un método turbidimétrico consistente en partículas de látex recubiertas con anticuerpos policlonales de conejo anti-cistatina C, que son aglutinadas por la cistatina C presente en la muestra del paciente. El proceso de aglutinación provoca un cambio de absorbancia que es proporcional a la concentración de cistatina C de la muestra^{73,87}. Finalmente, la concentración de cistatina C se determina por interpolación de la curva de calibración preparada a partir de estándares de concentraciones conocidas de cistatina C, que fueron los siguientes: 0,5 mg/L, 1,5 mg/L, 3 mg/L, 6 mg/L y 10 mg/L (Spinreact®, España).

La concentración plasmática de RBP se realizó mediante kit comercial (Laboratorios Diazyme®, USA) para analizador automatizado de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia). Esta determinación se llevó a cabo en 23 perros con DRA y en 30 perros con ERC, de los que 12 padecían leishmaniosis y 18 fueron negativos a las pruebas de diagnóstico de la enfermedad.

Para la interpretación de los resultados correspondientes a la hematología y concentración plasmática de urea, creatinina, fósforo, ALT, FA, GGT, LDH, colesterol, proteínas totales y albúmina se utilizaron los valores de referencia proporcionados por el laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx. Los rangos de referencia correspondientes a los valores de cistatina C y RBP en plasma fueron calculados siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

VI.5 Análisis de orina

Las muestras de orina fueron recogidas mediante cistocentesis ecoguiada e, inmediatamente, procesadas en el Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- Examen físico y químico: inicialmente se llevó a cabo una valoración física mediante visualización directa de la orina (color y aspecto) y química, utilizando tiras reactivas específicas (Multistix Reagent Strips, Bayer Corporation, España), interpretadas mediante lector automatizado (Spinreact®, España) para la concentración de proteínas, glucosa, pH, cuerpos cetónicos y eritrocitos.

- Sedimento urinario: la muestra de orina se centrifugó a 200 g durante 5 minutos. El sobrenadante se separó y etiquetó convenientemente para la determinación de la densidad, UP/C y biomarcadores urinarios. El sedimento se depositó en un portaobjetos. Tras la colocación de un cubreobjetos, se realizó su estudio en un microscopio de luz polarizada a 10X y 40X para cuantificar la presencia de leucocitos, eritrocitos, cristales, células, etc.

- Densidad: se determinó mediante refractometría en el sobrenadante de la orina (refractómetro clínico de dos escalas®, Zuzi, España).

- UP/C: se determinó a partir de las concentraciones de proteína y de creatinina en el sobrenadante de la orina centrifugada. Para ello, se utilizaron las técnicas rojo de pirogalol-molibdato para la determinación de la concentración de proteínas urinarias y de Jaffé para la de creatinina (RAL Diagnostics, S.A., España), programadas para analizador automático de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia).

- Enzimas urinarias: se determinaron en el sobrenadante de la orina, previamente congelado a -22°C hasta el momento de su análisis, utilizando un analizador automático de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia). Para la concentración urinaria de LDH, FA y GGT se utilizaron kits comerciales de Laboratorios Spinreact® (España). La concentración de NAG se realizó mediante un kit comercial de Laboratorios Diazyme® (USA).

- Proteínas de bajo peso molecular: se determinaron en el sobrenadante de la orina, previamente congelado a -22°C hasta el momento de su análisis, utilizando un analizador automático de bioquímica sanguínea (Saturno 100 VetCrony® Instruments, Italia). Para la concentración urinaria de cistatina C se utilizó un kit comercial de

Laboratorios Spinreact® (España). La concentración de RBP se realizó mediante un kit comercial de Laboratorios Diazyme® (USA).

Los resultados de los biomarcadores estudiados se expresaron en forma de ratio con la creatinina (/c).

Para la interpretación de los resultados correspondientes a la densidad, UP/C y sedimento de la orina se utilizaron los valores de referencia proporcionados por el laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx. Los rangos de referencia correspondientes a los valores de cistatina C, RBP, NAG, GGT, LDH y FA fueron calculados siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC).

VI.6 Diagnóstico de leishmaniosis

El diagnóstico de leishmaniosis se llevó a cabo mediante la visualización en microscopía (40X y 100X) de amastigotes de *Leishmania infantum* en muestras obtenidas mediante PAAF de nodo linfático y/o médula ósea, previa tinción de las muestras (kit de tinción Diff-Quik®), o por enzimoimmunoensayo (kit Q letitest ELISA leishmania®; Laboratorios Leti, España), para la detección de inmunoglobulinas anti-leishmania.

VI.7 Diagnóstico hormonal

Hipotiroidismo

Se determinó la concentración plasmática de TSH y de T4 mediante técnica ELISA. Se consideró hipotiroidismo un valor de TSH > 0,74 µg/mL combinado con una concentración de T4 > 52 µg/mL, siguiendo las instrucciones del laboratorio donde se hicieron las determinaciones. Los resultados fueron valorados conjuntamente con el cuadro clínico, resultados del análisis de sangre y respuesta al tratamiento. Para la interpretación de los valores de T4 Y TSH se utilizaron los valores de referencia proporcionados por el laboratorio donde se realizaron los análisis (Laboratorios Laborti Veternària; Barcelona, España).

Hiperadrenocorticismo

Se obtuvo una muestra de sangre entre las 8 y 10 horas de la mañana (muestra basal) y, posteriormente, se inyectaron 0,25 mg de ACTH sintética vía intramuscular (Nuvacthen Depot® Laboratorios Alfasigma España S.L.). Una hora después se recogió la segunda muestra (muestra post-ACTH). En la obtención de las muestras de sangre se utilizó como anticoagulante heparina sódica. Tras la obtención del plasma, se determinó la concentración de cortisol plasmático basal y post-ACTH mediante radioinmunoensayo. La concentración basal de cortisol plasmático en el perro oscila entre 1,5 y 8,5 µg/dL y, transcurrida una hora tras la administración de ACTH, entre 7,5 y 16,5 µg/dL, independientemente de los valores basales. Se acepta que el animal padece hiperadrenocorticismo cuando el valor de cortisol post-ACTH es > 22,0 µg/dL siguiendo las instrucciones del laboratorio donde se hicieron las determinaciones. Los resultados fueron valorados conjuntamente con el cuadro clínico, resultados del análisis de sangre y respuesta al tratamiento. Para la interpretación de los valores de cortisol se utilizaron los valores de referencia proporcionados por el laboratorio donde se realizaron los análisis (Laboratorios Laborti Veterinària; Barcelona, España).

VI.8 Estudio estadístico de los datos

El análisis estadístico ha sido realizado con la ayuda del software informático estadístico SPSS versión 19,0 para Windows, licenciado para la UEx.

Se realizó un estudio estadístico descriptivo de las variables objeto de estudio analizando los datos por grupos y subgrupos. Los resultados obtenidos para las variables con una distribución gaussiana se expresan como media ± desviación estándar.

Antes de realizar el estudio estadístico inferencial de los grupos y subgrupos investigados, se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk la distribución normal, y mediante el test de Levene la homogeneidad de las varianzas. Seguidamente, se realizaron las comparaciones de las medias de los diferentes grupos y subgrupos, para las variables estudiadas, mediante la prueba ANOVA de un factor, en caso de

distribución normal, o la prueba de Kruskal-Wallis en caso contrario. Las diferencias entre grupos han sido consideradas como significativas para un p-valor $< 0,05$.

Finalmente, para estudiar el grado de relación entre las variables analizadas, se realizó un análisis de correlación en el que se estudió el coeficiente de correlación de Pearson.

VII RESULTADOS

VII.1 Verificación del método de cuantificación de cistatina C plasmática

Linealidad

En la Tabla 13 y en la Figura 4 se relacionan los resultados obtenidos de las tres curvas de calibración realizadas con estándares de concentración conocida para el estudio de linealidad del método utilizado.

Tabla 13: Valores correspondientes a las curvas de calibración obtenidas (y su correspondiente media) utilizando diferentes estándares de concentración conocida de cistatina C.

	0,5 mg/L	1,5 mg/L	3 mg/L	10 mg/L
Curva1	0,59	1,77	3,36	10,1
Curva2	0,61	1,52	3,28	10,9
Curva3	0,47	1,47	3,28	10,3

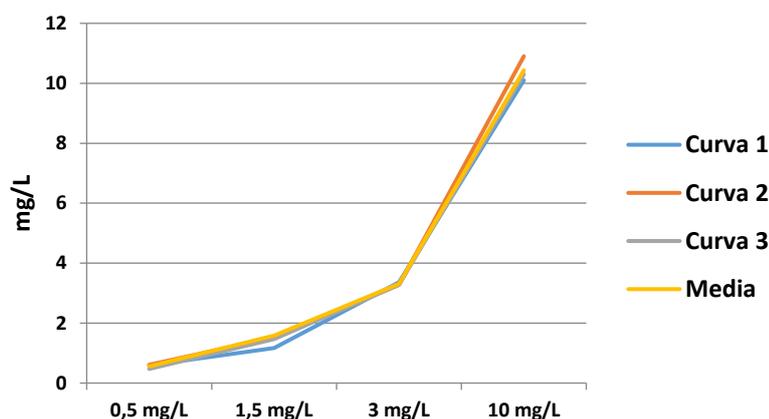


Figura 4: Representación gráfica de las curvas de calibración obtenidas (y su correspondiente media) utilizando diferentes estándares de concentración conocida de cistatina C.

Límites

En las Tablas 14 y 15 se expresan los resultados correspondientes al estudio de los límites (LC, LOD y LOQ).

Tabla 14: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en un plasma con concentración conocida de la misma (0,06 mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,07	0,06	0,06	0,08	0,07	0,05	0,04	0,05	0,05	0,04

Tabla 15: Prueba de Kolmogorov-Smirnov obtenida de 10 medidas realizadas en un plasma de concentración de cistatina C conocida (0,06 mg/L; concentración comprendida en el LOD esperado).

		Cistatina C
N		10
Parámetros normales^{ab}	Media	0,06
	Desviación típica	0,01
	Absoluta	0,2
Diferencias más extremas	Positiva	0,2
	Negativa	-0,13
Z de Kolmogorov-Smirnov		0,63
Sig. Asintót (bilateral)		0,82

a = La distribución de contraste es la Normal; b = Se han calculado a partir de los datos.

Puesto que el nivel de significación 0,82 es mayor de 0,05, se puede asumir que la muestra presenta una distribución normal y se procedió al cálculo de los límites (Tabla 16).

Tabla 16: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un plasma de concentración conocida (0,06 mg/L).

N	10
Media	0,06
Mediana	0,05
Desviación estándar	0,01
Rango	0,04
Mínimo	0,04
Máximo	0,08

$LC = 1,64 \cdot$	$LC = 1,64 \cdot 0,01 = 0,02$
$LOD = 3,29 \cdot S_0$	$LOD = 3,29 \cdot 0,01 = 0,04$
$LOQ = 10 \cdot S_0$	$LOQ = 0,13$

Precisión

Tabla 17: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en un estándar de concentración conocida de la misma (3 mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3.57	3.36	3.64	3.82	3.32	3.67	3.41	3.46	3.35	3.82

En las Tablas 17-20 se recogen los resultados obtenidos relativos a los estudios de repetitibilidad y reproducibilidad del método.

Tabla 18: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (3 mg/L).

N	10
Media	3,54
Desviación estándar	0,19
Asimetría	0,39
Error típico de asimetría	0,69

$$\% CVr = S/X \cdot 100$$

$$\% CVr = 0,19/ 3,54 \cdot 100 = 5,36 \%$$

Comparado con el coeficiente de variación de Horwitz: $CVh \% = 2^{(1-0,5)\text{Log } C} \cdot 100$

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10; 1 ppm = 1mg/L = 10^{-6} .

$CVh \% = 2^{(1-0,5)\text{Log } 0,000003} \cdot 100 = 14,74\%$. Se establece para la repetitividad que el CVr % obtenido debe ser menor que CVh % / 2.

$$CVh \% / 2 = 7,37\%$$

Como el % CVr = 5,36 % < CVh % / 2 = 7,37%, se cumple el criterio de aceptabilidad establecido.

Tabla 19: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en 10 días consecutivos, de un estándar de concentración conocida de la misma (1,5 mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,77	1,47	1,5	1,69	1,56	1,69	1,42	1,66	1,54	1,57

Se determinó el promedio de las concentraciones obtenidas (X), la desviación estándar de las mismas (SRi) y el CVRI% (Tabla 20).

Tabla 20: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,5 mg/L).

N	10
Media	1,59
Desviación estándar	0,11

$$\%CVri = S/X \cdot 100$$

$$\%CVri = 0,11/ 1,58 \cdot 100 = 7,04\%$$

Comparado con el coeficiente de variación de Horwitz: $CVhri\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } C} \cdot 100$

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10; 1 ppm = 1 mg/L = 10^{-6} .

$$CV_{hri}\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } 0,0000015} * 100 = 13,29\%$$

Se establece para la repetitividad que el CVr% obtenido debe ser menor que $2 * CV_{hri}\% / 3 = 8,86\%$

Como el %CVri = 7,04% < $2 * CV_{hri}\% / 3 = 8,86\%$, se cumple el criterio de aceptabilidad establecido.

Veracidad

Para el estudio de veracidad, se procedió al cálculo del sesgo, cuyos resultados se expresan en las Tablas 21 y 22.

Tabla 21: Cálculo del sesgo correspondiente a los resultados obtenidos en la Tabla 17.

Lectura	Resultado	(X-X _A)	Sesgo
1	3,57	3,57-3	0,57
2	3,36	3,36-3	0,36
3	3,64	3,64-3	0,64
4	3,82	3,82-3	0,82
5	3,32	3,32-3	0,32
6	3,67	3,67-3	0,67
7	3,41	3,41-3	0,41
8	3,46	3,46-3	0,46
9	3,35	3,35-3	0,35
10	3,82	3,82-3	0,82

Tabla 22: Valores estadísticos de la prueba (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (3 mg/L)

N	10
Media	3,54
Desviación estándar	0,19

Seguidamente, se evaluó el sesgo utilizando la prueba t-Student, comparando el t calculado (t_{cal}) con el t teórico o crítico (t_{crit}) (Tabla 23).

Se puede observar que para la medición de la cistatina C en plasma, el sesgo obtenido para el método utilizado es aceptable, y por lo tanto su veracidad también lo es.

Tabla 23: Distribución del sesgo utilizando la prueba t- Student.

2 colas V $\alpha/2$	80% 0,1	90% 0,05	95% 0,025
1	3,08	6,31	12,70
2	1,886	2,920	4,303
3	1,638	2,353	3,182
4	1,533	2,132	2,776
5	1,476	2,015	2,571
6	1,440	1,943	2,447
7	1,415	1,895	2,365
8	1,397	1,860	2,306
9	1,383	1,833	2,262
10	1,372	1,812	2,228

VII.2 Verificación del método de cuantificación de cistatina C en orina

Límites

Para el cálculo de los límites se utilizó el mismo planteamiento descrito para el plasma. Los resultados se relacionan en la Tabla 24.

Tabla 24: Resultados obtenidos de la determinación seriada de cistatina C (expresadas en mg/L) de una muestra de orina con concentración conocida de la misma (0,04 mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0,05	0,08	0,03	0,02	0,08	0,03	0,04	0,03	0,03	0,04

Tabla 25: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L) en una orina de concentración conocida (0,04 mg/L).

N	10
Media	0,04
Mediana	0,03
Desviación estándar	0,021
Mínimo	0,02
Máximo	0,08

LC = 1,645 ·	LC = 1,64 · 0,02 = 0,03
LOD = 3,29 ·	LOD = 3,29 · 0,02 = 0,07
LOQ = 10 · S ₀	LOQ = 0,21

Puesto que el nivel de significación 0,820 es mayor que 0,05, se puede asumir que la muestra presenta una distribución normal y se procede al cálculo de los límites (Tabla 25).

Precisión

Las Tablas 26 -28 describen los resultados correspondientes a los estudios de precisión.

Tabla 26: Determinaciones seriadas de una muestra de orina con concentración de cistatina C de 1,5 mg/L (expresadas en mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,23	1,17	1,21	1,2	1,1	1,24	1,18	1,19	1,02	1,2

Tabla 27: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,5 mg/L).

N	10
Media	1,17
Desviación estándar	0,07

$$\%CVr = S/X \cdot 100$$

$$\%CVr = 0,07/ 1,17 \cdot 100 = 5,66 \%$$

Comparado con el coeficiente de variación de Horwitz: $CVh\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } C} \cdot 100$

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10; 1 ppm= 1 mg/L = 10^{-6} .

$CVh\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } 0,0000015} \cdot 100 = 13,29\%$ Se establece para la repetitividad que el CVr% obtenido debe ser menor que CVh%/2.

$$CVh\%/2 = 6,12\%$$

Como el %CVr = 5,66% < CVh%/2 = 6,12%, se cumple el criterio de aceptabilidad establecido.

Tabla 28: Resultados de la determinación seriada de cistatina C (expresadas en mg/L), en 10 días consecutivos, de una muestra de orina con concentración conocida de la misma (1,3 mg/L).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1,23	1,33	1,22	1,21	1,37	1,31	1,25	1,28	1,29	1,25

Se determinó el promedio de las concentraciones obtenidas (X), la desviación estándar de las mismas (SRi) y el CVRI% (Tabla 29).

Tabla 29: Valores estadísticos correspondientes a la determinación seriada de cistatina C (expresados en mg/L), en un estándar de concentración conocida (1,3 mg/L).

N	10
Media	1,27
Desviación estándar	0,05

$$\%CVr_i = S/X \cdot 100$$

$$\%CVr_i = 0,05/ 1,27 \cdot 100 = 4,06\%$$

Comparado con el coeficiente de variación de Horwitz: $CVhri\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } C} \cdot 100$

C= Valor nominal del analito expresado en potencia de 10; 1ppm = 1mg/L = 10^{-6} .

$$CVhri\% = 2^{(1-0,5)\text{Log } 0,0000015} \cdot 100 = 13,29\%$$

Se establece para la repetitividad que el CVr% obtenido debe ser menor que $2 \cdot CVhri\%/3 = 8,86\%$

Como el $\%CVr_i = 4,06\% < 2 \cdot CVhri\%/3 = 8,86\%$, se cumple el criterio de aceptabilidad establecido.

VII.3 Grupo control

El grupo control, de 43 animales, está constituido por perros de diferentes razas, con una edad media de $4,13 \pm 2,65$ años (rango comprendido entre 1 y 11 años). De ellos, el 39,5 % (17 perros) son machos y el 60,5% (26 perros) hembras.

VII.3.1 Hematología

En la Tabla 30 se relacionan los valores hematológicos obtenidos en el grupo control.

Tabla 30: Hematología de los perros del grupo control, expresada como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL		RANGO DE REFERENCIA	CONTROL
RBC (x 10 ⁶ /μl)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	WBC (/μl)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	Neutrófilos (/μl)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	Eosinófilos (/μL)	90-1.750	638 \pm 376
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	Basófilos (/μL)	0-1	38 \pm 132
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099
Plaquetas(/μl)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	Monocitos (/μL)	0-210	200 \pm 52

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

VII.3.2 Bioquímica plasmática

Los resultados de la bioquímica sanguínea obtenidos para el grupo control, se observan en la Tabla 31.

Tabla 31: Bioquímica plasmática de los perros del grupo control, expresada como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7
Creatinina(mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3
GGT (UI/L)	1–6	3,74 \pm 1,59
LDH (UI/L)	20–500	257,79 \pm 241
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34
RBP (mg/L)	24,81–97,17	30,99 \pm 6,18

ALT = alanina-aminotransferasa; GGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa;
LDH = lactato-deshidrogenasa; PT = proteínas totales; FA = fosfatasa alcalina;
RBP = proteína de unión al retinol.

Se ha realizado, además, un estudio para comprobar si el sexo, la edad y el peso influyen en la concentración plasmática de cistatina C en perros sanos.

No se han observado diferencias para el sexo (concentración de cistatina C en machos de $0,2 \pm 0,12$ mg/L, y en hembras de $0,19 \pm 0,09$ mg/L).

En cuanto a la edad, se han estudiado dos grupos de perros: 29 animales con edad igual o inferior a 5 años (concentración de cistatina C plasmática = $0,18 \pm 0,09$ mg/L), y 14 animales con edad superior a 5 años (concentración de cistatina C plasmática = $0,13 \pm 0,12$ mg/L). Aunque se ha observado una disminución en el valor medio de los animales de más edad, no hay diferencias significativas entre ambos grupos.

Por último, se han dividido a los animales según el peso en otros dos grupos: 9 perros con peso corporal igual o inferior a 20 Kg (concentración de cistatina C plasmática = $0,13 \pm 0,09$ mg/L) y 20 perros con peso corporal superior a 20 Kg (concentración de cistatina C plasmática = $0,17 \pm 0,08$ mg/L). En 14 animales no fue registrado el peso corporal. La diferencia observada ha manifestado una diferencia entre ambos grupos estadísticamente significativa ($P < 0,01$).

VII.3.3 Análisis de orina

La Tabla 32 muestra los resultados del estudio de la orina.

Tabla 32: Análisis de orina de los perros del grupo control, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL
UP/C	< 0,4	$0,11 \pm 0,07$
Densidad	1.020-1.050	$1.034 \pm 10,4$
Cistatina C/c ($\mu\text{g/g}$)	13-709	$361,08 \pm 348,14$
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	$5,96 \pm 4,07$
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	$0,99 \pm 0,86$
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	$0,52 \pm 1,45$
RBP/c (mg/g)	0,08-0,88	$0,4 \pm 0,48$
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	$2,9 \pm 2,19$

UP/C = ratio proteína/creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina;
 LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil- β -D-glucosamina/creatinina;
 Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; RBP/c = ratio proteína de unión al retinol/creatinina;
 GGT/c = ratio gamma-glutamyl-transpeptidasa/creatinina.

También se ha estudiado si el sexo, la edad y el peso influyen en la ratio cistatina C/c en perros sanos.

No se han observado diferencias para el sexo (machos = $324,68 \pm 220,81$ $\mu\text{g/g}$; hembras = $316,71 \pm 209,94$ $\mu\text{g/g}$).

En cuanto a la edad, como en el caso de la cistatina C plasmática, se han estudiado dos grupos de perros: 29 animales con edad igual o inferior a 5 años (ratio cistatina C/c = $273,24 \pm 153,18$ $\mu\text{g/g}$), y 14 animales con edad superior a 5 años (ratio cistatina C/c = $398,46 \pm 274,01$ $\mu\text{g/g}$). Se ha observado un incremento en los animales de más edad, con una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ($P < 0,05$).

Por último, respecto al peso, los perros con peso corporal igual o inferior a 20 Kg presentan una ratio cistatina C/c de $259,62 \pm 72,15 \mu\text{g/g}$, y los perros con peso corporal superior a 20 Kg, de $297,13 \pm 241,22 \mu\text{g/g}$. En este caso, no se ha observado diferencia estadística.

VII.4 Daño renal agudo

El grupo de perros con DRA está constituido por 40 animales de diferentes razas, con una edad media de $6,34 \pm 2,95$ años (rango comprendido entre 1,5 y 14 años). De ellos, 28 perros son machos (70%) y 12 hembras (30%).

Este grupo se ha subdividido en 4 grupos atendiendo a los criterios de la clasificación IRIS.

El grupo IRIS I, compuesto por 10 animales, presenta una edad media de $7,17 \pm 3,46$ años, siendo la distribución por sexos de 8 machos (80%) y 2 hembras (20%). Todos presentaron un cuadro clínico de deshidratación, oliguria que respondió positivamente al tratamiento con fluidoterapia (producción de orina $> 1 \text{ mL/Kg/h}$ en un plazo de tiempo inferior a 6 horas), y disminución de la concentración de creatinina en sangre a valores normales en menos de 48 horas.

En el grupo IRIS II, de 10 animales, la edad media fue de $6,34 \pm 1,9$ años, formado por 6 machos (60%) y 4 hembras (40%). En 5 animales se documentó la enfermedad responsable del DRA: 2 habían sido tratados con antibióticos aminoglucósidos (gentamicina), 2 presentaron una obstrucción postrenal por cálculos urinarios y uno fue diagnosticado de leptospirosis. Los 5 animales restantes presentaron un cuadro de deshidratación de etiología no definida acompañado de oliguria. En todos los casos se observó una respuesta positiva al tratamiento con fluidoterapia (producción de orina $> 1 \text{ mL/Kg/h}$ en un plazo de tiempo inferior a 6 horas), y una disminución de la concentración de creatinina en sangre a valores normales en menos de 48 horas.

El grupo IRIS III, constituido por 10 animales, presentó una edad media de $4,45 \pm 3,54$ años, siendo la distribución por sexos de 7 machos (70%) y 3 hembras (30%). En todos los animales se documentó la enfermedad responsable del DRA: 2 presentaron

pancreatitis aguda, 2 presentaron leptospirosis, uno había sido tratado con antibióticos aminoglucósidos (gentamicina), 2 presentaron un shock séptico por politraumatismo, 2 presentaron un shock hipovolémico por hipoadrenocorticismo y uno desarrolló pielonefritis.

Por último, el grupo IRIS IV, formado por 10 animales, presentó una edad media de $4,65 \pm 1,32$ años, siendo la distribución por sexos de 7 machos (70%) y 3 hembras (30%). En 9 animales se documentó la enfermedad responsable del DRA: 5 presentaron leptospirosis, uno había sido tratado con antibióticos aminoglucósidos (gentamicina), 2 presentaron pancreatitis y uno desarrolló un shock séptico por aspergilosis. El perro restante del grupo presentó un cuadro de deshidratación intensa de etiología no definida (grado de deshidratación estimado del 7%).

VII.4.1 Hematología

Tabla 33: Hematología del grupo de perros con DRA, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS I	IRIS II	IRIS III	IRIS IV
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	$6,44 \pm 0,78$	$6,23 \pm 1,28$	$7,07 \pm 1,53$	$6,01 \pm 1,88$	$7,28 \pm 1,52$
HTO (%)	41,10–55,00	$46,18 \pm 5,33$	$42,18 \pm 8,58$	$43,16 \pm 17,01$	$41,91 \pm 12,91$	$51,01 \pm 10,84$
HGB (g/dL)	14,50–19,20	$16,15 \pm 1,82$	$14,44 \pm 3,06$	$15,84 \pm 3,33$	$14,24 \pm 4,27$	$16,73 \pm 3,3$
VCM (fl)	62,00–72,00	$70,92 \pm 3,83$	$67,87 \pm 6,22$	$71,56 \pm 3,46$	$69,66 \pm 4,18$	$71,62 \pm 5,36$
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	$35,01 \pm 1,36$	$34,21 \pm 1,37$	$32,39 \pm 0,9$	$33,82 \pm 2,41$	$33,29 \pm 1,19$
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	166.000–575.000	261.372 ± 155.612	346.455 ± 192.633	298.100 ± 192.633	254.300 ± 160.436	167.500 ± 243.915
WBC ($/\mu\text{L}$)	6.800–14.000	10.012 ± 2.663	18.256 ± 10.654	21.769 ± 16.102	20.445 ± 12.956	19.866 ± 10.920
Neutrófilos ($/\mu\text{L}$)	4.120–10.350	6.074 ± 2.069	14.516 ± 15.463	17.081 ± 15.820	10.372 ± 7.308	14.785 ± 9.784
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	90-1.750	638 ± 376	771 ± 711	$1.746 \pm 1.305^*$	770 ± 610	1.127 ± 1.174
Basófilos ($/\mu\text{L}$)	0-1	38 ± 132	43 ± 65	87 ± 197	78 ± 195	61 ± 74
Linfocitos ($/\mu\text{L}$)	1.110–3.300	2.762 ± 1.099	1.725 ± 941	2.242 ± 1.752	622 ± 359	1.846 ± 1.358
Monocitos ($/\mu\text{L}$)	0-210	200 ± 52	$1.225 \pm 889^*$	$1.466 \pm 1.134^*$	1.042 ± 1.308	$1.941 \pm 1.500^*$

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos. * = Diferencias estadísticas respecto al grupo control.

En la Tabla 33 se aprecian los resultados correspondientes a la hematología de los perros con DRA atendiendo a los criterios de la clasificación IRIS. En todos los grados de la enfermedad se observa leucocitosis debida a neutrofilia.

VII.4.2 Bioquímica plasmática

En la Tabla 34 se muestran los resultados obtenidos para la bioquímica sanguínea del grupo de DRA. La RBP sólo se determinó en 23 perros. Se observa la presencia de azoemia, ascendente conforme lo hacen los grados de IRIS (Figura 5), acompañada de hiperfosfatemia a partir de IRIS II. Existe una correlación altamente significativa entre las concentraciones plasmáticas de creatinina y de fósforo ($P < 0,001$).

Tabla 34: Bioquímica plasmática del grupo de perros con DRA, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS I	IRIS II	IRIS III	IRIS IV
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	46,6 \pm 33,61 ^{c,d}	100,42 \pm 28,9 ^d	147,73 \pm 76,93 ^{*a}	209 \pm 57,38 ^{*a,b}
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	1,36 \pm 0,07 ^d	1,95 \pm 0,27 ^d	3,07 \pm 0,46 ^{*d}	7,31 \pm 1,46 ^{*a,b,c}
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,9 \pm 2,45 ^d	6,84 \pm 2,83	8,17 \pm 2,82	11 \pm 7,84 ^{*a}
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,16 \pm 0,12	0,29 \pm 0,12	0,48 \pm 0,14 [*]	1,36 \pm 0,42 [*]
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	45,44 \pm 18,86 ^d	53,4 \pm 14,16 ^d	61,78 \pm 50,65 ^d	180 \pm 83,13 ^{*a,b,c}
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	308,25 \pm 106,45 [*]	198,2 \pm 137,07 ^d	370,7 \pm 240,29 [*]	535,3 \pm 291,2 ^{*b}
GGT (UI/L)	1-6	3,74 \pm 1,59	6,25 \pm 4,02	9,84 \pm 7,61	12,6 \pm 8,78	9,7 \pm 5,89
LDH (UI/L)	20–500	257,79 \pm 241	139,4 \pm 125,92	123,51 \pm 77,19 ^d	141,03 \pm 122,21	392,1 \pm 127,52 ^b
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	227,57 \pm 120,64	216,43 \pm 47,1	257,5 \pm 91,8	181,2 \pm 46,92
PT (g/dL)	5,50-7,30	6,38 \pm 0,58	6,53 \pm 1,3	7,11 \pm 1,01	6,68 \pm 0,95	7,57 \pm 0,97
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,26 \pm 0,52	3,62 \pm 0,68	3,3 \pm 0,61	3,72 \pm 0,58

ALT = alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamil-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice. * = control. ^a = DRA IRIS I, ^b = DRA IRIS II, ^c = DRA IRIS III, ^d = DRA IRIS IV.

También se observa un incremento progresivo en la concentración plasmática de cistatina C, estadísticamente significativo en las fases III y IV de IRIS (Tabla 34; Figura 5). Los resultados comparativos con los obtenidos en los perros con ERC se representan más adelante (Figura 17).

RESULTADOS

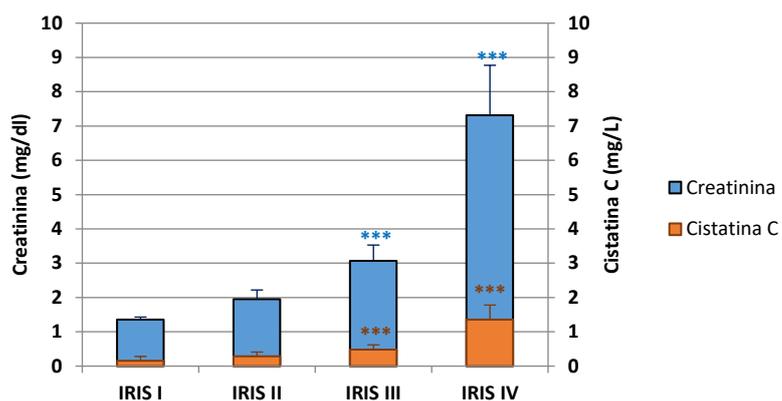


Figura 5: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con DRA en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control *** $P < 0,001$.

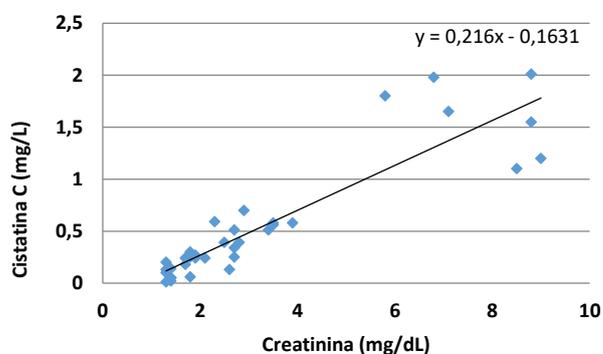


Figura 6: Gráfica de correlación entre las concentraciones plasmáticas de cistatina C y de creatinina en los perros con DRA ($r = 0,9032$; $P < 0,001$).

La dispersión de datos observada en el plasma para la concentración de cistatina C es muy discreta (Figura 7), no observándose valores atípicos.

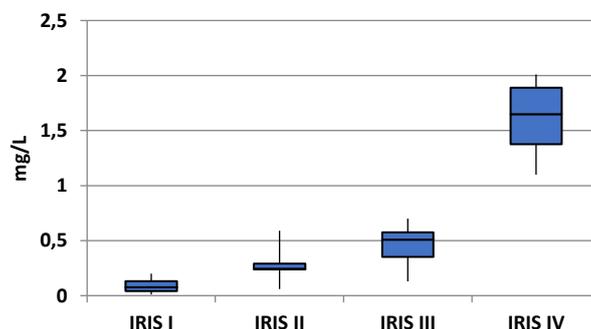


Figura 7: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con DRA, clasificados según IRIS.

Este parámetro presenta una alta correlación con la concentración plasmática de creatinina (Figura 6). La evolución de ambos se representa en la Figura 5.

Se observa un incremento, sobre todo en las últimas fases de IRIS, de los valores medios plasmáticos de ALT y FA.

No se ha podido realizar un estudio del RBP según la clasificación IRIS. No obstante, al comparar el grupo control ($30,99 \pm 6,18$ mg/L) con el de perros con DRA ($23,84 \pm 10,09$ mg/L) de forma conjunta, no se han observado diferencias significativas.

VII.4.3 Análisis de orina

En la Tabla 35 se muestran los resultados obtenidos en el análisis de orina del grupo de DRA. Se aprecia un incremento del valor UP/C, especialmente manifiesto en IRIS III y, sobre todo, en IRIS IV ($P < 0,001$). Este último presenta, además, una diferencia significativa ($P < 0,01$) con IRIS I y II. En general, se observa un incremento en los valores medios correspondientes a todos los biomarcadores urinarios estudiados, aunque la diferencia es significativa en todos ellos sólo en IRIS IV (Tabla 35; Figuras 25-28). Destacan los resultados observados para la ratio NAG/c urinaria, que presenta significación estadística respecto al grupo control en IRIS II, III y IV (Tabla 35; Figura 27). Este parámetro presenta además, en IRIS IV, una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) con las fases IRIS I, II y III.

La ratio cistatina C/c urinaria presenta un comportamiento semejante a la ratio NAG/c urinaria, aumentando de forma significativa en los grados II, III y IV de IRIS respecto al grupo control (Tabla 35; Figura 20). Su concentración en IRIS IV es significativamente mayor ($P < 0,001$) que en IRIS I y II. Además, presenta una correlación estadísticamente significativa con la concentración plasmática de creatinina (Figura 9) y de cistatina C (Figura 10). Los resultados comparativos con los obtenidos en los perros con ERC se representan más adelante (Figura 20).

Los datos obtenidos para el parámetro en cuestión se caracterizan por su escasa dispersión y por su distribución homogénea (Figura 8), aunque en IRIS IV se han encontrado 3 valores atípicos por exceso.

Tabla 35: Análisis de orina del grupo de perros con DRA, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS I	IRIS II	IRIS III	IRIS IV
UP/C	< 0,4	0,11 ± 0,07	1,54 ± 1,74 ^d	0,96 ± 1,23 ^d	2,02 ± 2,21 ^{*a}	2,78 ± 1,67 ^{*ab}
Densidad	1.020-1.050	1.034 ± 10,4	1.024 ± 14,69	1.028 ± 11,32	1.022 ± 8,04	1.016 ± 7,81
Cistatina C/c (µg/g)	13-709	361,08 ± 348,14	6.229 ± 12.215 ^d	14.938 ± 19.502 ^d	24.608 ± 21.953 [*]	59.110 ± 24.324 ^{*ab}
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	5,96 ± 4,07	8,91 ± 6,70	45,97 ± 66,06	144,08 ± 190,64 [*]	931,89 ± 484,98 [*]
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 ± 0,86	2,42 ± 3,78	52,64 ± 55,77	619,25 ± 666,54	755,35 ± 667,22 [*]
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 ± 1,45	1,24 ± 1,81 ^d	11,17 ± 3,24 ^{*d}	26,95 ± 28 ^{*d}	107,86 ± 77,55 ^{*abc}
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	2,9 ± 2,19	3,95 ± 2,79	27,66 ± 130,4 ^a	73,52 ± 89,14	520 ± 81 [*]

UP/C = ratio proteína/creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil-β-D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamyl-transpeptidasa/creatinina.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = DRA IRIS I, ^b = DRA IRIS II, ^c = DRA IRIS III, ^d = DRA IRIS IV.

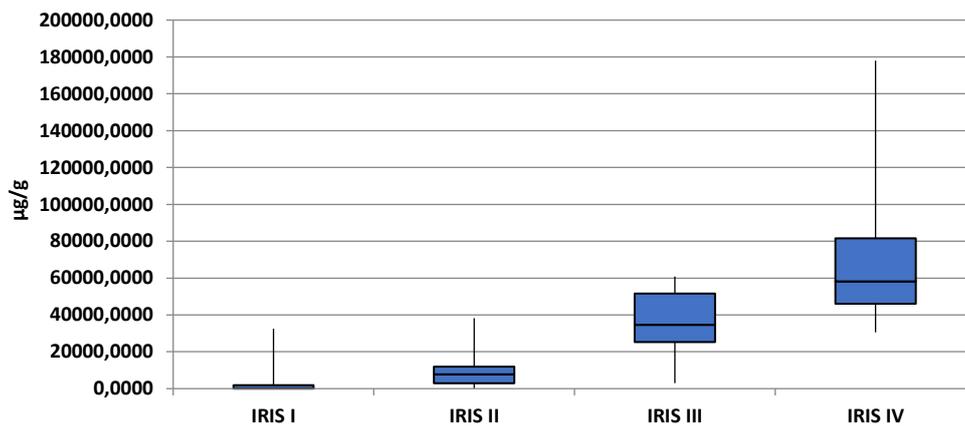


Figura 8: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con DRA, clasificados según IRIS.

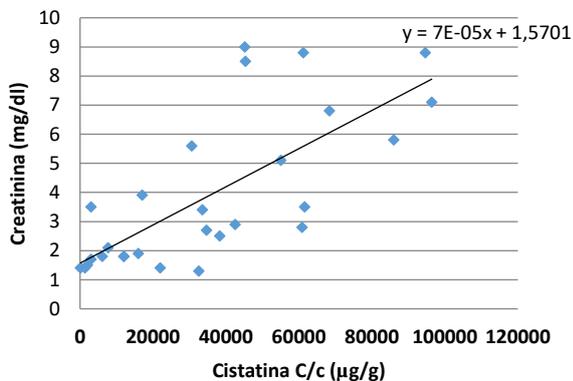


Figura 9: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la creatinina plasmática en los perros con DRA ($r = 0,7288$; $P < 0,001$).

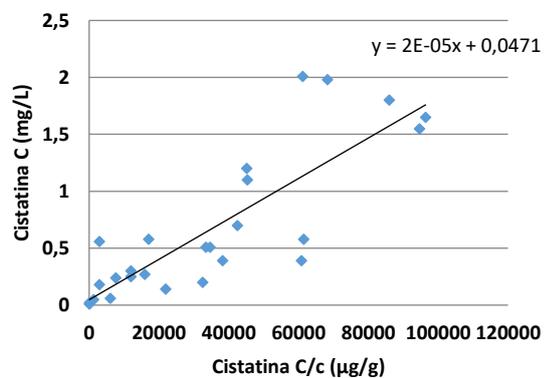


Figura 10: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de cistatina C en los perros con DRA ($r = 0,5895$; $P < 0,001$).

Si se estudian los resultados obtenidos individualmente (Figura 11), se ha observado su incremento en 5 de 10 perros en IRIS I (50%), 8 de 10 perros en IRIS II (80%), 9 de 10 perros en IRIS III (90%) y en todos los perros en IRIS IV (100%).

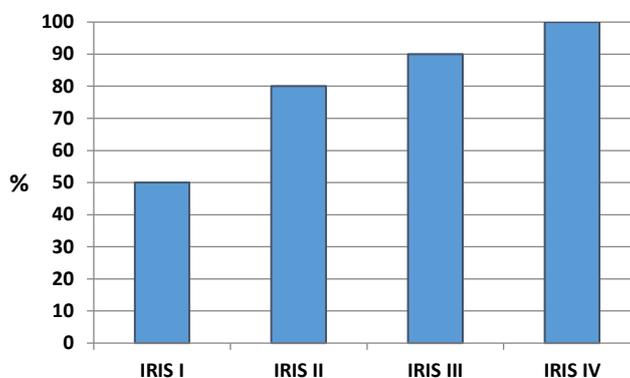


Figura 11: Incidencia de presentación de los perros con DRA que presentan un incremento de la ratio creatinina C/c urinaria, clasificados según IRIS.

No había suficientes perros para estudiar la ratio RBP/c urinaria por estadios IRIS. Sin embargo, si se estudian de forma conjunta los 23 perros en los que se determinó y se compara con el grupo control, se observa un incremento estadísticamente significativo (Grupo control = $0,4 \pm 0,48$ mg/g; perros con DRA = $21,36 \pm 17,89$ mg/g; $P < 0,001$).

VII.5 Enfermedad renal crónica

El grupo de perros con ERC, constituido por 141 animales, presentó una edad media de $12,64 \pm 3,85$ años y diferentes etiologías. De estos animales, 82 perros son machos (58,15%) y 59 perros son hembras (41,84%).

Este grupo se ha subdividido, a su vez, en 4 grupos atendiendo a los criterios establecidos por la clasificación IRIS.

El primer grupo, IRIS 1, compuesto por 31 perros, presentó una edad media de $10,31 \pm 7,22$ años, y una distribución por sexos de 20 machos (64,52%) y 11 hembras (35,49%). Todos presentaron un incremento de la concentración plasmática de creatinina al menos en dos extracciones diferentes de sangre, separadas como mínimo por un intervalo de tiempo de dos semanas. De estos animales, 12 tenían proteinuria en valores límite (UP/C = 0,2 – 0,4), de los que 6 tenían leishmaniosis y 6 ERC de etiología

desconocida, y 19 presentaron proteinuria patológica (UP/C = 0,5 - 2), de los que 10 tenían leishmaniosis y 9 ERC de etiología desconocida. En todos los casos la proteinuria persistió más de dos semanas.

El grupo IRIS 2, formado por 32 individuos, presentó una edad media de $13,92 \pm 8,85$ años, e incluye 18 machos (56,25%) y 14 hembras (43,75%). Todos presentaron un incremento de la concentración plasmática de creatinina al menos en dos extracciones diferentes de sangre, separadas como mínimo por un intervalo de tiempo de dos semanas, y una densidad urinaria < 1.030 . De estos animales, 13 tenían proteinuria en valores límite (UP/C = 0,2 - 0,4), de los que 3 tenían leishmaniosis. 19 perros presentaron proteinuria patológica (UP/C = 0,5 - 6), de los que 11 tenían leishmaniosis. En los perros con ERC negativos a leishmaniosis se diagnosticó hiperadrenocorticismismo en 2 perros, cardiopatías en 2 perros, linfoma en un perro, amiloidosis renal en un perro y etiología desconocida en 12 perros. En todos los casos la proteinuria persistió más de dos semanas.

El grupo IRIS 3, formado por 33 animales, presentó una edad media de $12,88 \pm 7,72$ años, 16 eran machos (48,48%) y 17 hembras (51,51%). Todos presentaron un incremento de la concentración plasmática de creatinina en al menos dos extracciones diferentes de sangre y una densidad urinaria < 1.030 . De estos animales, 3 presentaron proteinuria patológica con valores de UP/C comprendidos entre 0,5 y 4,9, de los que uno tenía leishmaniosis. 30 perros presentaron proteinuria con valor de $UP/C \geq 5$, de los que 16 tenían leishmaniosis. En los perros con ERC negativos a leishmaniosis se diagnosticó hiperadrenocorticismismo en un perro, pielonefritis crónica en un perro y etiología desconocida en 14 perros. En todos los casos la proteinuria persistió más de cuatro semanas.

Por último, el grupo IRIS 4, formado por 35 animales, presentó una edad media de $13,31 \pm 7,2$ años, formado por 21 machos (60%) y 14 hembras (40%). Todos presentaron un incremento de la concentración plasmática de creatinina en al menos dos extracciones diferentes de sangre y una densidad urinaria < 1.030 . Todos los perros presentaron proteinuria patológica (UP/C ≥ 5). De ellos, 16 tenían leishmaniosis. En los perros con ERC negativos a leishmaniosis se diagnosticó

pielonefritis crónica en un perro, leptospirosis crónica en un perro, mastocitoma en un perro, DRA agudo repetido y secundario a obstrucción uretral por cálculos urinarios en un perro y etiología desconocida en 15 perros. En todos los casos la proteinuria persistió más de cuatro semanas.

VII.5.1 Hematología

En la Tabla 36 se muestran los valores obtenidos en la hematología. Se aprecia el desarrollo de una anemia moderada normocítica y normocrómica, más acentuada en los grados 3 y 4 de IRIS ($P < 0,001$ respectivamente para el recuento de eritrocitos, valor hematocrito y concentración de hemoglobina). Los resultados obtenidos indican la tendencia a desarrollar leucocitosis debida a neutrofilia en estos perros.

Tabla 36: Hematología del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	5,37 \pm 1,36	5,34 \pm 1,43	4,25 \pm 1,56*	4,29 \pm 1,37*
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	37,61 \pm 10,53 ^{cd}	35,45 \pm 10,12*	27,3 \pm 7,95 ^{*a}	29,03 \pm 8,07 ^{*a}
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	12,2 \pm 3,52*	13,32 \pm 4,35 ^{cd}	10,13 \pm 3,65 ^{*b}	10,4 \pm 3,26 ^{*b}
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	69,98 \pm 5,87	72,13 \pm 7,23	69,59 \pm 5,03	72,59 \pm 5,87
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	33,76 \pm 6,46	33,55 \pm 5,84	33,93 \pm 2,43	33,76 \pm 1,71
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	302.029 \pm 198.531	278.545 \pm 166.104	286.000 \pm 254.168	237.227 \pm 149.857
WBC ($/\mu\text{L}$)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663	11.002 \pm 8.427	19.030 \pm 14.856	18.432 \pm 12.365	11.785 \pm 4.830
Neutrófilos ($/\mu\text{L}$)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069	8.214 \pm 6.779	13.424 \pm 10.545	13.515 \pm 9.568	9.590 \pm 3.983
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	90-1.750	638 \pm 376	395 \pm 259	547 \pm 491	634 \pm 958	560 \pm 330
Basófilos ($/\mu\text{L}$)	0-1	38 \pm 132	38 \pm 116	190 \pm 892	394 \pm 2.062	22 \pm 54
Linfocitos ($/\mu\text{L}$)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099	2.021 \pm 1.913	4.063 \pm 1.658	1.602 \pm 1.346	1.238 \pm 1.042
Monocitos ($/\mu\text{L}$)	0-210	200 \pm 52	581 \pm 437	738 \pm 635	875 \pm 784	772 \pm 518

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

VII.5.2 Bioquímica plasmática

En la Tabla 37 se muestran los valores correspondientes a la bioquímica sanguínea de los grupos estudiados. Se observa la presencia de azoemia en todos los grupos (en

aumento según lo hacen las fases de la enfermedad), acompañada de hiperfosfatemia en IRIS 3 y 4, estadísticamente visibles en los grados IRIS 2, 3 y 4 respecto al grupo control y entre sí. No se ha observado diferencia entre el valor del RBP correspondiente a los grupos control ($30,99 \pm 6,18$ mg/L) y problema ($30,47 \pm 11,44$ mg/L).

Tabla 37: Bioquímica plasmática del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	65,39 \pm 38,56 ^{cd}	89,76 \pm 48,56 ^{*cd}	179,47 \pm 107,99 ^{*abd}	290,86 \pm 137,75 ^{*abc}
Creatinina (mg/dL)	0.70–1,20	0,87 \pm 0,14	1,34 \pm 0,16 ^{cd}	1,77 \pm 0,29 ^{*cd}	3,58 \pm 0,92 ^{*abd}	8,49 \pm 3,25 ^{*abc}
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,58 \pm 1,41 ^{cd}	5,17 \pm 1,95 ^{cd}	9,51 \pm 2,88 ^{*abd}	16,4 \pm 5,37 ^{*abc}
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,29 \pm 0,15 ^d	0,38 \pm 0,26 ^{*d}	0,76 \pm 0,58 ^{*d}	1,33 \pm 0,7 ^{*abc}
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	62,46 \pm 52,89	62,09 \pm 54,47	77,55 \pm 86,46	73,29 \pm 109,48
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	109,17 \pm 60,01	187,63 \pm 197,35	197,41 \pm 240,26	201,06 \pm 193,23
GGT (UI/L)	1-6	3,74 \pm 1,59	6,33 \pm 3,79	8,2 \pm 5,8	15,24 \pm 13,76	9,29 \pm 7,93
LDH (UI/L)	20–500	257,79 \pm 241	118,37 \pm 62,14	165,42 \pm 111,27	186,88 \pm 269,72	220,67 \pm 282,27
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	227,38 \pm 130,01	226,03 \pm 124,26	284,83 \pm 82,96 [*]	247,91 \pm 91,29 [*]
PT (g/dL)	5,50-7,30	6,38 \pm 0,58	7,22 \pm 1,52 [*]	6,73 \pm 1,09	6,52 \pm 1,64	6,78 \pm 1,35
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,17 \pm 0,64	3,21 \pm 0,66	2,87 \pm 0,7 ^{**}	2,86 \pm 0,66 [*]

ALT = alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

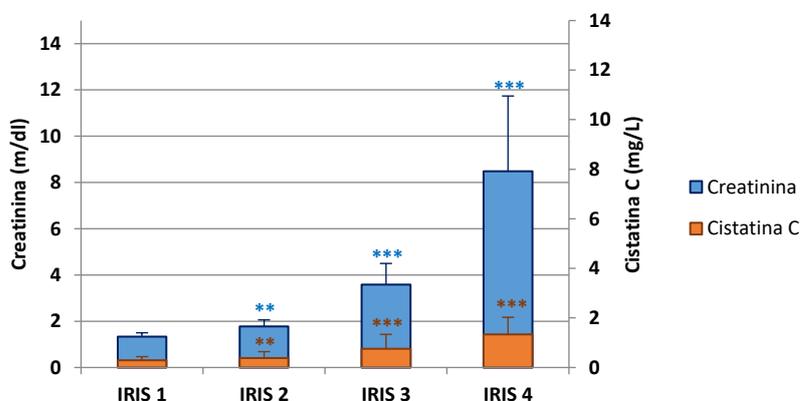


Figura 12: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con ERC en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control ** P < 0,01; *** P < 0,001.

La concentración de cistatina C plasmática presenta un incremento respecto al grupo control, que se hace visible desde el grado IRIS 1, aunque es estadísticamente significativo a partir de IRIS 2 (Tabla 37; Figuras 12 y 17). Este incremento presenta una fuerte correlación con las concentraciones plasmáticas de creatinina (Figura 13) y de fósforo (Figura 14).

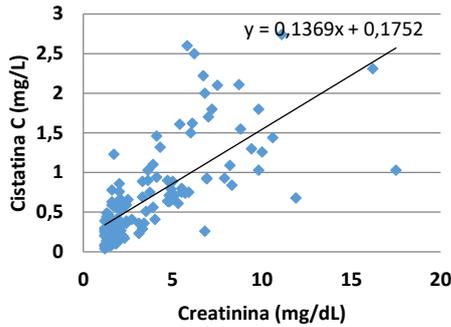


Figura 13: Gráfica de correlación entre la concentración plasmática de cistatina C y creatinina en los perros con ERC ($r = 0,7234$; $P < 0,001$).

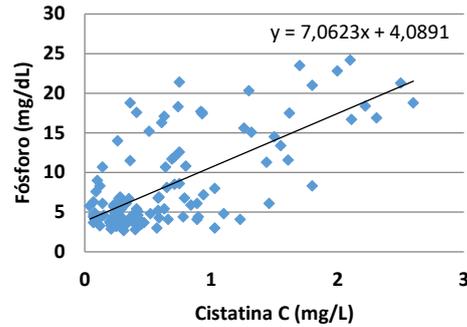


Figura 14: Gráfica de correlación entre la concentración plasmática de cistatina C y fósforo en los perros con ERC ($r = 0,6868$; $P < 0,001$).

Los datos correspondientes a este parámetro presentan una dispersión que va en aumento a medida que avanza la clasificación IRIS (Figura 15). No se han encontrado valores atípicos en ninguno de los grupos.

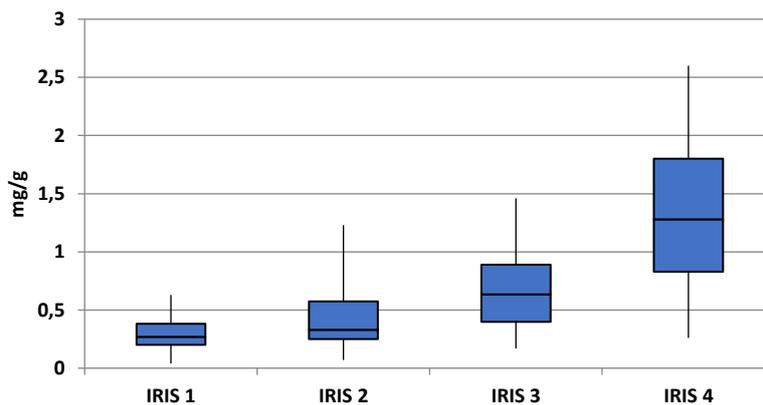


Figura 15: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con ERC, clasificados según IRIS.

La concentración media de cistatina C plasmática obtenida en los perros con ERC estudiados en conjunto es superior a la de los perros con DRA, tal y como se puede

apreciar en la Figura 16, aunque no hay diferencia estadística entre ambos grupos. Cuando se estudian los resultados en función de la clasificación IRIS, se observa la misma tendencia en ambos grupos (Figura 17).

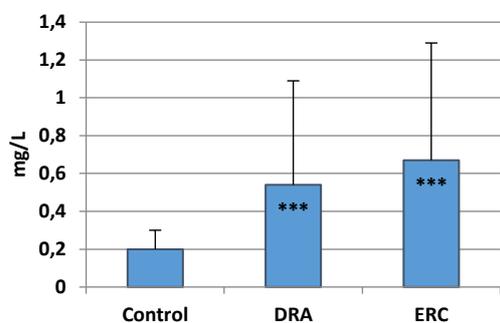


Figura 16: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros control, con DRA y con ERC. Diferencia significativa respecto al grupo control *** $p < 0,001$.

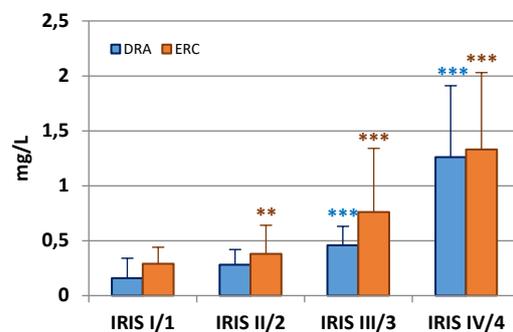


Figura 17: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la cistatina C plasmática de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Se observa hipoalbuminemia, debido al descenso en la concentración de albúmina plasmática en IRIS 3 y 4 (Tabla 37; $P < 0,01$). Este hallazgo está correlacionado ($P < 0,05$) con la concentración de fósforo plasmático. Coincide con un aumento del colesterol en estos grupos ($P < 0,05$).

VII.5.3 Análisis de orina

En la Tabla 38 se muestran los valores obtenidos para el análisis de orina. Se aprecia que existe un incremento estadísticamente significativo respecto al grupo control para el UP/C en las fases 3 y 4 de IRIS, así como una densidad media < 1.030 en todos los grupos estudiados.

Se observa un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria estadísticamente significativo respecto al grupo control en todas las fases de IRIS (Tabla 38; Figura 20). Los grupos de perros de IRIS 1 y 2 presentan también diferencias significativas con IRIS 3 y 4 respectivamente.

El correspondiente diagrama de cajas y bigotes muestra una gran dispersión del grupo de los datos correspondientes al grupo IRIS 3. En IRIS 1 se han encontrado 4 valores atípicos en la zona de mayor concentración para IRIS 1 (Figura 18).

Tabla 38: Análisis de orina del grupo de perros con ERC, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
UP/C	< 0,4	0,11 \pm 0,07	1,69 \pm 0,64	1,76 \pm 1,9	5,58 \pm 2,39*	5,98 \pm 1,03*
Densidad	1.020-1.050	1.034 \pm 10,4	1.027 \pm 10,93	1.023 \pm 11,89	1.016 \pm 4,61	1.018 \pm 9,11
Cistatina C/c (μ g/g)	13-709	361,08 \pm 348,14	6.458 \pm 7.001* ^{c,d}	11.507 \pm 13.145* ^{c,d}	22.000 \pm 21.091* ^{a,b}	51.453 \pm 42.830* ^{a,b}
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	5,96 \pm 4,07	21 \pm 21,52	34,55 \pm 49,26*	49,56 \pm 59,96*	51,48 \pm 39,34*
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 \pm 0,86	12,94 \pm 30,89	23,73 \pm 28,15*	33,22 \pm 96,31*	231,81 \pm 295,49*
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 \pm 1,45	3,26 \pm 1,18*	9,34 \pm 6,67*	28,58 \pm 33,72*	38,69 \pm 42,62*
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	2,9 \pm 2,19	25,88 \pm 29,55*	8,67 \pm 6,71*	35,79 \pm 58,56*	87,3 \pm 60,71*

UP/C = ratio proteína/creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil- β -D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamil-transpeptidasa/creatinina. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

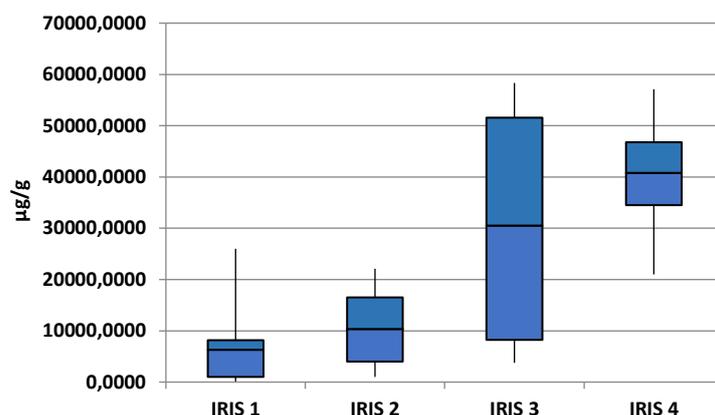


Figura 18: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con ERC, clasificados según IRIS.

Al contrario de lo que ocurre en plasma, la ratio de cistatina C en orina es inferior en este grupo respecto a los perros con DRA cuando se estudian ambos grupos en conjunto (Figura 19), aunque no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Este hallazgo se comprueba, a medida que avanza la enfermedad, en función de la clasificación IRIS (Figura 20).

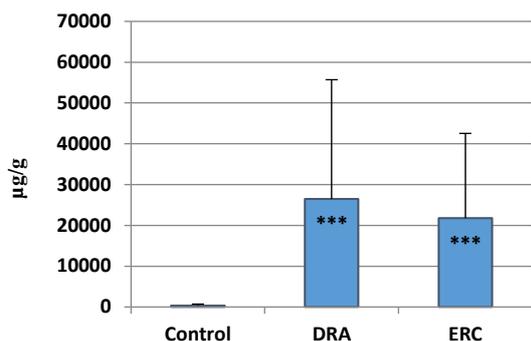


Figura 19: Representación gráfica del valor medio de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros control, con DRA y con ERC. Diferencia significativa respecto al grupo control *** P < 0,001.

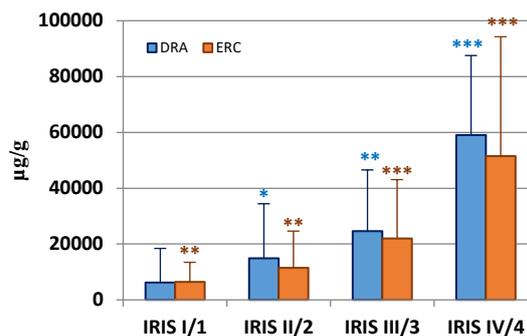


Figura 20: Representación gráfica del valor medio ± desviación estándar de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0.05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Si se valoran los resultados de forma individual (Figura 21), la ratio cistatina C/c urinaria aparece incrementada en 38 de 45 perros en IRIS 1 (84,44%), en 32 de 36 perros en IRIS 2 (88,88%) y en todos los perros en IRIS 3 y 4 (100%), como se puede apreciar también en la Figura 18.

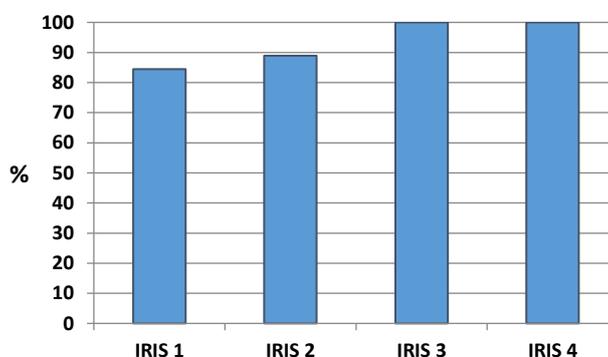


Figura 21: Incidencia de presentación de los perros con ERC que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.

Este parámetro está estadísticamente correlacionado con la cistatina C (Figura 22), creatinina (Figura 23) y fósforo plasmático (Figura 24).

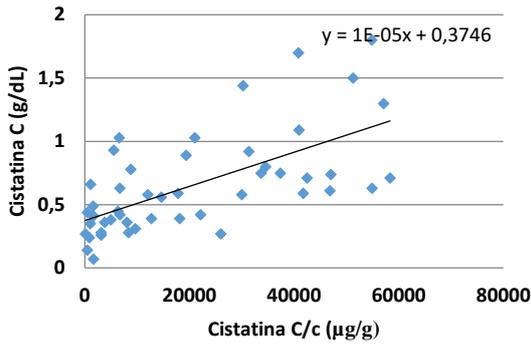


Figura 22: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de cistatina C en los perros con ERC ($r = 0,6406$; $P < 0,001$).

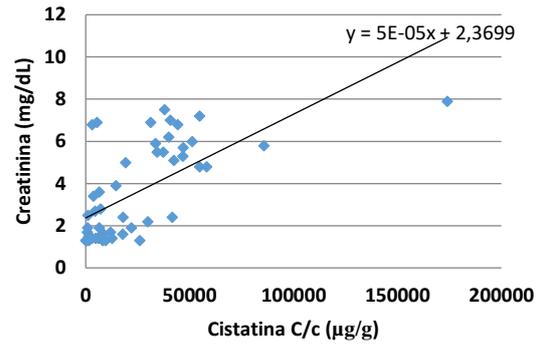


Figura 23: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de creatinina en los perros con ERC ($r = 0,6406$; $P < 0,001$).

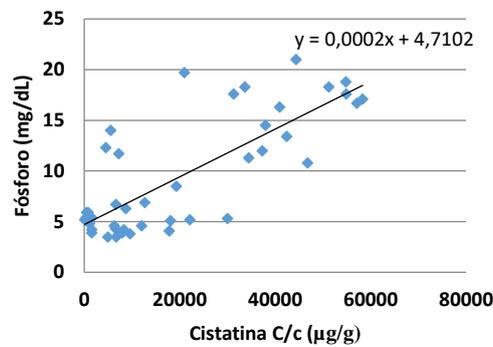


Figura 24: Gráfica de correlación entre la ratio cistatina C/c urinaria y la concentración plasmática de fósforo en los perros con ERC ($r = 0,6406$; $P < 0,001$).

La concentración del resto de biomarcadores urinarios estudiados (Tabla 38) también presenta un incremento progresivo, a medida que la gravedad de la enfermedad avanza (Figuras 25-28), de forma significativa desde IRIS 1 para NAG/c (Figura 27) y GGT/c (Figura 28). Es necesario destacar que todos los biomarcadores urinarios presentan una concentración superior en los perros con DRA comparados con los que padecen ERC (Tablas 35 y 38; Figuras 25-28).

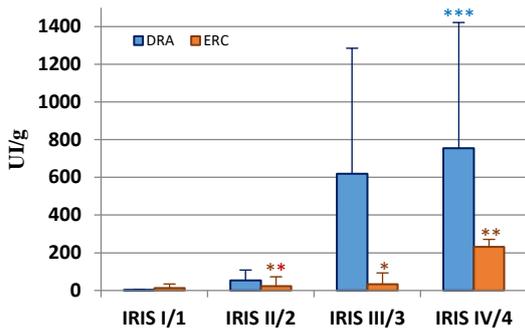


Figura 25: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio FA/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0.05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

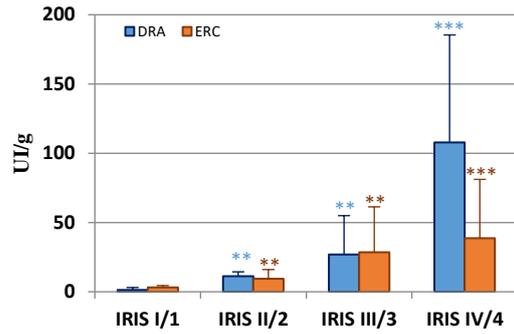


Figura 26: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio NAG/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control ** P < 0,01, *** P < 0,001.

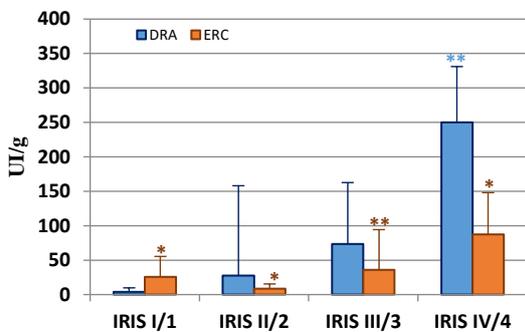


Figura 27: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio GGT/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0.05, ** P < 0,01.

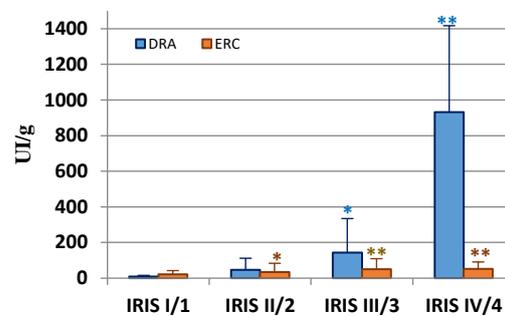


Figura 28: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio LDH/c urinaria de los perros con DRA y con ERC, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0.05, ** P < 0,01.

La ratio RBP/c urinaria presenta un incremento significativo (P < 0,001) respecto al grupo control (0,4 \pm 0,48 mg/g) cuando se estudia de forma global en el grupo de perros con ERC (17,69 \pm 16,03mg/g). Como ocurre con el resto de biomarcadores urinarios estudiados, su concentración es menor que en los perros con DRA.

VII.6 Leishmaniosis canina

VII.6.1 Presencia de azoemia

Con el fin de comprobar la utilidad de la determinación de cistatina C en sangre y en orina en perros con leishmaniosis, se ha procedido a realizar un estudio en dos grupos de perros con leishmaniosis:

- Leishmaniosis sin azoemia, constituido por 35 animales de diferentes razas, 15 hembras (42,86%) y 20 machos (57,14%). La edad media de este grupo es de $5,11 \pm 2,52$ años (edades comprendidas entre 1 y 13 años).

- Leishmaniosis con azoemia: constituido por 63 perros de diferentes razas, 38 machos (60,32%) y 25 hembras (39,68%), con una edad media de $6,15 \pm 2,66$ años, incluidos en el grupo general de perros con ERC. Según la clasificación IRIS se han dividido, además, en los siguientes subgrupos: IRIS 1, formado por 16 perros, 12 machos (75%) y 4 hembras (25%), con una edad media de $5,79 \pm 2,41$ años; IRIS 2, formado por 14 perros, 8 machos (57,14%) y 6 hembras (42,86%), con una edad media de $6,65 \pm 3,4$ años; IRIS 3, formado por 17 perros, 9 machos (52,94%) y 8 hembras (47,06%), con una edad media de $5,75 \pm 2,95$ años; IRIS 4, formado por 16 perros, 9 machos (56,25%) y 7 hembras (43,75%), con una edad media de $6,52 \pm 1,97$ años.

Los resultados obtenidos se han comparado con el grupo control y con el grupo restante de perros que presentaron azoemia debida a ERC y que fueron negativos a las pruebas de leishmaniosis. Este último grupo está formado por 68 perros, 37 machos (54,41%) y 31 hembras (45,59%), con una edad media de $8,3 \pm 4,55$ años. Según la clasificación IRIS se han dividido en los siguientes subgrupos: IRIS 1, formado por 15 perros, 8 machos (53,33%) y 7 hembras (46,66%), con una edad media de $6,41 \pm 5,02$ años; IRIS 2, formado por 18 perros, 10 machos (55,55%) y 8 hembras (44,44%), con una edad media de $8,97 \pm 5,02$ años; IRIS 3, formado por 16 perros, 7 machos (43,75%) y 9 hembras (56,25%), con una edad media de $9,06 \pm 4,75$ años; IRIS 4, formado por 19 perros, 12 machos (63,16%) y 7 hembras (36,84%), con una edad media de $8,44 \pm 4,54$ años.

VII.6.1.1 Hematología

En la Tabla 39 se pueden comparar los resultados hematológicos del grupo de leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis, comprobándose la presencia de anemia normocítica y normocrómica en los tres grupos estudiados.

Tabla 39: Hematología de los grupos de perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	Leishmaniosis sin azoemia	Leishmaniosis con azoemia	ERC sin leishmaniosis
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	5,62 \pm 1,28*	4,55 \pm 1,43*	4,93 \pm 1,54*
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	38,67 \pm 9,53*	30,62 \pm 8,81*	33,56 \pm 10,89*
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	12,88 \pm 3,12* ^{bc}	10,62 \pm 3,31* ^a	11,96 \pm 4,06* ^a
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	68,86 \pm 4,05	70 \pm 4,53	71,96 \pm 6,9
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	33,59 \pm 4,87	33,59 \pm 1,72	32,6 \pm 5,99*
Plaquetas (/ μL)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	226.784 \pm 130.787	213.269 \pm 123.481 ^c	324.233 \pm 227.008 ^b
WBC (/ μL)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663	9.252 \pm 5.629	12.579 \pm 15.365	16.793 \pm 19.531
Neutrófilos (/ μL)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069	6.587 \pm 4.429	9.996 \pm 14.997	11.995 \pm 14.452*
Eosinófilos (/ μL)	90-1.750	638 \pm 376	353 \pm 369	462 \pm 380	591 \pm 705
Basófilos (/ μL)	0-1	38 \pm 132	37 \pm 173	45 \pm 171 ^a	276 \pm 1.568
Linfocitos (/ μL)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099	1.851 \pm 1.069	1.387 \pm 793	2.955 \pm 2.543
Monocitos (/ μL)	0-210	200 \pm 52	592 \pm 520	669 \pm 467	801 \pm 713*

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = leishmaniosis sin azoemia, ^b = ERC con leishmaniosis, ^c = ERC sin leishmaniosis.

Cuando se estudian los perros con leishmaniosis y azoemia clasificados según IRIS (Tabla 40) se comprueba la existencia de anemia normocítica y normocrómica ya desde el grado IRIS 1, que se va agravando a medida que lo hace la enfermedad. El resto de la hematología no presenta diferencias reseñables con los animales sanos ni entre ellos.

En los perros con ERC por causas diferentes a leishmaniosis (Tabla 41) se observa que la anemia normocítica y normocrómica, propia de la enfermedad, se hace estadísticamente manifiesta a partir de IRIS 3. En el resto de parámetros hematológicos no se observan diferencias con el grupo control ni entre ellos.

RESULTADOS

Tabla 40: Hematología de los perros control y con leishmaniosis y azoemia, expresado como media ± desviación estándar.

	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,44 ± 0,78	5,14 ± 1,64*	4,92 ± 0,96*	4,45 ± 1,42*	3,94 ± 1,31*
HTO (%)	46,18 ± 5,33	33,1 ± 10,62*	34,47 ± 7,48*	29,94 ± 8,18*	27,08 ± 7,91*
HGB (g/dL)	16,15 ± 1,82	12 ± 3,89*	11,19 ± 2,35*	10,55 ± 3,48*	9,17 ± 2,7*
VCM (fl)	70,92 ± 3,83	68,43 ± 5,1	69,78 ± 2,41	69,84 ± 4,64	71,39 ± 4,66
CHCM (g/dL)	35,01 ± 1,36	34,46 ± 1,58	32,51 ± 1,59	33,89 ± 1,41	33,24 ± 1,86
Plaquetas (/μL)	261.372 ± 155.612	174.556 ± 89.569	230.385 ± 93.574	174.786 ± 94.146	250.194 ± 164.687
WBC (/μL)	10.012 ± 2.663	7.151 ± 2.889	18.275 ± 15.524	11.623 ± 6.450	11.977 ± 3.529
Neutrófilos (/μL)	6.074 ± 2.069	5.080 ± 2.619	15.096 ± 12.672	8.517 ± 6.420	9.641 ± 3.078
Eosinófilos (/μL)	638 ± 376	303 ± 312	655 ± 566	380 ± 316	452 ± 233
Basófilos (/μL)	38 ± 132	108 ± 237	85 ± 299	25 ± 67	14 ± 44
Linfocitos (/μL)	2.762 ± 1.099	1.364 ± 689	1798 ± 932	1.311 ± 791	1.161 ± 669
Monocitos (/μL)	200 ± 52	524 ± 294	602 ± 365	654 ± 445	796 ± 598

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

Tabla 41: Hematología del grupo de perros control y con ERC sin leishmaniosis, expresado como media ± desviación estándar.

	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
RBC (x10 ⁶ /μL)	6,44 ± 0,78	5,72 ± 1,32 ^{cd}	5,5 ± 1,36 ^d	4,31 ± 1,58 ^{aa}	4,1 ± 1,33 ^{aa,b}
HTO (%)	46,18 ± 5,33	39,89 ± 10,52 ^{cd}	37,04 ± 10,32*	27,36 ± 8,6 ^{aa}	28,11 ± 8,45 ^{aa}
HGB (g/dL)	16,15 ± 1,82	12,87 ± 3,26*	14,41 ± 4,67 ^{cd}	10,47 ± 3,78 ^{bb}	9,97 ± 3,07 ^{bb}
VCM (fl)	70,92 ± 3,83	69,75 ± 7,32*	74,68 ± 7,87*	70,05 ± 4,68	73,16 ± 6,22
CHCM (g/dL)	35,01 ± 1,36	31,08 ± 8,36	31,19 ± 7,58	34,69 ± 2	33,83 ± 1,57
Plaquetas (/μL)	261.372 ± 155.612	377.000 ± 218.876	302.722 ± 194.930	375.133 ± 325.782	252.650 ± 156.087
<WBC (μL)	10.012 ± 2.663	12.212 ± 10.287	19.993 ± 20.956	25.843 ± 22.782*	11.702 ± 5.577
Neutrófilos (/μL)	6.074 ± 2.069	8.921 ± 8.170	12.256 ± 10.785	18.708 ± 27.117*	9.647 ± 4.527
Eosinófilos (/μL)	638 ± 376	431 ± 247	487 ± 459	869 ± 1.333	606 ± 372
Basófilos (/μL)	38 ± 132	23 ± 48	288 ± 1.189	813 ± 3.010	26 ± 56
Linfocitos (/μL)	2.762 ± 1.099	2.506 ± 2.347	3.027 ± 1.758	2.003 ± 1.738	1.332 ± 1.200
Monocitos (/μL)	200 ± 52	431 ± 337 ^{cc}	868 ± 776	1.187 ± 670 ^{aaa}	747 ± 506

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

VII.6.1.2 Bioquímica plasmática

Tal y como se puede comprobar en la Tabla 42, los perros con leishmaniosis, tanto con azoemia como sin ella, se caracterizan por presentar hiperproteinemia ($P < 0,001$) respecto al grupo control. Los tres grupos presentan hipoalbuminemia estadísticamente significativa respecto a los animales sanos ($P < 0,01$ para el grupo de leishmaniosis sin azoemia y $P < 0,001$ para los grupos de leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis respectivamente). Los dos grupos de perros con ERC presentan azoemia ($P < 0,001$) acompañada de incremento en la concentración plasmática de cistatina C e hiperfosfatemia.

Tabla 42: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	Leishmaniosis sin azoemia	Leishmaniosis con azoemia	ERC sin leishmaniosis
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	46,86 \pm 13,64 ^{bc}	162,29 \pm 121,01 ^{*a}	157,25 \pm 136,89 ^{*a}
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	1,06 \pm 0,26 ^{bc}	3,99 \pm 3,5 ^{*a}	3,76 \pm 3,25 ^{*a}
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,58 \pm 0,91 ^{bc}	11,05 \pm 7,59 ^{*ac}	8,29 \pm 5,48 ^{*ab}
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,23 \pm 0,11 ^c	1,32 \pm 0,73 [*]	0,72 \pm 0,64 ^{*a}
ALT (UI/L)	16–49	43,48 \pm 19,42	37,5 \pm 16,62 ^c	52,04 \pm 39,98	81,72 \pm 99,69 ^{*a}
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	128,33 \pm 60,72	126,74 \pm 131,11 ^c	237,97 \pm 228,6 ^{*b}
GGT (UI/L)	1-6	3,74 \pm 1,59	5,73 \pm 2,73	7,95 \pm 5,14	11,65 \pm 11,54 ^a
LDH (UI/L)	20–500	257,79 \pm 241	127,85 \pm 116,13 ^a	135,7 \pm 81,34 ^a	194 \pm 256,37
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	205,61 \pm 84,25	236,55 \pm 102,64	260,34 \pm 128,27
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	7,85 \pm 1,19 ^{*b}	7,69 \pm 1,47 ^{*ac}	6,33 \pm 1,19 ^b
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,07 \pm 0,54 [*]	2,8 \pm 0,65 ^{*cc}	3,11 \pm 0,68 ^{*b}
RBP (mg/L)	24,81–97,17	30,99 \pm 6,18	-	30,75 \pm 10,16 [#]	30,25 \pm 12,64 ^{##}

ALT = alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamil-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa; RBP = proteína de unión al retinol. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = leishmaniosis sin azoemia, ^b = ERC con leishmaniosis, ^c = ERC sin leishmaniosis. [#]N = 12; ^{##}N = 18.

En la Tabla 43 se reflejan los valores de la bioquímica sanguínea del grupo de animales con leishmaniosis y azoemia, clasificados según los criterios IRIS. Se observa azoemia en todos los grupos estudiados, estadísticamente manifiesta en los grados IRIS 3 y 4 ($P < 0,001$), así como de la fase IRIS 4 con el resto de fases IRIS ($P < 0,001$). Igual ocurre con la presentación de hiperfosfatemia, y se constata la presencia de hiperproteinemia ($P < 0,001$). El estudio estadístico refleja la presencia de hipoalbuminemia en IRIS 2 ($P < 0,01$) e IRIS 3 y 4 ($P < 0,001$ respectivamente).

También se observa un incremento de la concentración de cistatina C a partir de IRIS 1, estadísticamente significativo en IRIS 2, 3 y 4 (Figura 30). El grupo IRIS 4 presenta diferencias estadísticas, a su vez, con IRIS 1, 2 y 3.

Tabla 43: Bioquímica plasmática del grupo de perros control, con leishmaniosis y azoemia expresado como media \pm desviación estándar.

	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
Urea (mg/dL)	32,16 \pm 7,7	59,99 \pm 41,9 ^{cd}	86,85 \pm 35,11	170,81 \pm 109,12 ^{*a}	260,59 \pm 120,67 ^{*ab}
Creatinina (mg/dL)	0,87 \pm 0,14	1,28 \pm 0,06 ^d	1,75 \pm 0,31 ^d	3,47 \pm 0,98 ^{*d}	7,4 \pm 4,2 ^{*abc}
Fósforo (mg/dL)	4,27 \pm 0,88	4,74 \pm 0,9 ^{cd}	4,99 \pm 0,93 ^{cd}	10,89 \pm 7,48 ^{*abd}	17,01 \pm 6,57 ^{*abc}
Cistatina C (mg/L)	0,2 \pm 0,1	0,31 \pm 0,1 ^d	0,4 \pm 0,2 ^{*d}	0,61 \pm 0,31 ^{*d}	1,46 \pm 0,65 ^{*abc}
ALT (UI/L)	43,18 \pm 21,01	36,5 \pm 15,66	58,46 \pm 53,25	44,85 \pm 32,66	59,94 \pm 38,09
FA (UI/L)	85,54 \pm 64,3	85,25 \pm 24,72	117,3 \pm 85,68	135,55 \pm 211,39	143,1 \pm 80,55
GGT (UI/L)	3,74 \pm 1,59	8,25 \pm 4,79	6,3 \pm 2,58	10,5 \pm 7,93	7,27 \pm 3,85
LDH (UI/L)	257,79 \pm 241	177,25 \pm 104,79	143,8 \pm 61,03	182,1 \pm 46,19	232 \pm 105,4
Colesterol (mg/dL)	216,46 \pm 59,45	252,5 \pm 163,6	198,27 \pm 66,89	266,08 \pm 78,73	229,35 \pm 92,16
PT (g/dL)	6,38 \pm 0,58	8,9 \pm 1,2 ^{*c}	7,85 \pm 0,74 [*]	7,95 \pm 1,22 ^{*a}	7,79 \pm 1,09 [*]
Albúmina (g/dL)	3,63 \pm 0,34	3,16 \pm 0,62	2,91 \pm 0,76 [*]	2,57 \pm 0,49 [*]	2,72 \pm 0,66 [*]

ALT = alanina-aminotransferasa; FA = fosfatasa alcalina; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa; RBP = proteína de unión al retinol. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice. * = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

En la Tabla 44 se muestran los valores bioquímicos del grupo de ERC sin leishmaniosis. Se puede apreciar el desarrollo de azoemia con hiperfosfatemia en todos los grupos, estadísticamente significativo en IRIS 3 y 4, diferencia que estos últimos grupos presentan tanto con el control ($P < 0,001$) como con IRIS 1 y 2 ($P < 0,001$ respectivamente). Igual ocurre con la concentración de cistatina C plasmática que, aunque el estudio estadístico demuestra su incremento en los grupos IRIS 3 y 4 (Figura 30), se observa ya aumentada en IRIS 1 y 2. En este grupo de animales no se observa hiperproteinemia, y la hipoalbuminemia se detecta de forma significativa en IRIS 3 y 4 ($P < 0,001$ respectivamente).

Tabla 44: Bioquímica plasmática de los grupos de perros con ERC sin leishmaniosis expresado como media ± desviación estándar.

	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
Urea (mg/dL)	32,16 ± 7,7	67,61 ± 36,9 ^{cd}	91,8 ± 60,2 ^{cd}	186,98 ± 119,34 ^{*ab}	277,47 ± 162,24 ^{*ab}
Creatinina (mg/dL)	0,87 ± 0,14	1,33 ± 0,09 ^{cd}	1,73 ± 0,18	3,71 ± 0,87 ^{*ad}	7,86 ± 3,29 ^{*ac}
Fósforo (mg/dL)	4,27 ± 0,88	4,61 ± 1,83 ^c	4,75 ± 1,6 ^c	9,11 ± 4,7 ^{*abd}	13,6 ± 5,52 ^{*abc}
Cistatina C (mg/L)	0,2 ± 0,1	0,27 ± 0,17 ^{cd}	0,44 ± 0,28	0,77 ± 0,54 ^{*a}	1,27 ± 0,59 ^{*a}
ALT (UI/L)	43,18 ± 21,01	73,69 ± 57,28	65,24 ± 59,61	86,43 ± 94,23	100,78 ± 153,78
FA (UI/L)	85,54 ± 64,3	121,13 ± 70,05	265,78 ± 257,52	310,83 ± 267,38	265,45 ± 260,47
GGT (UI/L)	3,74 ± 1,59	5,38 ± 1,77 ^c	10,78 ± 7,63 ^c	25 ± 17,55 ^{abd}	10,07 ± 10,15 ^c
LDH (UI/L)	257,79 ± 241	90,11 ± 52,84	159,5 ± 120,95	216,89 ± 226,67	361,5 ± 294,78
Colesterol (mg/dL)	216,46 ± 59,45	223,21 ± 151	257,5 ± 165,21	314,86 ± 85,2	259,33 ± 85,94
PT (g/dL)	6,38 ± 0,58	6,9 ± 1,46	6,37 ± 0,91	6,13 ± 1,37	5,93 ± 0,83
Albúmina (g/dL)	3,63 ± 0,34	3,03 ± 0,65	3,44 ± 0,57	3,16 ± 0,82 [*]	2,88 ± 0,61 [*]

ALT = alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa; RBP = proteína de unión al retinol. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

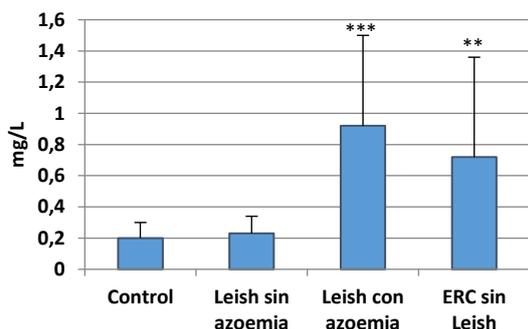


Figura 29: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros control, leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis. Diferencias significativas respecto al grupo control: ** P < 0,01, *** P < 0,001.

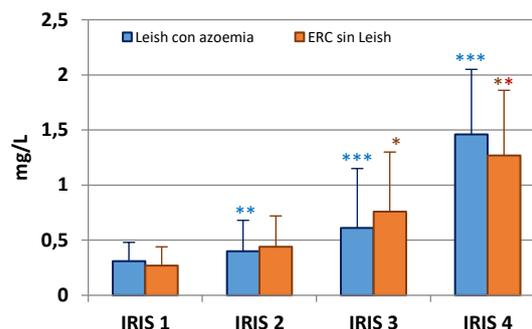


Figura 30: Representación gráfica del valor medio de cistatina C plasmática de los perros con leishmaniosis y azoemia y ERC sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0,05, ** P < 0,01, ***

El grupo de perros con leishmaniosis y azoemia presenta una concentración media de cistatina C plasmática superior a la de los perros con ERC sin leishmaniosis (Tablas 43 y 44), tal y como se puede apreciar en la Figura 29. No hay diferencia estadística entre ambos grupos.

Cuando se estudian los resultados en función de la clasificación IRIS, se observa que la concentración media de cistatina C plasmática de los perros con azoemia, con y sin

leishmaniosis, presentan una evolución semejante, aunque en los perros con leishmaniosis se eleva principalmente en IRIS 4 (Tablas 45 y 46; Figura 30).

VII.6.1.3 Análisis de orina

En la Tabla 45 se observan los valores del análisis de orina de los grupos de leishmaniosis sin azoemia, leishmaniosis con azoemia y ERC sin leishmaniosis. Se observa proteinuria manifiesta ($P < 0,001$) en los tres grupos de perros estudiados, así como una densidad < 1.030 en los animales con azoemia.

Se aprecia un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria de forma estadísticamente muy significativa ($P < 0,001$ para los dos grupos con leishmaniosis; $P < 0,01$ para los perros con ERC sin leishmaniosis; Figura 33). También la ratio NAG/c desarrolla un incremento estadístico significativo en todos los grupos, aunque el grado de significación fue inferior ($P < 0,05$ para los perros con leishmaniosis sin azoemia y con ERC sin leishmaniosis; $P < 0,01$ en los perros con leishmaniosis y azoemia; Figura 37).

El resto de enzimas urinarias (ratios LDH/c, FA/c y GGT/c) experimentan un incremento altamente significativo ($P < 0,001$ para todos los casos, excepto para la ratio FA/c en leishmaniosis con azoemia, cuyo grado de significación fue de $P < 0,01$) en los perros con leishmaniosis. No hay significación en el incremento de las mismas observado en los perros con ERC sin leishmaniosis (Figuras 36 y 38).

En ambos grupos con azoemia se observa un incremento de la ratio RBP/c urinaria respecto al grupo control (Tabla 45).

De forma individual, se ha observado un aumento de la ratio cistatina C/c urinaria en 20 de los 35 perros con leishmaniosis y sin azoemia, lo que supone el 58,82% de los casos.

En la Tabla 46 se expresan los valores obtenidos en el análisis de orina de los perros con leishmaniosis y azoemia clasificados según IRIS. Estos perros presentan una clara proteinuria, acompañada de densidad < 1.030 , estadísticamente significativas ambas en los grados IRIS 3 y 4 ($P < 0,001$ respectivamente). La ratio NAG/c urinaria presenta un incremento en todas las fases IRIS (Figura 37). Las ratios cistatina C/c, FA/c, GGT/c

y LDH/c aumentan en los grados IRIS 2, 3 y 4, con diferentes grados de significación (Figuras 34 – 38).

Tabla 45: Análisis de orina de los grupos de perros control y con leishmaniosis sin azoemia, ERC con leishmaniosis y ERC sin leishmaniosis, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	Leishmaniosis sin azoemia	Leishmaniosis con azoemia	ERC sin leishmaniosis
UP/C	< 0,4	0,11 ± 0,07	0,65 ± 0,92*	4,37 ± 3,16*	3,74 ± 2,54*
Densidad	1.020-1.050	1.034 ± 10,4	1,030 ± 12,69*	1,022 ± 9,63*	1,020 ± 10,28*
Cistatina C/c (µg/g)	13-709	361,08 ± 348,14	3.890 ± 4.979* ^{bc}	31.077 ± 24.929* ^a	36.706 ± 35.509* ^a
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	5,96 ± 4,07	26,11 ± 38,87*	98,67 ± 99,43*	240,99 ± 250,85
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 ± 0,86	6,09 ± 13,47*	73,42 ± 71,67*	116,49 ± 121,94
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 ± 1,45	5,97 ± 7,46* ^{bc}	35,48 ± 36,72* ^{a c}	14,32 ± 15,12* ^{ab}
RBP/c (mg/g)	0,08-0,88	0,4 ± 0,48	-	24,84 ± 20,98* [#]	13,03 ± 8,5* ^{###}
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	2,9 ± 2,19	2,46 ± 2,49 ^b	42,15 ± 39,66* ^a	67,81 ± 68,16

UP/C = ratio proteína /creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil-β-D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; RBP/c = ratio proteína de unión al retinol/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamyl-transpeptidasa/creatinina. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice. * = control, ^a = leishmaniosis sin azoemia, ^b = ERC con leishmaniosis, ^c = ERC sin leishmaniosis. [#]N = 12; ^{###}N = 18.

De forma individual (Figura 31), se ha observado un aumento de la ratio cistatina C/c urinaria en 12 de 16 perros en IRIS 1 (75%), en 11 de 14 perros en IRIS 2 (78,57%), en 14 de 17 perros en IRIS 3 (82,35%) y en todos los perros en IRIS 4 (100%).

Tabla 46: Análisis de orina de los perros control y con leishmaniosis y azoemia, expresado como media ± desviación estándar, según la clasificación IRIS.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
UP/C	< 0,4	0,11 ± 0,07	0,75 ± 0,8 ^c	2,36 ± 1,83 ^c	6,78 ± 5,12* ^{ab}	5,08 ± 3,24*
Densidad	1.020-1.050	1.034 ± 10,4	1,028 ± 12,67	1,025 ± 11,41	1,017 ± 4,29*	1,019 ± 6,68*
Cistatina C/c (µg/g)	13-709	361,08 ± 348,14	1.010 ± 756 ^{cd}	10.934 ± 5.512* ^{cd}	38.024 ± 23.152* ^{ab}	41.426 ± 19.770* ^{ab}
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	0,11 ± 0,07	15,84 ± 21,84	17,94 ± 6,37*	18,39 ± 25,6*	40,42 ± 47,3*
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 ± 0,86	6,59 ± 5,38	29,99 ± 21,45*	36,37 ± 11,89*	124,74 ± 78,82*
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 ± 1,45	4,77 ± 0,33* ^d	12,55 ± 7,39* ^d	35,8 ± 19,81* ^d	85,79 ± 14,33* ^{abc}
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	2,9 ± 2,19	10,45 ± 27,65	9,18 ± 7,81*	18,69 ± 11,23*	111,21 ± 55,94*

UP/C = ratio proteína /creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil-β-D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamyl-transpeptidasa/creatinina. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

RESULTADOS

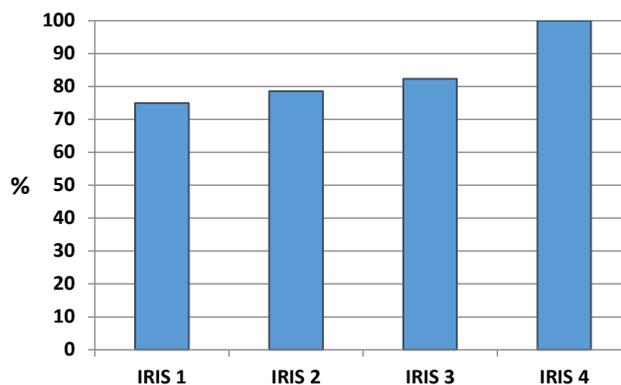


Figura 31: Incidencia de presentación de los perros con leishmaniosis y azoemia que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.

En la Tabla 47 se expresan los valores obtenidos en el análisis de orina de los perros con ERC sin leishmaniosis. Es el grupo de animales estudiado donde se observan menos variaciones en los biomarcadores urinarios respecto al grupo control. Se observa un incremento estadísticamente significativo respecto a éste de la ratio NAG/c urinaria en todas las fases IRIS (Figura 37) y de la ratio cistatina C/c urinaria en IRIS 1, 3 y 4, con diferentes grados de significación (Figura 34). El mayor incremento se observa en las fases 3 y 4 de IRIS, las cuales presentan, a su vez, incrementos significativos respecto a IRIS 1 y 2. Se ha observado un incremento de este parámetro (Figura 32) en 7 de 15 perros en IRIS 1 (46,66%), 9 de 18 perros en IRIS 2 (50%) y en todos los perros en IRIS 3 y 4 (100%). Las alteraciones del resto de biomarcadores se manifiestan de forma errática.

Tabla 47: Análisis de orina de los perros control y con ERC sin leishmaniosis, expresado como media ± desviación estándar, según la clasificación IRIS.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
UP/C	< 0,4	0,11 ± 0,07	1,7 ± 1,5 ^d	1,03 ± 1,4 ^d	4,63 ± 3,63*	6,46 ± 6,17 ^{*ab}
Densidad	1.020-1.050	1.034 ± 10,4	1.025 ± 10,01	1.021 ± 12,57	1.015 ± 4,76	1.018 ± 10,07
Cistatina C/c (µg/g)	13-709	361,08 ± 348,14	6.323 ± 3.014 ^{*cd}	6.636 ± 1.794 ^{cd}	43.950 ± 21.283 ^{*ab}	56.851 ± 28.948 ^{*ab}
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	0,11 ± 0,07	10,02 ± 10,11*	12,23 ± 6,45	49,31 ± 80,11	776,14 ± 253,36*
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 ± 0,86	2,94 ± 1,33*	5,08 ± 7,23	82,5 ± 57,79	338,89 ± 297,94
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 ± 1,45	2,83 ± 0,94*	7,04 ± 5,51*	7,25 ± 4,25*	7,31 ± 3,88*
GGT/c (UI/g)	0,71-5,09	2,9 ± 2,19	3,61 ± 4,05	36,58 ± 29,4	67,13 ± 84,87	156,75 ± 110,94

UP/C = ratio proteína /creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil-β-D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamil-transpeptidasa/creatinina. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice, * = control, ^a = ERC IRIS 1, ^b = ERC IRIS 2, ^c = ERC IRIS 3, ^d = ERC IRIS 4.

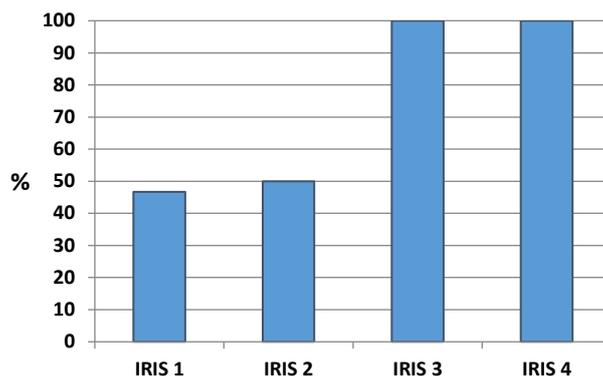


Figura 32: Incidencia de presentación de los perros con ERC sin leishmaniosis que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.

Al contrario de lo que ocurre en el plasma, la ratio cistatina C/c urinaria es inferior en el grupo de perros con leishmaniosis y azoemia que en aquellos que fueron negativos a la enfermedad (Tablas 49 y 50; Figura 33), aunque no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos. Este hallazgo se comprueba a medida que avanza la enfermedad, en función de la clasificación IRIS (Figura 34), aunque la evolución de ambos grupos es muy semejante.

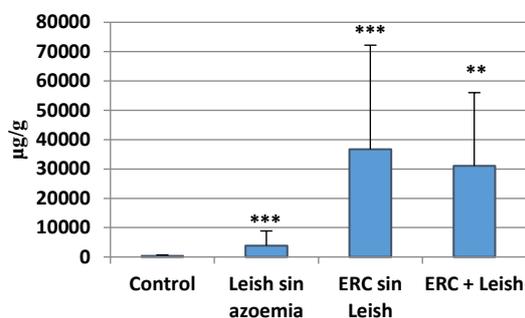


Figura 33: Representación gráfica del valor medio de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros control, con ERC y leishmaniosis, y con ERC sin leishmaniosis. Diferencias significativas respecto al grupo control: ** P < 0,01, *** P < 0,001.

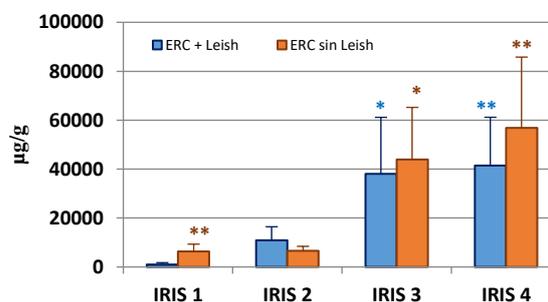


Figura 34: Representación gráfica del valor medio de cistatina C/c de los perros con ERC y leishmaniosis, y con ERC sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

Al comparar los resultados obtenidos en los demás biomarcadores urinarios, se observa que las ratios GGT/c, FA/c y LDH/c son superiores en los perros con ERC sin leishmaniosis, sobre todo en las fases 3 y 4 de la enfermedad. El comportamiento de la ratio NAG/c es inverso (Figuras 35-38). Se ha observado que existe una correlación positiva (P < 0,01) en estos perros entre la ratio NAG/c y el UP/C (Figuras 35-38).

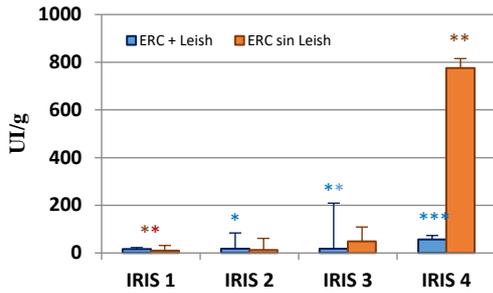


Figura 35: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio LDH/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control: * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

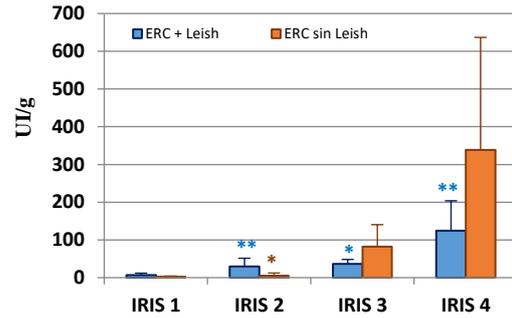


Figura 36: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio FA/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control: * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$.

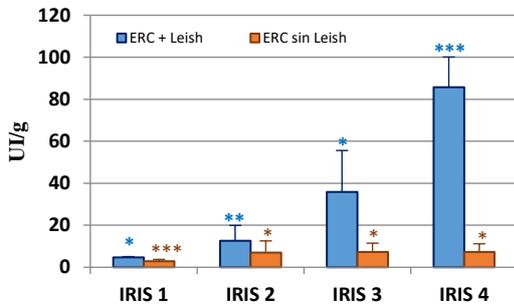


Figura 37: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio NAG/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

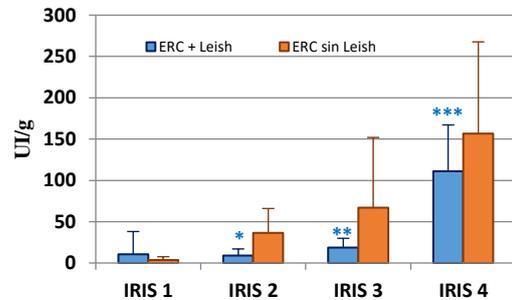


Figura 38: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio GGT/c urinaria de los perros con ERC con y sin leishmaniosis, en las diferentes fases IRIS. Diferencias significativas respecto al grupo control * $P < 0.05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

VII.6.2 Clasificación LeishVet

Se han estudiado 97 perros con leishmaniosis de diferentes razas clasificados en 4 subgrupos siguiendo las recomendaciones del grupo de expertos LeishVet³¹⁵:

Fase I (enfermedad leve): formado por 19 perros, 8 hembras (42,1%) y 11 machos (57,9%), con una edad media de $5,47 \pm 3,11$ años. De ellos, 14 perros presentaban linfadenomegalia periférica y 2 dermatitis pustular.

Fase II (enfermedad moderada): formado por 30 perros, 10 hembras (23,33%) y 20 machos (66,67%), con una edad media de $5,23 \pm 2,22$ años. Presentaban

linfadenomegalia (30 perros), lesiones cutáneas (12 perros), anorexia (4 perros), pérdida de peso (7 perros) y epistaxis (2 perros). Además, presentaron anemia discreta no regenerativa (24 perros), hiperglobulinemia (24 perros) e hipoalbuminemia (4 perros). 14 perros pertenecen al subgrupo a) (creatinina < 1,4 mg/dl y UP/C < 0,5) y 16 al subgrupo b) (creatinina < 1,4 mg/dl y UP/C = 0,5-1).

Fase III (enfermedad grave): formado por 15 perros, 6 hembras (40%) y 9 machos (60%), con una edad media de $7,33 \pm 3,11$ años. Todos presentaban linfadenomegalia, anorexia y pérdida de peso, 8 presentaban lesiones cutáneas, 2 desarrollaron epistaxis, uno manifestó artritis y 3 padecían uveítis. En cuanto a los datos procedentes del análisis de sangre, en 10 se desarrolló anemia no regenerativa, en 12 hiperglobulinemia y en 9 hipoalbuminemia. Un perro estaba en IRIS 1 y 14 perros en IRIS 2.

Fase IV (enfermedad muy grave): formado por 33 perros, de los que 15 (54,54%) eran hembras y 18 (45,45%) machos, con una edad media de $6,72 \pm 2,47$ años. Todos presentaban anorexia y pérdida de peso, 28 de ellos linfadenomegalia, 10 tenían lesiones cutáneas, 1 epistaxis, 3 artritis, 2 uveítis y en 7 perros se diagnosticó un síndrome nefrótico. En cuanto a los datos procedentes del análisis de sangre, 29 presentaron anemia no regenerativa, todos tenían hiperglobulinemia y 18 tenían hipoalbuminemia. 16 perros estaban en IRIS 3 y 17 en IRIS 4.

VII.6.2.1 Hematología

En la Tabla 48 se pueden observar los resultados obtenidos en la hematología realizada a los perros con leishmaniosis, clasificados según las recomendaciones del grupo de expertos LeishVet³¹⁵. Se observa anemia normocítica y normocrómica estadísticamente significativa ($P < 0,001$) respecto a los animales sanos a partir de la Fase II. Esta diferencia se presenta también entre las Fases III y IV con la Fase I, y entre la Fase IV con la Fase II. Es destacable la presencia de eosinopenia, estadísticamente significativa en las Fases I, II y IV, y linfopenia ($P < 0,001$) en las Fases II, III y IV.

Tabla 48: Hematología del grupo de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	6,64 \pm 0,89 ^{cd}	4,88 \pm 1,09 ^{*d}	5,15 \pm 1,52 ^{*a}	4,13 \pm 1,7 ^{*ab}
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	45,56 \pm 7,07 ^{cd}	33,77 \pm 8,61 [*]	33,6 \pm 9,85 ^{*a}	28,79 \pm 9,08 ^{*a}
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	15,45 \pm 3,26 ^{cd}	12,41 \pm 4,67 [*]	10,47 \pm 3,85 ^{*a}	9,55 \pm 3,2 ^{*a}
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	69,75 \pm 7,32	70,45 \pm 7,87	70,14 \pm 4,44	73,32 \pm 6,2552
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	33,27 \pm 1,05	31,93 \pm 6,28	34,23 \pm 1,61	33,60 \pm 1,70
Plaquetas (/μL)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	255.864 \pm 215.862	121.290 \pm 152.528 [*]	228.066 \pm 86.861	218.250 \pm 146.268 [*]
<WBC (μL)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663	10.936 \pm 4347	19.993 \pm 20.956	16.920 \pm 28.486	12.001 \pm 5.090
Neutrófilos (/μL)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069	7.233 \pm 3.422	5.805 \pm 5.201 ^d	13.883 \pm 27.658	9.638 \pm 4.694 ^{*a}
Eosinófilos (/μL)	90-1.750	638 \pm 376	443 \pm 384 [*]	253 \pm 341 ^{*cd}	610 \pm 540 ^b	445 \pm 268 ^{*b}
Basófilos (/μL)	0-1	38 \pm 132	28 \pm 121	46 \pm 210	73 \pm 278	21 \pm 57
Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099	2.374 \pm 1.102 ^{bd}	1.530 \pm 969 ^{*a}	869 \pm 224 [*]	649 \pm 118 ^{*a}
Monocitos (/μL)	0-210	200 \pm 52	620 \pm 506	535 \pm 556 ^d	339 \pm 87 [*]	538 \pm 98 ^{*b}

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = I, ^b = II, ^c = III, ^d = IV.

VII.6.2.2 Bioquímica plasmática

La azoemia presente en las Fases III y IV de la clasificación se ve acompañada de hiperfosfatemia ($P < 0,01$ y $P < 0,001$ respectivamente). La concentración de cistatina C plasmática se ve incrementada respecto al grupo control en las Fases II, III y IV, como se puede apreciar en la Tabla 49 y en la Figura 39, a la vez que se observa también un incremento en la concentración de creatinina. Todos los grupos presentan diferencias estadísticas entre sí, siendo muy significativa ($P < 0,001$) la presenta entre las Fases III y IV y entre cada una de ellas con las Fases I y II. También es reseñable el incremento de la concentración de proteínas totales respecto a los perros sanos ($P < 0,001$ en todas las Fases), así como la disminución en la concentración de albúmina ($P < 0,01$ para la Fase II y $P < 0,001$ para las Fases II, III y IV).

Tabla 49: Bioquímica plasmática del grupo de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 ± 7,7	31,23 ± 12,44 ^{cd}	58,08 ± 42,56 ^{cd}	85,66 ± 35,67 ^{*abd}	227,57 ± 121,43 ^{*abc}
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 ± 0,14	0,97 ± 0,2 ^{bcd}	1,11 ± 0,28 ^{*acd}	1,69 ± 0,87 ^{*abd}	7,86 ± 3,29 ^{*abc}
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 ± 0,88	4,41 ± 0,85 ^{cd}	4,46 ± 0,78 ^d	9,11 ± 0,34 ^{*ad}	9,82 ± 3,69 ^{*abc}
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 ± 0,1	0,20 ± 0,06 ^{bcd}	0,27 ± 0,1 ^{*acd}	0,47 ± 0,21 ^{*abc}	1,03 ± 0,62 ^{*abd}
ALT (UI/L)	16–49	43,18 ± 21,01	53,94 ± 24,02 ^{*b}	38 ± 12,77 ^{ad}	85,68 ± 59,35	56,72 ± 31,01 ^{*b}
FA (UI/L)	18–100	85,54 ± 64,3	129,13 ± 89,65	129 ± 118,8	117,30 ± 85,68	149,42 ± 163,47
GGT (UI/L)	1-6	3,74 ± 1,59	5,39 ± 1,13	5,64 ± 3,41	7 ± 3,37	8,34 ± 6,04
LDH (UI/L)	20–500	257,79 ± 241	185,11 ± 78,84	254,51 ± 112,14	143,8 ± 61,03	118,33 ± 91,87
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 ± 59,45	215 ± 56,36	203,87 ± 100,52 ^{*d}	184,66 ± 61,89 ^d	237 ± 85,03 ^{bc}
PT (g/dL)	5,50-7,30	6,38 ± 0,58	7,16 ± 0,69 ^{*b}	8,42 ± 1,23 ^{*acd}	7,54 ± 0,92 ^{*b}	7,46 ± 1,54 ^{*b}
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 ± 0,34	3,32 ± 0,33 ^{*bcd}	2,93 ± 0,28 ^{*ad}	2,88 ± 0,71 ^{*a}	2,65 ± 0,60 ^{*ab}

ALT = alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales; GGT = gamma-glutamyl-transpeptidasa; LDH = lactato-deshidrogenasa; RBP = proteína de unión al retinol. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice.

* = control, ^a = I, ^b = II, ^c = III, ^d = IV.

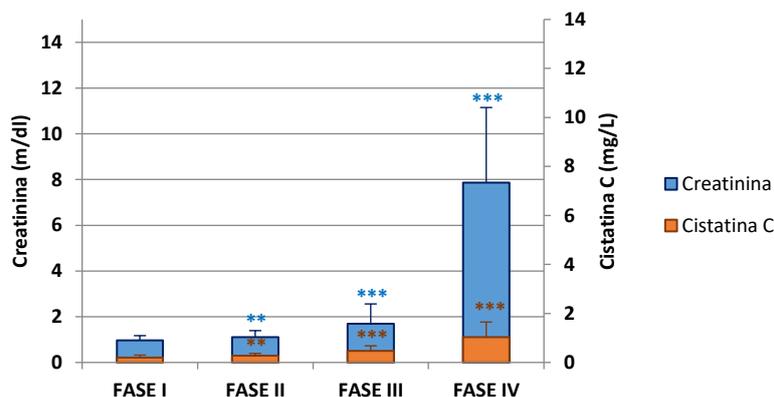


Figura 39: Representación gráfica del valor medio ± desviación estándar de la creatinina y cistatina C plasmáticas de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet. Diferencias significativas respecto al grupo control ** P < 0,01; *** P < 0,001.

La Figura 40 muestra un bajo grado de dispersión en las Fases I, II y III. Además, en las fases de enfermedad más avanzadas (III y IV), el 50% de los perros tienen tendencia a presentar valores altos, con 4 valores atípicos muy altos en la Fase IV.

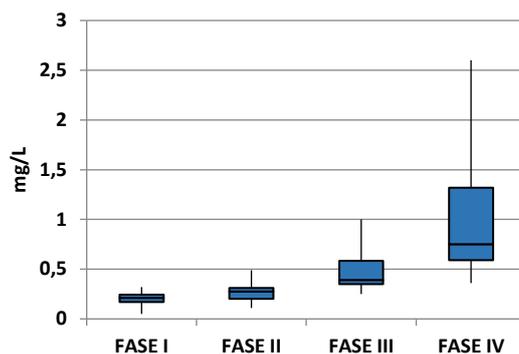


Figura 40: Diagrama de cajas y bigotes de la concentración de cistatina C plasmática de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.

VII.6.2.3 Análisis de orina

En la Tabla 50 se recogen los resultados correspondientes al análisis de orina de los perros con leishmaniosis según la clasificación de LeishVet. La presencia de proteinuria es significativa respecto al grupo control desde la Fase I ($P < 0,01$), y continúa así en el resto de Fases ($P < 0,001$). Se observa también un descenso progresivo de la densidad, significativo respecto a los animales sanos en las Fases III ($P < 0,01$) y IV ($P < 0,001$).

Se pone de manifiesto que dos biomarcadores urinarios, las ratios cistatina C/c y la NAG/c (Tabla 50), presentan un incremento estadísticamente significativo respecto al grupo control desde la Fase I (Figuras 42 y 43). Además, también en ambos biomarcadores, existen diferencias significativas entre todas las fases, con un alto grado de significación ($P < 0,001$, excepto entre las Fases I y II que es de $P < 0,01$). El resto de biomarcadores también presentan resultados positivos, aunque no de forma tan homogénea como los dos anteriores (Tabla 50; Figura 43). La ratio LDH/c urinaria manifiesta un incremento significativo respecto al grupo control en las Fases II, III y IV. La ratio FA/c manifiesta un incremento muy significativo en las Fases II, III y IV respecto al grupo control (Figura 43), así como entre todos los grupos, con una alta significación ($P < 0,001$) entre las Fases II y IV y de cada una de éstas con las Fases I y II respectivamente. Por último, la ratio GGT/c urinaria presenta un incremento respecto a los animales sanos en todas las fases, significativa en las Fases I, III y IV. En este caso, también se observa una diferencia altamente significativa ($P < 0,001$) entre las Fases III y IV y entre cada una de ellas con las Fases I y II ($P < 0,001$ respectivamente).

Tabla 50: Análisis de orina de de perros control y con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	FASE I	FASE II	FASE III	FASE IV
UP/C	< 0,4	0,11 ± 0,07	0,20 ± 0,12 ^{*cd}	0,71 ± 0,68 ^{*acddc}	2,64 ± 1,7 ^{*bd}	5,86 ± 3,63 ^{*abc}
Densidad	1.020-1.050	1.034 ± 10,4	1,032 ± 14,01 ^d	1,029 ± 12,36 ^d	1,024 ± 10,32 ^{*d}	1,016 ± 5,11 ^{*abc}
Cistatina C/c (µg/g)	13-709	361,08 ± 348,14	1.340 ± 1.892 ^{*bcd}	4.076 ± 3.277 ^{*acd}	15.350 ± 7.746 ^{*abd}	37.793 ± 19.090 ^{*abc}
LDH/c (UI/g)	1,89-10,03	0,11 ± 0,07	7,71 ± 7,72 ^{cd}	16,53 ± 12,05 ^{*cd}	31,52 ± 18,50 ^{*ab}	61,27 ± 74,75 ^{*ab}
FA/c (UI/g)	0,13-1,85	0,99 ± 0,86	2,02 ± 1,7 ^{bcd}	3,57 ± 2,12 ^{*acd}	31,52 ± 18,50 ^{*abd}	127,36 ± 79,97 ^{*abc}
NAG/c (UI/g)	0,93-1,97	0,52 ± 1,45	3,98 ± 2,58 ^{*bcd}	5,31 ± 7,20 ^{*acd}	21,83 ± 7,63 ^{*abd}	139,12 ± 85,03 ^{*abc}
GGT/c (UI/g)	0,08-0,88	2,9 ± 2,19	1,67 ± 1,81 ^{*cd}	2,94 ± 2,84 ^{cd}	7,67 ± 3,44 ^{*abd}	87,4 ± 55,96 ^{*abc}

UP/C = ratio proteína /creatinina; FA/c = ratio fosfatasa alcalina/creatinina; LDH/c = ratio lactato-deshidrogenasa/creatinina; NAG/c = ratio N-acetil-β-D-glucosamina/creatinina; Cistatina C/c = ratio cistatina C/creatinina; GGT/c = ratio gamma-glutamil-transpeptidasa/creatinina. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice, * = control, ^a = I, ^b = II, ^c = III, ^d = IV.

Los resultados obtenidos para la ratio cistatinaC/c urinaria presentan una baja dispersión para las Fases I-III. Sin embargo, ésta aumenta considerablemente en la Fase IV (Figura 41), con 3 valores atípicos en la Fase III y 7 en la Fase IV.

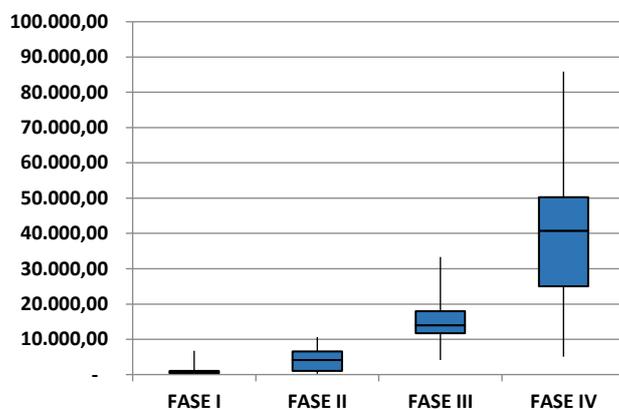


Figura 41: Diagrama de cajas y bigotes de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet.

RESULTADOS

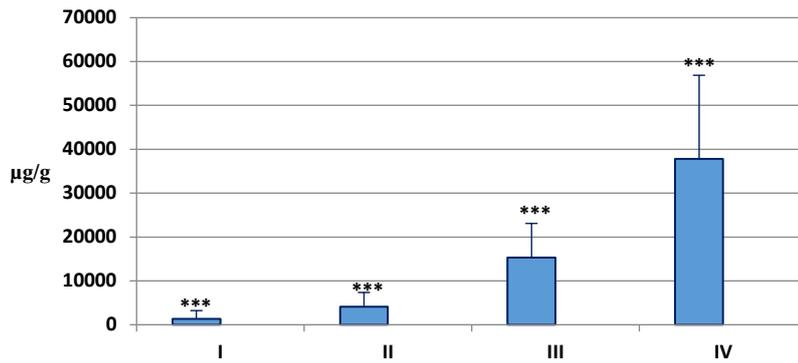


Figura 42: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de la ratio cistatina C/c urinaria de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001.

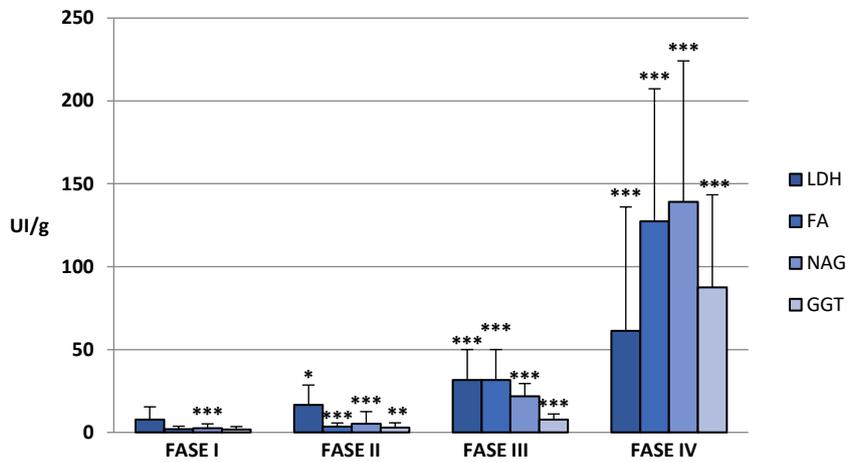


Figura 43: Representación gráfica del valor medio \pm desviación estándar de las ratios LDH/c, FA/c, NAG/c y GGT/c urinaria de los perros con leishmaniosos, clasificados según LeishVet. Diferencias significativas respecto al grupo control * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

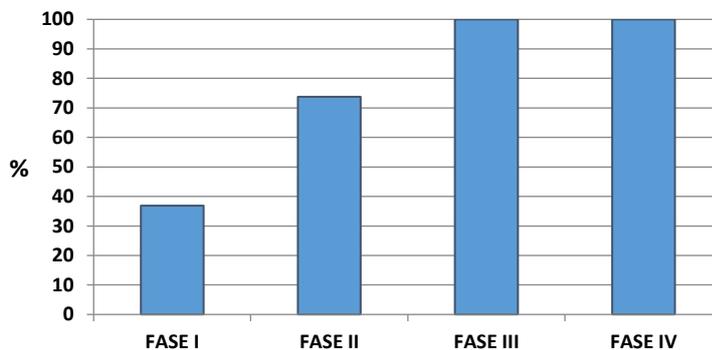


Figura 44: Incidencia de presentación de los perros con leishmaniosis, clasificados según LeishVet, que presentan un incremento de la ratio cistatina C/c urinaria, clasificados según IRIS.

Si se valoran los resultados de forma individual (Figura 44), la ratio cistatina C/c aparece incrementada en 7 de 19 perros en la Fase I (36,84%), en 22 de 30 perros en la Fase II (73,73%) y en todos los perros en las Fases III y IV (100%).

VII.6 Hipotiroidismo

El grupo de animales hipotiroideos, constituido por 10 perros de diferentes razas, presentaron una edad media de $7,99 \pm 2,62$ años, de los que 6 son machos (60%) y 4 hembras (40%). De ellos, 6 presentaron alteraciones cutáneas y todos desarrollaron hipercolesterolemia, un perro presentaba debilidad generalizada y dos animales presentaron intolerancia al ejercicio.

VII.6.1 Hematología

En la Tabla 51 se muestran los resultados hematológicos del grupo de animales hipotiroideos.

Tabla 51: Hematología de los grupos de perros control y con hipotiroidismo, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	HIPOTIROIDISMO
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	$6,44 \pm 0,78$	$6,43 \pm 0,96$
HTO (%)	41,10–55,00	$46,18 \pm 5,33$	$45,03 \pm 7,2$
HGB (g/dL)	14,50–19,20	$16,15 \pm 1,82$	$15,28 \pm 2,57$
VCM (fl)	62,00–72,00	$70,92 \pm 3,83$	$63,16 \pm 19,79$
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	$35,01 \pm 1,36$	$34 \pm 0,97$
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	166.000–575.000	261.372 ± 155.612	360.900 ± 92.732
WBC ($/\mu\text{L}$)	6.800–14.000	10.012 ± 2.663	9.058 ± 1.747
Neutrófilos ($/\mu\text{L}$)	4.120–10.350	6.074 ± 2.069	5.718 ± 1.483
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	90–1.750	638 ± 376	556 ± 285
Basófilos ($/\mu\text{L}$)	0–1	38 ± 132	0 ± 0
Linfocitos ($/\mu\text{L}$)	1.110–3.300	2.762 ± 1.099	2.170 ± 1.001
Monocitos ($/\mu\text{L}$)	0–210	200 ± 52	578 ± 439

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

VII.6.2 Bioquímica plasmática

En la Tabla 52 se muestran los resultados bioquímicos del grupo de animales hipotiroideos. Se aprecia un incremento significativo respecto al grupo control en los

valores medios correspondientes a las concentraciones plasmáticas de ALT ($P < 0,001$) y colesterol ($P < 0,01$), así como una disminución en la concentración de cistatina C (Figura 45).

Tabla 52: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con hipotiroidismo, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	HIPOTIROIDISMO
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	30,8 \pm 10,42
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,97 \pm 0,31
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,76 \pm 1,1
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,08 \pm 0,05*
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	100,6 \pm 80,01*
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	194 \pm 142,93
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	291,3 \pm 74,66*
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	6,93 \pm 0,52
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,44 \pm 0,38

ALT = Alanina-aminotransferasa; FA = Fosfatasa alcalina; PT = proteínas totales.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

Ningún perro de este grupo presentó una concentración de cistatina C plasmática superior al rango de referencia considerado (Figura 46). Sin embargo, 6 perros presentaron un valor inferior al mismo (0,04 mg/L, 0,08 mg/L, 0,07 mg/L, 0,02 mg/L, 0,08 mg/L y 0,02 mg/L respectivamente).

VII.7 Enfermedad cardiaca congestiva

El grupo de enfermedad cardiaca congestiva, compuesto por 10 animales (5 perros con cardiomiopatía dilatada y 5 perros con insuficiencia de la válvula mitral), presentó una edad media de $11 \pm 3,52$ años, de los cuales 6 son machos (60%) y 4 hembras (40%). Todos los perros con miocardiopatía dilatada eran de razas medianas o grandes (1 Golden retriever, 1 Bóxer, y Cocker spaniel y 2 mestizos). Los perros con insuficiencia de la válvula mitral eran todos de razas pequeñas (1 Caniche, 1 Yorkshire y 3 mestizos). Todos presentaban signos clínicos, radiológicos y ecocardiográficos compatibles con la enfermedad.

VII.7.1 Hematología

En la Tabla 53 se muestran los valores obtenidos en la hematología del grupo de animales con enfermedad cardíaca congestiva. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control para el recuento de neutrófilos y de monocitos.

Tabla 53: Hematología de los grupos de perros control y con enfermedad cardíaca congestiva, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	ENFERMEDAD CARDIACA CONGESTIVA
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	6,94 \pm 1,13
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	52,78 \pm 9,2
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	16,16 \pm 3,08
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	69,96 \pm 3,7
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	33,22 \pm 3,3
Plaquetas ($/\mu\text{L}$)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	293.400 \pm 204.033
WBC ($/\mu\text{L}$)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663	12.031 \pm 4.264
Neutrófilos ($/\mu\text{L}$)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069	9.163 \pm 4.264*
Eosinófilos ($/\mu\text{L}$)	90–1.750	638 \pm 376	502 \pm 529
Basófilos ($/\mu\text{L}$)	0–1	38 \pm 132	2 \pm 4
Linfocitos ($/\mu\text{L}$)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099	1.663 \pm 1.581
Monocitos ($/\mu\text{L}$)	0–210	200 \pm 52	771 \pm 724*

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

VII.7.2 Bioquímica plasmática

En la Tabla 54 se muestran los valores obtenidos para la bioquímica sanguínea del grupo de animales cardiopatas, que ponen de manifiesto un incremento estadístico en la concentración de proteínas totales ($P < 0,01$). No se ha encontrado un incremento en la concentración de cistatina C respecto a los perros sanos (Figura 45).

Sólo dos perros de este grupo (20%) han manifestado un leve incremento para la concentración de cistatina C plasmática por encima del valor de referencia, de 0,34 mg/L y 0,4 mg/L respectivamente (Figura 46).

Tabla 54: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con enfermedad cardíaca congestiva, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	ENFERMEDAD CARDIACA CONGESTIVA
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	38,37 \pm 20,45
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,97 \pm 0,2
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,21 \pm 1,6
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,11
ALT (UI/L)	16–49	85,54 \pm 64,3	93,33 \pm 45,53
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	248 \pm 70,71
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	7,18 \pm 1,2*
Albúmina (g/dL)	2,50-3,90	3,63 \pm 0,34	3,77 \pm 0,57

ALT = Alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales.

*Diferencia significativa respecto al grupo control

VII.8 Neoplasias

El grupo de neoplasias, compuesto por 35 perros (16 perras con adenocarcinoma mamario y 19 perros con linfoma multicéntrico), presentó una edad media de 7,9 \pm 3,06 años, de los cuales 12 son machos (35%) y 23 hembras (65%).

VII.8.1 Hematología

La Tabla 55 muestra los resultados hematológicos del grupo de perras con tumores mamaros. Se aprecia una disminución estadísticamente significativa respecto al grupo control en el recuento eritrocitario, valor hematocrito, concentración de hemoglobina, VCM y CHCM, y un incremento en el recuento total leucocitario, de neutrófilos y de monocitos.

La Tabla 56 muestra los resultados hematológicos del grupo de perros con linfoma multicéntrico. Se aprecia una anemia moderada normocítica e hipocrómica, así como leucocitosis debida a neutrofilia. También se observó linfocitopenia en 6 animales.

RESULTADOS

Tabla 55: Hematología de los grupos de perros control y con tumores mamarios, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	TUMORES MAMARIOS
RBC (x10 ⁶ /μL)	5,90–7,60	6,44 ± 0,78	5,74 ± 2,22*
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 ± 5,33	38,15 ± 14,88*
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 ± 1,82	12,39 ± 4,73*
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 ± 3,83	59,47 ± 3,34*
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 ± 1,36	29,96 ± 10,98*
Plaquetas (/μL)	166.000–575.000	261.372 ± 155.612	322.600 ± 265.196*
WBC (/μL)	6.800–14.000	10.012 ± 2.663	9.273 ± 7.751*
Neutrófilos (/μL)	4.120–10.350	6.074 ± 2.069	7.649 ± 6.923*
Eosinófilos (/μL)	90-1.750	638 ± 376	379 ± 352
Basófilos (/μL)	0-1	38 ± 132	40 ± 101
Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.762 ± 1.099	1.524 ± 906
Monocitos (/μL)	0-210	200 ± 52	578 ± 828*

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

Tabla 56: Hematología de los grupos de perros control y con linfoma multicéntrico, expresado como media ± desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	LINFOMA MULTICÉNTRICO
RBC (x10 ⁶ /μL)	5,90–7,60	6,44 ± 0,78	5,42 ± 1,95*
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 ± 5,33	37,65 ± 12,93*
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 ± 1,82	22,63 ± 37,71*
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 ± 3,83	69,47 ± 4,7
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 ± 1,36	30,87 ± 8,94*
Plaquetas(/μL)	166.000–575.000	261.372 ± 155.612	195.533 ± 126.295
WBC (/μL)	6.800–14.000	10.012 ± 2.663	17.858 ± 11.283*
Neutrófilos (/μL)	4.120–10.350	6.074 ± 2.069	13.081 ± 10.768*
Eosinófilos (/μL)	90-1.750	638 ± 376	495 ± 662
Basófilos (/μL)	0-1	38 ± 132	10 ± 25
Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.762 ± 1.099	1.996 ± 2.681*
Monocitos (/μL)	0-210	200 ± 52	912 ± 682

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

*Diferencia significativa respecto al grupo control

VII.8.2 Bioquímica plasmática

La Tabla 57 muestra los resultados de la bioquímica plasmática del grupo de animales con tumores mamarios. No se han observado alteraciones en la concentración de cistatina C (Figura 45).

Tabla 57: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con tumores mamarios, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	TUMORES MAMARIOS
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	34,16 \pm 7,7	29,81 \pm 16,54
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,74 \pm 0,37
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,18 \pm 0,2
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	34,48 \pm 18,6
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	138,75 \pm 96,48
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	6,04 \pm 2,33 **
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,94 \pm 1,72
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,69 \pm 0,84

ALT = Alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales. *Diferencia significativa respecto al grupo control

Tres perras (18,75%) han manifestado un incremento por encima del valor de referencia para la cistatina C plasmática, de 0,4 mg/L, 0,72 mg/L y 0,35 mg/L (Figura 46).

La Tabla 58 muestra los resultados de la bioquímica del grupo de animales con linfoma multicentrico. Los resultados estadísticos obtenidos indican incremento en la concentración plasmática de ALT e hipoalbuminemia. Tampoco en este caso se han observado variaciones estadísticas respecto al grupo control para la cistatina C (Figura 45).

Cuatro perros (21,05%) han manifestado un incremento de la concentración de cistatina C plasmática por encima del valor de referencia, de 0,42 mg/L, 0,54 mg/L, 0,31 mg/L y 0,74 mg/L respectivamente (Figura 41).

Tabla 58: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con linfoma multicéntrico, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	LINFOMA MULTICÉNTRICO
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	34,16 \pm 7,7	41,09 \pm 21,95
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,89 \pm 0,39
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,24 \pm 0,17
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	118,51 \pm 102,47*
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	133,86 \pm 49,35
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	5,79 \pm 1,34*
Albumina (g/dL)	2,50–3,90	3,36 \pm 0,34	3,02 \pm 0,62*
Fósforo (mg/dL)	5,50–7,30	3,6 \pm 0,1	4,05 \pm 0,82

ALT = Alanina-aminotransferasa; PT = proteínas totales. *Diferencia significativa respecto al grupo control.

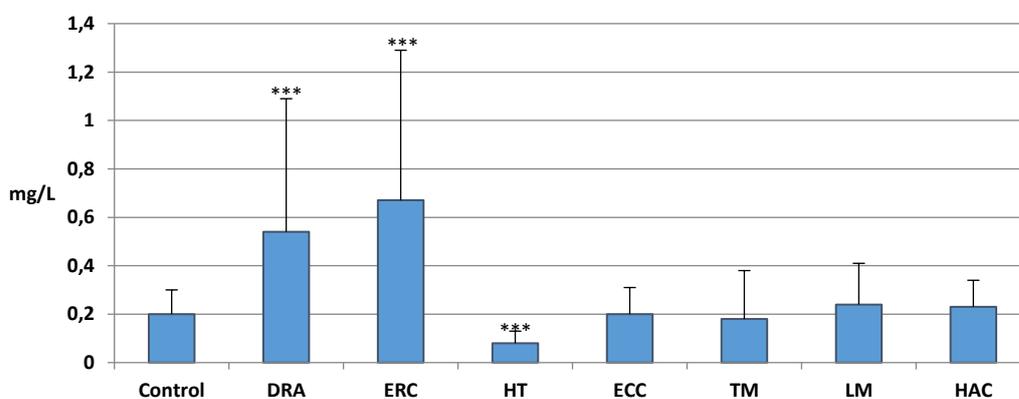


Figura 45: Representación gráfica del valor medio de la cistatina C plasmática de los perros control, DRA, ERC, (HT) hipotiroidismo, (ECC) enfermedad cardiaca congestiva, (TM) tumores mamarios, (LM) linfoma multicéntrico e (HAC) hiperadrenocorticismo. Diferencias significativas respecto al grupo control: *** P < 0,001.

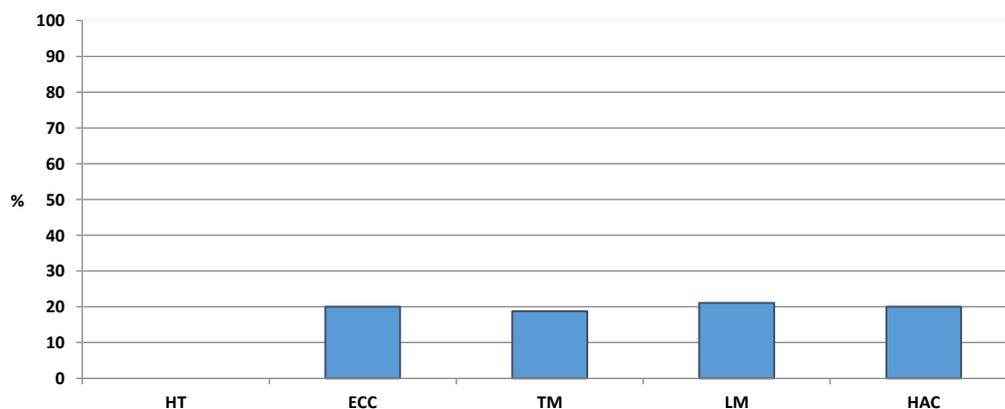


Figura 46: Incidencia de presentación de los perros con hipotiroidismo (HT), enfermedad cardiaca congestiva (ECC), tumores mamarios (TM), linfoma multicéntrico (LM) e hiperadrenocorticismo (HAC), que presentan un incremento de la concentración de cistatina C plasmática.

VII.9 Influencia de los corticoides en la concentración de cistatina C plasmática

Con el fin de comprobar el efecto de los corticoides sobre la concentración plasmática de cistatina C, se han estudiado dos grupos de perros (Anexo 1). El primero está formado por 20 animales con hiperadrenocorticismos, utilizado para observar el efecto de los corticoides endógenos, con una media de edad de $9,9 \pm 3,06$ años, y una distribución por sexos de 10 machos (50%) y 10 hembras (50%). De ellos, todos presentaban PD/PU y polifagia, 16 desarrollaron lesiones cutáneas y 15 presentaron abdomen péndulo. Todos presentaban también incremento en la concentración de FA, ALT y de colesterol, y 8 perros linfocitopenia. El segundo grupo, elegido para estudiar el efecto de los corticoides exógenos, está compuesto por 10 perros, diagnosticados de meningitis que responde a corticoides, con una edad media de $1,34 \pm 0,56$ años, de los que 6 son machos (60%) y 4 hembras (40%). Todos presentaban los criterios de inclusión descritos en el capítulo de Material y Métodos.

VII.9.1 Hematología

En la Tabla 59 y en el Anexo 1 se representan los valores de la hematología del grupo de animales con hiperadrenocorticismos, donde se aprecia un leve incremento significativo respecto al grupo control para el recuento eritrocitario, valor hematocrito, recuento total de plaquetas, leucocitos, neutrófilos y monocitos.

En la Tabla 60 y en el Anexo 1 se relacionan los valores estadísticos correspondientes a la hematología de los perros con meningitis que responde a los corticoides desde el día del diagnóstico de la enfermedad y comienzo del tratamiento, hasta el final del mismo. Se observa leucocitosis debida a neutrofilia y monocitosis en los cuatro días muestreados, con más intensidad en los días 7 y 14. También se observa linfocitopenia, significativa en los días 7 y 14 ($P < 0,01$).

RESULTADOS

Tabla 59: Hematología de los grupos de perros control y con hiperadrenocorticismio, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	HIPERADRENOCORTICISMO
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,44 \pm 0,78	6,84 \pm 1,14*
HTO (%)	41,10–55,00	46,18 \pm 5,33	46,72 \pm 1,61*
HGB (g/dL)	14,50–19,20	16,15 \pm 1,82	15,1 \pm 2,39
VCM (fl)	62,00–72,00	70,92 \pm 3,83	70,53 \pm 4,49
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	35,01 \pm 1,36	31,39 \pm 2,14
Plaquetas (/μL)	166.000–575.000	261.372 \pm 155.612	434.250 \pm 44.350*
WBC (/μL)	6.800–14.000	10.012 \pm 2.663	11.780 \pm 1.140*
Neutrófilos (/μL)	4.120–10.350	6.074 \pm 2.069	10.359 \pm 11.660*
Eosinófilos (/μL)	90-1.750	638 \pm 376	385 \pm 348*
Basófilos (/μL)	0-1	38 \pm 132	0 \pm 0
Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.762 \pm 1.099	2.261 \pm 1.946
Monocitos	0-210	200 \pm 52	958 \pm 1.108*

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de emoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

Tabla 60: Hematología de los grupos de perros control y con meningitis que responde a los corticoides en los diferentes días de tratamiento, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5,90–7,60	6,95 \pm 0,75	6,24 \pm 1,59	5,87 \pm 0,92	5,98 \pm 0,78	6,16 \pm 0,79
HTO (%)	41,10–55,00	45,89 \pm 1,09	45,64 \pm 3,11	42,07 \pm 1,88	43,2 \pm 1,71	43,55 \pm 1,55
HGB (g/dL)	14,50–19,20	15,12 \pm 1,85	15,02 \pm 2,45	14,85 \pm 2,14	14,95 \pm 2,45	15 \pm 2,37
VCM (fl)	62,00–72,00	69,56 \pm 2,08	70,24 \pm 2,58	70,65 \pm 2,41	70,59 \pm 2,18	71,02 \pm 2,85
CHCM (g/dL)	33,00–36,50	34,45 \pm 2,21	34,45 \pm 2,54	33,59 \pm 2,44	33,88 \pm 2,25	34,75 \pm 2,53
Plaquetas (/μL)	166.000–575.000	246.800 \pm 26.550	334.600 \pm 54.500	351.200 \pm 45.440	367.000 \pm 25.170 *	303.200 \pm 27.160
WBC (/μL)	6.800–14.000	9.470 \pm 790	20.210 \pm 2.460*	26.930 \pm 2.560 *	24.570 \pm 2.880 *	18.360 \pm 1.870 *
Neutrófilos (/μL)	4.120–10.350	5.547 \pm 1.025	17.585 \pm 3.568*	20.525 \pm 2.369*	20.458 \pm 3.655*	15.258 \pm 2.315*
Eosinófilos (/μL)	90-1.750	95 \pm 37	258 \pm 137	589 \pm 256	635 \pm 254	324 \pm 159
Basófilos (/μL)	0-1	15 \pm 3	45 \pm 52	37 \pm 55	45 \pm 25	23 \pm 39
Linfocitos (/μL)	1.110–3.300	2.150 \pm 358	1.256 \pm 785	958 \pm 524*	970 \pm 365*	1.089 \pm 758
Monocitos	0-210	102 \pm 59	1.236 \pm 639*	1.458 \pm 639*	1.368 \pm 612*	966 \pm 522

RBC = recuento de eritrocitos; HTO = valor hematocrito; HGB = concentración de hemoglobina; VCM = volumen corpuscular medio; CHCM = concentración de hemoglobina corpuscular media; WBC = recuento total de leucocitos.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

VII.9.2 Bioquímica sanguínea

Tabla 61: Bioquímica sanguínea de los grupos de perros control y con hiperadrenocorticismio, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	HIPERADRENOCORTICISMO
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	45,66 \pm 34,93
Creatinina (mg/dL)	0.70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,97 \pm 0,71
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	4,31 \pm 0,12
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,21 \pm 0,03
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	95,95 \pm 16,19 ^{*a}
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	494,35 \pm 79,15 ^{*a}
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	315,53 \pm 131,52 ^{*a}
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	6,9 \pm 0,1 ^a
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,9 \pm 0,1 [*]

ALT = Alanina-aminotransferasa; FA = fosfatasa alcalina; PT = proteínas totales. Diferencias significativas. El grupo con el que existe diferencia significativa se representa con una letra en superíndice. a = control corticoides.

^{*}Diferencia significativa respecto al grupo control.

En la Tabla 61 y en el Anexo 1 se representan los valores de bioquímica sanguínea del grupo de animales con hiperadrenocorticismio, donde se aprecia un incremento significativo respecto al grupo control para los valores de ALT ($P < 0,001$), colesterol ($P < 0,001$) y FA ($P < 0,001$), así como una disminución en la concentración de albúmina ($P < 0,05$). No se ha observado alteraciones en la concentración de cistatina C (Figura 45).

Cuatro perros (20%) han manifestado un incremento moderado por encima del valor de referencia, de 0,31 mg/L, 0,45 mg/L, 0,38 mg/L, y 0,37 mg/L para la concentración de cistatina C plasmática (Figura 46).

En la Tabla 62 y en el Anexo 1 se relacionan los valores estadísticos correspondientes a la bioquímica sanguínea de los perros con meningitis a lo largo del tratamiento. Se observa un incremento de la concentración de cistatina C que llega al máximo el día 7 ($P < 0,01$), cuando el animal está a dosis de 4 mg/Kg de prednisona (Figura 47 y Anexo 1). También se observa un incremento de la concentración de FA durante todo el tiempo ($P < 0,01$), así como en las de colesterol y ALT, una vez empezado éste.

Tabla 62: Bioquímica plasmática de los grupos de perros control y con meningitis que responde a los corticoides en los diferentes días de tratamiento, expresado como media \pm desviación estándar.

	RANGO DE REFERENCIA	CONTROL	DÍA 0	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21
Urea (mg/dL)	21,40–51,30	32,16 \pm 7,7	22,69 \pm 7,67	28,26 \pm 4,96	26,75 \pm 8,49	24,55 \pm 4,68*
Creatinina (mg/dL)	0,70–1,20	0,87 \pm 0,14	0,82 \pm 0,07	0,69 \pm 0,07 *	0,83 \pm 0,08	0,86 \pm 0,14
Fósforo (mg/dL)	3,30–5,70	4,27 \pm 0,88	3,96 \pm 0,19	4 \pm 0,19	4 \pm 0,25	3,93 \pm 0,22
Cistatina C (mg/L)	0,1–0,3	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,06	0,4 \pm 0,04*	0,27 \pm 0,03	0,15 \pm 0,02
ALT (UI/L)	16–49	43,18 \pm 21,01	31,8 \pm 28,8	43,7 \pm 4,03	104,4 \pm 27,77 *	59,3 \pm 9,85
FA (UI/L)	18–100	85,54 \pm 64,3	227,3 \pm 27,97*	360 \pm 46,14*	456 \pm 61,8*	306,7 \pm 36,6*
Colesterol (mg/dL)	111–250	216,46 \pm 59,45	210,65 \pm 27,08	280,04 \pm 48,23*	324,43 \pm 45,43*	237,5 \pm 39,48
PT (g/dL)	5,50–7,30	6,38 \pm 0,58	6,2 \pm 0,1	6,4 \pm 0,2	6,2 \pm 0,1	6,4 \pm 0,1
Albúmina (g/dL)	2,50–3,90	3,63 \pm 0,34	3,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,2	3,8 \pm 0,2	3,7 \pm 0,2

ALT = alanina-aminotransferasa; FA = fosfatasa alcalina; PT = proteínas totales.

*Diferencia significativa respecto al grupo control.

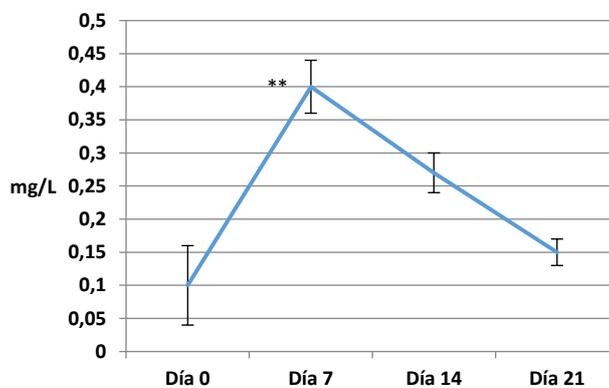


Figura 47: Evolución de la concentración de cistatina C plasmática en el grupo de perros con meningitis que responde a los corticoides, a lo largo del tratamiento. ** P < 0,01.

VIII DISCUSIÓN

Con el fin de estudiar la utilidad de la cistatina C en el diagnóstico de perros con enfermedad renal, en el presente trabajo se ha estudiado su concentración en sangre y en orina de cuatro grupos de perros: sanos (control), DRA, ERC y con leishmaniosis. Por último, se ha estudiado la concentración plasmática de cistatina C de perros con enfermedades no renales, similares a las que en medicina humana se ha descrito previamente que pueden influir en su concentración, así como la influencia sobre la misma de los corticoides.

VIII.1 Verificación del método de cuantificación de la cistatina C plasmática y urinaria

Actualmente, en medicina canina no existe un método analítico disponible para evaluar de forma exacta la concentración de cistatina C en líquidos biológicos, por lo que se usan métodos empleados en medicina humana, aunque no logren reflejar de manera exacta su concentración. La secuencia de aminoácidos común entre perros y personas oscila entre un 46% y un 78% según algunos autores²⁵³, aunque otros refieren una similitud que oscila entre un 22% y un 63%²⁴⁰.

Desde 2001 se conoce que existe una reactividad cruzada entre la cistatina C plasmática canina y los anticuerpos anti-cistatina C humana de conejo en la técnica PETIA¹⁴⁹. Un año después, en 2002, Almy FS *et al.* validaron la utilidad de la técnica inmunturbidimétrica comercializada en medicina humana para la determinación de la cistatina C en plasma canino. En el presente trabajo se ha utilizado un kit comercial para la determinación de cistatina C (Spinreact®, España), basado en un ensayo turbidimétrico similar al utilizado por Almy FS *et al.* en 2002. Consiste en la utilización de partículas de látex recubiertas con anticuerpos policlonales de conejo anti-cistatina-C humana, que son aglutinadas por la cistatina C presente en la muestra problema.

Aunque el fundamento del método ya ha sido validado para la cistatina C canina, se ha creído necesario realizar una validación menor o verificación de la técnica comercial específica utilizada en este estudio (método normalizado), en el Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx. La validación de un método analítico constituye un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos por dicho método son

fiables. Lo que se busca es demostrar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. Es muy importante que el laboratorio tenga claro antes de iniciar la validación cuáles son los requerimientos del método para establecer el alcance de la misma. La verificación tiene generalmente como objetivo comprobar que el laboratorio domina el método de ensayo normalizado y que lo utiliza correctamente. En este caso, al tratarse de un método normalizado modificado para la verificación, se ha requerido realizar sólo aquellas pruebas que indiquen que la variación realizada no afecta al ensayo¹⁴¹.

En el estudio de verificación realizado se ha demostrado que se cumplen adecuadamente los criterios de aceptabilidad para los parámetros de linealidad, límites, repetitividad, reproducibilidad y veracidad del ensayo. Esto indica que el método comercial normalizado para la cuantificación de la cistatina C elegido es aplicable para el análisis de su concentración en plasma sanguíneo y en orina caninos, al menos en el rango comprendido entre 0,13 y 10 mg/L.

VIII.2 Perros sanos

VIII.2.1 Análisis de sangre

Los perros sanos no presentaron alteraciones ni en la hematología ni en la bioquímica sanguínea (Tablas 30 y 31). Los resultados obtenidos están comprendidos dentro de los rangos de referencia descritos por diferentes autores^{271,276}, así como por los correspondientes al laboratorio donde se analizaron las muestras (Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx).

VIII.2.2 Análisis de orina

Los resultados obtenidos en el análisis físico-químico, densidad y valor UP/C (Tabla 32) están comprendidos dentro de los rangos de referencia descritos por diferentes autores^{38,305}, así como por los correspondientes al laboratorio donde se analizaron las muestras (Laboratorio de Patología Clínica del HCV de la UEx). La concentración de las diferentes enzimas urinarias (Tabla 32) está comprendida dentro de los rangos de referencia aportados por la mayoría de autores consultados^{38,124,196,288}. El valor

obtenido para la ratio RBP/c creatinina es superior al aportado por Raila J *et al.*²⁵⁸ en 2010 (0,007 - 0,03 mg/g) y semejante al descrito por Maddens BE *et al.*¹⁹⁶ (0,02 - 0,34 mg/g) y por Smets PM *et al.*³¹¹ (0 - 0,9 mg/g), ambos en 2010.

VIII.2.3 Cistatina C en sangre y en orina

La concentración de cistatina C plasmática está comprendida dentro de los rangos de normalidad descritos por Randers E y Erlandsen EJ²⁶³ en 1999, Grubb AO *et al.*¹¹⁵ en 2001, Antognoni MT *et al.*¹⁰ en 2005, Monti P *et al.*²⁰⁹ en 2012 y algo inferior al descrito por Jensen AL *et al.*¹⁴⁹ en 2001, Almy FS *et al.*⁸ en 2002, Braun JP *et al.*³⁵ en 2002, Gonul R *et al.*¹⁰⁶ en 2004, Wehner A *et al.*³⁵⁹ en 2008, Miyagawa Y *et al.*²⁰⁵ y Pasa S *et al.*²³⁷, ambos en 2009. Esta diferencia se puede atribuir a la técnica de determinación utilizada.

Existe cierta controversia sobre si este parámetro podría verse afectado por factores externos como edad, sexo, estado corporal o ritmos circadianos^{33,234,359}. En el presente estudio no se han observado diferencias estadísticas en la cistatina C plasmática ni para el sexo ni para la edad, lo que coincide con los autores mencionados. Braun JP *et al.*³⁵ en 2002, encontraron un incremento en función de la edad. Sin embargo, en su estudio, que incluye un número considerable de animales, no se comprobó que estuviesen sanos, puesto que no se realizó hematología ni bioquímica sanguínea adicional.

Se ha observado un leve incremento, pero significativo, en los perros de mayor peso. Este hallazgo coincide con lo descrito por Braun *et al.* en 2002, Miyagawa Y *et al.*²⁰⁵ en 2009 y Tvarijonaviciute A *et al.*³⁴² en 2013. Estos últimos autores lo explican basándose en que la cistatina C plasmática en personas se ve incrementada en individuos obesos independientemente de su TFG, puesto que su expresión se ve incrementada en el tejido adiposo²¹⁷. Dado que actualmente no se conoce si el tejido adiposo canino puede sintetizar cistatina C, es factible que se deba a que los perros de mayor talla presentan también un mayor número de células nucleadas productoras de esta proteína. No obstante, el incremento en su concentración es discreto, y presenta escasa influencia en la interpretación de resultados patológicos.

En cuanto a la ratio cistatina C/c urinaria, los datos encontrados en la bibliografía disponible son variables y expresados en diferentes unidades. Los resultados obtenidos coinciden con el rango aportado por Randers E y Erlandsen EJ²⁶³ en 1999, Grubb AO *et al.*¹¹⁵, en 2001 y Monti P *et al.*²⁰⁹ en 2012, y es superior al aportado por García-Martínez JD *et al.*¹⁰⁰ en 2015.

No se han observado diferencias significativas en la concentración de cistatina C para el sexo. Tampoco para el peso, a pesar de observarse un incremento respecto al mismo en la concentración plasmática. Este incremento no se ve reflejado en la orina debido, posiblemente, a la capacidad de metabolización de la cistatina C de los túbulos renales. Se observa una diferencia estadística para la edad, encontrándose un incremento en los perros de más de 5 años. No se ha encontrado este hallazgo en la bibliografía consultada, y puede ser atribuido a que en perros adultos y seniles se empieza a desarrollar una lesión tubular, que no es suficientemente significativa para alterar otros parámetros plasmáticos y renales, pero sí para modificar la concentración de cistatina C urinaria. Se debe tener en cuenta que la concentración de esta proteína en la orina es muy baja debido a que, en condiciones normales, la pequeña cantidad filtrada por el glomérulo es metabolizada prácticamente en su totalidad a nivel de los túbulos proximales, por lo que su único origen es un defecto renal a este nivel^{153,332}. Como ocurre con la variable del peso en el estudio en plasma²⁹⁸, su incremento también es discreto y no altera manifiestamente la interpretación laboratorial en caso de enfermedad renal.

VIII.3 Perros enfermos

VIII.3.1 Análisis de sangre

Los perros con DRA presentan los resultados hematológicos esperados (Tabla 33). El recuento eritrocitario es normal en los diferentes grados IRIS, con normocitosis y normocromía. Existe una tendencia al incremento del recuento de eritrocitos, del valor hematocrito y de la concentración de hemoglobina, reflejo del estado de deshidratación que presentan algunos de estos animales. También se observa

leucocitosis, asociada principalmente a neutrofilia y a monocitosis, indicativa de estrés y de procesos inflamatorios.

Por su parte, el grupo de perros con ERC (Tabla 36) presenta de forma general anemia normocítica y normocrómica, que se hace más evidente a medida que evoluciona la enfermedad (clasificación IRIS). Se trata de un hallazgo hematológico común. Aunque su génesis es multifactorial se debe, principalmente, a hipoplasia de la médula ósea, secundaria a una disminución de la síntesis de eritropoyetina como consecuencia de la pérdida de nefronas funcionales²⁵⁰. Este resultado coincide con lo descrito en medicina humana, y se relaciona la gravedad de la anemia con la pérdida de funcionalidad renal²⁶⁷. La anemia es más evidente en los perros con leishmaniosis y azoemia por ERC (Tablas 39 y 40), e incluso se presenta de forma discreta en los perros con leishmaniosis y sin azoemia (Tabla 39). Se ha descrito que los perros con esta enfermedad desarrollan anemia, además de la producida por la propia ERC, de forma secundaria a un proceso inflamatorio, atribuida a un descenso del hierro sérico, de la capacidad de unión al hierro, del porcentaje de saturación de la transferrina y a un aumento de la ferritina sérica. Se ha encontrado en estos animales una correlación negativa entre el aumento de la proteína C reactiva y el hierro, y positiva con la ferritina sérica. Sin embargo, la inflamación no explica completamente las alteraciones del hierro y se piensa que la depleción del mismo se puede deber también a su consumo por parte del parásito durante su crecimiento o al secuestro por el organismo para evitar la supervivencia del mismo. También puede contribuir a la anemia el sangrado crónico (epistaxis), lesiones cutáneas y úlceras digestivas secundarias a la azoemia³⁰³.

Los resultados obtenidos en la bioquímica plasmática, tanto de los perros con DRA (Tabla 34) como con ERC (Tabla 37), se caracterizan, de forma general, por un incremento en la concentración de cistatina C, acompañada de azoemia e hiperfosfatemia, así como por hipercolesterolemia en fases avanzadas de ERC.

La concentración plasmática de creatinina y de urea se consideran marcadores indirectos de la TFG y constituyen dos determinaciones convencionales en medicina canina para el diagnóstico de enfermedad renal. La creatinina es un compuesto

endógeno procedente del metabolismo de la creatina y fosfocreatina en el tejido muscular³⁶⁹, que se excreta a nivel glomerular y cuya concentración aumenta a medida que disminuye la TFG³⁵⁸. La urea, por su parte, es uno de los principales productos de desecho del metabolismo proteico, procede del metabolismo hepático del amonio, se excreta por filtración glomerular y su concentración en sangre es inversamente proporcional a la TFG³³. Es filtrada por los riñones y excretada en la orina, aunque también es reabsorbida a nivel de los túbulos colectores. La azoemia observada en todos los grupos de perros con enfermedad renal se incrementa a medida que avanza la enfermedad (clasificación IRIS) (Tablas 34, 37, 43, 44 y 49). Este hallazgo es previsible, puesto que constituye uno de los criterios de inclusión de los perros estudiados y, además, la clasificación IRIS se basa en la concentración de la creatinina plasmática. El aumento de ambos parámetros indica una pérdida de la función renal del 70-75%^{17,33}, por lo que se trata de marcadores tardíos de enfermedad. Además, son biomarcadores que se influyen por diversos factores extrarenales, tales como masa muscular, sexo, edad o estado de alimentación¹⁴⁷, así como por variaciones intraindividuales¹⁸⁵. Se ha comprobado en medicina humana que existe cierta secreción tubular de creatinina, que conlleva a una sobrestimación de la TFG en pacientes con una disminución de la misma de moderada a severa²⁴⁴. La urea, por su parte, es reabsorbida por los túbulos, sobre todo cuando el flujo tubular es lento²⁷⁸, por lo que no puede ser considerada como buen marcador de la TFG por sí solo²²². Además, la producción y excreción de urea no es constante⁷⁴.

Como se ha descrito en la enfermedad renal avanzada, tanto en los perros con DRA como con ERC la azoemia se acompaña de hiperfosfatemia (Tablas 34, 37, 43, 44 y 49). El fósforo se excreta principalmente vía renal, es filtrado libremente a nivel glomerular y reabsorbido mayoritariamente en los túbulos proximales, aunque en los distales también se produce cierta reabsorción. Por lo tanto, si la ingestión de fósforo es constante, una reducción de la TFG incrementa su retención, produciendo consiguientemente hiperfosfatemia⁴⁶. Se ha descrito que, al inicio de un deterioro renal, la concentración de fósforo se regula correctamente, puesto que se produce una disminución compensatoria de la reabsorción a nivel tubular. No obstante, cuando la TFG desciende por debajo del 20%, el organismo es incapaz de compensar tal

desequilibrio y se desarrolla una hiperfosfatemia¹⁷. Los resultados obtenidos para los diferentes grupos estudiados así lo demuestran. Se observa, tanto en el DRA como en la ERC, cómo se hace más evidente a medida que se avanza en la clasificación IRIS, y es estadísticamente significativa respecto al grupo control en fases avanzadas: IRIS IV en DRA (Tabla 34) e IRIS 3 y 4 en ERC (Tabla 37).

La hipercolesterolemia también es un hallazgo frecuentemente encontrado en perros con enfermedad glomerular, asociado principalmente a ERC, hayan desarrollado clínicamente síndrome nefrótico o no. Varios estudios demuestran que una disminución de la actividad de determinadas sustancias implicadas en el catabolismo lipídico renal podría ser una de las causas²³¹. También es probable que la pérdida urinaria de lípidos sea un factor importante que influye en la síntesis incrementada de colesterol. En el presente trabajo se desarrolla en las fases 3 y 4 de los perros con ERC (Tabla 37), y coincide con los animales que presentan los niveles más bajos de albúmina plasmática. Este hallazgo ha sido descrito previamente por Behling-Kelly E¹⁹ en 2014, que describen un incremento en la síntesis de lipoproteínas como mecanismo compensatorio para incrementar la presión oncótica. El patrón de lipoproteínas afectado ha sido previamente descrito¹⁶⁰.

Se ha observado un incremento en la concentración de proteínas totales en los perros con DRA (Tabla 34), atribuido a deshidratación^{41,159}, y en los perros con ERC (Tabla 37), debido principalmente a los perros con leishmaniosis (Tablas 42 y 43). Esta enfermedad produce estimulación policlonal de linfocitos B, que promueve a su vez la producción de inmunoglobulinas específicas e inespecíficas, uniéndose a los antígenos del parásito y fracciones del complemento⁴¹. En el caso de ERC (Tabla 37) se aprecia hipoalbuminemia, más manifiesta en los subgrupos IRIS 3 y 4. Tanto los perros con leishmaniosis como aquellos que no padecen esta enfermedad se comportan de forma muy similar, aunque es más marcada en los primeros. En el caso de leishmaniosis se explica porque se desarrolla una glomerulonefritis⁸⁵, que cursa con pérdida urinaria de proteínas (es el grupo que presenta el mayor valor de UP/C).

En la bioquímica plasmática realizada se ha incluido la concentración de RBP. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas entre los valores plasmáticos

correspondientes a los perros sanos, con DRA y con ERC. En la actualidad es complicado interpretar su concentración plasmática en perros con alteración renal, puesto que hasta hoy la bibliografía disponible es escasa. En medicina humana, su descenso se asocia a enfermedad hepática, puesto que es el hígado el encargado de su síntesis, y en pacientes con ERC se encuentra incrementado, atribuido a que el riñón es el órgano encargado de su catabolismo¹⁰⁷. Los escasos estudios de esta proteína en medicina canina parecen revelar que no se comporta de la misma manera en esta especie, debido a las diferencias detectadas con la especie humana en el transporte de la vitamina A. Los riñones juegan un importante papel en el metabolismo de la misma y en el reciclaje del RBP⁴⁹. Esto, añadido a que se ha detectado una alta concentración de vitamina A en los riñones de perros y baja en el hígado, a diferencia de lo descrito en el hombre, sugiere una función especial del riñón canino en el metabolismo y concentración plasmática de RBP en esta especie²⁵⁹.

Además de las alteraciones bioquímicas descritas, derivadas directamente de la enfermedad renal (urea, creatinina, fósforo y colesterol) y de la leishmaniosis (proteínas totales), se ha detectado un incremento de las enzimas hepáticas tanto en DRA como en ERC (Tablas 34 y 37).

Aunque la ALT presenta diferentes orígenes en el perro, sus mayores concentraciones se encuentran en el tejido hepático¹⁷⁷. Su incremento se atribuye a enfermedades concomitantes. En el grupo con DRA, 8 perros presentaron leptospirosis, 4 pancreatitis agudas y 3 shock séptico. En el grupo con ERC, 63 perros presentaron leishmaniosis y uno leptospirosis. Además, las propias toxinas urémicas pueden producir daño a este nivel.

La FA, por su parte, es una enzima muy inespecífica⁹³. En la especie canina, su concentración en sangre se usa principalmente como biomarcador de enfermedades hepáticas y óseas, o como indicador de un incremento de corticoides tanto de origen endógeno (estrés, hiperadrenocorticismos) como exógeno. Además de las enfermedades descritas, a menudo se observa también un incremento moderado en enfermedades renales, que se atribuye al estrés que produce la enfermedad, puesto que la enzima procedente del riñón tiene una vida media de escasos minutos³²⁸. Su

incremento se observa especialmente en el grupo de perros con DRA, y más concretamente en los subgrupos IRIS III y IV. Los perros con ERC presentan valores inferiores, debido a que el individuo tiene tiempo para adaptarse a los niveles de estrés causados por la enfermedad.

Se ha observado un incremento de la GGT en todos los grupos de perros estudiados, tanto con DRA como con ERC, aunque no se obtiene significación estadística. También esta enzima tiene diferentes orígenes (páncreas, plexo coroideo y porción apical del epitelio intestinal), pero su mayor concentración está en riñón y en hígado^{104,229,275,280}. No suele formar parte de los paneles analíticos de perros con enfermedad renal, a menos que se sospeche de enfermedad hepatobiliar concomitante (como ocurre por ejemplo en casos de leptospirosis). Recientemente se ha demostrado en la especie canina que la enzima puede ser un marcador de estrés oxidativo de las células renales, y que puede relacionarse directamente con la patogénesis de la disfunción endotelial³⁷¹. En medicina humana se está utilizando como indicador de alto riesgo de enfermedad renal en fumadores²²⁴.

Los resultados analíticos de las enfermedades no renales estudiadas también son los esperados. Así, el grupo de perros con hipotiroidismo se caracteriza por hipercolesterolemia e incremento de la concentración de ALT (Tabla 52). La hipercolesterolemia se atribuye a que las hormonas tiroideas estimulan la síntesis, movilización y degradación de los lípidos. El incremento de la ALT, descrita en el 30% de los perros con esta enfermedad, se debe probablemente a la acumulación de lípidos en el hígado^{75,235}. Los perros con enfermedad cardíaca no presentaron alteraciones remarcables (Tablas 53 y 54). Los perros con neoplasias desarrollaron anemia y un leucograma inflamatorio (Tablas 55 y 56), y los perros con linfoma multicéntrico un incremento de la ALT plasmática, atribuido a posible afectación hepática (Tabla 58). Los perros con HAC desarrollaron un leucograma de estrés (Tabla 59) y un incremento en la concentración plasmática de ALT, FA y colesterol (Tabla 61)¹². Por último, los perros con meningitis que responde a los corticoides presentaban en el momento del ingreso un leucograma inflamatorio (Tabla 60) para desarrollar, una vez instaurado el tratamiento con prednisona un incremento de la concentración plasmática de colesterol y de FA (Tabla 62). Este incremento se asocia al desarrollo de

una hepatopatía vacuolar esteroidea⁴² y al incremento de una isoforma de FA inducida por corticoides y específica de la especie canina (C-ALP)¹⁰³.

VIII.3.2 Análisis de orina

Los resultados obtenidos en el análisis de orina se caracterizan, de forma general, por un incremento del valor UP/C, de la concentración de proteínas de bajo peso molecular y de las enzimas analizadas en todos los grupos de enfermedad renal (Tablas 35 y 38).

En el estudio de la enfermedad renal es muy importante la determinación de la densidad urinaria, puesto que se considera uno de los pilares del análisis de orina de perros con esta enfermedad. Además, en el caso de ERC, se ve afectada antes de que se produzca la azoemia¹⁷, cuando aproximadamente un 67% de las nefronas no son funcionales⁴⁶. De hecho, en el presente trabajo se ha observado una moderada disminución estadísticamente significativa en el grupo de leishmaniosis sin azoemia ($1.034 \pm 10,4$) (Tabla 45), y no significativa en la Fase II de los perros con esta enfermedad clasificados según el grupo de expertos LeishVet (Tabla 50). El aumento de la cantidad de solutos eliminados por las nefronas aún funcionales, la alteración de la arquitectura medular renal y el daño renal primario responsable de una deficiente respuesta tubular a la hormona antidiurética provocan su disminución en la ERC⁴⁵. La enfermedad suele cursar con isostenuria, aunque hay que tener en cuenta que la presencia de diferentes solutos, como glucosa y/o proteínas, pueden falsear los resultados³²¹. Los resultados obtenidos son superiores al rango establecido por Stockham SL y Scott MA³²¹ en 2008, pero pueden estar influenciados por la proteinuria existente, tal y como también explican estos autores (todos los perros con ERC presentan una elevación del valor de UP/C). No obstante, la interpretación de la densidad de orina es difícil, y debe hacerse en conjunto con otros parámetros, como el estado de hidratación, la proteinuria, la homogeneidad de los grupos, la azoemia u otros signos de enfermedad renal³²¹.

La densidad de la orina se debe interpretar conjuntamente con la proteinuria. Ésta, en ausencia de un sedimento urinario activo, es indicador de daño renal, a la vez que contribuye a la progresión del mismo: se asocia con el incremento de la tasa de

mortalidad en perros con ERC²⁵⁸. En la actualidad, la determinación del UP/C se considera el mejor método para su evaluación en la especie canina³⁶⁰. Se ha encontrado un incremento de su valor medio por encima de 0,5 (valor considerado patológico por la clasificación IRIS) en todos los grupos de perros con enfermedad renal estudiados. En los perros con DRA es debida, normalmente, a causas postrenales. Se ha observado un valor superior en los perros con ERC respecto a los perros con DRA. Welles EG *et al.*³⁶⁰, en 2006, afirmaron que un UP/C en perros con ERC comprendido entre 1 y 3 puede estar asociado con daño tubular, superior a 3 con pérdida de proteínas a nivel glomerular, y entre 5 y 15 con glomerulonefritis. Los resultados descritos por estos autores pueden ser orientativos en los encontrados en el presente trabajo. Así, el valor medio en todas las fases IRIS del DRA, asociado principalmente a enfermedad tubular, está comprendido entre 1 y 3 (Tabla 35); en las fases más graves de ERC, IRIS 3 y 4, es superior a 3 (Tabla 38); y en 6 perros con ERC se observó un UP/C muy elevado (superior a 15), compatible con glomerulonefritis grave.

Los marcadores de función tubular estudiados (además de la determinación de la densidad urinaria), se pueden dividir en dos grupos: proteínas urinarias de bajo peso molecular y enzimas. La interpretación de las primeras consiste en detectar en orina la presencia de determinadas proteínas de bajo peso molecular que no deben aparecer o que, si lo hacen, es en cantidades mínimas (RBP y cistatina C). La de las segundas consiste en la presencia en la orina de una serie de enzimas de origen tubular (LDH, FA, NAG y GGT) (enzimuria), que normalmente también están en concentraciones muy bajas o casi ausentes.

La RBP constituye una de las proteínas de bajo peso molecular relacionadas con la enfermedad renal⁶⁸. Bajo condiciones fisiológicas, una vez liberada de la transtiterina (TTR), es filtrada por el glomérulo y reabsorbida completamente por endocitosis mediada por megalina a nivel de túbulo contorneado proximal. Debido a este proceso, sólo pequeñas trazas son excretadas en la orina de animales sanos, y su incremento se asocia a una disfunción a nivel de túbulos proximales^{96,258,261,311}.

Se observa un incremento estadísticamente significativo de la ratio RBP/c tanto en perros con DRA como con ERC, con valores relativamente parecidos. Estos resultados

concuerdan con los obtenidos por varios grupos de investigadores^{131,176,195,258,311}. No se ha podido analizar su alteración en función de la clasificación IRIS debido al escaso número de perros analizados (23 perros con DRA y 30 perros con ERC), lo que explica también que, al haber perros en diferentes grados de la enfermedad, la desviación estándar sea alta. Aunque no hay diferencias significativas entre los valores correspondientes a los perros con ERC con y sin leishmaniosis (Tabla 45), los resultados son mayores en los primeros. Con los resultados obtenidos parece ser que la ratio RBP/c urinaria no es capaz de distinguir entre DRA y ERC. Los valores más elevados se presentaron en aquellos animales con signos indicativos de deterioro glomerular importante (valores de UP/C más elevados). Se ha demostrado que la proteinuria puede deteriorar gradualmente la estructura y funcionalidad tubular proximal^{49,123}. Otras investigaciones defienden que la proteinuria leve a moderada compite con la reabsorción de RBP^{63,289,351} más que inducir lesiones tubulares^{60,351}.

La FA forma parte de un grupo de enzimas que se encuentran ancladas a la bicapa lipídica de la membrana celular. A nivel renal se localiza en las células en cepillo de los túbulos proximales, al igual que ocurre con la GGT^{39,68,93}. La LDH, por su parte, es una enzima citosólica ampliamente distribuida. A nivel renal se localiza en el citoplasma de las células del túbulo proximal⁵⁴. Por último, la NAG es una enzima que se encuentra predominantemente en los lisosomas de las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales y distales^{233,288}. Por lo tanto, al menos desde un punto de vista teórico, como se conoce el origen de cada enzima, cuando una de ellas aumenta se puede orientar la región del túbulo renal dañado, aunque en general todas son indicadores de daño a nivel de túbulo contorneado proximal. Con el fin de corregir en lo posible su medida en una muestra de orina puntual, se expresan en forma de cociente con la creatinina urinaria.

La detección de daño localizado en el túbulo contorneado proximal es muy importante, puesto que es en este segmento tubular donde se llevan a cabo la mayoría de las funciones de los túbulos renales. Así, a este nivel se absorbe más del 99% de la glucosa, aminoácidos y bicarbonato, dos tercios del sodio y potasio, entre un 80% y un 90% del fósforo, más del 90% de calcio y se excretan diferentes solutos, como toxinas urémicas, creatinina (sólo en la especie canina y en perros machos o con enfermedad

renal) y moléculas orgánicas. Por último, junto con el asa de Henle y el túbulo contorneado distal, es responsable de la reabsorción de más del 99% del agua filtrada³⁶.

Cuando se analizan los resultados obtenidos, se observa que los valores medios encontrados de enzimuria están incrementados tanto en los perros con DRA (Tabla 35) como con ERC (Tabla 38) respecto al grupo control. La ratio de enzimas urinarias/creatinina es superior en los primeros (Figuras 25 - 28). Estos resultados indican un daño tubular de mayor intensidad en estos perros, tal y como se ha descrito por diversos autores en las especies humana y canina^{6,65,110,124,169,214,254,256,287,307,361}. Aunque los valores medios obtenidos indican un aumento progresivo de las enzimas urinarias estudiadas en función de la gravedad del proceso, es en IRIS IV donde se observa el mayor incremento (Tabla 35; Figuras 25–28). El estudio estadístico muestra una amplia dispersión de datos. Se debe tener en cuenta que se han estudiado animales con DRA debido a diversas etiologías, y que no se ha podido realizar un estudio histopatológico de los riñones afectados, por lo que se desconoce realmente el grado individual de lesión tubular. No obstante, la enzima que parece ser más sensible es la NAG, ya que presenta significación estadística a partir de IRIS II (Figura 26).

La ERC, caracterizada por daño glomerular, suele ir acompañada de daño tubular, tal y como indican los resultados obtenidos. Las lesiones glomerulares puras, en enfermedades crónicas, son poco frecuentes, aunque su origen sea una alteración del glomérulo. Como en el caso del DRA, también en este grupo la dispersión de datos es considerable, y la explicación también puede radicar en el diferente grado de lesión tubular de cada perro, dependiente, principalmente, de la causa responsable. Tampoco en este caso se disponen de datos histopatológicos. Los resultados estadísticos indican un incremento progresivo de la enzimuria a medida que se agrava la enfermedad, de forma estadísticamente significativa en todas las enzimas estudiadas a partir de IRIS 2 (Figuras 25-28). La ratio NAG/c sigue siendo la más sensible, al igual que en el DRA, presentando diferencia estadística respecto a los perros sanos ya en IRIS 1 (Figura 26).

Este grupo incluye 63 perros con leishmaniosis. Estos animales desarrollan una enfermedad renal debida a infección por *Leishmania infantum* y, por lo tanto, con daño histopatológico más homogéneo. Así lo indican los resultados obtenidos. Mientras que en los perros con ERC negativos a leishmaniosis sólo la NAG parece alterarse (Tabla 45), con diferencia significativa respecto al grupo control en los cuatro grados de IRIS (Tabla 47), en los perros con ERC debida a leishmaniosis el incremento de la enzimuria es significativa a partir de IRIS 2 para las ratios de LDH/c, FA/c y GGT/c, y a partir de IRIS 1 para la ratio NAG/c (Tabla 46; Figuras 35-38). Esto se ve apoyado por los resultados obtenidos en el grupo de perros con leishmaniosis y sin azoemia, que presenta un incremento significativo respecto al grupo control para todas las enzimas, excepto para la GGT (Tabla 45). Bianciardi P *et al.*²¹, en 2009, aportaron que los riñones están probablemente afectados en todos los perros con leishmaniosis. Pacientes infectados clínicamente sanos pueden presentar el mismo tipo de lesión renal histológica que los enfermos (hipercelularidad mesangial, hipersegmentación glomerular, nefritis intersticial y depósito de colágeno)⁸⁵. Incluso pacientes no proteinúricos pueden presentar una glomerulonefritis mesangioproliferativa con nefritis tubulointersticial²⁴⁶. La Fase I de la clasificación LeishVet incluye perros sin alteraciones laboratoriales en sangre. Sin embargo, el estudio estadístico realizado de los biomarcadores urinarios en este grupo manifiesta un incremento estadísticamente significativo de la ratio NAG/c urinaria. En la Fase II, con UP/C < 1, se observa también un incremento significativo de las ratios LDH/c y FA/c. En las Fases III y IV, azoémicas, se ven incrementados todos los biomarcadores (Tabla 50; Figura 43).

VIII.3.3 Cistatina C

La concentración de cistatina C en plasma y en orina es objeto de estudio para el diagnóstico de la enfermedad renal en el perro desde hace varios años, en virtud de los resultados obtenidos previamente en medicina humana. En 2014, Ghys L *et al.*¹⁰² pusieron de relieve su importancia en un completo artículo de revisión sobre su utilidad como marcador renal en medicina de pequeños animales, comparando los estudios realizados con los existentes en medicina humana. Son varias las propiedades que presenta y que la convierten en un marcador renal prometedor. Como marcador endógeno indirecto de la TFG^{8,205,359} está el hecho de que su producción y

concentración en el plasma es constante, presenta una baja variación intraindividual, no va unida a las proteínas plasmáticas, no presenta secreción tubular, no es reabsorbida sin ser catabolizada y no presenta eliminación extrarrenal²⁹⁸. En personas se considera incluso más sensible que la creatinina para detectar enfermedad renal⁷³. En cuanto a la orina, su concentración en individuos sanos es extremadamente baja comparada con los enfermos renales, lo que la convierte en un marcador de daño tubular^{56,343}.

VIII.3.3 1 Cistatina C en sangre

Daño renal agudo

En medicina humana se ha descrito un incremento de la cistatina C plasmática, como indicativo de deterioro renal agudo, hasta dos días antes del incremento de la concentración de creatinina, lo que puede permitir instaurar de forma más prematura un tratamiento adecuado y, por lo tanto, disminuir daños y riesgos¹²⁶. En medicina canina Pasa S *et al.*²³⁸, en 2008, también demostraron el incremento de su concentración sérica en perros críticos con DRA (pacientes politraumatizados, en estado de shock y con enfermedad del tracto urinario).

Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa para la cistatina C plasmática entre los perros con DRA y los sanos a partir de IRIS III (Tabla 34; Figuras 5). Aunque se observa un incremento progresivo desde IRIS I hasta IRIS IV (Tabla 34), en las primeras fases de IRIS la cistatina C plasmática se solapa con el rango obtenido en los perros sanos en 8 perros en IRIS I y en 7 perros en IRIS II. También la concentración de creatinina manifiesta significación estadística a partir de IRIS III (Tabla 34; Figura 5). Tal y como se puede comprobar en la Figura 5, el comportamiento de ambos biomarcadores plasmáticos es semejante, observándose una correlación entre ambas (Figura 6; $P < 0,001$), con la peculiaridad de que la cistatina C presenta un incremento más uniforme a medida que se agrava la enfermedad en comparación con el comportamiento hiperbólico de la creatinina respecto a la disminución de la TFG³⁴.

Existen escasos estudios publicados sobre la sensibilidad diagnóstica de la cistatina C plasmática en el DRA del perro. A pesar de que no se ha determinado la TFG, los

resultados obtenidos parecen ir en la línea de los aportados por Almy FS *et al.*⁸ en 2002, que llegaron a la conclusión de que no se le puede considerar un marcador prematuro de lesión renal aguda, al menos por causas responsables de azoemia prerrenal, puesto que no encontraron sensibilidad a disminuciones discretas de la TFG en perros en los que experimentalmente se produjo una depleción de volumen.

Enfermedad renal crónica

Existen diversos estudios en medicina humana que demuestran que los niveles de cistatina C plasmática se correlacionan mejor con la TFG en ERC que la creatinina^{27,114,170,222,269,304}, sobre todo en etapas tempranas de la enfermedad^{94,222}. En 2011, Horio M *et al.*¹³³ concluyeron que, debido a la mayor variación intraindividual y menor interindividual respecto a la creatinina plasmática, se considera que la cistatina C es un mejor test de screening para disminuciones sutiles en la TFG en ERC, mientras que la creatinina es mejor para monitorizar una enfermedad renal ya establecida.

En el presente estudio se observa un aumento de los niveles de cistatina C plasmática en los animales con ERC (Tabla 37; Figura 12), estadísticamente significativo desde IRIS 2. Aunque no son muchos los trabajos de investigación realizados al respecto, estos resultados coinciden con los aportados previamente por Almy FS *et al.*⁸ en 2002, Wehner A *et al.*³⁵⁹ en 2008 y Miyagawa Y *et al.*²⁰⁵ en 2009. Diferentes autores han aportado que puede existir un solapamiento de valores entre perros sanos y enfermos^{10,35,205}, lo que se ha observado principalmente en 25 perros de IRIS 1 en el presente estudio. Al igual que en los perros con DRA, la cistatina C plasmática parece mostrar de forma más homogénea la evolución de la enfermedad (Figura 12), frente al comportamiento hiperbólico de la creatinina en fases terminales. Esto puede ayudar a una mejor monitorización de los pacientes con ERC grave. Ambos parámetros están muy correlacionados entre sí (Figura 13; $P < 0,001$). La cistatina C también se correlaciona con la concentración de fósforo en el plasma (Figura 14), lo que tiene importancia desde el punto de vista del pronóstico.

La ERC se suele atribuir a enfermedades con un componente principalmente glomerular, mientras que el DRA se suele asociar a enfermedades con daño tubular. El hecho de que la cistatina C plasmática es un biomarcador sanguíneo de enfermedad

glomerular explica que su concentración media sea superior en los perros con ERC que en aquellos que padecen DRA (Figura 16). Sin embargo, no se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre ambas enfermedades, y su evolución es muy parecida en las dos (Figura 17), aunque los estadios IRIS no son exactamente equivalentes en ambas enfermedades.

Se ha realizado un estudio específico en perros con leishmaniosis, debido a la frecuencia de presentación de la enfermedad en el área de influencia del hospital en el que se ha realizado el estudio (Suroeste de la Península Ibérica) y porque la enfermedad es considerada un modelo natural de enfermedad renal⁵⁷. Como se ha comentado anteriormente, la leishmaniosis es una enfermedad responsable de lesión renal probablemente en todos los perros afectados²¹, a pesar de que no todos la presenten clínicamente y/o con azoemia. Esta enfermedad causa diferentes grados de daño glomerular que puede dar lugar a ERC. En la mayoría de los casos se desarrolla una glomerulonefritis cuya lesión ocurre de manera secundaria a la formación y depósito de inmunocomplejos. Como se ha comentado anteriormente, los pacientes infectados clínicamente sanos pueden presentar el mismo tipo de lesión renal⁸⁵, incluso los no proteinúricos²⁴⁶. Si solo se tiene en cuenta a la hora de detectar daño renal la medida de la concentración sérica de creatinina y el UP/C, se obtiene una prevalencia de alrededor del 49,5 %⁵⁷, mientras que si el criterio se basa en los estudios histológicos post-mortem prácticamente el 100% de los animales padecen alteraciones renales⁵⁹.

Es escasa la bibliografía disponible sobre cistatina C plasmática en perros con leishmaniosis. Pasa S *et al.*²³⁷, en 2009, determinaron la concentración de este biomarcador en el plasma de 16 perros infectados naturalmente de leishmaniosis, con valores de BUN y creatinina normales, y lo compararon con un grupo formado por 10 perros sanos. Describieron un incremento estadístico en el valor medio de la concentración plasmática de cistatina C, aunque todos los perros, excepto uno, presentaron valores incluidos en el rango de referencia obtenido en el grupo control. En la presente Tesis Doctoral se ha determinado la concentración de cistatina C plasmática en 35 perros con leishmaniosis no azoémicos. Sin embargo, no se ha

encontrado, a diferencia del trabajo de Pasa S *et al.*²³⁷ (2009), un incremento significativo respecto al grupo de animales sanos (Tabla 42).

La cistatina C parece ser un marcador plasmático, en los casos descritos, más precoz que la creatinina. Se conoce muy poco sobre su sensibilidad para detectar ERC en el perro. Braun JP *et al.*³⁵ (2002) llevaron a cabo un estudio en 7 animales con signos clínicos de ERC pero sin azoemia, encontrando un incremento del nivel de cistatina C plasmática sólo en un animal (14,29%), aunque no se determinó la TFG, por lo que no se puede estar seguro del estado de la función renal.

La enfermedad renal en perros con leishmaniosis puede progresar desde una proteinuria subclínica hasta una ERC con glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial y amiloidosis o un síndrome nefrótico¹⁶⁵. Histológicamente, la lesión renal se ha clasificado como glomerulonefritis mesangial, glomerulonefritis membranosa, glomerulonefritis membranoproliferativa y glomerulonefritis focal segmental⁵⁹. Estas alteraciones histológicas terminan manifestándose como ERC. En el presente trabajo se ha estudiado un número cuantitativamente importante de perros azoémicos con leishmaniosis, adquirida de forma natural. Su concentración plasmática muestra un incremento desde la fase IRIS 1, altamente significativo respecto al grupo control desde IRIS 2, mientras que la creatinina muestra significación a partir de IRIS 3 (Tabla 43). Se trata de un grupo de perros de etiología conocida: alteración fisiopatológica a nivel glomerular producida por el depósito de inmunocomplejos^{248,317}. En medicina humana se ha comprobado que los niveles de cistatina C plasmática se correlacionan positivamente con la cantidad de inmunocomplejos circulantes y con la producción de factores de crecimiento de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), ambos importantes factores que producen disfunción glomerular en la enfermedad^{8,82}. Al estudiar este marcador renal sanguíneo en perros sin alteraciones analíticas (Fase I de la clasificación LeishVet; Tabla 49), no se observa un incremento respecto al grupo control. Éste se hace manifiesto a partir de la Fase II, en la que también empieza a detectarse proteinuria (Figura 39).

Pasa S *et al.*²³⁷ (2009) concluyen que son necesarios más estudios combinados con biopsias renales para completar la interpretación de la cistatina C plasmática en perros

con leishmaniosis, y comprobar si las alteraciones observadas son debidas sólo al daño renal o a factores extrarrenales. Esta conclusión está muy bien fundamentada, y debe ser así. No obstante, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral para la cistatina C plasmática muestran un patrón de comportamiento semejante en los perros con leishmaniosis y en aquellos en los que, siendo también azoémicos, la ERC es debida a otras etiologías. Aunque se observa una mayor concentración en el grupo total de perros con leishmaniosis (Figura 29), principalmente en la fase 4 de IRIS (Figura 30), ésta no es estadísticamente significativa.

Por último, para completar el estudio de la cistatina C plasmática, se ha analizado su concentración en un grupo de enfermedades no renales: disfunción tiroidea, enfermedades cardiacas, neoplasias, HAC y administración de corticoides. En diversos estudios previos se ha encontrado un solapamiento de valores de cistatina C plasmática entre perros con diversas enfermedades no renales respecto a animales sanos^{11,149,205}.

Se ha descrito en medicina humana que la disfunción tiroidea puede alterar la concentración de creatinina en sangre, aumentando en el hipotiroidismo (por disminución de la TFG) y disminuyendo en el hipertiroidismo (por aumento de la TFG). No obstante, esta alteración no está clara. Puesto que la concentración de cistatina C se emplea cada vez con mayor frecuencia, son numerosos los estudios llevados a cabo para comprobar cómo se comporta este parámetro en casos de hipotiroidismo⁹⁷. Como se ha explicado en el capítulo de revisión bibliográfica, la cistatina C es un inhibidor fisiológico de las cisteín-proteasas, y su producción es constante en la mayoría de las células nucleadas¹. Sin embargo, son numerosos los estudios que han demostrado un impacto importante de la disfunción tiroidea sobre los niveles sanguíneos de cistatina C en medicina humana³⁶⁵, disminuyendo en el hipotiroidismo y aumentando en el hipertiroidismo^{97,365}. De hecho, parece ser más sensible a los cambios de la función tiroidea que la creatinina³⁶⁵. Se desconoce si todas las células formadoras de cistatina C se ven afectadas del mismo modo³⁶⁵, aunque se ha comprobado que, al menos, la triyodotironina aumenta el metabolismo de la cistatina C por las células osteoblásticas²⁹².

Actualmente no existen evidencias en medicina veterinaria de que la función tiroidea pueda modificar los niveles de cistatina C plasmática en el perro. Se ha realizado un estudio preliminar en gatos que muestra resultados similares a algunos de los obtenidos en medicina humana, indicando que los niveles plasmáticos de cistatina C se podrían ver aumentados en hipertiroidismo y disminuidos en hipotiroidismo¹⁵⁰. Sin embargo, Willians TL *et al.*³⁶⁶, en 2016, en un estudio realizado en gatos hipertiroideos y con ERC, no encontraron cambios significativos en la concentración de la cistatina C en plasma. Resultados similares a los obtenidos por Jepson RE *et al.*¹⁵⁰ (2006) para el hipotiroidismo se han observado en los perros del presente trabajo (Tabla 52). Aunque sería deseable aumentar el número de animales estudiados, de los 10 perros analizados, 6 (60%) presentaron un valor inferior al rango descrito como normal. Por lo tanto, el hipotiroidismo parece ser un factor a tener en cuenta en la interpretación de la concentración de cistatina C plasmática en perros con enfermedad renal.

También se ha estudiado la concentración de cistatina C plasmática en perros con enfermedades cardíacas. El corazón y los riñones constituyen dos órganos que están interconectados desde un punto de vista funcional a través del conocido como “eje cardiorrenal”. Esta conexión fisiológica se produce a través de varias vías, que incluyen la presión de perfusión renal, la presión de llenado del corazón y la actividad neurohormonal. Por lo tanto, es lógico pensar que la alteración en uno de estos dos sistemas puede tener repercusiones clínicas sobre el otro, y viceversa. Aunque las enfermedades del corazón y de los riñones, tanto en el perro como en el gato, se reconocen como causas habituales de morbilidad y mortalidad en medicina veterinaria, la interacción entre los dos sistemas todavía no se ha estudiado en profundidad. En este sentido, en 2015, un grupo de cardiólogos y nefrólogos veterinarios de Europa y Estados Unidos se reunieron para establecer un consenso en cuanto a la definición, fisiopatología, diagnóstico y tratamiento de los trastornos que afectan a la interacción entre los sistemas renal y cardiovascular²⁵². Se ha demostrado que la azoemia y la enfermedad renal aumentan con la gravedad de las enfermedades cardíacas, y son hallazgos frecuentes en perros con insuficiencia crónica de la válvula mitral²²³. Puesto que la concentración en sangre de urea y creatinina son marcadores

tardíos, cada vez se hace más necesaria la utilización de biomarcadores renales precoces en perros cardiopatas, como la SDMA y la cistatina C²⁵².

Esta última es objeto de estudio desde hace varios años en cardiología humana como marcador de enfermedad cardíaca^{76,210,243,285}, aunque no se conoce con certeza si se trata sólo de un marcador pronóstico o de un factor de riesgo independiente para el desarrollo de la enfermedad^{76,77,242}. Podría existir una relación entre la cistatina C plasmática y la enfermedad renal secundaria a hipertensión arterial grave o mal controlada²⁴². Djoussé L *et al.*⁷⁶ (2008) afirman que la asociación entre la cistatina C en sangre y el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca se restringe exclusivamente a pacientes con hipertensión arterial. La reducción de la función renal, medida por la concentración en sangre de cistatina C, conduce a la retención de sodio y agua, con la consiguiente aceleración del proceso de remodelado ventricular y el desarrollo de insuficiencia cardíaca⁷⁷.

La cistatina C plasmática se considera un importante marcador del riesgo cardiovascular en personas de edad avanzada antes de enfermar, y en sujetos que ya han desarrollado una insuficiencia cardíaca sintomática, especialmente en aquéllos sin antecedentes de enfermedad cardiovascular previa⁷². El equilibrio entre las cisteinoproteasas, como las catepsinas B, S y K, y sus inhibidores, como la cistatina C, se ha involucrado en la patogenia de remodelación e hipertrofia ventricular del corazón insuficiente^{44,326}. Las catepsinas son las causantes del proceso fisiológico de digestión de determinadas proteínas a nivel celular, y podrían influir en la hipertrofia miocárdica^{283,300}.

Sin embargo, el grupo de perros cardiopatas estudiado no presenta diferencias significativas para el parámetro sanguíneo en cuestión respecto a los perros sanos (Tabla 54), y sólo dos de los perros estudiados (20%) han presentado una concentración por encima del rango considerado normal (Figura 46). Es difícil explicar estos resultados. Sería necesario ampliar la población de estudio, sobre todo en pacientes con enfermedad cardíaca avanzada, de larga duración e hipertensos. Es indudable que la función renal es un factor pronóstico de insuficiencia cardíaca, reflejo de cambios preclínicos en la estructura cardiovascular²⁴³, y que la cistatina C es un

marcador sensible de ésta, especialmente en grados leves de disfunción en los que los marcadores clásicos están distorsionados y ofrecen una información confusa. No obstante, no es ésta la única información que puede proporcionar. Se puede especular que se asocia de modo primario a fenotipos cardiacos específicos de hipertrofia ventricular^{76,239} y, por tanto, sería un marcador subrogado de la misma. Además, como se ha comentado anteriormente, es posible que sea un marcador sensible y directo del remodelado ventricular, independientemente de la función renal, directamente implicada en la patogenia de la enfermedad cardiaca²⁴³. Pero aún se está muy lejos en medicina canina de llegar a estos resultados. Miyagawa Y *et al.*²⁰⁵ (2009) estudiaron la concentración de cistatina C plasmática en varios grupos de perros, entre los que se incluía uno de enfermedades no renales. En el mismo estudiaron 3 perros con insuficiencia de la válvula mitral y 2 perros con conducto arterioso persistente, no encontrando diferencias respecto a un grupo control formado por animales sanos. En contraste, recientemente se ha publicado un trabajo de investigación determinando la concentración plasmática de cistatina C y SDMA en 33 perros con insuficiencia crónica de la válvula mitral, observándose un incremento en ambos parámetros, sobre todo en perros en fase avanzada de la enfermedad⁴⁷.

Un gran número de procesos normales y anormales son controlados por el equilibrio entre las proteasas y sus inhibidores³⁰⁹. Varias proteasas lisosomales, entre las que se incluye la cisteín-proteasa y la catepsina B, están implicadas en la progresión de tumores malignos²²⁰. La cistatina C podría estar implicada en la regulación de estos procesos, puesto que es considerada como el inhibidor más fuerte de la catepsina B¹⁵. Se le atribuyen dos propiedades antitumorales: inhibidor de las catepsinas (enzimas tumorales que causan degradación de las membranas basales, por lo que disminuye el potencial metastásico) e inhibidor del TGF- β (transforming growth factor-beta)^{298,314}. Sin embargo, se desconoce su papel exacto en la oncogénesis y los resultados sobre el incremento de su concentración en plasma es contradictorio^{15,92,162,274}. Personas con carcinoma³²⁴ y con leucemias⁷¹ presentaron, antes de recibir tratamiento, un incremento significativo de la concentración de cistatina C plasmática cuando se compararon con pacientes con las mismas enfermedades después del tratamiento. Sin

embargo, otros estudios no encontraron diferencias entre personas con neoplasias malignas y sanas^{9,207}.

En esta última línea se encuentran los resultados obtenidos en el presente trabajo (Tablas 57 y 58). Sólo se observa un incremento del valor de cistatina C plasmática en 3 perras (18,75%) con neoplasias mamarias (Figura 46). En medicina humana, Vigneswaran N *et al.*³⁴⁹, en 2005, encontraron en esta enfermedad concentraciones superiores de cistatina C en sangre respecto a un grupo control sano. Sin embargo, dicho hallazgo no se evidenció en ratones, en los que los niveles de la proteína estaban incluso disminuidos en procesos neoplásicos semejantes²⁷⁴.

Tampoco en los perros con linfoma multicéntrico los resultados han sido manifiestos, observándose su incremento en 4 perros (21,05%; Figura 46). Esto coincide con resultados obtenidos en algunas investigaciones realizadas en oncología humana. Un estudio llevado a cabo en 60 personas diagnosticadas de mieloma mostró la ausencia de correlación entre los niveles de cistatina C plasmática y la carga tumoral⁹², resultado que fue confirmado por otro estudio²⁰⁷, en el que se observó que los niveles de cistatina C no eran significativamente superiores en pacientes con desordenes hematológicos proliferativos (mieloma múltiple y leucemia crónica y aguda) y con función renal normal en comparación con un grupo de individuos sanos. Miyagawa Y *et al.*²⁰⁵ (2009), en su estudio sobre la concentración de cistatina C plasmática en perros con enfermedades no renales, estudiaron 2 perros con carcinoma de células transicionales de vejiga de la orina, 2 perros con linfoma renal y una perra con tumores mamarios, no encontrando diferencias respecto al grupo control formado por animales sanos. Como en los grupos anteriores, sería necesario realizar un estudio en una población mayor de animales enfermos.

Otro de los objetivos del presente trabajo es comprobar si los corticoides influyen sobre la concentración de cistatina C plasmática en el perro (Anexo 1). Los corticoides son fármacos muy utilizados en medicina canina debido a su potente efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. Varios estudios han demostrado que la administración de prednisona induce un aumento de cistatina C plasmática en personas^{30,198,269,270,377}. Un resultado similar se ha observado en los perros tras su

administración oral durante 7 días a 4 mg/kg/24 horas. Este hallazgo no parece estar relacionado con una TFG alterada, ya que al menos la concentración en plasma de creatinina y de urea y el UP/C permanecen dentro de los rangos de referencia en todos los grupos (Tabla 62). Bjarnadóttir M *et al.*²⁴, en 1995, demostraron que la adición *in vitro* de dexametasona a células HeLa indujo un aumento dependiente de la dosis de la secreción de cistatina C en cultivos después de 40 horas. Los autores sugirieron que el aumento observado se debió a un efecto estimulador del corticoide relacionado con el promotor del gen cistatina C, aumentando así la transcripción del mismo. En pacientes con asma tratados con metilprednisolona, el aumento observado de la cistatina C plasmática también se ha relacionado con la patogénesis del proceso, ya que es secretado activamente por los macrófagos a nivel alveolar⁵¹.

Aunque las enfermedades estudiadas, las dosis y el calendario de administración varían en medicina veterinaria y en medicina humana, así como con los utilizados en el presente estudio, los resultados muestran que la cistatina C aumenta significativamente en sangre tras la administración exógena de glucocorticoides en perros. Los resultados mostraron un aumento significativo a dosis de 4 mg/kg/día de prednisona, disminuyendo a dosis de 2 mg/kg/día y después de retirar el tratamiento (Figura 47). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Risch L *et al.*²⁷⁰ (2001), los cuales demostraron que, en personas sometidas a trasplante renal, la concentración plasmática de cistatina C fue superior en pacientes tratados con corticoides, aumentando con dosis crecientes de los mismos. Resultados similares fueron aportados por Pöge U *et al.*²⁴⁷ (2004), quienes describieron que, en pacientes sometidos a trasplante renal tratados con 500 mg de metilprednisolona, la cistatina C plasmática alcanzó su punto máximo después de 24 horas, y que este aumento fue dosis-dependiente.

Por otra parte, los resultados demuestran que en perros diagnosticados de HAC, en los que la producción endógena de corticoides está alterada, los valores de cistatina C plasmática no son significativamente diferentes de los del grupo control (Tabla 61), y sólo 4 animales (20%) presentaban una concentración incrementada (Figura 46). Estos resultados coinciden con los aportados por Marynissen SJ *et al.*²⁰¹ (2016), que demostraron que en un seguimiento realizado a perros afectados con HAC durante 12

meses, los valores de cistatina C plasmática no fueron significativamente diferentes en comparación con los perros sanos. Estos resultados sugieren que en los perros afectados con HAC, la producción endógena de corticoides no es lo suficientemente alta como para inducir un aumento en cistatina C plasmática y que existe un umbral por debajo del cual los corticoides no alteran este parámetro.

Queda por estudiar si la influencia de los corticoides es transitoria en los perros, como se ha observado en personas afectadas de nefritis debida a lupus tratados de forma crónica con corticoides³⁵².

VIII.3.3.2 Cistatina C en orina

El análisis de orina ha contribuido al diagnóstico de la enfermedad renal desde hace decenas de años. Tradicionalmente se ha limitado, principalmente, al análisis de la densidad como marcador tubular, y de la proteinuria (UP/C), en ausencia de sedimento urinario activo, como marcador glomerular. Sin embargo, en los últimos años se han analizado en el perro otros biomarcadores urinarios, previamente estudiados en medicina humana, con el objetivo de realizar un diagnóstico más precoz de la enfermedad, y de ayudar a localizar la lesión a nivel de la nefrona. La orina, además, es el producto más directo obtenido de la funcionalidad del riñón y, por lo tanto, su composición refleja de forma directa una función anormal del mismo. En general estos nuevos biomarcadores informan de daño o disfunción tubular, principalmente del túbulo proximal, segmento de la nefrona muy activo en la fisiología renal.

Estos biomarcadores urinarios se dividen, como se ha comentado anteriormente, en dos grupos: proteínas de bajo peso molecular, cuyo incremento en la orina se debe a una disminución en su reabsorción (RBP y cistatina C) o a una alteración en su metabolismo a nivel tubular (cistatina C)¹³², y enzimas, procedentes de los lisosomas (NAG)¹⁷⁸, borde en cepillo (GGT y FA)¹¹⁶ o citosol de las células tubulares (LDH)⁶⁸.

Los datos existentes en medicina canina sobre la cistatina C en orina, no obstante, son escasos. Incluso más que en sangre. Posiblemente influya en ello que no hay un método analítico definido, no están claros los valores de normalidad o cuáles son las

condiciones de estabilidad en la muestra. A pesar de todo, los datos obtenidos en el presente trabajo son, cuanto menos, esperanzadores.

Daño renal agudo

La cistatina C, debido a su pequeño tamaño molecular y a su punto isoeléctrico (9,3), se filtra libremente por el glomérulo y se reabsorbe a nivel de túbulo contorneado proximal, donde se cataboliza en su totalidad por las células tubulares, no volviendo de este modo ni al torrente sanguíneo ni a la orina²⁷². Por este motivo, la cistatina C urinaria puede utilizarse como marcador endógeno de funcionalidad renal tubular²²¹. Su presencia en orina, por lo tanto, refleja la disfunción de las células tubulares, a diferencia de su concentración plasmática que, como se ha indicado anteriormente, señala una lesión glomerular⁶⁸.

Con función renal normal, la cistatina C se detecta en orina en pequeñas cantidades¹⁹⁰. En el presente estudio, la ratio cistatina C/c urinaria en animales sanos ha sido de $361,08 \pm 348,14 \mu\text{g/g}$ (Tabla 32). Cuando se produce daño tubular proximal, su concentración aumenta^{56,343}, tal y como se puede comprobar en la Tabla 36 en los perros con DRA. Dicho incremento se observa desde la fase I de IRIS (incidencia del 50%; Figura 11), siendo estadísticamente significativo a partir de IRIS II.

En personas se recomienda interpretar su concentración conjuntamente con el valor de proteinuria ya que, en los casos en los que es masiva, puede inhibirse su reabsorción tubular. Esto se ha demostrado en nefropatías inducidas experimentalmente³³³ y en niños con nefropatías idiopáticas³³⁶. En ambos trabajos de investigación se encontraron concentraciones más altas de cistatina C urinaria y, por lo tanto, se puede subestimar la función tubular. No existen trabajos de investigación en medicina canina al respecto. No obstante, no se ha observado una proteinuria masiva en los animales de este grupo. El valor medio de UP/C más alto lo presentan los perros en IRIS IV, con un resultado de $2,78 \pm 1,67$. Además, se ha observado un incremento de la ratio cistatina C/c superior que en los perros con ERC (Figura 19), que presentan valores de UP/C superiores (Tabla 38), manifiesto en todas las fases IRIS (Figura 20). Este resultado se atribuye al mayor daño tubular atribuido al DRA.

Con el fin de contrastar los resultados obtenidos y comprobar su utilidad, se han comparado con los aportados por otros biomarcadores renales: RBP, LDH, FA, NAG y GGT. Hokamp JA y Nabity MB¹³², en 2016, afirman que tanto en DRA inducido por drogas como de origen natural, las enzimas tubulares pueden ser marcadores sensibles de daño tubular. Sin embargo, los resultados pueden presentar inconsistencia en cuanto a la magnitud de la enzimuria, a la presencia de cambios histológicos, y al desarrollo de azoemia.

El incremento de la ratio cistatina C/c urinaria coincide con un incremento en la de RBP/c y en el resto de biomarcadores tubulares (Tabla 35), especialmente de la ratio NAG/c que, conjuntamente con la de cistatina C/c, presenta un incremento estadístico a partir de IRIS II. Todos ellos aumentan a medida que se avanza en la clasificación IRIS, especialmente de forma manifiesta en las fases más graves de la enfermedad (Tabla 35; Figuras 25-28). Se ha descrito que la NAG puede comportarse respecto a la proteinuria como la cistatina C. El aumento en su concentración puede ser secundario a daño tubular o a un aumento del recambio lisosómico relacionado con una mayor competencia por la reabsorción tubular secundaria a la proteinuria glomerular²¹⁴. Para su discusión, es válida la desarrollada para la cistatina C.

Como se ha comentado anteriormente, es reseñable que todas las enzimas urinarias, al igual que se observa para la ratio cistatina C/c, presentan una mayor concentración en la orina de los perros de este grupo que en los que padecen ERC, apoyando la hipótesis de que es mayor el daño tubular producido.

Enfermedad renal crónica

También se ha estudiado la ratio cistatina C/c en perros con ERC, y también se ha comparado con los resultados obtenidos en otros biomarcadores urinarios. Se observa un incremento significativo de esta ratio, así como del resto de biomarcadores, que se manifiesta de forma progresiva cuando se analizan los resultados en función de la clasificación IRIS (Tabla 38; Figura 20). Como se ha comentado para el DRA, la ratio cistatina C/c urinaria, al igual que la del resto de enzimas urinarias, es inferior en los perros con ERC respecto a los que padecen DRA (Figura 19). Es de reseñar además que, si bien es llamativo el incremento de la concentración de estos biomarcadores en los

estadios III y IV del DRA, en fases avanzadas de la ERC (IRIS 3 y 4) no es tan pronunciado, indicativo de que se suele desarrollar un proceso progresivo más homogéneo (Figuras 25-28).

Las ratios cistatina C/c, NAG/c y FA/c urinarias muestran ser biomarcadores fiables, pues presentan un incremento estadísticamente significativo desde la fase IRIS 1 (Tabla 38; Figuras 20, 25 y 26). Existe una escasa bibliografía al respecto sobre la cistatina C urinaria en la especie canina. Los resultados obtenidos coinciden con los de Monti P *et al.*²⁰⁹ en 2012, que demostraron que su determinación en la orina de perros mediante métodos inmunoturbidimétricos presenta una alta precisión, y que la ratio cistatina C/c urinaria presenta una diferencia estadísticamente muy significativa ($P < 0,001$) entre perros sanos y con ERC.

La cistatina C parece ser más sensible para detectar enfermedad renal en estadios tempranos en ERC que en DRA, como demuestran las gráficas de incidencia (Figuras 11 y 21). El número de animales con un incremento de la ratio cistatina C/c es del 85% en la ERC frente al 50% en el DRA para IRIS 1/I, y del 89% en la ERC frente al 80% en el DRA para IRIS 2/II. Además, presenta una alta correlación ($P < 0,001$) con los parámetros clásicos indicadores de ERC en plasma: creatinina, cistatina C y fósforo (Figuras 22-24).

Los resultados indican, pues, la presencia de daño tubular en estos animales, puesto que la cistatina C se ve aumentada en la orina cuando las células tubulares no son capaces de absorber o metabolizar la proteína. Aunque la ERC se suele atribuir a enfermedad glomerular, las patologías puras que sólo alteran determinados segmentos renales no suelen aparecer, y aunque el proceso comience siendo tubular, a menudo progresa y afecta también a otros segmentos de la nefrona y viceversa.

Una enfermedad que se comporta principalmente con componente glomerular, y que a menudo progresa a tubular, es la leishmaniosis canina, manifestándose como ERC²³⁶. Así lo demuestran los resultados obtenidos en la sangre de estos animales. En ellos, la concentración plasmática de cistatina C muestra un incremento desde la fase IRIS 1, estadísticamente significativo desde IRIS 2 (Tabla 45). La orina, por su parte, muestra cambios aún más significativos que la sangre. Si bien es verdad que tanto los perros

con leishmaniosis y azoemia (Tabla 45 y 46), como aquellos que presentan azoemia por causas diferentes (Tabla 45 y 47), presentan un incremento altamente significativo de la ratio cistatina C/c urinaria, la incidencia de presentación por fases IRIS es diferente. Así, en los primeros es del 75% y 79% para las fases IRIS 1 y 2 respectivamente (Figura 31), mientras que en los segundos es del 47% y 50% para las mismas fases (Figura 32). Esto se ve reforzado por los resultados obtenidos en el grupo de perros con leishmaniosis sin azoemia, que también presenta diferencia significativa respecto al control (Tabla 45; $P < 0,01$). Estos resultados coinciden con los aportados por García-Martínez JD *et al.*¹⁰⁰ en 2015, que encontraron un incremento en la concentración en orina de cistatina C en perros con leishmaniosis y proteinúricos. Monti P *et al.*²⁰⁹ (2012) concluyeron que la cistatina C urinaria en perros debería considerarse una prueba complementaria capaz de investigar lesión tubular mejor que función glomerular.

La capacidad de detección temprana de enfermedad renal mediante la determinación de la ratio cistatina c/c urinaria se pone aún más de manifiesto cuando se estudian los perros con leishmaniosis clasificados según las recomendaciones del grupo de expertos LeishVet. Se observa un aumento estadístico respecto al grupo control desde la Fase I, en la que los animales aún no han desarrollado alteraciones clinicopatológicas. Además, estas diferencias no sólo aparecen entre todos los grupos y el grupo control, sino también entre todos los grupos entre sí (Figura 42).

Se debe tener en cuenta la influencia de la proteinuria sobre la interpretación tanto de la ratio cistatina C/c como de la ratio NAG/c urinaria, descrita en medicina humana^{333,336}. Ésta puede subestimar la función tubular. Sin embargo, la interpretación de la proteinuria respecto a la presencia de cistatina C en orina es discutida. Conti M *et al.*⁵⁶. (2006) afirman que la aparición de proteínas de bajo peso molecular, como la cistatina C, podría deberse en algunos casos a la saturación de la capacidad de reabsorción de las células tubulares, lo que se puede interpretar no como una interferencia, sino como una disfunción tubular en las personas. Es cierto que los valores obtenidos de UP/C son superiores a los del grupo de perros con DRA, pero los resultados obtenidos para la concentración de RBP/c, LDH/c, FA/c y GGT/c también avalan el daño tubular, pues todos los biomarcadores urinarios estudiados presentaron la misma tendencia. Además, se observa una ratio cistatina C/c superior

en los perros con azoemia sin leishmaniosis, que presentan menos proteinuria (Tabla 47; Figura 34), que en aquellos con leishmaniosis (Tabla 46; Figura 34). No obstante, son necesarios más estudios para comprobar la interferencia real que la proteinuria pueda ejercer sobre la concentración de cistatina C en orina.

Todos los biomarcadores urinarios estudiados aparecen en mayor concentración en los perros con azoemia y sin leishmaniosis que en aquellos que padecen la enfermedad, excepto para la ratio NAG/c, que ha presentado una concentración mucho mayor en perros con leishmaniosis (Tablas 46 y 47; Figuras 34, 35-38). De todas las enzimas urinarias, sólo la NAG ha sido estudiada previamente en la ERC del perro, demostrándose su incremento en perros con esta enfermedad^{214,288,311}. Smets PM *et al.*³¹¹ (2010) y Hokamp JA *et al.*¹³¹ (2016) no encontraron una presentación proporcional entre su concentración y la clasificación IRIS, lo que no coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo. La explicación al incremento de la enzima en perros con leishmaniosis puede estar en que, en estudios previos en perros con ERC, proteinúricos y con azoemia variable, en los que se estudió la ratio NAG/c conjuntamente con biopsias renales, se obtiene una correlación aceptable de la enzima con el daño glomerular, y no con el tubular¹³¹. Además, se ha demostrado que también presenta correlación con el UP/C^{131,214}, hallazgo que coincide con los resultados encontrados en el presente estudio. Estos hallazgos respaldan, que la ratio NAG/c podría ser mejor indicador de daño glomerular que de tubular en la ERC proteinúrica canina.

Tal y como se puede comprobar en las Figuras 42 y 43, las ratios cistatina C/c y NAG/c urinarias constituyen los biomarcadores más precoces de daño renal.

IX.CONCLUSIONES

- 1ª El sexo y la edad no influyen en la concentración plasmática de cistatina C, aunque se produce un incremento de su concentración en orina en perros con más de 5 años. El sexo y el peso tampoco influyen en la concentración de cistatina C en orina, aunque se produce un incremento de su concentración en perros con más de 5 años. Sin embargo, el incremento observado en ambos casos no influye de forma importante en la interpretación de los resultados en casos de enfermedad renal.

- 2ª La concentración plasmática de cistatina C se incrementa de forma clara en la enfermedad renal del perro, tanto en daño renal agudo como en enfermedad renal crónica, viéndose escasamente influida por enfermedades cardíacas, neoplásicas, y por hiperadrenocorticismos dependientes de la hipófisis. Sin embargo, debe ser interpretada con precaución en perros hipotiroideos o en tratamiento con dosis inmunosupresoras de corticoides.

- 3ª Tanto la concentración de cistatina C plasmática como urinaria son más sensibles para detectar enfermedad renal crónica que daño renal agudo en el perro. A su vez, su concentración en orina es más sensible para detectar enfermedad renal que su concentración en plasma en ambos casos.

- 4ª La concentración de cistatina C en plasma y en orina no permite distinguir entre daño renal agudo y enfermedad renal crónica en el perro.

- 5ª Las ratios cistatina C/c y NAG/c constituyen dos biomarcadores urinarios de enfermedad renal crónica de gran importancia en el perro.

- 6ª La ratio cistatina C/creatinina urinaria se eleva en perros con leishmaniosis sin azoemia. Este hallazgo, unido a un incremento del valor UP/C y de la ratio NAG/c, es indicador precoz de enfermedad renal.

- 7ª El incremento en la ratio cistatina C/c y la alteración de la enzimuria es más uniforme en enfermedad renal debida a leishmaniosis. Este hallazgo se atribuye a que el daño renal causado por la enfermedad es más homogéneo.

X.BIBLIOGRAFÍA

1. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, Ulvsbäck M, Lundwall A, Jensson O, Grubb A. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J*. 1990; 268: 287-294
2. Acierno MJ, Senior DF. Urinary disorder. En Schaer M (ed). *Clinical Medicine of the Dog and Cat*. 2ª ed., London. Manson Publishing. 2010. Pp. 505-560.
3. Adiyanti SS, Loho T. Acute Kidney Injury (AKI) biomarker. *Acta Med Indones*. 2012; 44: 246-255.
4. Alehagen U, Dahlström U, Lindahl TL. Cystatin C and NT-proBNP, a powerful combination of biomarkers for predicting cardiovascular mortality in elderly patients with heart failure: results from a 10-year study in primary care. *Eur J Heart Fail*. 2009; 11: 354-360.
5. Ali T, Khan I, Simpson W, Prescott G, Townend J, Smith W, Macleod A. Incidence and outcomes in acute kidney injury: a comprehensive population-based study. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 1292-1298.
6. Ali-Mirafteb H, Bourbouze R, Bondiou MT, Percheron F. Urinary excretion of N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) and its isoenzyme B as a marker of the nephrotoxicity of gentamicin: re-test from an animal model. *Pathol Biol*. 1988; 36: 240-244.
7. Almeida PC, Nantes IL, Chagas JR, Rizzi CC, Faljoni-Alario A, Carmona E, Juliano L, Nader HB, Tersariol IL. Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem*. 2001; 276: 944-951.
8. Almy FS, Christopher MM, King DP, Brown SA. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med*. 2002; 16: 45-51.
9. Al-Tonbary YA, Hammad AM, Zaghoul HM, El-Sayed HE, Abu-Hashem E. Pretreatment cystatin C in children with malignancy: can it predict chemotherapy-induced glomerular filtration rate reduction during the induction phase? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2004; 26: 336-341.
10. Antognoni MT, Siepi D, Porciello F, Fruganti G. Use of serum cystatin C determination as a marker of renal function in the dog. *Vet Res Commun*. 2005; 29: 265-267.
11. Antognoni MT, Siepi D, Porciello F, Rueca F, Fruganti G. Serum cystatin-C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency. *Vet Res Commun*. 2007; 31: 269-271.
12. Arenas C, Melián C, Pérez-Alenza MD. Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: a comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment. *J Vet Intern Med*. 2014; 28: 473-480.
13. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008; 23: 1569-1574.
14. Bardi E, Dobos E, Kappelmayer J, Kiss C. Differential effect of corticosteroids on serum cystatin C in thrombocytopenic purpura and leukemia. *Pathol Oncol Res*. 2010; 16: 453-456.
15. Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 120: 631-636.
16. Barsanti JA, Finco DR. Protein concentration in urine of normal dogs. *Am J Vet Res*. 1979; 40: 1583-1588.
17. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin N Am-Small*. 2012; 42: 669-692.
18. Beatrice L, Nizi F, Callegari D, Paltrinieri S, Zini E, D'Ippolito P, Zatelli A. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2010; 11: 1221-1224.
19. Behling-Kelly E. Serum lipoprotein changes in dogs with renal disease. *J Vet Intern Med*. 2014; 28: 1692-1698.
20. Bennett SL, Abraham LA, Anderson GA, Holloway SA, Parry BW. Reference limits for urinary fractional excretion of electrolytes in adult dog non-racign grayhound. *Aust Vet J*. 2006; 84: 393-397.
21. Bianciardi P, Brovida C, Valente M, Aresu L, Cavicchioli L, Vischer C, Giroud L, Castagnaro M. Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys. *Toxicol Pathol*. 2009; 37: 770-775.

22. Biewenga WJ, Gruys E. Proteinuria in the dog: a clinicopathological study in 51 proteinuric dogs. *Res Vet Sci.* 1986; 41: 257-264.
23. Binkley F, Olson CK. Metabolism of glutathione. IV. Activators and inhibitors of the hydrolysis of glutathione. *J Biol Chem.* 1951; 188: 451-457.
24. Bjarnadóttir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest.* 1995; 55: 617-623.
25. Blaner WS. Retinol-binding protein: The serum transport protein for vitamin A. *Endocr Rev.* 1989; 10: 308-316.
26. Bobek LA, Levine MJ. Cystatins-inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1992; 3: 307-332.
27. Bökenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, Schumann G, Byrd D, Brodehl J. Cystatin C -a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics.* 1998; 101: 875-881.
28. Bökenkamp A, Laarman CA, Braam KI, van Wijk JA, Kors WA, Kool M, de Valk J, Bouman AA, Spreuwenberg MD, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on low-molecular weight protein markers of kidney function. *Clin Chem.* 2007; 53: 2219-2221.
29. Bökenkamp A, Ozden N, Dieterich C, Schumann G, Ehrich JH, Brodehl J. Cystatin C and creatinine after successful kidney transplantation in children. *Clin Nephrol.* 1999; 52: 371-376.
30. Bökenkamp A, van Wijk JA, Lentze MJ, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroid therapy on serum cystatin C and beta2-microglobulin concentrations. *Clin Chem.* 2002; 48: 1123-1126.
31. Bonini PA, Ceriotti G, Franzini C. Human urinary alpha-glucosidase as an index of kidney tubular damage. *Clin Chim Acta.* 1970; 27: 415-419.
32. Boyd JM. Serum enzymes in the diagnosis of disease in man and animals. *J Comp Pathol.* 1988; 381-404.
33. Braun JP Lefebvre HJ. Kidney function and damage. En Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (eds). *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6ª ed. Oxford, Elsevier. 2008. Pp. 485-528.
34. Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol.* 2003; 32: 162-179.
35. Braun JP, Perxachs A, Pechereau D, De La Farge F. Plasma cystatin C in the dog: Reference values and variations with renal failure. *Comp Clin Pathol.* 2002; 11: 44-49.
36. Brown N; Segev G; Francey T; Kass P; Cowgill LD. Glomerular filtration rate, urine production, and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *J Vet Intern Med.* 2015; 29: 28-34.
37. Brown SA. Management of chronic kidney disease. Elliot J, Grauer GF (eds). *BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology.* 2ª ed. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association. 2007. Pp 223-230.
38. Bruncker JD, Ponzio NM, Payton ME. Indices of urine N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and gamma-glutamyl transpeptidase activities in clinically normal adult dogs. *Am J Vet Res.* 2009; 70: 297-301.
39. Bush S. Development and initial validation of the progressive attention series (PAS). *Arch Clin Neuropsychol.* 1999; 14: 725-726.
40. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of post-gamma protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Pathol.* 1961; 14: 172-178.
41. Campino L, Abranches P. Indirect fluorescent immunoassay in the diagnosis of infantile and adult kala-azar (Short Report). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991; 85: 476.
42. Center SA, Slater MR, Manwarren T, Prymak K. Diagnostic efficacy of serum alkaline phosphatase and gamma-glutamyltransferase in dogs with histologically confirmed hepatobiliary disease: 270 cases (1980-1990). *J Am Vet Med Assoc.* 1992; 201: 1258-1264.
43. Chacar F, Kogika M, Sanches TR, Caragelasco D, Martorelli C, Rodrigues C, Capcha JMC, Chew D, Andrade L. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. *Physiol Rep.* 2017; 5: pii: e13262.
44. Cheng XW, Obata K, Kuzuya M, Izawa H, Nakamura K, Asai E, Nagasaka T, Saka M, Kimata T, Noda A, Nagata K, Jin H, Shi GP, Iguchi A, Murohara T,

- Yokota M. Elastolytic cathepsin induction/activation system exists in myocardium and is upregulated in hypertensive heart failure. *Hypertension*. 2006; 48: 979-987.
45. Chew DJ, DiBartola SP, Schenck P. Chronic Renal Failure. En: Chew DJ, DiBartola SP, y Schenck P E (eds). *Canine and Feline Nephrology and Urology*. 2ª ed. St., Louis, Elsevier Saunders. 2011b. Pp. 145-198.
46. Chew DJ, DiBartola SP, Schenck P., Acute Renal Failure. En: Chew DJ, DiBartola SP, y Schenck P E (eds). *Canine and Feline Nephrology and Urology*. 2ª ed. St., Louis, Elsevier Saunders. 2011a. Pp. 63-92.
47. Choi BS, Moon HS, Seo SH, Hyun C. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *J Vet Med Sci*. 2017; 79: 41-46.
48. Choi J, Kim H, Yoon J. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Med Sci*. 2011; 73: 985-989.
49. Christensen EI, Moskaug JO, Vorum H, Jacobsen C, Gundersen TE, Nykjaer A, Blomhoff R, Willnow TE, Moestrup SK. Evidence for an essential role of megalin in transepithelial transport of retinol. *J Am Soc Nephrol*. 1999; 10: 685-695.
50. Cianciolo R, Hokamp J, Nabity M. Advances in the evaluation of canine renal disease. *Vet J*. 2016; 215: 21-29.
51. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases, is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta*. 2000; 300: 83-95.
52. Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1961; 107: 170-172.
53. Clemon FAS. Urinary enzyme evaluation of nephrotoxicity in the dog. *Toxicol Pathol*. 1998; 32: 162-179.
54. Coles EH. *Veterinary Clinical Pathology*. Philadelphia, Saunders. 1980.
55. Colle A, Tonnelle C, Jarry T, Coirre C, Manuel Y. Isolation and characterization of post gamma globulin in mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984; 122: 111-115.
56. Conti M, Moutereau S, Zater M, Lallali K, Durrbach A, Manivet P, Eschwège P, Loric S. Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. *Clin Chem Lab Med*. 2006; 44: 288-291.
57. Cortadellas O, del Palacio MJ, Bayón A, Albert A, Talavera J. Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J Vet Intern Med*. 2006; 20: 941-947.
58. Corticchiato O, Cajot JF, Abrahamson M, Chan SJ, Keppler D, Sordat B. Cystatin C and cathepsin B in human colon carcinoma: expression by cell lines and matrix degradation. *Int J Cancer*. 1992; 52: 645-652.
59. Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL. Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet Pathol*. 2003; 40: 677-684.
60. Costigan MG, Yaqoob M, Lindup WE. Retention of an albumin-bound furan dicarboxylic acid in patients with chronic renal failure or after a kidney transplant. *Nephrol Dial Transplant*. 1996; 11: 803-807.
61. Cowgill LD, Langston C. Acute kidney insufficiency. En Bartges J, Polzin DJ (eds). *Nephrology and urology of small animals*. Ames, Iowa, Wiley Blackwell. 2011. Pp 472-523.
62. Cox JL, Sexton PS, Green TJ, Darmani NA. Inhibition of B16 melanoma metastasis by overexpression of the cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *Melanoma Res*. 1999; 9: 369-74.
63. D'Amico G, Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney Int*. 2003; 63: 809-825.
64. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, Steinbach SM. Plasma symmetric dimethylarginine concentration in dogs with acute kidney injury and chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2017; 31: 799-804.
65. Dance N, Price RG. The excretion of N-acetyl-β-D-glucosaminidase and β-galactosidase by patients with renal disease. *Clin Chim Acta*. 1970; 27: 87-92.
66. Darling IM, Morris ME. Evaluation of 'true' creatinine clearance in rats reveals extensive renal secretion. *Pharm Res*. 1991; 8: 1318-1322.

67. Daza MA. Estudio de la enfermedad renal y la respuesta al tratamiento (antiamoniales vs miltefosina) en perros con infección natural por *Leishmania infantum*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2016.
68. De Loor J, Daminet S, Smets P, Maddens P, Meyer E. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med*. 2013; 27: 998-1010.
69. De Moraes HA, DiBartola SP. Hyponatremia: a quick reference. *Vet Clin N Am-Small*. 2008; 38: 491-495.
70. De Scally MP, Leisewitz AL, Lobetti RG, Thompson PN. The elevated serum urea: creatinine ratio in canine babesiosis in South Africa is not of renal origin. *J S Afr Vet Assoc*. 2006; 77: 175-178.
71. Demirtas S, Akan O, Can M, Elmali E, Akan H. Cystatin C can be affected by nonrenal factors: a preliminary study on leukemia. *Clin Biochem*. 2006; 39: 115-118.
72. Deo R, Fyr CL, Fried LF, Newman AB, Harris TB, Angleman S, Green C, Kritchevsky SB, Chertow. Kidney dysfunction and fatal cardiovascular disease - an association independent of atherosclerotic events: results from the health, aging, and body composition (Health ABC) study. *Am Heart J*. 2008; 155: 62-68.
73. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2002; 40: 221-226.
74. DiBartola SP, Westropp JL. Urinary Tract Disorders. En Nelson RW, Couto CG (eds). *Small Animal Internal Medicine*. St. Louis, Missouri, Elsevier. 2014. Pp. 629-712.
75. Dixon RM, Reid SW, Mooney CT. Epidemiological, clinical, haematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet Rec*. 1999; 145: 481-487.
76. Djoussé L, Kurth T, Gaziano JM. Cystatin C and risk of heart failure in the Physicians' Health Study (PHS). *Am Heart J*. 2008; 155: 82-86.
77. Dries DL, Exner DV, Domanski MJ, Greenberg B, Stevenson LW. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 35: 681-689.
78. Duffy ME, Specht A, Hill RC. Comparison between urine protein: creatinine ratios of samples obtained from dogs in home and hospital settings. *J Vet Intern Med*. 2015; 29: 1029-1035.
79. Dunlay SM, Gerber Y, Weston SA, Killian JM, Redfield MM, Roger VL. Prognostic value of biomarkers in heart failure: application of novel methods in the community. *Circ Heart Fail*. 2009; 2: 393-400.7
80. Ebert E, Werle B, Jülke B, Kopitar-Jerala N, Kos J, Lah T, Abrahamson M, Spiess E, Ebert W. Expression of cysteine protease inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in human lung tumor tissue. *Adv Exp Med Biol*. 1997; 421: 259-265.
81. Eckardt KU. Anaemia of critical illness - implications for understanding and treating rHuEPO resistance. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17: 48-55.
82. Ellis BG, Price RG, Topham JC. The effect of tubular damage by mercuric chloride on kidney function and some urinary enzymes in the dog. *Chem Biol Interact*. 1973; 7: 101-113.
83. El-Shafey EM, El-Nagar GF, Selim MF, El-Sorogy HA, Sabry AA. Is serum cystatin C an accurate endogenous marker of glomerular filtration rate for detection of early renal impairment in patients with type 2 diabetes mellitus?. *Ren Fail*. 2009; 31: 355-359.
84. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the Dade Behring N Latex Cystatin C assay on the Dade Behring Nephelometer II system. *Scand J Clin Lab Invest*. 1999; 59: 1-8.
85. Esch KJ, Schaut RG, Lamb IM, Clay G, Moraes Lima AL, do Nascimento PR, Whitley EM, Jeronimo SM, Sutterwala FS, Haynes JS, Petersen CA. Activation of autophagy and nucleotide-binding domain leucine-rich repeat-containing-like receptor family, pyrin domain-containing 3 inflammasome during *Leishmania infantum*-associated glomerulonephritis. *Am J Pathol*. 2015; 185: 2105-1217.
86. Ferguson MA, Vaidya VS, Bonventre JV. Biomarkers of nephrotoxic acute kidney injury. *Toxicology*. 2008; 245: 182-193.
87. Filler G, Bökenkamp A, Hofmann W, Le Bricon T, Martínez-Brú C, Grubb A. Cystatin C as a marker of GFR--history, indications, and future research. *Clin Biochem*. 2005; 38: 1-8.
88. Finco DR, Braselton WE, Cooper TA. Relationship between plasma iohexol clearance and urinary

- exogenous creatinine clearance in dogs. *J Vet Intern Med.* 2001; 15: 368–373.
89. Finco DR, Brown SA, Crowell WA, Barsanti JA. Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. *Am J Vet Res.* 1991; 52: 1029-1032.
90. Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC. Relationship between plasma creatinine concentration and glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Pharmacol Ther.* 1995; 18: 418-421.
91. Finney H, Newman DJ, Gruber W, Merle P, Price CP. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem.* 1997; 43: 1016-1022.
92. Finney H, Williams AH, Price CP. Serum cystatin C in patients with myeloma. *Clin Chim Acta.* 2001; 309: 1-6.
93. Fishman WH. Alkaline phosphatase isozymes: recent progress. *Clin Biochem.* 1990; 23: 99-104.
94. Flodin M, Larsson A. Performance evaluation of a particle-enhanced turbidimetric cystatin C assay on the Abbott ci8200 analyzer. *Clin Biochem.* 2009; 42: 873-876.
95. Ford HC, Lim WC, Chisnall WN, Pearce JM. Renal function and electrolyte levels in hyperthyroidism: urinary protein excretion and the plasma concentrations of urea, creatinine, uric acid, hydrogen ion and electrolytes. *Clin Endocrinol.* 1989; 30: 293-301.
96. Forterre S, Raila J, Schweigert FJ. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. *J Vet Diagn Invest.* 2004; 16: 271-277.
97. Fricker M, Wiesli P, Brändle M, Schwegler B, Schmid C. Impact of thyroid dysfunction on serum cystatin C. *Kidney Int.* 2003; 63: 1944-1947.
98. Fry MM. Urinalysis. En Bartges J, Polzin DJ (eds). *Nephrology and urology of small animals.* Ames, Iowa, WileyBlackwell. 2011. Pp. 46-57.
99. Gabriel IC, Nishida SK, Kirsztajn GM. Serum cystatin C: a practical alternative for renal function evaluation? *J Bras Nefrol.* 2011; 33: 261-267.
100. García-Martínez JD, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Caldin M, Ceron JJ. Urinary ferritin and cystatin C concentration at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Res Vet Sci.* 2015, 204-207.
101. Gaumann A, Hansen T, Köhler HH, Kommos F, Mann W, Maurer J, Kirkpatrick CJ, Kriegsmann J. The expression of cathepsins in osteoclast-like giant cells of an anaplastic thyroid carcinoma with tracheal perforation. *Pathol Res Pract.* 2001; 197: 257-262.
102. Ghys L, Paepe D, Smets P, Lefebvre H, Delanghe J, Daminet S. Cystatin C: A new renal marker and its potential use in small animal medicine. *J Vet Intern Med.* 2014; 28: 1152–1164.
103. Ginel PJ, Lucena R, Fernández M. Duration of increased serum alkaline phosphatase activity in dogs receiving different glucocorticoid doses. *Res Vet Sci.* 2002; 72: 201-204.
104. Goldberg JA, Friedman OM, Pineda EP, Smith EE, Chatterji R, Stein EH, Rutenberg AM. The colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys.* 1960; 91: 61-70.
105. Gommeren K, van Hoek I, Lefebvre HP, Benckroun G, Smets P, Daminet S. Effect of thyroxine supplementation on glomerular filtration rate in hypothyroid dogs. *J Vet Intern Med.* 2009; 23: 844-849.
106. Gonul R, Kayar A, Or ME, Kahraman I. Assessment of renal function in dogs with renal disease using serum cystatin C. *Indian Vet J.* 2004; 81: 872–874.
107. Goodman DS. Plasma retinol-binding protein. *Ann N Y Acad Sci.* 1980; 348: 378-390.
108. Gorst J. Improved assay characteristics of an immunoturbidimetric assay for cystatin C. Letters to the Editor. *Ann Clin Biochem.* 2001; 38: 153.
109. Goy-Thollot I, Besse S, Garnier F, Marignan M, Barthez PY. Simplified methods for estimation of plasma clearance of iohexol in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 52-56.
110. Grauer GF, Greco DS, Behrend EN, Mani I, Allen TA. Estimation of quantitative enzuria in dogs with gentamicin induced nephrotoxicosis using urine enzyme/creatinine ratios from spot urine samples. *J Vet Intern Med.* 1995; 9: 324-327.
111. Grauer GF, Thrall MA, Henre BA, Grauer RM, Hamar DW. Early clinicopathologic findings in dogs ingesting ethylene glycol. *Am J Vet Res.* 1984; 45: 2299-2303.

112. Greco DS, Turnwald GH, Adams R, Gossett KA, Kearney M, Casey H. Urinary gamma-glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am J Vet Res.* 1985; 46: 2332-2335.
113. Grubb A, Löfberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: Amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79: 3024-3027.
114. Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, Truedsson L, Thysell H. Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand.* 1985; 218: 499-503.
115. Grubb AO. Cystatin C properties and use as diagnostic marker. *Adv Clin Chem.* 2001; 35: 63-99.
116. Guder WG, Ross BD. Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int.* 1984; 26: 101-111.
117. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Almes K, Jewell DE. Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2016; 30: 794-802.
118. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Melendez LD, Jewell DE. Relationship between lean body mass and serum renal biomarkers in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2015; 29: 808-814.
119. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Yu S, Jewell DE. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *Vet J.* 2014; 202: 588-596.
120. Hanes CS, Hird FJR. Isherwood FA. *Nature.* 1950; 166: 288-292.
121. Harison E, Langston C, Palma D, Lamb K. Acute azotemia as a predictor of mortality in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2012; 26: 1093-1098.
122. Hasegawa A, Naruse M, Hitoshi S, Iwasaki Y, Takebayashi H, Ikenaka K. Regulation of glial development by cystatin C. *J Neurochem.* 2007; 100: 12-22.
123. Hebert LA, Agarwal G, Sedmak DD, Mahan JD, Becker W, Nagaraja HN. Proximal tubular epithelial hyperplasia in patients with chronic glomerular proteinuria. *Kidney Int.* 2000; 57: 1962-1967.
124. Heiene R, Moe L, Mølmen G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res Vet Sci.* 2001; 70: 129-137.
125. Heiene R, Moe L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog. *J Vet Intern Med.* 1998; 12: 401-414.
126. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Hüsing J, Göring F, Pietruck F, Janssen O, Philipp T, Kribben A. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004; 66: 1115-1122.
127. Hilton R. Acute renal failure. *BMJ.* 2006; 14: 333-790.
128. Hirai K, Yokoyama M, Asano G, Tanaka S. Expression of cathepsin B and cystatin C in human colorectal cancer. *Hum Pathol.* 1999; 30: 680-686.
129. Hird FJR. The γ -glutamyl transpeptidation reaction. Tesis Doctoral. Universidad de Cambridge (UK). 1950.
130. Hochwald GM, Thorbecke GJ. Use of an antiserum against cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962 109: 91-95.
131. Hokamp JA, Cianciolo RE, Boggess M, Lees GE, Benali SL, Kovarsky M, Nability MB. Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2016; 30: 591-601.
132. Hokamp JA, Nability MB. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45: 28-56.
133. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Watanabe T, Matsuo S. Performance of serum cystatin C versus serum creatinine as a marker of glomerular filtration rate as measured by inulin renal clearance. *Clin Exp Nephrol.* 2011; 15: 868-876.
134. Hoste EA, Clermont G, Kersten A, Venkataraman R, Angus DC, De Bacquer D, Kellum JA. RIFLE criteria for acute kidney injury are associated with hospital mortality in critically ill patients: a cohort analysis. *Crit Care.* 2006; 10: R73.
135. Hoste EA, De Waele JJ. Physiologic consequences of acute renal failure on the critically ill. *Crit Care Clin.* 2005; 21: 251-260.

136. Hsu WL, Lin YS, Hu YY, Wong ML, Lin FY, Lee YJ. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases. *J Vet Intern Med.* 2014; 28: 437-442.
137. Huh CG, Håkansson K, Nathanson CM, Thorgeirsson UP, Jonsson N, Grubb A, Abrahamson M, Karlsson S. Decreased metastatic spread in mice homozygous for a null allele of the cystatin C protease inhibitor gene. *Mol Pathol.* 1999; 52: 332-340.
138. Iacobuzio-Donahue CA, Shuja S, Cai J, Peng P, Murnane MJ. Elevations in cathepsin B protein content and enzyme activity occur independently of glycosylation during colorectal tumor progression. *J Biol Chem.* 1997; 272: 29190-29199.
139. Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *Vet J.* 2016; 210: 89-91.
140. Iglesias R. Estudio de la cistatina C como marcador de enfermedad renal en el perro. Trabajo de Grado. Universidad de Extremadura. 2013.
141. Instituto de Salud Pública de Chile. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "aspectos generales sobre la validación de métodos". Guía técnica N°1. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, Aguilera M, Sandoval S (Eds). <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/12/guia>
142. International Renal Interest Society (IRIS). <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>. Último acceso 04-03-2018.
143. Israni AK, Kasiske BL. Laboratory assessment of kidney disease: glomerular filtration rate, urinalysis, and proteinuria. En Teal MW, Chertow GM, Marsden PA, Skorecki K, Yu ASL (eds). Brenner & Rector's The Kidney. 9ª ed. Philadelphia, Saunders Elsevier. 2011. Pp. 868-896.
144. Izzat NN, Rosborough JP. Renal function in conscious dogs: potential effect of gender on measurement. *Res Exp Med.* 1989; 189: 371-379.
145. Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, Kirk CA, Allen TA, Swanson LL. 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.* 2005; 226: 393-400.
146. Jacobsson B, Lignelid H, Bergerheim US. Transthyretin and cystatin C are catabolized in proximal tubular epithelial cells and the proteins are not useful as markers for renal cell carcinomas. *Histopathology.* 1995; 26: 559-564.
147. James GD, Sealey JE, Alderman M, Ljungman S, Mueller FB, Pecker MS, Laragh JH. A longitudinal study of urinary creatinine and creatinine clearance in normal subjects. Race, sex, and age differences. *Am J Hypertens.* 1988; 1: 124-131.
148. Jayagopal V, Keevil BG, Atkin SL, Jennings PE, Kilpatrick ES. Paradoxical changes in cystatin C and serum creatinine in patients with hypo- and hyperthyroidism. *Clin Chem.* 2003; 49: 680-681.
149. Jensen AL, Bomholt M, Moe L. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet Clin Pathol.* 2001; 30: 86-90.
150. Jepson RE, Slater L, Nash S, Neiger R, Church D, Elliott J, Syme HM. Evaluation of cystatin c as a marker of gfr in hyperthyroid cats. *J Vet Intern Med.* 2006; 20(3):740.
151. Jung K, Pergande M, Screiber G, Pergande M, Schröder K. Stability of enzymes in urine at 37 °C. *Clin Chim Acta.* 1983; 131: 185-191.
152. Kantrowitz LB, Peterson ME, Melián C, Nichols R. Serum total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and thyrotropin concentrations in dogs with nonthyroidal disease. *J Am Vet Med Assoc.* 2001; 219: 765-769.
153. Kaseda R, N, Hosojima M, Takeda T, Hosaka K, Kobayashi A, Yamamoto K, Suzuki A, Kasai A, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. Megalin-mediated endocytosis of cystatin C in proximal tubule cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 357: 1130-1134.
154. Kaufman J, Glantz LH, Grodin MA, Bersoff DN. Case vignette: Niki goes to school -- autonomy, control, and psychiatric hospitalization. *Ethics Behav.* 1991; 1: 273-281.
155. Keane WF. Proteinuria: its clinical importance and role in progressive renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2000; 35: 97-105.
156. Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, deLaforcade-Buress AM, Berg JR, Silverstein DC, Montealegre

- CD, Jutkowitz LA, Adamantos S, Ovbey DH, Boysen SR, Shaw SP. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). *J Am Vet Med Assoc.* 2010; 236: 83-87.
157. Keppler D, Waridel P, Abrahamson M, Bachmann D, Berdoz J, Sordat B. Latency of cathepsin B secreted by human colon carcinoma cells is not linked to secretion of cystatin C and is relieved by neutrophil elastase. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1226: 117-125.
158. King LG, Giger U, Diserens D, Nagode LA. Anemia of chronic renal failure in dogs. *J Vet Intern Med.* 1992; 6: 264-270.
159. Klosterman ES, Moore GE, de Brito Galvao JF, DiBartola SP, Groman RP, Whittemore JC, Vaden SL, Harris TL, Byron JK, Dowling SR, Grant DC, Grauer GF, Pressler BM. Comparison of signalment, clinicopathologic findings, histologic diagnosis, and prognosis in dogs with glomerular disease with or without nephrotic syndrome. *J Vet Intern Med.* 2011; 25: 206-214.
160. Klosterman ES, Pressler BM. Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Top Companion Anim Med.* 2011; 26: 135-142.
161. Konduri SD, Yanamandra N, Siddique K, Joseph A, Dinh DH, Olivero WC, Gujrati M, Kouraklis G, Swaroop A, Kyritsis AP, Rao JS. Modulation of cystatin C expression impairs the invasive and tumorigenic potential of human glioblastoma cells. *Oncogene.* 2002; 21: 8705-8712.
162. Kos J, Krasovec M, Cimerman N, Nielsen HJ, Christensen IJ, Brünner N. Cysteine proteinase inhibitors stefin A, stefin B, and cystatin C in sera from patients with colorectal cancer: relation to prognosis. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 505-511.
163. Kos J, Stabuc B, Cimerman N, Brünner N. Serum cystatin C, a new marker of glomerular filtration rate, is increased during malignant progression. *Clin Chem.* 1998; 44: 2556-2557.
164. Koulouridis I, Price LL, Madias NE, Jaber BL. Hospital-acquired acute kidney injury and hospital readmission: a cohort study. *Am J Kidney Dis.* 2015; 65: 275-282.
165. Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG. Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *J Am Anim Hosp Assoc.* 1999; 35 :376-383.
166. Krawiec DR, Badertscher RR, Twardock AR, Rubin SI, Gelberg HB. Evaluation of ^{99m}Tc-diethylenetriaminepentaacetic acid nuclear imaging for quantitative determination of the glomerular filtration rate in dogs. *Am J Vet Res.* 1986; 47: 2175-2179.
167. Kreisman SH, Hennessey JV. Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism. *Arch Intern Med.* 1999; 159: 79-82.
168. Krepela E, Procházka J, Kárová B, Cermák J, Roubková H. Cysteine proteases and cysteine protease inhibitors in non-small cell lung cancer. *Neoplasma.* 1998; 45: 318-331.
169. Kunin CM, Chesney RW, Craig WA, England AC, Deangelis C. Enzymuria as a marker of renal injury and disease: Studies of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in the general population and in patient with renal disease. *Pediatrics.* 1978; 62: 751-761.
170. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, Andersson B, Nilsson-Ehle P, Lindström V, Grubb A. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem.* 1994; 40: 1921-1926.
171. Lah TT, Cercek M, Blejec A, Kos J, Gorodetsky E, Somers R, Daskal I. Cathepsin B, a prognostic indicator in lymph node-negative breast carcinoma patients: comparison with cathepsin D, cathepsin L, and other clinical indicators. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 578-584.
172. Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Kastelic L, Babnik J, Stofa A, Rainer S, Turk V. Cystatins and stefins in ascites fluid from ovarian carcinoma. *Cancer Lett.* 1992; 61: 243-253.
173. Langston CE. Acute kidney injury. Ettinger SJ, Feldman EC (eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat.* 7^a ed. St. Louis, Elsevier Saunders. 2016. Pp. 1919-1938.
174. Langston CE. Acute Renal Failure. En Silverstein D, Hopper K (eds). *Small Animal Critical Care Medicine.* St. Louis, Saunders Elsevier. 2009. Pp 590-594.

175. Laroute V, Lefebvre HP, Costes G, Toutain PL. Measurement of glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in the conscious beagle dog by single intravenous bolus of iohexol and p-aminohippuric acid. *J Pharmacol Toxicol.* 1999; 41: 17-25.
176. Lavoué R, Trumel C, Smets PM, Braun JP, Aresu L, Daminet S, Concordet D, Palanché F, Peeters D. Characterization of proteinuria in dogue de Bordeaux dogs, a breed predisposed to a familial glomerulonephropathy: A retrospective study. *PLoS One.* 2015; 16: 10-17.
177. Lawrence YA, Steiner JM. Laboratory Evaluation of the Liver. *Vet Clin N Am-Small.* 2017; 47: 539-553.
178. Le Hir M, Dubach UC, Schmidt U. Quantitative distribution of lysosomal hydrolases in the rat nephron. *Histochemistry.* 1979; 63: 245-251.
179. Lee YJ, Hu YY, Lin YS, Chang CT, Lin FY, Wong ML, Kuo-Hsuan H, Hsu WL. Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. *BMC Vet Res.* 2012; 8: 248.
180. Lees GE, Brown SA, Elliott J, Grauer GE, Vaden SL. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). *J Vet Intern Med.* 2005; 19: 377-385.
181. Lees GE, Jensen WA, Simpson DF, Kashtan CE. Persistent albuminuria precedes onset of overt proteinuria in male dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med.* 2002; 16: 353-360.
182. Lees GE. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Vet Clin N Am-Small Anim.* 2004; 34: 867-885.
183. Lefebvre HP, Dossin O, Trumel C, Braun JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. *Vet Clin Pathol.* 2008; 37: 4-20.
184. Lerner UH, Grubb A. Human cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, inhibits bone resorption in vitro stimulated by parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide of malignancy. *J Bone Miner Res.* 2009; 7: 433-440.
185. Levey AS. Use of glomerular filtration rate measurements to assess the progression of renal disease. *Semin Nephrol.* 1989; 9: 370-379.
186. Lewis AV, James TJ, McGuire JB, Taylor RP. Improved immunoturbidimetric assay for cystatin C. *Ann Clin Biochem.* 2001; 38: 111-114.
187. Liangos O, Pereira BJ, Jaber BL. Anemia in acute renal failure: role for erythropoiesis-stimulating proteins?. *Artif Organs.* 2003; 27: 786-791.
188. Linnetz EH, Graves TK. Glomerular filtration rate in general small animal practice. *Compend Cont Educ Pract Vet.* 2010; E1-E5.
189. Littman MP, Daminet S, Grauer GF, Lees GE, van Dongen AM. IRIS Canine GN. Study Group Diagnosis Subgroup. Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 19-26.
190. Löfberg H, Grubb AO. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest.* 1979; 39: 619-626.
191. Lulich J, Osborne C, O'Brien T. Feline renal failure: questions, answers, questions, Com Cont Educ Pract. 1992; 14: 127-152.
192. Lund EM, Armstrong PJ, Kirk CA, Kolar LM, Klausner JS. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 214: 1336-1341.
193. Luo XQ, Yang X, Hu R, Huang WT, Lan B, Tu RX, Liu JY. Effects of methyl cantharidimide tablets on urinary protein and enzymes in Beagle dogs. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2014; 39: 4426-4429.
194. Lyon SD, Sanderson MW, Vaden SL, Lappin MR, Jensen WA, Grauer GF. Comparison of urine dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein-to-creatinine ratio, and species-specific ELISA methods for detection of albumin in urine samples of cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010; 236: 874-879.
195. Maddens B, Heiene R, Smets P, Svensson M, Aresu L, van der Lugt J, Daminet S, Meyer E. Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. *J Vet Intern Med.* 2011; 25: 1075-1083.
196. Maddens BE, Daminet S, Demeyere K, Demon D, Smets P, Meyer E. Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol

- binding protein in canine urine. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010; 134: 259-264.
197. Mandic LM, Acimovic JM, Jovanovic VB. The possibility of determining N-acetyl-B-D-glucosaminidase isoenzymes under alkaline conditions. *Clin Biochem.* 2005; 38: 384-389.
198. Manetti L, Genovesi M, Pardini E, Grasso L, Lupi I, Linda Morselli L, Pellegrini G, Martino E. Early effects of methylprednisolone infusion on serum cystatin C in patients with severe Graves' ophthalmopathy. *Clin Chim Acta.* 2005; 356: 227-228.
199. Manzano-Fernández S, Boronat-García M, Albaladejo-Otón MD, Pastor P, Garrido IP, Pastor-Pérez FJ, Martínez-Hernández P, Valdés M, Pascual-Figal DA. Complementary prognostic value of cystatin C, N-terminal pro-B-type natriuretic Peptide and cardiac troponin T in patients with acute heart failure. *Am J Cardiol.* 2009; 103: 1753-1759.
200. Martineau AS, Leray V, Lepoudere A, Blanchard G, Bensalem J, Gaudout D, Ouguerram K, Nguyen P. A mixed grape and blueberry extract is safe for dogs to consume. *BMC Vet Res.* 2016; 12: 162.
201. Marynissen SJ, Smets PM, Ghys LF, Paepe D, Delanghe J, Galac S, Meyer E, Lefebvre HP, Daminet S. Long-term follow-up of renal function assessing serum cystatin C in dogs with diabetes mellitus or hyperadrenocorticism. *Vet Clin Pathol.* 2016; 45: 320-329.
202. McDuffie LA, Aufforth RD. Adrenocortical carcinoma: modern management and evolving treatment strategies. *Int J Endocr Oncol.* 2016; 3: 161-174.
203. McMurray MD, Trivax JE, McCullough PA. Serum cystatin C, renal filtration function, and left ventricular remodeling. *Circ Heart Fail.* 2009; 2: 86-89.
204. Merz GS, Benedikz E, Schwenk V, Johansen TE, Vogel LK, Rushbrook JI, Wisniewski HM. Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells. *J Cell Physiol.* 1997; 173: 423-432.
205. Miyagawa Y, Takemura N, Hirose H. Evaluation of the measurement of serum cystatin C by an enzyme-linked immunosorbent assay for humans as a marker of the glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Med Sci.* 2009; 71: 1169-1176.
206. Moe L, Heiene R. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with 99 M-Tc DTPA and iothexol. *Res Vet Sci.* 1995; 58: 138-143.
207. Mojiminiyi OA, Marouf R, Abdella N, Kortom M, Abdul-Razzak R. Serum concentration of cystatin C is not affected by cellular proliferation in patients with proliferative haematological disorders. *Ann Clin Biochem.* 2002; 39: 308-310.
208. Möller CA, Löfberg H, Grubb AO, Olsson SO, Davies ME, Barrett AJ. Distribution of cystatin C (gamma-trace), an inhibitor of lysosomal cysteine proteinases, in the anterior lobe of simian and human pituitary glands. *Neuroendocrinology.* 1985; 41: 400-404.
209. Monti P, Benckekroun G, Berlato D. Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. *J Small Anim Pract.* 2012; 53: 254-259.
210. Moran A, Katz R, Jenny NS, Astor B, Bluemke DA, Lima JA, Siscovick D, Bertoni AG, Shlipak MG. Left ventricular hypertrophy in mild and moderate reduction in kidney function determined using cardiac magnetic resonance imaging and cystatin C: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA). *Am J Kidney Dis.* 2008; 52: 839-848.
211. Mussap M, Plebani M. Biochemistry and clinical role of human cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2004; 41: 467-550.
212. Mützel W, Speck U. Pharmacokinetics and biotransformation of iothexol in the rat and the dog. *Acta Radiol Suppl.* 1980; 362: 87-92.
213. Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, Rakitin A, Aguiar J, Relford R. Symmetric Dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2015; 29: 1036-1044.
214. Nabity MB, Lees GE, Cianciolo R, Boggess MM, Steiner JM, Suchodolski JS. Urinary biomarkers of renal disease in dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med.* 2012; 26: 282-293.
215. Nabity MB, Lees GE, Dangott LJ, Cianciolo R, Suchodolski JS, Steiner JM. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40: 222-236.

216. Nakamura M, Itoh T, Miyata K, Higashiyama N, Takesue H, Nishiyama S. Difference in urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity between male and female beagle dogs. *Ren Physiol.* 1983; 6: 130-133.
217. Naour N, Fellahi S, Renucci JF, Poitou C, Rouault C, Basdevant A, Dutour A, Alessi MC, Bastard JP, Clément K, Guerre-Millo M. Potential contribution of adipose tissue to elevated serum cystatin C in human obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2009; 17: 2121-2126.
218. Naruse H, Ishii J, Kawai T, Hattori K, Ishikawa M, Okumura M, Kan S, Nakano T, Matsui S, Nomura M, Hishida H, Ozaki Y. Cystatin C in acute heart failure without advanced renal impairment. *Am J Med.* 2009; 122: 566-573.
219. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. *Am J Kidney Dis.* 2002; 39: 930-936.
220. Newman D. More on cystatin C. *Clin Chem.* 1999; 45: 718-719.
221. Newman DJ, Cystatin C. *Ann Clin Biochem.* 2002; 39: 89-104.
222. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, Wilkie M, White T, Grubb AO, Price CP. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.* 1995; 47: 312-318.
223. Nicolle AP, Chetboul V, Allerheiligen T, Pouchelon JL, Gouni V, Tessier-Vetzel D, Sampedrano CC, Lefebvre HP. Azotemia and glomerular filtration rate in dogs with chronic valvular disease. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 943-949.
224. Noborisaka Y, Ishizaki M, Yamazaki M, Honda R, Yamada Y. Elevated blood pressure and serum γ -glutamyltransferase as significant characteristics of smokers with chronic kidney disease. *Nephrourol Mon.* 2014; 6: e20746.
225. Novo F. Evolução dos níveis séricos de cistatina C em recém-nascidos de termo no primeiro mês de vida. Trabajo de Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina. Universidad de Sao Paulo. 2009.
226. O'Connor WJ, Summerill RA. The effect of a meal of meat on glomerular filtration rate in dogs at normal urine flows. *J Physiol.* 1976; 256: 81-91.
227. Oburai NL, Rao VV, Bonath RBN. Comparative clinical evaluation of boerhavia diffusa root extract with standard enalapril treatment in canine chronic renal failure. *J Ayurveda Integr Med.* 2015; 6: 150-157.
228. O'Neill DG, Elliott J, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 814-821.
229. Orłowski M, Sessa G, Green JP. Gamma-glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science.* 1974; 184: 66-68.
230. Ortega TM, Feldman EC, Nelson RW, Willits N, Cowgill LD. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. *J Am Vet Med Assoc.* 1996; 209: 1724-1729.
231. Orth SR, Ritz E. The nephrotic syndrome. *N Engl J Med.* 1998; 338: 1202-1211.
232. Osborne CA, Stevens JB, Lulich JD, Ulrich LK, Bird KA, Koehler LA, Swanson LL. A clinician's analysis of urinalysis. En Osborne CA, Finco DR (eds). *Canine and Feline Nephrology and Urology.* Baltimore, Williams & Wilkins. 1995. Pp. 136-205.
233. Ostermann M, Philips BJ, Forn LG. Clinical review: biomarkers of acute kidney injury; where are we now? *Crit Care.* 2012; 16: 233-238.
234. Pagitz M, Frommlet F, Schwendenwein I. Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 2007; 21: 936-942.
235. Panciera DL. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *J Am Vet Med Assoc.* 1994; 204: 761-767.
236. Pardo-Marín L, Martínez-Subiela S, Pastor J, Tvarijonaviciute A, Garcia-Martinez JD, Segarra S, Cerón JJ. Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniasis treatment. *BMC Vet Res.* 2017; 13: 31-35.
237. Pasa S, Bayramli G, Atasoy A, Karul A, Ertug S, Ozensoy TS. Evaluation of serum cystatin C in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Res Commun.* 2009; 33: 529-534.
238. Pasa S, Kilic N, Atasoy A, Derincegoz OO, Karul A. Serum cystatin C concentration as a marker acute renal dysfunction in critically ill dogs. *J Anim Vet Adv.* 2008; 7: 1410-1412.

239. Patel PC, Ayers CR, Murphy SA, Peshock R, Khera A, de Lemos JA, Balko JA, Gupta S, Mammen PP, Drazner MH, Markham DW. Association of cystatin C with left ventricular structure and function: the Dallas Heart Study. *Circ Heart Fail*. 2009; 2: 98-104.
240. Pearson WR, Wood T, Zhang Z, Miller W. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics*. 1997; 46: 24–36.
241. Pedersen LG, Tarnow I, Olsen LH, Teerlink T, Pedersen HD. Body size, but neither age nor asymptomatic mitral regurgitation, influences plasma concentrations of dimethylarginines in dogs. *Res Vet Sci*. 2006; 80: 336-342.
242. Peralta CA, Whooley MA, Ix JH, Shlipak MG. Kidney function and systolic blood pressure new insights from cystatin C: data from the Heart and Soul Study. *Am J Hypertens*. 2006; 19: 939-946.
243. Pérez-Calvo JI, Morales Rull JL, Ruiz Ruiz FJ. Cystatin C: a protein for heart failure. *Med Clin (Barc)*. 2011; 136: 158-162.
244. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem*. 1992; 38: 1933-1953.
245. Peters AM. Quantification of renal hemodynamics with radionuclides. *Eur J Nucl Med*. 1991; 18: 274-286.
246. Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L. Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med*. 2006; 20: 228-233.
247. Pöge U, Gerhardt T, Bökenkamp A, Stoffel-Wagner B, Klehr HU, Sauerbruch T, Woitas RP. Time course of low molecular weight proteins in the early kidney transplantation period--influence of corticosteroids. *Nephrol Dial Transplant*. 2004; 19: 2858-2863.
248. Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A. Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. *Nephron*. 1991; 57 :444-452.
249. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animal. *Vet Clin N Am-Small*. 2011; 41: 15-30.
250. Polzin DJ. Chronic kidney disease. En Ettinger SJ, Feldman EC (eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat*. 7ª ed. St. Louis, Elsevier Saunders. 2016. Pp. 1938-1959.
251. Polzin DJ. Chronic kidney disease. En: Ettinger SP, Feldman E (eds) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7ª ed. St. Louis, Saunders Elsevier. 2010; 1990-2021.
252. Pouchelon JL, Atkins CE, Bussadori C, Oyama MA, Vaden SL, Bonagura JD, Chetboul V, Cowgill LD, Elliot J, Francey T, Grauer GF, Luis Fuentes V, Sydney Moise N, Polzin DJ, Van Dongen AM Van Israël N. Cardiovascular–renal axis disorders in the domestic dog and cat: a veterinary consensus statement. *J Small Anim Pract*. 2015; 56: 537-552.
253. Poulik MD, Shinnick CS, Smithies O. Partial aminoacid sequences of human and dog post-gamma-globulins. *Mol Immunol*. 1981; 18: 569–572.
254. Powell SC, Scaro J, Wilson E, Shihabi ZK. Assay of urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidasa in a centrifugal analyzer. *Clin Chem*. 1983; 29: 1717-1719.
255. Pressler BM. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Clin Lab Med*. 2015. 35: 487–502.
256. Price RG. Urinary enzymes, nephrotoxicity and renal disease. *Toxicology*. 1982; 23: 99-134.
257. Raila J, Aupperle H, Raila G. Renal pathology and urinary protein excretion in a 14-monthold Bernese Mountain Dog with chronic renal failure. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2007; 54: 131-135.
258. Raila J, Brunnberg L, Schweigert FJ, Kohn B. Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. *Am J Vet Res*. 2010; 71: 1387-1394.
259. Raila J, Buchholz I, Aupperle H, Raila G, Schoon HA, Schweigert FJ. The distribution of vitamin A and retinol-binding protein in the blood plasma, urine, liver and kidneys of carnivores. *Vet Res*. 2000; 31: 541-551.
260. Raila J, Forterre S, Kohn, Brunnberg L, Schweigert FJ. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. *Am J Vet Res*. 2003a; 64: 874-879.

261. Raila J, Forterre S, Schweigert FJ. Levels of retinol and retinyl esters in plasma and urine of dogs with urolithiasis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2003b; 50: 380-382.
262. Raila J, Neumann U, Schweigert FJ. Immunochemical localization of megalin, retinolbinding protein and Tamm-Horsfall glycoprotein in the kidneys of dogs. *Vet Res Commun*. 2003c; 27: 125-135.
263. Randers E, Erlandsen EJ. Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function - a review. *Clin Chem Lab Med*. 1999; 37: 389-395.
264. Reine NJ, Langston CE. Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2005; 20: 2-10.
265. Relford R, Robertson J, Clements C. Symmetric dimethylarginine improving the diagnosis and staging of chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin Small Anim*. 2016; 46: 941-960.
266. Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1448-1456.
267. Rennke HG, Denker BM. Renal pathophysiology: The essentials 4th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2014.
268. Risch L, Blumberg A, Huber A. Rapid and accurate assessment of glomerular filtration rate in patients with renal transplants using serum cystatin C. *Nephrol Dial Transplant*. 1999; 14: 1991-1996.
269. Risch L, Drexel H, Huber AR. Differences in glomerular filtration rate estimates by 2 cystatin C-based equations. *Clin Chem*. 2005; 51: 2211-2212.
270. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber AR. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin C concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem*. 2001; 47: 2055-2059.
271. Rizzi TE, Meinkoth HH, Clinkenbeard KD. Normal hematology of the dog. En: Weiss DJ, Wardrop KJ (eds) Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. 2010; Pp .799-810.
272. Roald AB, Aukland K, Tenstad O. Tubular absorption of filtered cystatin-C in the rat kidney. *Exp Physiol*. 2004; 89: 701-707.
273. Robles NR, Mena C, Chávez E, Bayo MA, González Candia B, Cidoncha A, López Gómez J, Cubero JJ. A comparison of cystatin C concentrations between patients with chronic interstitial nephritis and glomerular diseases. *J Clin Lab Anal*. 2018; 32. e22166.
274. Rodenburg W, Pennings JL, van Oostrom CT, Roodbergen M, Kuiper RV, Luijten M, de Vries A. Identification of breast cancer biomarkers in transgenic mouse models: A proteomics approach. *Proteomics Clin Appl*. 2010; 4: 603-612.
275. Rosalki SB, Rowe JA. Gamma-glutamyl-transpeptidase activity of human seminal fluid. *The Lancet*. 1973; 301: 323-324.
276. Rosenfeld AJ, Dial SM. Clinical Pathology for the Veterinary Team. Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. 2010.
277. Rosner MH. Urinary biomarkers for the detection of renal injury. En Makowski GS (ed). Advances in clinical Chemistry. San Diego, Elsevier Academic Press Inc. 2009. Pp. 7379-7385.
278. Ross L. Acute kidney injury in dogs and cats. *Vet Clin N Am-Small*. 2011; 41: 1-14.
279. Ross LA. Fluid therapy for acute and chronic renal failure. *Vet Clin N Am-Small*. 1989; 19: 343-359.
280. Ross LL, Barber L, Tate SS, Meister A. Enzymes of the gamma-glutamyl cycle in the ciliary body and lens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973; 70: 2211-2214.
281. Rossi G, Bertazzolo W, Binnella M, Scarpa P, Paltrinieri S. Measurement of proteinuria in dogs, analytic and diagnostic differences using 2 laboratory methods. *Vet Clin Pathol*. 2016; 45: 450-458.
282. Royakkers AA, Korevaar JC, van Suijlen JD, Hofstra LS, Kuiper MA, Spronk PE, Schultz MJ, Bouman CS. Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. *Intensive Care Med*. 2011; 37: 493-501.
283. Sam F, Siwik DA. Digesting the remodeled heart: role of lysosomal cysteine proteases in heart failure. *Hypertension*. 2006; 48: 830-831.
284. Sandman R, Margules RM, Kountz SL. Urinary lysosomal glycosidases after renal allotransplantation: correlation of enzyme excretion with allograft rejection and ischemia. *Clin Chim Acta*. 1973; 45: 349-359.

- 285.Sarnak MJ, Katz R, Stehman-Breen CO, Fried LF, Jenny NS, Psaty BM, Newman AB, Siscovick D, Shlipak MG; Cardiovascular Health Study. Cystatin C concentration as a risk factor for heart failure in older adults. *Ann Intern Med.* 2005; 142: 497-505.
- 286.Sasaki A, Sasaki Y, Iwama R, Shimamura S, Yabe K, Takasuna K, Ichijo T, Furuhashi K, Satoh H. Comparison of renal biomarkers with glomerular filtration rate in susceptibility to the detection of gentamicin-induced acute kidney injury in dogs. *J Comp Path.* 2014; 151: 264-270.
- 287.Sato R, Sano Y, Sato J, Naito Y. N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity in urine of cows with renal parenchymal lesions. *Am J Vet Res.* 1999; 60: 410-413.
- 288.Sato R, Soeta S, Miyazaki M, Syuto B, Sato J, Miyake Y, Yasuda J, Okada K, Naito Y. Clinical availability of urinary of N-acetyl-b-Dglucosaminidase index in dogs with urinary diseases. *J Vet Med Sci.* 2002; 64: 361–365.
- 289.Scarpioni L, Dall'aglio PP, Poissetti PG, Buzio C. Retinol binding protein in serum and in urine of glomerular and tubular nephropathies. *Clin Chim Acta.* 1976; 68: 107-113.
- 290.Schenck PA, Chew DJ. Determination of calcium fractionation in dogs with chronic renal failure. *Am J Vet Res.* 2003; 64: 1181-1184.
- 291.Schenck PA, Chew DJ. Prediction of serum ionized calcium concentration by use of serum total calcium concentration in dogs. *Am J Vet Res.* 2005; 66: 1330-1336.
- 292.Schmid C, Ghirlanda-Keller C, Zwimpfer C, Zoidis E. Triiodothyronine stimulates cystatin C production in bone cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 419: 425-30.
- 293.Schneider SM, Cianciolo RE, Nabity MB, Clubb FJ Jr, Brown CA, Lees GE. Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 cases (2007-2012). *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 67-75.
- 294.Schwartz GJ, Furth SL. Glomerular filtration rate measurement and estimation in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol.* 2007; 22: 1839-1848.
- 295.Segev G, Fascetti AJ, Weeth LP, Cowgill LD. Correction of hyperkalemia in dogs with chronic kidney disease consuming commercial renal therapeutic diets by a potassium-reduced home-prepared diet. *J Vet Intern Med.* 2010; 24: 546-550.
- 296.Segev G, Langston C, Takada K, Kass PH, Cowgill LD. Validation of a clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *J Vet Intern Med.* 2016; 30: 803-807.
- 297.Segev G, Palm C, LeRoy B, Cowgill LD, Westrop JL. Evaluation of neutrophil gelatinase associated lipocalin as a marker of kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 1362-1367.
- 298.Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, Mariat C, Froissart M, Cristol JP. Cystatin C: current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med.* 2008; 12: 1664-1686.
- 299.Sexton PS, Cox JL. Inhibition of motility and invasion of B16 melanoma by the overexpression of cystatin C. *Melanoma Res.* 1997; 7: 97-101.
- 300.Shirwany A, Weber KT. Extracellular matrix remodeling in hypertensive heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48: 97-98.
- 301.Shlipak MG, Praught ML, Sarnak MJ. Update on cystatin C: new insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2006; 15: 270-275.
- 302.Siewiński M, Gutowicz J, Kielan W, Bolanowski M. Cysteine peptidase inhibitors and activator(s) in urine of patients with colorectal cancer. *Oncology.* 1994; 51: 446-449.
- 303.Silvestrini P, Zoia A, Planellas M, Roura X, Pastor J, Cerón JJ, Caldin M. Iron status and C-reactive protein in canine leishmaniasis. *J Small Anim Pract.* 2014; 55: 95-101.
- 304.Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest.* 1985; 45: 97–101.
- 305.Sink CA, Nicole MW. *Practical Veterinary Urinalysis.* Ames, Iowa, Wiley-Blackwell. 2012.
- 306.Sivaprasadarao A, Findlay JBC. The interaction of retinol-binding protein with its plasma membrane receptor. *Biochem J.* 1988; 255: 561-569.
- 307.Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2005; 48: 75-80.

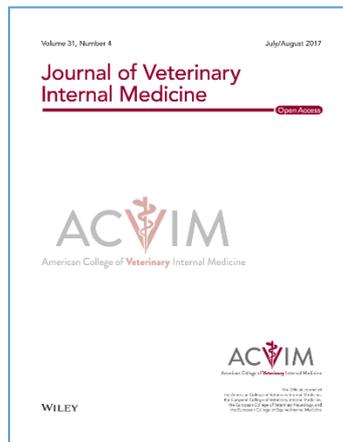
- 308.Sloane BF, Rozhin J, Robinson D, Honn KV. Role for cathepsin B and cystatins in tumor growth and progression. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1990; 371: 193-198.
- 309.Sloane BF. Suicidal tumor proteases. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 826-827.
- 310.Smets PM, Lefebvre HP, Kooistra HS, Meyer E, Croubels S, Maddens BE, Vandenaabeele S, Saunders JH, Daminet S. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *Vet J*. 2012; 192: 532-534.
- 311.Smets PM, Meyer E, Maddens BE, Duchateau L, Daminet S. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2010; 24: 65-72.
- 312.Sohrabian A, Noraddin FH, Flodin M, Fredricsson A, Larsson A. Particle enhanced turbidimetric immunoassay for the determination of urine cystatin C on Cobas c501. *Clin Biochem*. 2012; 45: 339-344.
- 313.Sokol JP, Neil JR, Schiemann BJ, Schiemann WP. The use of cystatin C to inhibit epithelial-mesenchymal transition and morphological transformation stimulated by transforming growth factor-beta. *Breast Cancer Res*. 2005; 7: R844-853.
- 314.Sokol JP, Schiemann WP. Cystatin C antagonizes transforming growth factor signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res*. 2004; 2: 183-195.
- 315.Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. *Parasite Vector*. 2011; 4: 86.
- 316.Solano-Gallego L, Rodríguez A, Iniesta L, Arboix M, Portús M, Alberola J. Detection of anti-Leishmania immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with Leishmaniasis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003; 10: 849-855.
- 317.Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Trotta M, Zampieron C, Razia L, Furlanello T, Caldin M, Roura X, Alberola J. Detection of Leishmania infantum DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2007; 147: 315-319.
- 318.Stabuc B, Vrhovec L, Stabuc-Silih M, Cizej TE. Improved prediction of decreased creatinine clearance by serum cystatin C: use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clin Chem*. 2000; 46: 193-197.
- 319.Steinbach S, Weis J, Schweighauser A, Francey T, Neiger R. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2014; 28: 264-269.
- 320.Stevens LA, Fares G, Fleming J, Martin D, Murthy K, Qiu J, Stark PC, Uhlig K, Van Lente F, Levey AS. Low rates of testing and diagnostic codes usage in a commercial clinical laboratory: evidence for lack of physician awareness of chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005; 16: 2439-2448.
- 321.Stockham SL, Scott MA. Urinary system. Stockham SL Scott MA (eds). *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. 2nd ed. Ames IA, Blackwell. 2008. Pp. 415-494.
- 322.Stockigt JR. Guidelines for diagnosis and monitoring of thyroid disease: nonthyroidal illness. *Clin Chem*. 1996; 42: 188-192.
- 323.Stowe H, Lawrence D, Newman DJ, Lamb EJ. Analytical performance of a particle-enhanced nephelometric immunoassay for serum cystatin C using rate analysis. *Clin Chem*. 2001; 47: 1482-1485.
- 324.Strojan P, Svetic B, Smid L, Kos J. Serum cystatin C in patients with head and neck carcinoma. *Clin Chim Acta*. 2004; 344: 155-161.
- 325.Strojnjk T, Kos J, Zidanik B, Golouh R, Lah TT. Cathepsin B immunohistochemical staining in tumor and endothelial cells is a new prognostic factor for survival in patients with brain tumors. *Clin Cancer Res*. 1999; 5: 559-567.
- 326.Stypmann J, Gläser K, Roth W, Tobin DJ, Petermann I, Matthias R, Mönnig G, Haverkamp W, Breithardt G, Schmahl W, Peters C, Reinheckel T. Dilated cardiomyopathy in mice deficient for the lysosomal cysteine peptidase cathepsin L. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99: 6234-6239.
- 327.Surks MI, Sievert R. Drugs and thyroid function. *N Engl J Med*. 1995; 333: 1688-1694.
- 328.Syakalima M, Takiguchi M, Yasuda J, Hashimoto A. The canine alkaline phosphatases: a review of the isoenzymes in serum, analytical methods and their diagnostic application. *Jpn J Vet Res*. 1998; 46: 3-11.

329. Syme HM, Jepson R. Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the Dog and Cat*, 7th ed. St. Louis, Elsevier Saunders; 2016: 1905-1919.
330. Tang WH, Van Lente F, Shrestha K, Troughton RW, Francis GS, Tong W, Martin MG, Borowski AG, Jasper S, Starling RC, Klein AL. Impact of myocardial function on cystatin C measurements in chronic systolic heart failure. *J Card Fail.* 2008; 14: 394-399.
331. Tavera C, Leung-Tack J, Prevot D, Gensac MC, Martinez J, Fulcrand P, Colle A. Cystatin C secretion by rat glomerular mesangial cells: autocrine loop for in vitro growth-promoting activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 182: 1082-1088.
332. Tenstad O, Roald AB, Grubb A, Aukland K. Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996; 56: 409-414.
333. Thielemans N, Lauwerys R, Bernard A. Competition between albumin and low-molecular-weight proteins for renal tubular uptake in experimental nephropathies. *Nephron.* 1994; 66: 453-458.
334. Thoen ME, Kerl ME. Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care.* 2011; 21: 648-657.
335. Thrall MA, Grauer GF, Mero KN. Clinicopathologic findings in dogs and cats with ethylene glycol intoxication. *J Am Vet Med Assoc.* 1984; 184: 37-41.
336. Tkaczyk M, Nowicki M, Lukamowicz J. Increased cystatin C concentration in urine of nephrotic children. *Pediatr Nephrol.* 2004; 19: 1278-1280.
337. Todolí F, Solano-Gallego L, Ojeda A, Quintana J, Lloret A, Roura X, Alberola J, Rodríguez-Cortés A. Anti-Leishmania IgA in urine samples from dogs with clinical leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2009; 159: 17-23.
338. Tolkoff-Rubin NE, Rubin RH, Bonventre JV. Noninvasive renal diagnostic studies. *Clin Lab Med.* 1988; 8: 507-526.
339. Torrent E, Planellas M, Ordeix L, Pastor J, Rodon J, Solano-Gallego L. Serum Symmetric Dimethylarginine as an early marker of excretory dysfunction in canine Leishmaniosis (*L. infantum*) induced nephropathy. *Vet Med Int.* 2018. 2018: 7517359.
340. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Letters.* 1991; 285: 213-219.
341. Turk V, Brzin J, Lenarcic B, Locnikar P, Popović T, Ritonja A, Babnik J, Bode W, Machleid T. Structure and function of lysosomal cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Prog Clin Biol Res.* 1985; 180: 91-103.
342. Tvarijonaviciute A, Ceron JJ, Holden SL, Biourge V, Morris PJ, German AJ. Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. *J Vet Intern Med.* 2013; 27: 31-38.
343. Uchida K, Gotoh A. Measurement of cystatin-C and creatinine in urine. *Clin Chim Acta.* 2002; 323: 121-128.
344. Uchida K, Kuroki K, Yoshino T, Yamaguchi R, Tateyama S. Immunohistochemical study of constituents other than beta-protein in canine senile plaques and cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol.* 1997; 93: 277-284.
345. Uchino S, Bellomo R, Goldsmith D, Bates S, Ronco C. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients. *Crit Care Med.* 2006; 34:1913-1917.
346. Usova TA, Poteryaeva ON, Zhanayeva SY, Yarygina ES, Korolenko TA. Cystatin C and cysteine proteinases during the development and therapy of Lewis lung adenocarcinoma in mice. *Bull Exp Biol Med.* 2003; 135: 81-84.
347. Vaden SL, Levine J, Breitschwerdt EB. A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *J Vet Intern Med.* 1997; 11: 58-64.
348. Van Hoek I, Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ systems: a review. *Gen Comp Endocrinol.* 2009; 160: 205-215.
349. Vigneswaran N, Wu J, Muller S, Zacharias W, Narendran S, Middleton L. Expression analysis of cystatin C and M in laser-capture microdissected human breast cancer cells--a preliminary study. *Pathol Res Pract.* 2005; 200: 753-762.
350. Villa P, Jiménez M, Soriano MC, Manzanares J, Casasnovas P. Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care.* 2005; 9: 139-143.

351. Vinge L, Lees GE, Nielsen R, Kashtan CE, Bahr A, Christensen EI. The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. *Nephrol Dial Transplant*. 2010; 25: 2458–2467.
352. Vinicius M, Silva M, Moscoso-Solorzano G, Kiyomi Nishida S, Kirsztajn GM. Os níveis séricos de cistatina C sofrem influencia da dose de corticoide em pacientes com nefrite lúpica?. *J Bra Nefrol*. 2011; 33: 306-312.
353. Von Hendy-Willson VE, Pressler BM. An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Vet J*. 2011; 188: 156-165.
354. Wagoner MP, Yang Y, McDuffie JE, Klapczynski M, Buck W, Cheatham L, Eisinger D, Sace F, Lynch KM, Sonee M, Ma JY, Chen Y, Marshall K, Damour M, Stephen L, Dragan YP, Fikes J, Snook S, Kinter LB. Evaluation of temporal changes in urine-based metabolomic and kidney injury markers to detect compound induced acute kidney tubular toxicity in Beagle dogs. *Curr Top Med Chem*. 2017; 17: 2767-2780.
355. Waldrop JE. Urinary electrolytes, solutes and osmolality. *Vet Clin N Am-Small*. 2008; 38: 503-512.
356. Warfel AH, Zucker-Franklin D, Frangione B, Ghiso J. Monocytes and macrophages and its downregulation after stimulation. *J Exp Med*. 1987; 166: 1912–1917.
357. Waters CB, Adams LG, Scott-Moncrieff JC, DeNicola DB, Snyder PW, White MR, Gasparini M. Effects of glucocorticoid therapy on urine protein-to-creatinine ratios and renal morphology in dogs. *J Vet Intern Med*. 1997; 11: 172-177.
358. Watson ADJ, Lefebvre HP, Concordet D, Laroute V, Ferre JP, Braun JP, Conchou F, Toutain PL. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med*. 2002; 16: 22-33.
359. Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2008; 44: 131–138.
360. Welles EG, Whatley EM, Hall AS, Wright JC. Comparison of Multistix PRO dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein (UP), urine creatinine (UC) and UP: UC ratio in dogs and cats. *Vet Clin Pathol*. 2006; 35: 31-36.
361. Wellwood JM, Ellis BG, Price RG, Hammond K, Thompson AE, Jones NF. Urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase activities in patients with renal disease. *Br Med J*. 1975; 3: 408-411.
362. Westhuyzen J, Endre ZH, Reece G, Reith DM, Saltissi D, Morgan TJ. Measurement of tubular enzyuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol Dial Transplant*. 2003; 18: 543–551.
363. Whittemore JC, Gill VL, Jensen WA, Radecki SV, Lappin MR. Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumin-creatinine ratio and systemic disease in dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2006; 229: 958-963.
364. Whittemore JC, Marcum BA, Mawby DI, Coleman MV, Hackett TB, Lappin MR. Associations among albuminuria, C-Reactive protein concentrations, survival predictor index scores, and survival 78 critically ill dogs. *J Vet Intern Med*. 2011; 25: 818-824.
365. Wiesli P, Schwegler B, Spinass GA, Schmid C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clin Chim Acta*. 2003; 338: 87-90.
366. Williams TL, Dillon H, Elliott J, Syme HM, Archer J. Serum cystatin C concentrations in cats with hyperthyroidism and chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2016; 30: 1083–1089.
367. Wonnacott A, Meran S, Amphlett B, Talabani B, Phillips A. Epidemiology and outcomes in community-acquired versus hospital-acquired AKI. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014; 9: 1007-1014.
368. Wright PJ, Plummer DT. The use of urinary enzyme measurements to detect renal damage caused by nephrotoxic compounds. *Biochem Pharmacol*. 1974; 23: 65-73.
369. Wyss M y Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol Rev*. 2000; 80: 1107-213.
370. Yano M, Hirai K, Naito Z, Yokoyama M, Ishiwata T, Shiraki Y, Inokuchi M, Asano G. Expression of cathepsin B and cystatin C in human breast cancer. *Surg Today*. 2001; 31: 385-389.
371. Yilmaz MI, Turgut F, Kanbay M, Saglam M, Sonmez A, Yaman H, Demirbas S, Unal HU, Gok M, Karaman M, Ay SA, Demirkaya E, Covic A, Carrero JJ. Serum gamma-glutamyltransferase levels are inversely related to endothelial function in chronic

- kidney disease. *Int Urol Nephrol*. 2013; 45: 1071-1078.
372. Yoshimura K, Tsuchida T, Kawamoto K. Expression of cathepsin B and cystatin C in the human adenohypophysis and in pituitary adenomas. *Oncol Rep*. 2000; 7: 27-31.
373. Zanotti G, Berni R. Plasma retinol-binding protein: Structure and interactions with retinol, retinoids, and transthyretin. *Vitam Horm*. 2004; 69: 271-295.
374. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Durán E, González M, Mañé MC. SDS-PAGE and western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Res*. 2003a; 34: 137-151.
375. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Mañé MC. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by (SDS-PAGE) and western blotting. *Theriogenology*. 2004; 61: 1259-1272.
376. Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Mañé MC. Characterization of renal damage in canine leptospirosis by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blotting of the urinary proteins. *J Comp Pathol*. 2003b; 129: 169-178.
377. Zhai JL, Ge N, Zhen Y, Zhao Q, Liu C. Corticosteroids significantly increase serum cystatin c concentration without affecting renal function in symptomatic heart failure. *Clin Lab*. 2016; 62: 203-207.
378. Zoja C, Benigni A, Remuzzi G. Cellular responses to protein overload: key event in renal disease progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13: 31-37.
379. Zore I, Krasovec M, Cimerman N, Kuhelj R, Werle B, Nielsen HJ, Brünner N, Kos J. Cathepsin B/cystatin C complex levels in sera from patients with lung and colorectal cancer. *Biol Chem*. 2001; 382: 805-810.

ANEXO I



Effects of Oral Prednisone Administration on Serum Cystatin C in Dogs

J. Muñoz, P. Soblechero, F.J. Duque, B. Macías-García, P. Ruiz, C. Zaragoza, R. Barrera

J Vet Intern Med 2017; 31: 1765–1770

Standard Article

J Vet Intern Med 2017;31:1765–1770

Effects of Oral Prednisone Administration on Serum Cystatin C in Dogs

J. Muñoz, P. Soblechero, F.J. Duque, B. Macías-García, P. Ruiz, C. Zaragoza, and R. Barrera **Background:** Oral administration of glucocorticoid alters serum cystatin C (sCysC) concentration in humans.**Objective:** To determine if oral administration of prednisone alters sCysC in dogs without pre-existing renal disease.**Animals:** Forty six dogs were included: 10 dogs diagnosed with steroid responsive meningitis arteritis (SRMA; group A), 20 dogs diagnosed of pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH; group B), and 16 healthy control dogs (group C).**Methods:** Retrospective observational study. SRMA diagnosed dogs were administered prednisone 4 mg/kg/24 h PO 7 days, reducing the dose to 2 mg/kg/24 h 7 days before medication withdrawal. In group A, sampling was performed at days 0, 7, 14 and a final control at day 21. Blood and urine samples were collected in the 3 groups, and in group A, sampling was performed at all time points (days 1, 7, 14, and 21).**Results:** In group A, sCysC was significantly higher at day 7 compared to the control group (0.4 ± 0.04 mg/L vs. 0.18 ± 0.03 mg/L mean \pm SEM respectively $P < 0.01$); sCysC values decreased to basal at day 14 when the dose was decreased and after 1 week of withdrawal of prednisone (0.27 ± 0.03 mg/L for group A at day 14 and 0.15 ± 0.02 mg/L at day 21; $P > 0.05$). Dogs with PDH included in group B did not have significant differences in sCysC (0.22 ± 0.03 mg/L) compared to control ($P > 0.05$).**Conclusions and Clinical Importance:** Oral administration of prednisone unlike altered endogenous glucocorticoid production, increases sCysC in dogs in a dose-dependent fashion.**Key words:** Cystatin C; Dog; Glucocorticoid; Meningitis.

Serum urea and creatinine levels are commonly used in veterinary medicine as indirect markers of glomerular filtration rate (GFR) to estimate renal function in dogs. However, these are delayed markers of renal failure as substantial variations in these parameters are only observed when approximately 75% of the functional renal mass is lost¹ and can be influenced by nonrenal factors. For example, urea can vary due to a high protein diet and both markers (urea and creatinine) are modified by age, hydration status, and muscle mass.¹ Therefore, when using serum urea or creatinine levels to estimate renal function, the results need to be carefully evaluated in light of the previously mentioned factors.

Cystatin C (Cys-C) is a 120 amino acid polypeptide constantly produced by most nucleated cells in the

Abbreviations:

ALP	alkaline phosphatase
ALT	alanine aminotransferase
CL	critical limit
CSF	cerebrospinal fluid
CV	coefficient of variation
GFR	glomerular filtration rate
LOD	limit of detection
LOQ	limit of quantification
PDH	pituitary-dependent hyperadrenocorticism
sCysC	serum cystatin C
SRMA	steroid responsive meningitis arteritis
UP/C	urinary protein/creatinine ratio
USG	urinary specific gravity

body²; this molecule exhibits no tubular reabsorption, secretion, or metabolism and is freely filtered through the glomerulus.³ Thus, serum cystatin C (sCysC) levels can be considered as another renal marker with superior reliability compared to creatinine.⁴ In addition, sCysC shows lower individual variability than creatinine and has been reported not to be influenced by sex, age, or muscle mass in human medicine.^{5,6} With these physiologic characteristics, sCysC has a great potential to be an excellent surrogate marker of GFR.^{7–9}

Nevertheless, as its clinical application was initiated in human medicine, it has been reported that several conditions unrelated to renal failure such as thyroid dysfunction, chronic liver disease, malignancies, or asthma among others can alter sCysC.^{10–21} However, it has to be noted that the treatment of choice for all these conditions include exogenous glucocorticoid administration and that methylprednisolone or prednisone administration deeply influence sCysC in humans.^{10,15,22}

In veterinary medicine, reference values for sCysC can vary with age and body weight (<15 kg),²³ although

From the Animal Medicine Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, Cáceres, Spain (Muñoz, Soblechero, Duque, Ruiz, Zaragoza, Barrera); and Assisted Reproduction Unit, Minimally Invasive Surgery Centre JesúsUsón, Cáceres, Spain (Macías-García).

The study was conducted at the Animal Medicine Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain.

The study was presented in abstract form at the 25th ECVIM-CA Congress, Lisbon, Portugal, September 2015.

Corresponding author: R. Barrera, Animal Medicine Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10071 Cáceres, Spain, e-mail: rabacha@umex.es.

Submitted March 14, 2017; Revised June 20, 2017; Accepted August 1, 2017.

Copyright © 2017 The Authors. Journal of Veterinary Internal Medicine published by Wiley Periodicals, Inc. on behalf of the American College of Veterinary Internal Medicine.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

DOI: 10.1111/jvim.14820

these results are controversial.^{24,25} Other conditions such as fasting²³ or leishmaniasis^{26,27} influence sCysC in dogs.

Until now, no reports have been published regarding the effect of glucocorticoid supplementation on sCysC in dogs. We therefore hypothesized that, as reported in humans, oral administration of prednisone would increase sCysC in dogs in the absence of a pre-existing renal condition. To achieve this goal, a cohort of 10 dogs affected with steroid responsive meningitis arteritis (SRMA) was selected and the levels of sCysC before and after prednisone administration were evaluated.

Material and Methods

Animals

This study has not been subjected to any animal ethics committee as all the animals enrolled in this study were dogs referred to the Veterinary Hospital of the University of Extremadura. The excess of blood and urine samples were used for this study with the owner consent.

This study includes 46 dogs seen at the Veterinary Hospital of the University of Extremadura. The dogs were divided into the following groups: 10 dogs diagnosed with SRMA (group A), 20 dogs diagnosed of pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH; group B), and 16 healthy control dogs (group C).

Experimental Groups

The animals included in group A were sampled from January of 2015 to February of 2016) had a body weight ≥ 15 kg, different ages (range: 1–2 years), sex (6 males and 4 females), and breeds. They were selected based on the following inclusion criteria: having SRMA, absence of clinical and laboratorial signs of kidney disease, and proper state of hydration. All the dogs received a similar treatment with prednisone (Prednisona Alonga^a) and none of them had previously been treated with glucocorticoids.^b Corticosteroid therapy consisted of oral administration of prednisone alone at 4 mg/kg/24 h for 7 days, reducing the dose to 2 mg/kg/24 h for further 7 days; after 14 days, prednisone was removed. Blood samples were collected in prednisone-treated animals on days 1, 7, 14, and 21 after the onset of the treatment and were immediately processed; for all the rest of the groups (control and PDH), blood was obtained once in the absence of any treatment.

SRMA was diagnosed on the basis of: (1) characteristic clinical signs (reluctance to move, kyphosis, stiff gait, cervical and/or thoracolumbar pain, muscle rigidity, or apparent pain on opening the mouth), (2) hematology (WBC higher than $14.00 \text{ cells} \times 10^9/\text{L}$ due to neutrophilia) and normal biochemistry profile, (3) normal urinalysis, and (4) modifications in the cerebrospinal fluid or CSF (increased WBCs $>10 \text{ cells}/\mu\text{L}$, with predominantly mature neutrophils, increased protein concentration in the CSF $>20 \text{ mg/dL}$, and IgA concentrations $\geq 0.2 \text{ mg/mL}$); failure to isolate an infectious agent from the CSF and positive response to therapy with corticosteroids were considered as diagnostic of SRMA.

A retrospective study (from June 2014 to February 2016) was performed to test the influence of an increase of endogenous steroids on the concentration of sCysC (positive control; group B). Twenty nonhemolyzed sera samples stored at -80°C were used as it has been demonstrated that sCysC remains unchanged for years.²⁸ The cohort of dogs with untreated pituitary-dependent hyperadrenocorticism (PDH) included in group B were of different breeds and sexes (10 males and 10 females), ages (4–12 years), and weighted over 15 kg. PDH diagnosis was based on the clinical

condition of the dogs (polydipsia/polyuria, polyphagia, alopecia, pendulous abdomen, and/or hepatomegaly) and some of the following laboratorial findings: lymphopenia, hypercholesterolemia, high serum alkalinephosphatase (ALP), and alanineaminotransferase (ALT). In addition, an ACTH stimulation test was performed. A serum cortisol above 22 mg/dL was considered as abnormal in a sample obtained 1 hour after a single dose of 0.25 mg/dog IM of synthetic ACTH (Nuvacthen Depot). Adrenal ultrasound examination was performed with an 8 MHz curved array transducer. Dogs were positioned in lateral recumbency, the images in longitudinal planes were obtained, and the largest transverse diameter was recorded. Bilateral adrenal gland enlargement was considered as indicative of PDH; the upper limit of the normal adrenal gland width was 7.5 mm for dogs weighing over 10 kg and 6 mm for dogs weighing $\leq 10 \text{ kg}$.²⁹

Finally, a group of healthy dogs (group C) was studied and used as negative control. All the dogs included were clinically healthy dogs presented for elective surgery or annual review. The animals included weighted over 15 kg and had different age (1–9 years old), sex (7 males and 9 females) and breeds. They were considered healthy on the basis of a normal physical examination, complete blood count determination, serum biochemical analysis, urinalysis, and fecal examination for parasites.

Clinical Pathology Testing

Blood samples were collected from the cephalic vein after a 12-hour fasting and placed in tubes containing EDTA for the hematologic examination or with a clotting activator for the serum biochemistry. Sera were prepared by centrifuging blood samples at $200 \times g$ for 10 min. The hematologic analyses were performed with an automated analyser (Mindray BC-5300; Vet Spinreact), and blood smears were stained with Diff-Quick. The biochemical variables determined included urea, creatinine, ALT, ALP, total protein, albumin, cholesterol, calcium, and phosphorus by a commercial kit (Spinreact, Barcelona, Spain) and a clinical chemistry analyser (Saturno 100 Vet Crony Instruments, Rome, Italy).

sCysC concentration was determined by a latex turbidimetric commercial kit (Cystatin C turbilatex; Spinreact, Barcelona, Spain) as previously validated by Almy et al.³⁰ As an indication of assay precision, the intraday coefficient of variation (CV) was calculated from 10 samples assayed on the same day, and the interday CV was calculated from 10 samples assayed on separate days. The accuracy of the assay was investigated by linearity during dilution using the mean of three calibration curves of four standards with known cystatin C concentrations (Cystatin C Calibrator; Spinreact, Barcelona, Spain). The CL (critical limit), LOD (limit of detection), and LOQ (limit of quantification) were calculated as follows³¹: $\text{CL} = \text{standard deviation (SD)} \times t (0.05, \infty)$; $\text{LOD} = \text{SD} \times 2 t (0.05, \infty)$; $\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}$, where the parameter t represents Student's t -test. The repeatability and reproducibility of the cystatin C turbidimetric assay had satisfactory variability with a within-day CV = 5.4% and a between-day CV = 7.0%, both less than 10%. Regression analysis showed a linear relationship ($R = 0.9997$) between the real and theoretical values of the cystatin C concentration. All dogs were tested for the absence of canine heartworm disease, *Anaplasma phagocytophylum*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* antibodies (Canine SNAP 4Dx, IDEXX Laboratories, USA), and leishmaniasis (direct visualization of *Leishmania infantum* amastigotes in ganglia or bone marrow smears and/or a positive immunoassay commercial kit; kit Q leitest ELISA leishmania; Laboratorios Leti, Spain).

Urine was obtained by ultrasound-guided aseptic cystocentesis. Three microliter of urine was used for routine urinalysis (Multistix Reagent Strips, Bayer Corporation, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions using an Urispin reader

(Spinreact). The strips were used to determine the presence of glucose, ketones, bilirubin, urobilinogen, blood, and protein in the urine, as well as urinary pH. The remaining sample was centrifuged for 5 min at $200 \times g$. The sediment was evaluated, and a part of the supernatant was used to measure urinary specific gravity (USG) by manual refractometry (ZUZI 300). The urinary protein/creatinine ratio (UP/C) was calculated by measuring the urinary protein concentration (pirogallol red and molybdate technique; RAL Laboratory, Chilton, U.K.) and the creatinine concentration in the urine (Jaffe method's; RAL Laboratory).

Statistical Analysis

Data were tested for normality by a Shapiro-Wilk test; results are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). Groups were compared using ANOVA on ranks due to their non-Gaussian distribution. When statistically significant differences were found, a Dunn's posthoc test was used. All statistical analyses were performed by Sigma Plot software version 11.0 for Windows (Systat Software, Chicago, IL, USA). Differences among values were considered as statistically significant when $P < 0.05$ or $P < 0.01$.

Results

Hematology

The hematologic, biochemical, and urinalysis values of control group (Group C) were within the normal reference range established by the Clinical Pathology Service of the Clinical Veterinary Hospital of the UEx. WBC (Table 1) was significantly enhanced in groups A (over $18.00 \times 10^9/L$ cells) and B (11.78 ± 1.14 cells $\times 10^9/L$) compared to group C (9.47 ± 0.78 cells $\times 10^9/L$; $P < 0.001$). Lymphopenia was observed in some dogs affected with PDH (11 out of 20) and leukocytosis (9 out of 20) due to neutrophilia; neutrophilia and monocytosis were detected in all SRMA cases throughout the study (data not shown). Platelet count (Table 1) differed statistically in Group A (day 14) and Group B compared to control (Table 1; $P < 0.05$).

Serum Biochemistry and Urinalysis

Serum concentrations of total proteins, albumin, calcium, and phosphorus remained within the reference values in all dogs in Group A (Table 2). A significant raise in serum cholesterol (Table 2) was observed after

prednisone administration at day 7 (280.04 ± 48.23 mg/dL; mean \pm SEM) and 14 (324.43 ± 45.43 mg/dL) compared to the control group (186.19 ± 60.35 mg/dL group C; $P < 0.01$); ALP values were significantly enhanced in all groups (A and B) compared to control (group C; Table 2, $P < 0.01$). The dogs included in Group A (day 14) and B showed an increased ALT (Table 2; $P < 0.01$). In dogs diagnosed with PDH, endogenous corticosteroid production was altered (mean pre-ACTH cortisol of 8.7 ± 1.2 $\mu\text{g/dL}$; $n = 20$), while in the day 0 of the SRMA-affected group, cortisol values remained in the reference range (2.2 ± 0.6 $\mu\text{g/dL}$; $n = 16$), as 8 $\mu\text{g/dL}$ is the threshold value of the laboratory below which serum cortisol is considered as normal. The other biochemical determinations were within the normal intervals. No changes were observed in urinalysis in either group of dogs studied. The UP/C was lower than 0.4 in all groups (Table 2) although the higher value was observed in group B (0.35 ± 0.02 ; $P < 0.01$ vs. control), which is commonly found in dogs affected with PDH.³²

Serum Cystatin C determinations

In group A, sCysC concentration was significantly higher at day 7 (0.4 ± 0.04 mg/L; mean \pm SEM) compared to the control group (0.18 ± 0.03 mg/L; Graph 1); in addition, sCysC values decreased to basal values when the prednisone dose was reduced to 2 mg/kg/d (0.27 ± 0.03 mg/L; Group A, day 14) and further decreased after 1 week of cortisone withdrawal (0.15 ± 0.02 mg/L in group A, day 21; $P > 0.05$ compared to control). Furthermore, dogs with PDH included in group B did not show significant differences in sCysC (0.21 ± 0.03 mg/L) compared control ($P > 0.05$; Fig. 1).

Discussion

The aim of the present work was to elucidate if exogenous administration of corticosteroids in dogs without renal failure influence sCys-C. These data demonstrate that PO administered prednisone at 4 mg/kg enhances sCys-C and that dogs affected with PDH did not exhibit altered sCys-C values. These results are clinically relevant if sCys-C needs to be evaluated in any setting in which dogs are administered PO with

Table 1. Hematologic findings in the three groups of dogs included in the study

Group Day	A				B	C
	1	7	14	21		
PCV (%)	45.64 \pm 3.11	42.07 \pm 1.88	43.20 \pm 1.71	43.55 \pm 1.55	46.72 \pm 1.61	45.89 \pm 1.09
WBC ($\times 10^9/L$)	20.21 \pm 2.46**	26.93 \pm 2.56**	24.57 \pm 2.88**	18.36 \pm 1.87**	11.78 \pm 1.14**	9.47 \pm 0.79
PLT ($\times 10^9/L$)	334.60 \pm 54.56	351.20 \pm 45.44	367.00 \pm 25.17*	303.20 \pm 27.16	434.25 \pm 44.35*	246.80 \pm 26.55

PCV, white blood cell (WBC) and platelet (PLT) counts in dogs affected with steroid responsive meningitis arteritis (SRMA; group A, $n = 10$ at days 1, 7, 14, and 21 after treatment onset), dogs with hyperadrenocorticism (PDH; group B, $n = 20$), and control dogs (group C, $n = 16$). Values are presented as mean \pm SEM. Values marked with * differ statistically from the control group: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

Table 2. Biochemic and urinary findings in the three groups of dogs included in the study.

Group Day	A				B	C
	1	7	14	21		
Urea (mg/dL)	22.69 ± 7.67	28.26 ± 4.96	26.75 ± 8.49	24.55 ± 4.68*	45.66 ± 34.93	34.31 ± 8.35
ALT (UI/L)	31.8 ± 28.8	43.7 ± 4.03	104.4 ± 27.77**	59.3 ± 9.85	95.95 ± 16.19**	33.68 ± 2.86
Creatinine (mg/dL)	0.82 ± 0.07	0.69 ± 0.07*	0.83 ± 0.08	0.86 ± 0.14	0.97 ± 0.71	0.96 ± 0.12
TP (g/dL)	6.2 ± 0.1	6.4 ± 0.2	6.2 ± 0.1	6.4 ± 0.1	6.9 ± 0.1**	6.4 ± 0.1
Albumin (g/L)	0.37 ± 0.01	0.38 ± 0.02	0.38 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.01
Cholesterol (mg/dL)	210.65 ± 27.08	280.04 ± 48.23**	324.43 ± 45.43	237.50 ± 39.48	315.53 ± 131.52**	186.19 ± 60.35
ALP (UI/L)	227.3 ± 27.97**	360 ± 46.14**	456 ± 61.8**	306.7 ± 36.6**	494.35 ± 79.15**	63.68 ± 5.40
Calcium (mg/dL)	11.07 ± 0.78*	11.18 ± 0.66*	11.09 ± 0.71*	11.14 ± 0.60*	9.49 ± 0.44	9.95 ± 1.29
Phosphorus (mmol/L)	3.96 ± 0.19	4.00 ± 0.19	4.00 ± 0.25	3.93 ± 0.22	4.31 ± 0.12	3.78 ± 0.15
UP/C	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.35 ± 0.02**	0.2 ± 0.02

Serum urea, ALT, total protein (TP), albumin, cholesterol, ALP, calcium, phosphorus, and UP/C (urinary protein/creatinine ratio) values in dogs affected with steroid responsive meningitis arteritis (SRMA; group A, at days 1, 7, 14, and 21 after treatment onset, n = 10), dogs with hyperadrenocorticism (PDH; group B, n = 20), and control dogs (group C, n = 16). Values are presented as mean ± SEM. Values marked with * differ statistically from the control group: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

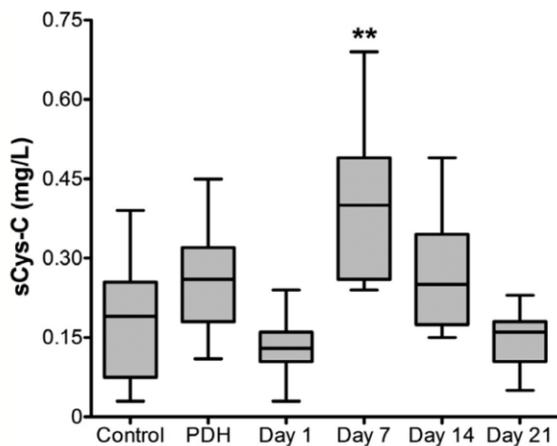


Fig 1. Serum cystatin C values in the three groups of dogs included in the study. sCysC values were determined after a 12-hour fasting in dogs affected with steroid responsive meningitis arteritis (SRMA; group A at days 1, 7, 14, and 21 after prednisone treatment onset, n = 10), dogs with hyperadrenocorticism (PDH; group B, n = 20), and control dogs (group C, n = 16). Bars represent the mean and standard error of the mean. Values bearing ** differ statistically from the control group ($P < 0.01$).

high doses of glucocorticoids (4 mg/kg daily). In the first part of this study, the hematologic findings revealed an increase in the total WBC in SRMA-affected dogs at day 0 compared to control (Table 1; $P < 0.01$); this finding is related to neutrophilia, often seen with the onset of the SRMA clinical signs. In addition, enhanced platelet counts were found in group B and group A at day 14 compared to control ($P < 0.05$), but they were not clinically relevant.

Corticoids are widely used in veterinary and human medicine due to their potent anti-inflammatory and immunosuppressive effects. Several studies have demonstrated that cortisone administration induces a rise in sCysC in humans.^{12-14,33} These results parallel the ones

above described as a similar increase in sCysC takes place in dogs after oral prednisone administration for 7 days at 4 mg/kg/24 hours; this finding is not related to impaired glomerular filtration as serum creatinine, urea and UP/C remain within reference ranges in all groups (Table 2). As previously mentioned, sCysC has been demonstrated to be an earlier indicator of decreased glomerular function compared to creatinine.^{34,35} However, exogenous corticoid administration does not seem to induce a raise in sCysC by decreasing the GFR. Instead, other mechanisms have been proposed, for example Bjarnadóttir et al., in 1995¹⁵ demonstrated that in vitro addition of dexamethasone to HeLa cells induced a dose-dependent increase Cys-C secretion in culture after 40 hours. The authors suggested that the increase observed in Cys-C was due to a corticoid-related stimulatory effect on the Cys-C gene promoter, thus increasing the transcription of the Cys-C gene. In methylprednisolone-treated asthma patients, the raise observed in sCysC has also been related to the pathogenesis of the process, as it is actively secreted by macrophages in the alveolus.¹⁰ Although the pathologic causes, dosages, and administration schedule vary between veterinary and human medicine, and with the ones used in the present study, these results show that sCysC significantly increases after exogenous glucocorticoid administration in dogs. These results showed that sCysC significantly increased at day 7 (4 mg/kg/d prednisone) and decreased to basal values at day 14 when the dose was reduced to half (2 mg/kg/d prednisone) and further decreased after treatment withdrawal (Fig. 1). These results parallel those of Risch et al.¹⁶ who demonstrated that in humans subjected to kidney transplantation sCysC was higher in patients treated with corticosteroids and raised with increasing glucocorticoid doses. Similar results were reported by Pöge et al.³⁶ who described that, in patients subjected to kidney transplantation treated with 500 mg of methylprednisolone, sCysC peaked after 24 hours and that this rise was dose-dependent. Interestingly, these results demonstrate that in dogs diagnosed with PDH in which

endogenous corticosteroid production is altered (mean pre-ACTH cortisol of $8.7 \pm 1.2 \mu\text{g/dL}$; $n = 20$), and sCysC values are not significantly different than those obtained in the control group ($P > 0.05$; Fig. 1). These results are in agreement with a recent report by Marynissen et al.⁵⁷ who demonstrated that in dogs affected with hyperadrenocorticism followed for 12 months, sCysC values were not significantly different compared to healthy dogs. In view of these results and previous publications,³⁵ it can be concluded that exogenous administration of corticosteroids increases sCysC in a dose-dependent fashion, but impaired endogenous production of corticosteroids does not alter sCysC. Hence, these results suggest that in dogs affected with PDH, the endogenous corticosteroid production is not sufficiently high to induce a raise in sCysC and that there is a threshold below which glucocorticoids do not alter this parameter (Fig. 1). In view of these results, the high immunosuppressive corticosteroid doses used in dogs (4 mg/kg) induce significant sCysC rise, while low immunosuppressive doses (2 mg/kg) do not. However, it remains to be studied if corticosteroid influence over sCysC is transitory in dogs, as previously observed in human patients affected with lupus nephritis chronically treated with corticoids.³⁸

In conclusion, oral prednisone administration increases sCysC in the canine species, and this rise seems to be dose-dependent; however, altered sCysC was not observed in dogs showing impaired endogenous corticosteroid production due to PDH. Hence, these results need to be considered when interpreting sCysC values in dogs receiving corticosteroid therapy.

Footnotes

^a Prednisona Alonga; sanofi-aventis, S.A., Barcelona, Spain

^b Nuvacthen Depot; Sigma-Tau Laboratory, Madrid, Spain

Acknowledgments

Beatriz Macías-García holds a postdoctoral grant Juan de la Cierva Incorporación IJCI-2014-19428 from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness.

Conflict of Interest Declaration: Authors declare no conflict of interest.

Off-label Antimicrobial Declaration: Authors declare no off-label use of antimicrobials.

References

1. Braum JP, Lefebvre HP. Kidney function and damage. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. London: Elsevier; 2008:485–528.
2. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990;268:287–294.
3. Royakkers AA, Korevaar JC, Van Suijlen JD, et al. Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury

and renal replacement therapy. *Intensive Care Med* 2011;37:493–501.

4. Knight EL, Verhave JC, Spiegelman D, et al. Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement. *Kidney Int* 2004;65:1416–1421.

5. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000;37:49–59.

6. Vinge E, Lindergard B, Nilsson-Ehle P, Grubb A. Relationships among serum cystatin C, serum creatinine, lean tissue mass and glomerular filtration rate in healthy adults. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:587–592.

7. Newman JD. Cystatin C. *Ann Clin Biochem* 2002;39:83–104.

8. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *J Clin Lab Invest* 1985;45:97–101.

9. Lamb EJ, Oriordan SE, Webb MC, Newman DJ. Serum cystatin C may be a better marker of renal impairment than creatinine. *J Am Geriatr Soc* 2003;51:1674–1675.

10. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, et al. Serum cystatin C, a potent inhibitor of cysteine proteinases, is elevated in asthmatic patients. *Clin Chim Acta* 2000;300:83–95.

11. Bökenkamp A, van Wijk JA, Lentze MJ, Stoffel-Wagner B. Effect of corticosteroidtherapy on serumcystat in C and beta2-microglobulin concentrations. *Clin Chem* 2002;48:1123–1126.

12. Risch L, Saely C, Reist U, et al. Course of glomerular filtration rate markers in patients receiving high-dose glucocorticoids following subarachnoidal hemorrhage. *Clin Chim Acta* 2005;360:205–207.

13. Manetti L, Genovesi M, Pardini E, et al. Early effects of methylprednisolone infusion on serum cystatin C in patients with severe Graves' ophthalmopathy. *Clin Chim Acta* 2005;356:227–228.

14. Zhai JL, Ge N, Zhen Y, et al. Corticosteroids significantly increase serum Cystatin C concentration without affecting renal function in symptomatic heart failure. *Clin Lab* 2016;62:203–207.

15. Bjarnadóttir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55:617–623.

16. Risch L, Herklotz R, Blumberg A, Huber A. Effects of glucocorticoid immunosuppression on serum cystatin concentrations in renal transplant patients. *Clin Chem* 2001;47:2055–2059.

17. Laterza O, Price C, Scott M. Cystatin C: An improved estimator of glomerular filtration rate? *Clin Chem* 2002;48:699–707.

18. Wesli P, Schwegler B, Spinas G, Schmid C. Serum cystatin C is sensitive to small changes in thyroid function. *Clin Chim Acta* 2003;338:87–90.

19. Demirtas S, Akan O, Can M, et al. Cystatin C can be affected by non renal factors: A preliminary study on leukemia. *Clin Biochem* 2006;39:115–118.

20. Rule A, Bergstralh E, Slezak J, et al. Glomerular filtration rate estimated by cystatin C among different clinical presentations. *Kidney Int* 2006;69:399–405.

21. Madero M, Wassel C, Peralta C, et al. Cystatin C associates with arterial stiffness in older adults. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1086–1093.

22. Filler G, Priem F, Lepage N, et al. Beta-trace protein, cystatin C, beta(2)-microglobulin, and creatinine compared for detecting impaired glomerular filtration rates in children. *Clin Chem* 2002;48:729–736.

23. Braun JP, Perxachs A, Pechereau D, De La Farge F. Plasma cystatin C in the dog: Reference values and variations with renal failure. *Comp Clin Pathol* 2002;11:44–49.

24. Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2008;44:131–138.
25. Pagitz M, Frommlet F, Schwendenwein I. Evaluation of biological variance of cystatin C in comparison with other endogenous markers of glomerular filtration rate in healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2007;21:936–942.
26. Antognoni MT, Siepi D, Porciello F, et al. Serum cystatin-C evaluation in dogs affected by different diseases associated or not with renal insufficiency. *Vet Res Commun* 2007;31:269–271.
27. Pasa S, Bayramli G, Atasoy A, et al. Evaluation of serum cystatin-C in dogs with visceral leishmaniasis. *Vet Res Commun* 2009;33:529–534.
28. Séronie-Vivien S, Delanaye P, Piéroni L, et al. Cystatin C: Current position and future prospects. *Clin Chem Lab Med* 2008;46:1664–1686.
29. Choi J, Kim H, Yoon J. Ultrasonographic adrenal gland measurements in clinically normal small breed dogs and comparison with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Med Sci* 2011;73:985–989.
30. Almy FS, Christopher MM, King DP, Brown SA. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* 2002;16:45–51.
31. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, Aguilera M, Sandoval S Eds. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: aspectos generales sobre la validación de métodos. Guía técnica editada por el Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. <http://www.ispch.cl/content/guia-tecnica-de-validacion-de-metodos-y-determinacion-de-la-incertidumbre-de-la-medicion>.
32. Smets PM, Lefebvre HP, Kooistra HS, et al. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *Vet J* 2012;192:532–534.
33. Risch L, Huber AR. Glucocorticoids and increased serum cystatin C concentrations. *Clin Chim Acta* 2002;320:133–134.
34. Roos JF, Doust J, Tett SE, Kirkpatrick CM. Diagnostic accuracy of cystatin C compared to serum creatinine for the estimation of renal dysfunction in adults and children—a meta-analysis. *Clin Biochem* 2007;40:383–391.
35. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: A meta-analysis. *Am J Kidney Dis* 2002;40:221–226.
36. Pöge U, Gerhardt T, Bökenkamp A, et al. Time course of low molecular weight proteins in the early kidney transplantation period—influence of corticosteroids. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19:2858–2863.
37. Marynissen SJJ, Smets PMY, Ghys LFR, et al. Long-term follow-up of renal function assessing serum cystatin C in dogs with diabetes mellitus or hyperadrenocorticism. *Vet Clin Pathol* 2016;45:320–329.
38. Vinicius M, Moscoso G, Kiyomi S, Mastroianni G. Are serum cystatin C levels influenced by steroid doses in lupus nephritis patients? *J Bras Nefrol* 2011;33:306–312.

