



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRICK EUGÊNIO LUZ

**PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E AVALIAÇÃO
CARDÍACA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR
*LEPTOSPIRA SPP.***

LONDRINA
2022

PATRICK EUGÊNIO LUZ

**PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E AVALIAÇÃO
CARDÍACA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR
*LEPTOSPIRA SPP.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Mendes Pereira

LONDRINA
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Luz, Patrick Eugênio.

Parâmetros hemostáticos e avaliação cardíaca em cães naturalmente infectados por *Leptospira* spp.. / Patrick Eugênio Luz. - Londrina, 2022.
68 f.

Orientador: Patrícia Mendes Pereira.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Miocardite - Tese. 2. Leptospirose - Tese. 3. Troponina - Tese. 4. Função diastólica - Tese. I. Pereira, Patrícia Mendes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

PATRICK EUGÊNIO LUZ

**PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E AVALIAÇÃO
CARDÍACA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR
*LEPTOSPIRA SPP.***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Orientadora: Profa. Dra. Patrícia
Mendes Pereira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Danielle Venturini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Lucas Alécio Gomes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser meu alicerce e sempre estar do meu lado, mesmo quando tudo parecia impossível.

Agradeço aos meus pais, Alceu e Yolanda, que em vida lutaram para que eu pudesse seguir nos estudos, mesmo em meio às dificuldades, nunca deixaram de me incentivar a buscar uma vida melhor. Foram verdadeiros exemplos de heróis. Meu pai nunca deixou de trabalhar e sustentar a casa, mesmo doente batalhava, me levava ao colégio aos domingos e nunca hesitou em me fornecer tudo que eu precisava e além, mesmo que eu não tenha sido um exemplo de filho e muitas vezes não merecesse. Você disse, antes de entrar naquela UTI, que eu já estava “encaminhado”, tudo graças a você, pai. Minha mãe, que mesmo com seu jeito duro, nunca deixou de me apoiar, me tratava como o seu “coração de abobra”, me ensinou a amar e respeitar. Em seu leito de morte oramos juntos, nos despedimos, mas o vazio nunca se foi. Sinto sua falta todos os dias, obrigado por me fazer um homem melhor. É tudo por vocês e para vocês, saudades eternas.

Agradeço ao meu companheiro incrível, Kaique, que tem suportado ao meu lado todos os momentos de dificuldade, desde a residência. Você é a minha metade especial, a pessoa que veio para arrumar a bagunça que era a minha vida. Deus não poderia ter escolhido ninguém melhor. Você é quem me faz rir, me faz leve, e é o primeiro a vibrar com as minhas conquistas. Obrigado por ser esse parceiro de vida incrível e obrigado por ser o melhor pai para os nossos filhos de quatro patas. O que teriam sido todos esses anos sem você? Que venham muitos anos ao seu lado, cheio de conquistas para nós dois.

Agradeço aos meus filhos felinos: Shamú, Hydra e Sírius. Vocês não fazem ideia do quanto eu amo vocês, o quanto eu conto as horas para chegar em casa e dar um cheiro em cada um, o quanto eu quero dar tudo de melhor, todos os dias para vocês. Hydra, com seu jeito todo de Kaique, mas que ama mesmo é dormir com o papai. Sírius, com seu amor de caçula mimado, como eu amo conversar com você e te apertar. Shamú, aquele que esteve comigo nos piores momentos da minha vida, e nunca, jamais saiu do meu lado, e assim é até hoje. Eu amo vocês.

Agradeço às minhas amigas Guta e Emmy, que mesmo distantes mostraram seu apoio constantemente e nunca me deixaram desistir. Eu amo vocês

demais e sinto muita falta de ter vocês aqui comigo.

Agradecimento especial para a minha pessoa, Ana Paula, que sempre esteve comigo nesses últimos quatro anos, sendo a melhor amiga que uma pessoa pode ter. Obrigado por ser quem você é, por ser minha dupla constantemente nesse HV. Você não tem ideia da importância que tem na minha vida, te amo. Aproveitando o gancho, preciso agradecer a minha master estagiária amiga Mariana. Obrigado por sempre estar onde eu preciso e nunca negar uma ajudinha no experimento. Você fez toda a diferença, não apenas para que esse trabalho nascesse, mas desde quando me acompanhava sempre nos plantões do HV.

Agradeço a todos os professores e funcionários do Hospital Veterinário da UEL, vocês são muito importantes para a minha formação. Tenham certeza de que eu aprendi com cada um de vocês e ainda aprendo, diariamente.

Agradeço ao Prof. Lucas, que durante a residência se tornou um grande amigo. Sinto falta de ir discutir um caso na sua sala e ficar horas pensando em todas as possibilidades, e sinto muita falta de desobstruir um gato com o senhor durante o plantão (embora nem adiantasse querer brigar, o senhor sempre que iria desobstruir).

Agradeço ao professor Fábio, esse ser iluminado que cruzou as nossas vidas trazendo muito conhecimento, muita diversão e muita ciência! O senhor não deve ter noção do quando é extremamente importante em nossas vidas e do quanto foi capaz de mudar elas. Obrigado por me fazer amar a cardiologia, por literalmente pegar na minha mão e me ensinar cada passo dessa carreira incrível. Gratidão.

Por último, preciso agradecer a minha mãe científica. Quem diria, 10 anos de parceria sendo completados esse ano. Eu não ganhei apenas uma professora que me orienta a tanto tempo, ganhei uma mãe, uma amiga, um exemplo de pessoa. A senhora é extremamente importante e responsável pelo Patrick de hoje, e não tem agradecimento que eu faça que seja capaz de superar isso. Muito obrigado por pegar na minha mão e me levantar quando eu mais precisei, obrigado por me fazer subir degrau a degrau e chegar até aqui. Perdão pelas vezes que fracassei. Te amo demais e que venham muitos e muitos anos de parceria na

Hematologia e Medicina Transfusional.

Agradeço à profa. Luciene, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, pela ajuda fundamental com o laboratório de Leptospirose e por todas as dúvidas que surgiram ao longo do caminho. E claro, agradeço à Cris pelos exames realizados.

Agradeço também a Profa. Daniele Venturini, do Departamento de Patologia, Análises Clínicas e toxicológicas, do centro de ciências da saúde (CCS), por segurar nossa mão e aceitar a dosar as troponinas. Sua ajuda foi fundamental para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradecimento especial ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por todo o empenho por manter o funcionamento do programa e das pesquisas durante a pandemia, em especial ao Prof. João Luiz, que sempre nos ajudou em tudo que precisávamos e agradeço ao Departamento de Clínicas Veterinárias, setor de Clínica Médica de Animais de Companhia, professores e residentes pelo apoio durante essa pesquisa.

Agradeço ao CNPq pela concessão de bolsa durante todo o período de estudo, sendo fundamental para realização da pesquisa durante todo esse período pandêmico.

LUZ, Patrick Eugênio. **Parâmetros hemostáticos e avaliação cardíaca em cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.***. 2022. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A leptospirose é uma doença de caráter zoonótico com distribuição global, sendo endêmica em países tropicais. Alguns estudos têm demonstrado a associação entre a doença e a ocorrência de miocardite, que se trata de uma lesão miocárdica aguda que pode ser causada por diversas doenças infectocontagiosas, que pode levar a insuficiência cardíaca, arritmias e ao óbito. Sendo assim, objetivou-se a avaliar os parâmetros hemostáticos e os achados preditivos de miocardite em cães com infecção por *Leptospira spp.* Foi realizado um estudo transversal avaliando dezesseis cães, sendo sete saudáveis, constituindo o grupo controle (GC) e nove cães com leptospirose, constituindo o grupo leptospirose (GL). Foram realizados aferição da pressão arterial sistêmica (PAS), mensuração do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), dosagem de creatinoquinase fração MB (CK MB) e troponina cardíaca I (cTnI), eletrocardiografia e ecodopplercardiografia convencional. Os exames foram realizados logo após a admissão dos pacientes. Os valores de dados foram submetidos ao teste normalidade de Shapiro Wilk e homogeneidade de variâncias Levene. Variáveis paramétricas foram submetidas ao teste t de Student e, quando significativas, ao teste de correlação de Pearson. Variáveis não paramétricas foram submetidas ao teste de Mann-Whitney e, quando significativas, ao teste de correlação de Spearman. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. A média de idade do GL foi de $6,25 \pm 3,41$ anos e de peso foi de $12,1 \pm 4,98$ kg, do GC a média de idade foi $2,29 \pm 1,5$ anos e média de peso de $14,9 \pm 10,1$ kg. Cães com leptospirose apresentaram maiores valores de cTnI (GC: $0,004 \pm 0,002$ ng/ml; GL: $0,22 \pm 2,70$ ng/ml, $p = 0,001$), PAS (GC: $130 \pm 23,8$ mmHg; GL: $178 \pm 34,1$ mmHg; $p = 0,009$), duração do complexo QRS (GC: $41,4 \pm 3,64$ ms; GL: $50,0 \pm 5,17$ ms, $p = 0,002$), duração do intervalo QT (GC: 164 ± 13 ms, GL: $225 \pm 24,3$ ms, $p < 0,001$) e espessura do septo interventricular em diástole normalizada pelo peso (GC: $0,34 \pm 0,15$ mm; GL $0,54 \pm 0,20$ mm; $p = 0,031$) quando comparados ao GC. 5/9 cães apresentaram diagnóstico possível de miocardite. Observou-se correlação negativa entre os valores de cTnI e relação Em/Am septal ($p = 0,007$; $\rho = - 0,601$) e cTnI e relação Em/Am parietal ($p = 0,001$, $\rho = - 0,703$). Os valores de PAS se correlacionaram negativamente com os valores da relação Em/Am septal ($p = 0,020$; $r = - 0,592$) e parietal ($p = 0,004$; $r = - 0,693$), e positivamente com a duração do complexo QRS ($p = <0,001$; $r = 0,766$). Conclui-se que a leptospirose gera distúrbios de coagulação e alterações cardíacas, evidenciadas principalmente pela disfunção diastólica e aumento da troponina.

Palavras-chave: Miocardite. Leptospirose. Troponina. Função diastólica. Ecocardiografia.

LUZ, Patrick Eugênio. **Hemostatic parameters and cardiac evaluation in dogs naturally infected by *Leptospira spp.***. 2022. 69p. Dissertation (Master's degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, ano de realização.

ABSTRACT

Leptospirosis is a zoonotic disease with a global distribution, being endemic in tropical countries. Some studies have demonstrated the association between the disease and the occurrence of myocarditis, which is an acute myocardial injury that can be caused by several infectious diseases, which can lead to heart failure, arrhythmias and death. Therefore, the objective was to evaluate the hemostatic parameters and the predictive findings of myocarditis in dogs infected with *Leptospira spp.* A cross-sectional study was carried out evaluating sixteen dogs, seven of them healthy, constituting the control group (GC) and nine dogs with leptospirosis, constituting the leptospirosis group (GL). Measurements of systemic blood pressure (SBP), prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), measurement of creatine kinase fraction MB (CK MB) and cardiac troponin I (cTnI), electrocardiography and conventional echocardiography were performed. The exams were performed soon after the patients' admission. The data were submitted to the Shapiro Wilk normality test and Levene homogeneity of variances. Parametric variables were submitted to Student's t test and, when significant, to Pearson's correlation test. Nonparametric variables were submitted to the Mann-Whitney test and, when significant, to the Spearman correlation test. Differences were considered significant when the p value was less than 0.05. The mean age of the GL was 6.25 ± 3.41 years and the mean weight was 12.1 ± 4.98 kg, the mean age of the GC was 2.29 ± 1.5 kg and the mean weight was 14.9 ± 10.1 . Dogs with leptospirosis had higher cTnI values (GC: 0.004 ± 0.002 ng/ml; GL: 0.22 ± 2.70 ng/ml, $p = 0.001$), SBP (GC: 130 ± 23.8 mmHg; GL: 178 ± 34.1 mmHg; $p = 0.009$), QRS complex duration (GC: 41.4 ± 3.64 ms; GL: 50.0 ± 5.17 ms, $p = 0.002$), QT interval duration (GC: 164 ± 13 ms, GL: $225 \pm 24, 3$ ms, $p < 0.001$) and interventricular septum thickness in diastole normalized by weight (GC: 0.34 ± 0.15 mm; GL 0.54 ± 0.20 mm; $p = 0.031$) when compared to GC. 5/9 dogs had a possible diagnosis of myocarditis. A negative correlation was observed between cTnI and septal Em/Am ratio ($p = 0.007$; $\rho = -0.601$) and cTnI and parietal Em/Am ratio ($p = 0.001$, $\rho = -0.703$). The SBP values correlated negatively with the values of the Septal ($p = 0.020$; $r = -0.592$) and parietal ($p = 0.004$; $r = -0.693$) ratio, and positively with the duration of the QRS complex ($p = <0.001$; $r = 0.766$). It is possible to conclude that leptospirosis generates coagulation disorders and cardiac alterations, evidenced mainly by diastolic dysfunction and increase in troponin.

Key-words: Myocarditis. leptospirosis. Troponin. Diastolic function. Echocardiography.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação gráfica dos valores de creatinoquinase fração MB (CK MB) (A) e troponina cardíaca I (cTnI) (B) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).....51
- Figura 2** – Representação gráfica dos valores de pressão arterial sistêmica (PAS) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).52
- Figura 3** – Representação gráfica da duração (ms) do complexo QRS (A) e segmento QT (B) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose)..... 53
- Figura 4** – Representação gráfica mostrando a correlação negativa existente entre os valores de troponina cardíaca I (cTnI) e os valores da relação Em/Am septal (A) e da cTnI com a relação Em/Am parietal (B), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).56
- Figura 5** – Representação gráfica mostrando a correlação negativa existente entre os valores de pressão arterial sistêmica (PAS) e os valores da relação Em/Am septal (A) e da PAS com a relação Em/Am parietal (B), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose). 56
- Figura 6** – Representação gráfica mostrando a correlação positiva entre os valores de pressão arterial sistêmica (PAS) e os valores da duração do complexo QRS (ms), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose)..... 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variáveis ecocardiográficas de cães híidos (GC) e cães com leptospirose (GL).....	54
Tabela 2 – Avaliação da função diastólica de cães híidos (GC) e cães com leptospirose (GL).....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Proposta de critérios maiores e menores para diagnóstico <i>antemortem</i> de miocardite em cães.	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
AE	Átrio esquerdo
ALT	Alanina aminotransferase
AO	Aorta
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BPM	Batimentos por minuto
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CID	Coagulação intravascular disseminada
CK	Creatinoquinase
CK MB	Creatinoquinase fração MB
cm/seg	Centímetros por segundo
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
cTnl	Troponina cardíaca I
cTnT	Troponina cardíaca T
DIVED	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole
DIVEDN	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado pelo peso
DIVES	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole
DIVESN	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole normalizado pelo peso
DRC	Doença renal crônica
ECG	Eletrocardiografia
EPLVED	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole
EPLVEDN	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole normalizada pelo peso
EPLVES	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole
EPLVESN	Espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole normalizada pelo peso
ESIVD	Espessura do septo interventricular em diástole
ESIVDN	Espessura do septo interventricular em diástole normalizada pelo peso

ESIVS	Espessura do septo interventricular em sístole
ESIVDN	Espessura do septo interventricular em sístole normalizada pelo peso
FA	Fosfatase alcalina
FE	Fração de ejeção
FS	Fração de encurtamento
g/dL	Gramas por decilitros
GC	Grupo controle
GL	Grupo leptospirose
IRA	Insuficiência renal aguda
LDH	Lactato desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MCE	Microscopia de campo escuro
mg/dL	Miligramas por decilitros
mm	Milímetros
mm ³	Milímetros cúbicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	Pressão arterial sistêmica
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PVAO	Pico de velocidade transaórtico
PVPUL	Pico de velocidade transpulmonar
SAM	Soroagutinação microscópica
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TP	Tempo de protrombina
TTPa	Tempo de tromboplastina parcial ativada
U/L	Unidades por litro
Vmáx	Velocidade máxima

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERÊNCIAL TEÓRICO	17
2.1	LEPTOSPIROSE	17
2.1.1	Epidemiologia.....	17
2.1.2	Fatores de risco.....	18
2.1.3	Patogenia	19
2.1.4	Sinais clínicos	20
2.1.5	Diagnóstico	20
2.1.6	Tratamento	23
2.2	MIOCARDITE.....	24
2.3	BIOMARCADORES DE LESÃO CARDÍACA	27
2.4	TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA	29
3	REFERÊNCIAS	32
4	HIPÓTESE	40
5.	OBJETIVOS	41
5.1	OBJETIVO GERAL.....	41
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
6	ARTIGO – Parâmetros hemostáticos e avaliação cardíaca em cães naturalmente infectados por <i>Leptospira Spp.</i>	42
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS/CONCLUSÃO	65
	ANEXOS	66
	ANEXO I – Aprovação CEUA.....	67
	ANEXO II – Normas para publicação	68

1 INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma zoonose de distribuição mundial, ocasionada pelas bactérias do gênero *Leptospira spp.*, sendo classificadas em mais de 250 sorovares (LEVETT, 2001). A doença é endêmica em países tropicais, principalmente devido a fatores como altos níveis de pluviosidade, temperaturas elevadas e condições sanitárias precárias (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; JORGE *et al.*, 2017).

Todos os mamíferos domésticos ou selvagens podem ser reservatórios da doença (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; ANDERSEN-RANBERG; PIPPER; JENSEN, 2016). Em cães os sinais clínicos estão principalmente relacionados à lesão renal aguda (SYKES *et al.*, 2011; SILVESTRINI; HEINEMANN; DE CASTRO, 2019). Nos rins as bactérias se replicam nos túbulos, conduzindo a produção de citocinas, quimiotaxia de células inflamatórias, necrose, apoptose de células epiteliais e nefrite aguda. Devido a inflamação do órgão há diminuição na perfusão renal com consequente diminuição da taxa de filtração glomerular. Além disso, as lesões no endotélio resultam em isquemia no parênquima renal (GOLDSTEIN, 2010; GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015).

O diagnóstico laboratorial se dá pela soroaglutinação microscópica (SAM), técnica eleita como padrão ouro pela Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo o teste sorológico mais utilizado devido à facilidade e baixo custo para realização, porém é necessária cautela e associação com os achados clínicos e laboratoriais para um diagnóstico preciso, visto que a SAM detecta anticorpos e estes aparecem na circulação entre os seis e 12 primeiros dias pós-infecção, com títulos máximos entre a terceira e quarta semana, declinando nas semanas seguintes e podendo permanecer por meses a anos (FAINE, 1982; BRASIL, 2004; SIMÕES *et al.*, 2016).

Na década de 90, foram publicados dois estudos em humanos associando as formas graves de leptospirose à miocardite, incluindo com insuficiência renal, com taxa de letalidade de 40% em um dos estudos e síndrome hemorrágica em outro (ESCOSTEGUY *et al.*, 1991; HERDY *et al.*, 1993).

A miocardite se caracteriza por uma lesão miocárdica e pode ser desencadeada por diversas doenças infectocontagiosas, como a leishmaniose, parvovirose, toxoplasmose, neosporose, erliquiose, leptospirose e tripanossomíase

(MESECK *et al.*, 2005; MASTRORILLI *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2008; KJOS *et al.*, 2008; PALEYEV e PALEYEV, 2009; ROSA *et al.*, 2014; DETMER *et al.*, 2016; FORD *et al.*, 2017; MEYERS *et al.*, 2019).

Os sinais clínicos da miocardite são diversos, podendo se manifestar tanto com distúrbios de ritmo como com alterações semelhantes à cardiomiopatia dilatada (GUEDES *et al.*, 2009). Mendes e colaboradores (2014) relataram um caso de miocardite crônica em um cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, onde observaram desmaio, relatado em anamnese, cardiomegalia moderada mais pronunciada do lado esquerdo ao exame radiográfico, complexos ventriculares prematuros unifocais e sobrecarga atrial e ventricular esquerda no exame eletrocardiográfico. A análise de biomarcadores cardíacos revelou níveis aumentados de troponina cardíaca I (cTnI): 0,22 ng/ml (0 – 0,07 ng/ml), creatinoquinase fração MB (CK MB): 120,2 U/L (11 – 38,8 U/L) e creatinoquinase (CK): 553 U/L (20 – 220 U/L).

Recentemente, Lakhdhir e colaboradores (2020) avaliaram a apresentação clínica, achados cardiovasculares e etiologia em uma série de casos suspeitos e/ou confirmados de miocardite. Tal estudo possibilitou uma proposta de critérios maiores e menores para o diagnóstico de miocardite, dentre eles, elevação dos níveis de troponina cardíaca I (cTnI) acima de 1 ng/ml.

Altas concentrações de cTnI tem sido associada a inúmeras doenças cardíacas, como nas cardiomiopatias dilatada e hipertrófica, doença degenerativa da valva mitral, arritmias graves, miocardites, contusão cardíaca, dentre outras (VIDAL *et al.*, 2015). A liberação da cTnI na circulação está relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos, sendo que o aumento de sua concentração é proporcional a gravidade da lesão (COLLINSON; BOA; GAZE, 2001). Outro biomarcador é a CK MB. Em cães, há relatos de maior atividade da CK MB devido ao comprometimento do miocárdio secundário a parvovirose, dirofilariose, endocardite e cardiomiopatia hipertrófica (YONEZAWA *et al.*, 2010).

Wagenaar e colaboradores (2010) realizaram um estudo prospectivo com 52 pacientes humanos positivos para leptospirose em apresentação clínica grave, observando que a presença de sangramento grave estava associada a um tempo de protrombina (TP) elevado. Ainda em seu estudo, verificaram que o aumento de TP ou tempo de tromboplastina parcial ativado (TTPa) estava associado à maior mortalidade. O TTPa é utilizado para avaliação de alterações qualitativas e

quantitativas dos fatores da via intrínseca (XII, XI, IX e VIII) e da via comum (fibrinogênio, II, V e X), Já o TP avalia anormalidades da via extrínseca (VII) e na via comum (MCCONNELL, 2000, KAMAL *et al.*, 2007; BOAS, OLIVEIRA, 2014).

Considerando que a leptospirose, uma doença endêmica no Brasil que possui caráter zoonótico, pode resultar em miocardite e, que a miocardite é uma doença miocárdica grave e pouco estudada, o presente trabalho objetivou avaliar as alterações cardíacas e hemostáticas em cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.*, com a finalidade de descrever as alterações cardíacas e hemostáticas encontradas nesses pacientes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LEPTOSPIROSE

A leptospirose é uma doença de caráter zoonótico com distribuição global, ocasionada pelas bactérias do gênero *Leptospira spp.*, sendo classificadas em mais de 250 sorovares (LEVETT, 2001). As espécies são classificadas pela ocorrência de aglutinação antígeno-anticorpo quando em contato com soro específico, sendo o lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano o principal componente que induz a aglutinação (FRAGA *et al.*, 2015). Tal classificação atribui a denominação sorovar a um membro do gênero *Leptospira* que reaja com um soro monoclonal específico. Já os sorogrupos são um conjunto de sorovares cujos antígenos são comuns (GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015).

Várias tentativas de associar a apresentação clínica da infecção com um sorogrupo ou sorovar foram realizadas, porém sem sucesso. Isso porque sorovares pertencentes a um sorogrupo podem apresentar diferenças genéticas que determinam patogenicidade diferentes, assim como diferentes hospedeiros e reservatórios (GREENE *et al.*, 2012; LEVETT, 2015).

2.1.1 Epidemiologia

A doença é endêmica em países tropicais, principalmente devido a fatores como altos níveis de pluviosidade, temperaturas elevadas e condições sanitárias precárias (ADLER; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, 2010; JORGE *et al.*, 2017).

A transmissão pode ser direta ou indireta, sendo a primeira pelo contato com a urina de animais infectados e a segunda pelo contato com água ou solo contaminados (TRUEBA *et al.*, 2004; PICARDEAU, 2013). Os animais podem ser infectados por via oronasal quando entram em contato com fluidos corporais ou sangue de outros animais que estão em fase de bacteremia (GREENE *et al.*, 2012; FRAGA *et al.*, 2015). A infecção ocorre quando há o contato da bactéria com micro lesões cutâneas, contato com mucosas, conjuntiva ou inalação via aerossol (ZAIDI *et al.*, 2018).

Todos os mamíferos domésticos ou selvagens podem ser

reservatórios da doença, sendo que a infecção pode ser assintomática ou apresentar uma gama de sinais clínicos (KO; GOARANT; PICARDEAU, 2009; ANDERSEN-RANBERG; PIPPER; JENSEN, 2016).

Os hospedeiros reservatórios são adaptados à infecção por um determinado sorovar, desenvolvendo uma infecção persistente ou assintomática (GOLDSTEIN, 2010). A leptospira permanece nos túbulos renais desses animais de forma crônica, sendo excretada por meses a anos, o que contribui para a perpetuação da doença. Os hospedeiros acidentais podem desenvolver a doença de forma aguda ou subaguda, e ao contrário dos reservatórios, estes excretam a bactéria por um curto período na urina (FRAGA *et al.*, 2015). A mesma espécie animal pode ser considerada reservatório para um sorovar e hospedeiro acidental para outro sorovar (SCHULLER *et al.*, 2015; GOARANT, 2016).

Um solo de pH neutro ou ligeiramente alcalino permite a sobrevivência da bactéria, podendo sobreviver durante meses nesse ambiente. Embora possam sobreviver por muito tempo em um solo com tais características, a multiplicação dessas bactérias não ocorre no ambiente, sendo necessário a presença do hospedeiro reservatório (GREENE *et al.*, 2012; RAGHAVAN *et al.*, 2012).

Em cães os sinais clínicos estão principalmente relacionados à lesão renal e, em casos crônicos, esses animais podem eliminar a bactéria pela urina por longos períodos (SYKES *et al.*, 2011; SILVESTRINI; HEINEMANN; DE CASTRO, 2019).

2.1.2 Fatores de risco

Vários estudos têm sido realizados a fim de elucidar os fatores de risco da infecção por *Leptospirose* spp. envolvendo cães. Ward, Glickman, Guptill (2002) estudaram 677 cães diagnosticados com leptospirose e observaram que cães com idade entre quatro e 9,9 anos apresentam um risco maior de desenvolver a doença. Ainda em seu estudo, verificaram que cães de pastoreio, caça ou trabalho apresentaram maior risco de desenvolvimento da doença, independente do sexo.

Vários outros estudos têm demonstrado que cães machos possuem maior risco de infecção quando comparados com fêmeas (WARD, GLICKMAN, GUPTILL, 2002; KIKUTI *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2019; SMITH *et al.*, 2019). Outro

fator de risco muito comentado é em relação ao ambiente e condição climática, como áreas com altos níveis pluviométricos, cheias frequentes e má condições sanitárias (GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015; SMITH *et al.*, 2019).

2.1.3 Patogenia

As bactérias do gênero *Leptospira spp.* são capazes de infectar os animais pelo contato com a pele lesionada ou mucosas. Os mecanismos moleculares envolvidos na infecção ainda são desconhecidos, contudo, sabe-se que a motilidade da bactéria é um fator crucial na fase primordial da infecção, permitindo que as bactérias penetrem na pele do animal atravessando todas as camadas, assim como em diferentes tecidos (MURRAY, 2015).

As bactérias possuem a maioria dos genes relacionados a quimiotaxia, respondendo a vários estímulos, como por exemplo a hemoglobina. Dessa forma as bactérias são atraídas por lesões sanguinolentas, cujas barreiras cutâneas tenham sido danificadas (LAMBERT *et al.*, 2012; MURRAY, 2015).

Uma vez que a bactéria infecta o animal, o período de incubação é variável, durando em média sete dias. Isso se deve a vários fatores, como a dose infectante, imunidade do hospedeiro e cepa, o que também irá interferir na gravidade das lesões. No sangue, as bactérias se multiplicam e se disseminam rapidamente, atingindo diversos órgãos como rim, fígado e baço (GREENE *et al.*, 2012).

A adesão da bactéria às células endoteliais altera a permeabilidade endotelial, culminando em manifestações hemorrágicas. Tais lesões e a ativação plaquetária desencadeada pelo LPS bacteriano podem resultar em edema, vasculite e coagulação intravascular disseminada (CID). Essas alterações estão associadas à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e sepse (GOLDSTEIN, 2010; GREENE *et al.*, 2012; DE BRITO, SILVA, ABREU, 2018).

Nos rins as bactérias se replicam nos túbulos, conduzindo a produção de citocinas, quimiotaxia de células inflamatórias, necrose, apoptose de células epiteliais e nefrite aguda. Devido a inflamação do órgão há queda na perfusão renal com consequente diminuição da taxa de filtração glomerular. Além disso, as lesões no endotélio resultam em isquemia no parênquima renal (GOLDSTEIN, 2010; GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015).

Outro órgão muito afetado pela bactéria é o fígado, onde lesões

como necrose centrolobular, edema periportal, lesões em hepatócitos e infiltração de células inflamatórias podem estar presentes (GOLDSTEIN, 2010; SCHULLER *et al.*, 2015). McCallum e colaboradores (2018) demonstraram que a lesão hepática pode ser a única alteração em animais com leptospirose. Nesse estudo, 10 cães com a doença apresentaram apenas hepatite crônica, sem alterações renais, concluindo que a bactéria deve ser considerada como diagnóstico diferencial em cães com alterações hepáticas.

Com a recuperação do paciente e eliminação completa da bactéria do organismo, ainda há a probabilidade de que este apresente lesões irreversíveis, culminando na doença renal crônica (DRC).

2.1.4 Sinais clínicos

Infecções hiperagudas frequentemente culminam no óbito do paciente. Já infecções agudas podem iniciar com febre evoluindo para êmese, desidratação, linfadenopatia generalizada, dor muscular e dor à palpação abdominal. Hematêmese, hematoquezia, melena, epistaxis e petéquias surgem devido a alterações na hemostasia. Muitas vezes, devido ao rápido desenvolvimento da doença, sinais de insuficiência renal ou hepática não são observados (GREENE *et al.*, 2012; SYKES, 2014).

Cães com infecções subagudas apresentam anorexia, apatia, êmese, diarreia, desidratação, perda de peso e polidipsia. Muitos desses sinais estão relacionados à lesão renal, como a polidipsia que acontece de forma compensatória à poliúria decorrente da insuficiência renal. Mucosas congestas podem estar presentes, contudo, devido ao comprometimento hepático pode haver colestase intra-hepática, o que resulta em icterícia. Mucosas pálidas são muito comuns devido à anemia desencadeada pela doença (GREENE *et al.*, 2012; SYKES, 2014).

2.1.5 Diagnóstico

A anamnese constitui um ponto de extrema importância no diagnóstico da leptospirose, onde é possível encontrar um histórico de acesso à rua,

contato com fontes de água possivelmente contaminadas e contato com animais silvestres ou roedores. Como citado anteriormente, os sinais clínicos apresentados pelo paciente dependem de vários fatores, como a imunidade e a virulência do sorovar (GREENE *et al.*, 2012).

Anemia e trombocitopenia são frequentemente encontradas em cães com leptospirose. A anemia pode ser decorrente da lesão renal, com consequente redução na produção de eritropoetina, devido a perda de sangue por hemorragia pulmonar, gastrointestinal ou lesões decorrentes de coagulopatias, ou ainda consequência da hemólise causada pelo processo inflamatório intenso. A trombocitopenia resulta do consumo plaquetário devido às lesões endoteliais ou causas imunomediadas (GREENE *et al.*, 2012). Barthélemy e colaboradores (2017) relatam que 83% dos cães com a doença apresentavam alterações de coagulação, sendo que 23% apresentavam CID. Casos mais avançados da doença costumam apresentar leucocitose com desvio à esquerda, porém durante a fase de leptospiremia é comum se observar leucopenia (GREENE *et al.*, 2012; REAGAN, SYKES; 2019).

Na avaliação bioquímica, a azotemia pode estar presente em 80 a 100% dos cães com a doença enquanto a elevação de biomarcadores de lesão hepática está presente em cerca de 50% dos casos (McCALLUM *et al.*, 2019; REAGAN, SYKES; 2019).

As lesões hepáticas são observadas com a elevação da alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubinas, sendo que geralmente a elevação da FA é superior à ALT. O aumento da bilirrubina é proporcional à insuficiência hepática, atingindo a concentração máxima no soro entre o sexto e oitavo dia de infecção. Frequentemente observa-se hipoalbuminemia, que decorre da proteinúria, insuficiência hepática e anorexia (GREENE *et al.*, 2012; TANGEMAN, LITTMAN; 2013).

Quanto a avaliação radiográfica, cerca de 50 a 70% dos animais infectados apresentam alterações torácicas. Frequentemente observa-se padrão intersticial, alveolar ou vascular e efusão pleural que podem estar acompanhados de sinais clínicos respiratórios, como dispneia com padrão restritivo. Tais alterações na radiografia torácica se correlacionam com uma maior probabilidade de óbito (KOHN *et al.*, 2010; TANGEMAN, LITTMAN; 2013; KNÖPFLER *et al.*, 2017; REAGAN, SYKES; 2019).

A ultrassonografia abdominal é a modalidade de imagem mais utilizada na avaliação de animais com leptospirose, permitindo a detecção de alterações renais e hepáticas. Comumente observa-se renomegalia, hiperecogenicidade do córtex renal, hiperecogenicidade medular, dilatação de pelve renal e perda da definição cortico-medular no rim. Já no fígado é comum encontrar hepatomegalia e hipoeecogenicidade difusa, além do envolvimento da vesícula biliar, que pode apresentar lama biliar, espessamento de parede e aumento da ecogenicidade (GREENE *et al.*, 2012; MATTOON, NYLAND, 2014; PENNICK, D'ANJOU; 2015; SONET *et al.*, 2017; REAGAN, SYKES; 2019).

O baço é outro órgão que pode ser observado durante a ultrassonografia abdominal, podendo estar aumentado e com o parênquima heterogêneo nos casos de leptospirose (KNÖPFLER *et al.*, 2017; SONET *et al.*, 2017). Quanto a alterações gastrointestinais, 26% dos pacientes podem apresentar espessamento de parede gástrica, intestino delgado com espessamento de parede, aumento da ecogenicidade da mucosa e alterações peristálticas devido a inflamação, podendo contribuir para o surgimento de invaginações intestinais (SCHULZ *et al.*, 2010; SONET *et al.*, 2017).

Quanto ao diagnóstico definitivo, a SAM é a técnica eleita como padrão ouro pela OMS, sendo o teste sorológico mais utilizado devido à facilidade e baixo custo para realização, porém é necessário cautela e associação com os achados clínicos e laboratoriais para um diagnóstico preciso, visto que a SAM detecta anticorpos e estes aparecem na circulação entre os seis e 12 primeiros dias pós-infecção, com títulos máximos entre a terceira e quarta semana, declinando nas semanas seguintes e podendo permanecer por meses a anos (FAINE, 1982; BRASIL, 2004; SIMÕES *et al.*, 2016). Portanto, é preciso ficar atento ao período de soroconversão, pois este apresenta uma limitação ao diagnóstico, pois a SAM pode apresentar resultados negativos no estado inicial da doença, sendo o ideal a repetição do teste entre sete a 14 dias após o primeiro, bem como aumento de quatro vezes ao valor da titulação inicial é compatível com doença ativa (GREENE *et al.*, 2012; NILOOFA *et al.*, 2015; SCHULLER *et al.*, 2015).

Outro fator importante é a vacinação, visto que animais previamente vacinados podem apresentar titulação inferior a 1:800 para os sorovares contidos na vacina, porém sabe-se que essa titulação tende a diminuir em até quatro meses após a vacinação. Ainda que alguns sorovares não estejam incluídos na vacinação,

é possível encontrar titulação mesmo que não tenha ocorrido exposição natural, isso se deve à imunidade cruzada pós vacinação (SYKES, 2014; BOUVET *et al.*, 2020).

Outro teste ainda utilizado é a microscopia de campo escuro (MCE), que possibilita a visualização da espiroqueta, porém deve ser utilizada com cautela por ser um teste de avaliação morfológica. A urina deve ser analisada em até 30 minutos após sua colheita, pois o diagnóstico é baseado na motilidade e morfologia das espiroquetas. Vale ressaltar ainda dois aspectos importantes quanto a técnica: o observador deve ser experiente e que a leptospirúria ocorre de forma intermitente, o que pode resultar em falsos positivos ou negativos (FAINE, 1982; FAINE *et al.*, 1999; BRASIL, 2004).

A cultura e isolamento da bactéria é considerado um método definitivo de diagnóstico, contudo, o processo é muito demorado e de difícil acesso, o que inviabiliza sua utilização na prática clínica. Para que possa ser realizada, o sangue e a urina precisam ser obtidos de forma asséptica antes do início da terapia antimicrobiana, devendo ser enviados ao laboratório de forma refrigerada (GREENE *et al.*, 2012; REAGAN, SYKES; 2019).

2.1.6 Tratamento

De modo geral, o tratamento irá depender da apresentação clínica do paciente, com exceção da antibioticoterapia que deverá ser instituída em todos os casos. O tratamento suporte é voltado a amenizar as consequências das alterações renais e hepática, bem como a reidratação do paciente (GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015).

Frequentemente cães com leptospirose apresentam insuficiência renal aguda, com consequente oligúria ou anúria. Nesses casos o protocolo inicial visa a administração de soluções cristalóides. Em situações em que apenas a fluidoterapia não reverte a baixa produção urinária, diuréticos osmóticos como o manitol devem ser considerados na tentativa de aumentar a taxa de filtração glomerular. Outra possibilidade é o uso de diurético de alça, como a furosemida, que também é útil em casos de hipercalemia (SCHULLER *et al.*, 2015; LANGSTON, 2017).

Em decorrência da azotemia pode-se observar a presença de

gastrite e êmese, que devem ser tratados com protetores gástricos e antieméticos. A anorexia por sua vez, pode ser contornada com a utilização de tubos de alimentação, que conferem suporte nutricional adequado aos pacientes (GREENE *et al.*, 2012; SCHULLER *et al.*, 2015).

A antibioticoterapia é fundamental no tratamento da doença, sendo recomendados medicamentos derivados da penicilina e a doxiciclina. Vários são os protocolos que podem ser utilizados, desde a utilização da doxiciclina via oral durante todo o tratamento, como a utilização inicial de ampicilina intravenosa até que o paciente esteja se alimentando normalmente para que então seja iniciada a terapia com a doxiciclina. A utilização da doxiciclina tem demonstrado a eliminação da bactéria dos tecidos em três dias de uso, incluindo no rim (TRUCCOLO *et al.*, 2002; SYLKES *et al.*, 2011; GREENE *et al.*, 2012; ARGYLE *et al.*, 2017).

2.2 MIOCARDITE

A miocardite se caracteriza por uma lesão miocárdica, inicialmente inflamatória, desencadeada por diversas doenças infecciosas, como a leishmaniose, parvovirose, toxoplasmose, neosporose, erliquiose, leptospirose e tripanossomíase (MESECK *et al.*, 2005; MASTRORILLI *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2008; KJOS *et al.*, 2008; PALEYEV e PALEYEV, 2009; ROSA *et al.*, 2014; DETMER *et al.*, 2016; FORD *et al.*, 2017; MEYERS *et al.*, 2019). Outras causas incluem drogas, toxinas, doenças imunomediadas, traumas, insolação, choque hemodinâmico e miocardite idiopática (DINIZ *et al.*, 2008; SCHOBER, 2014; JANUS *et al.*, 2014).

Os sinais clínicos da miocardite são diversos, podendo se manifestar tanto com distúrbios de ritmo como com alterações semelhantes à cardiomiopatia dilatada (GUEDES *et al.*, 2009). As arritmias são comumente observadas em cães com miocardite, todavia a eletrocardiografia (ECG) apresenta baixa sensibilidade (MURPHY, NAKAMURA, 2018). Souza e colaboradores (2013) investigaram distúrbios de ritmo em 105 cães com leishmaniose, encontrando 14,3% com parada sinusal, 4,8% com bloqueio de ramo direito e 4,8% com complexos atriais prematuros.

Janus e colaboradores (2014), em seu estudo sobre miocardite em

11 cães, observaram ao exame ecocardiográfico sete cães com dilatação de câmara cardíaca, sugerindo cardiomiopatia dilatada, um cão com dilatação limitada do ventrículo esquerdo, um cão com hipertrofia da parede ventricular esquerda com regurgitação mitral, um cão com massa de etiologia desconhecida no ventrículo esquerdo e em um cão não foram encontradas alterações cardíacas. Já no exame eletrocardiográfico quatro cães foram diagnosticados com fibrilação atrial, três com taquicardia ventricular, um com complexos ventriculares prematuros e três não apresentaram distúrbios do ritmo.

Mendes e colaboradores (2014) relataram um caso de miocardite crônica em um cão infectado por *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, onde observaram os seguintes sinais clínicos: um episódio de desmaio relatado em anamnese, cardiomegalia moderada mais pronunciada do lado esquerdo ao exame radiográfico, complexos ventriculares prematuros unifocais e sobrecarga atrial e ventricular esquerda no exame eletrocardiográfico. A análise de biomarcadores cardíacos revelou níveis aumentados de troponina cardíaca I (cTnI): 0,22 ng/ml (0 – 0,07 ng/ml), creatinoquinase fração MB (CK MB): 120,2 U/L (11 – 38,8 U/L) e creatinoquinase (CK): 553 U/L (20 – 220 U/L).

Ribas e colaboradores (2015) descreveram um quadro de insuficiência cardíaca congestiva direita em um cão de nove anos de idade apresentando ascite, severa perda de peso, hiporexia e intolerância ao exercício. Neste paciente foi realizada radiografia torácica onde observou-se cardiomegalia severa, efusão pleural leve e possível linfadenopatia esternal. O cão foi tratado com furosemida e retornou após quatro dias apresentando linfonodos periféricos levemente aumentados e sons cardíacos abafados. O exame eletrocardiográfico confirmou ritmo sinusal com complexo QRS de baixa amplitude e o exame ecocardiográfico revelou ecogenicidade homogênea do miocárdio, grande quantidade de efusão pericárdica e moderada quantidade de efusão pleural, todos sinais sugestivos de miocardite. Após a morte do animal foi confirmado, por meio de cultura e identificação fúngica, a presença do fungo *Inonotus tropicalis*, associando a miocardite a este agente etiológico.

O diagnóstico da miocardite pode ser difícil, pois as manifestações clínicas e patológicas normalmente são inespecíficas. Usualmente se obtém um conjunto de dados, incluindo hemograma, creatininoquinase, concentração sérica de troponina cardíaca I, eletrocardiograma, ecocardiograma, hemocultura, triagem

sorológica para causas infecciosas e exame histopatológico. Atualmente a biópsia miocárdica é a única forma de se obter um diagnóstico *ante mortem* definitivo (BURGENER *et al.*, 2006; FONFARRA *et al.*, 2010; HAMACHER *et al.*, 2015; WARE, 2015).

Na década de 90, foram publicados dois estudos em humanos associando as formas graves de leptospirose à miocardite, incluindo com insuficiência renal, com taxa de letalidade de 40% em um dos estudos e síndrome hemorrágica em outro (ESCOSTEGUY *et al.*, 1991; HERDY *et al.*, 1993).

Recentemente, Lakhdhir e colaboradores (2020) avaliaram a apresentação clínica, achados cardiovasculares e etiologia de 64 cães com suspeita de miocardite *antemortem* (sendo 26 confirmados após o óbito) e 137 casos confirmados apenas no *post-mortem*. Na ocasião, observaram que 21% dos animais apresentaram febre, 19% sopro e em 90% dos cães a cTnI excedeu 1,0 ng/ml. Quanto a eletrocardiografia, os autores relataram que a ectopia ventricular foi a arritmia mais comum (54%), enquanto na ecocardiografia, a alteração mais observada foi a diminuição da função sistólica do ventrículo esquerdo. Ainda neste trabalho, um caso de miocardite foi atribuído a infecção por leptospirose.

A elaboração do trabalho de Lakhdhir e colaboradores (2020) possibilitou uma proposta de critérios maiores e menores para o diagnóstico de miocardite, levando em consideração diversos achados, como a concentração de cTnI, resultados positivos em hemocultura ou outros fluidos, presença de febre e sopro, hiperecogenicidade do miocárdio observada na ecocardiografia, presença de efusão pericárdica e arritmias ventriculares. Tais critérios estão apresentados no quadro 1.

Quadro 1 – Proposta de critérios maiores e menores para diagnóstico *antemortem* de miocardite em cães.

Critérios maiores

- A. cTnI > 1,0 ng/ml
 - B. Hemocultura ou outros fluidos positivos para bactérias típicas OU teste positivo para doenças infectocontagiosas (reação da cadeia de polimerase (PCR), sorologia de anticorpos, sorologia de antígeno, isolamento de vírus ou visualização microscópica) para outros organismos relatados como
-

causadores de miocardite em cães:

- A) Viral: parvovírus, cinomose, herpesvírus, vírus do Nilo Ocidental, coronavírus
- B) Bactérias atípicas: *Bartonella*, *Leptospira*, *Borrelia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia*
- C) Protozoários: *Trypanosoma*, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Leishmania*, *Babesia*, *Hepatozoon*
- D) Fungos/algas: *Blastomyces*, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Aspergillus*, *Prototheca* II

Critérios menores

- A) Febre acima de 39,1 °C
- B) Presença de sopro cardíaco novo ou que tenha se agravado
- C) Leucograma inflamatório, anemia, trombocitopenia ou hipoalbuminemia
- D) Arritmias ventriculares
- E) Função sistólica ventricular esquerda diminuída (FS <25%; FEVE <50%; VSF > 30% ou hipocinesia focal)*
- F) Miocárdio ventricular esquerdo heterogêneo
- G) Efusão Pericárdica

Possível diagnóstico

- A) Um critério maior e dois menores
- B) Quatro critérios menores

Diagnóstico definitivo

- A) Confirmação histopatológica por biópsia endomiocárdica
- B) Um critério maior e três menores

* FS, Fração de encurtamento; FEVE, Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; VSF, Volume sistólico final

Fonte: Adaptado de Lakhdir *et al.*, (2020)

2.3 BIOMARCADORES DE LESÃO CARDÍACA

Atualmente tem se falado muito da utilização de biomarcadores cardíacos, como a cTnl e a CK MB, que demonstram ser úteis na avaliação de lesões miocárdicas e sua extensão associada à doença cardíaca isquêmica, drogas cardiotoxícas, trauma torácico e miocardite (SCHOBER, 2010). Terri (2008)

considera que os biomarcadores de lesão miocárdica são as cTnI e as troponinas cardíacas T (cTnT), a mioglobina, a creatinofosfoquinase (CPK) e o lactato desidrogenase (LDH). Embora cães e gatos possam não apresentar cTnI na circulação, alguns animais apresentam traços, normalmente concentrações inferiores a 0,1ng/mL (SANTOS *et al.*, 2011).

Com o tecido lesionado, os miócitos necrosados liberam essas substâncias para o espaço intersticial, que podem ser mensuradas em situações normais ou patológicas (HENTSCHEL, 2003; OYAMA, REYNOLDS, 2008).

As troponinas cardíacas são as moléculas que ajudam a regular a excitação-contração nos sarcômeros cardíacos. Existem três subunidades principais dessas troponinas, sendo elas a cTnI, cTnT e cTnC, sendo as duas primeiras associadas a lesões cardíacas (MURPHY, NAKAMURA, 2018). A liberação da cTnI na circulação está relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos, sendo que o aumento de sua concentração é proporcional a gravidade da lesão (COLLINSON; BOA; GAZE, 2001). Altas concentrações de cTnI tem sido associada a inúmeras doenças cardíacas, como nas cardiomiopatias dilatada e hipertrófica, doença degenerativa da valva mitral, arritmias graves, miocardites, contusão cardíaca, dentre outras (FREITAS *et al.*, 2015).

A CPK é a enzima responsável por tornar a adenosina trifosfato (ATP) disponível para a contração muscular, por meio da fosforilação de adenosina difosfato (ADP) e creatina fosfato, sendo reconhecidas três isoformas dessa: CK-BB (CK1), predominante no cérebro e sistema digestório; CK-MB (CK-2), presente no tecido cardíaco, rins, intestinos, pulmões e uma pequena fração na musculatura esquelética, e CK-MM (CK-3), presente no músculo esquelético estriado (AKTAS, *et al.* 1993).

Há relatos em cães da maior atividade da CK-MB devido ao comprometimento do miocárdio secundário a parvovirose, dirofilariose, endocardite e cardiomiopatia hipertrófica (YONEZAWA *et al.*, 2010).

A CK-MB pode ser mensurada por meio de sua atividade sérica, testes bioquímicos ou pela concentração total (YONEZAWA *et al.*, 2010). Vidal e colaboradores (2015) utilizaram o método de ensaio imunométrico em fase sólida de quimioluminescência para determinação de CK-MB massa e cTnI.

Em um estudo com 40 cães que sofreram trauma torácico, verificou-se elevação da concentração sérica de cTnI em 18 desses animais, enquanto 14

apresentaram elevação de CK-MB e somente nove tinham valores aumentados de cTnT. Com os resultados encontrados, os pesquisadores concluíram que lesões miocárdicas são frequentes em cães que sofreram traumas torácicos e que a troponina I é o biomarcador mais sensível para detectar essas lesões (SCHOBER; KIRBACH; OECHTERING, 1999).

2.4 TEMPO DE PROTROMBINA E TEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL ATIVADA

A hemostasia é um processo fisiológico do organismo que objetiva a manutenção do fluxo e integridade vascular e o controle da hemorragia e trombose (SMITH, 2010). Os distúrbios hemostáticos são comuns em pequenos animais, podendo ser congênitos ou adquiridos. Tais distúrbios podem ser causados também por alterações vasculares, hepáticas ou renais (BAKER, 2015).

O sistema hemostático é dividido em: hemostasia primária, envolvendo as plaquetas e a parede vascular para formar o tampão plaquetário, a hemostasia secundária, responsável pela formação do coágulo através de fatores plasmáticos da coagulação e a hemostasia terciária ou fibrinólise que envolve as enzimas relacionadas ao processo fibrinolítico e os anticoagulantes naturais (PETERSON, COUTO, WELLMAN, 1995, VITAL, 2014).

A hemostasia primária consiste na adesão e agregação plaquetária, e formação do tampão plaquetário, anterior à formação do coágulo. A aderência das plaquetas no local da lesão estimula a liberação de adenina difosfato (ADP), que estimula a secreção de tromboxano A₂, causando vasoconstrição e recrutamento de novas plaquetas no local (WARE, 2015). A adesão plaquetária ao colágeno subendotelial ocorre pela ação de proteínas plasmáticas de adesão, fator de Von Willebrand e fibrinogênio (BROOKS, 2004; WARE, 2015).

O termo coagulopatia diz respeito à hemorragia excessiva decorrente de uma função anormal ou da ausência de um ou mais fatores de coagulação (SMITH, 2010). Os fatores de coagulação são ativados principalmente pela exposição à tromboplastina tecidual. Após a ativação inicial, com a produção de pequena quantidade de trombina, os fatores de coagulação são adicionalmente ativados por meio de alças de retroalimentação para aumentar o estímulo inicial, o

que culmina na conversão de fibrinogênio em fibrina e a formação de um coágulo de fibrina estável, juntamente com as plaquetas para ocluir o fluxo sanguíneo de um vaso lesionado (SMITH, 2010).

Lesões endoteliais resultam em alterações vasculares, como a vasoconstrição e a ativação da hemostasia (liberação de endotelina para que ocorra a vasoconstrição e tromboplastina para que ocorra a ativação da via extrínseca da cascata de coagulação), resultando na formação do coágulo (BROOKS, 2004; WARE, 2015).

O tampão plaquetário primário ocorre pela ligação entre o fibrinogênio e receptores de glicoproteínas IIb/IIIa aderidas à lesão endotelial. Após a formação deste tampão a hemostasia secundária se inicia. A hemostasia possui três vias interrelacionadas: intrínseca, extrínseca e a comum (BROOKS, WARE, 2015). As vias intrínseca e extrínseca convergem na via comum, onde é formado o complexo ativador da protrombina. Este complexo, na presença suficiente de cálcio iônico (Ca^{++}), promove a conversão da protrombina em trombina. A trombina por sua vez converte o fibrinogênio em monômeros de fibrina, que irá envolver as plaquetas e demais células sanguíneas para formar o coágulo (RAND, 1996; TROY, 1998; HALL; GUYTON, 2002).

Para a avaliação dos distúrbios hemostáticos é necessário o levantamento do histórico clínico, exame físico completo e testes laboratoriais específicos (DIAZ GONZÁLEZ; SILVA, 2008). Hemograma, biomarcadores hepáticos e renais, urinálise, ultrassonografia e radiografias são consideradas testes de triagem para o diagnóstico de distúrbios hemostáticos (BRITES, 2007).

A avaliação laboratorial dos distúrbios hemostáticos deve ser realizada a partir da contagem do número de plaquetas circulantes para verificação de distúrbios primários. Os métodos utilizados para a contagem pode ser o direto, pela contagem na câmara de Neubauer ou por um contador automatizado (LOPES *et al.*, 2005).

Para a avaliação dos distúrbios hemostáticos secundários, segundo Lubas e colaboradores (2010), os testes realizados são o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa), tempo de protrombina (TP) e dosagem de fibrinogênio. O TTPa é utilizado para avaliação de alterações qualitativas e quantitativas dos fatores da via intrínseca (XII, XI, IX e VIII) e da via comum (fibrinogênio, II, V e X), podendo ser utilizado para diagnóstico e acompanhamento da CID em pacientes críticos,

além de avaliar a possibilidade de estado de hipercoagulabilidade, o que pode estar associado ao desenvolvimento de trombos. Já o TP avalia anormalidades da via extrínseca (VII) e na via comum (MCCONNELL, 2000, KAMAL *et al.*, 2007; BOAS, OLIVEIRA, 2014).

As análises de TTPa e TP são realizadas *in vitro*, a partir de analisadores automatizados, utilizando-se reagentes padronizados para cada teste (PEIXE; RODRIGUES; GALVÃO, 2016). Os testes *in vitro* envolvem partes da cascata de coagulação, permitindo avaliar o tempo até a formação do coágulo (TSENG; HUGHES; GIGER, 2001). Os reagentes utilizados para a determinação do TTPa e TP são desenvolvidos para a utilização em plasma humano, sendo adaptados para o uso em cães (GREENE *et al.*, 2012). Esses reagentes permitem a determinação quantitativa de TTPa e TP, podendo ser utilizados de forma manual ou através de aparelhos automatizados ou semiautomatizados (MISCHKE, 2001; TSENG; HUGHES; GIGER, 2001).

Na medicina veterinária, estudos com a avaliação de TTPa e TP em cães com leptospirose são escassos, entretanto, na medicina humana vários estudos mostram a relação entre a leptospirose e as alterações de TTPa e TP. Chierakul e colaboradores (2008) realizaram um estudo prospectivo entre outubro de 2000 e setembro de 2001 na Tailândia com 79 pessoas com diagnóstico confirmado de leptospirose com o objetivo de avaliar os fatores de coagulação e a presença de CID. Neste estudo, observaram que os pacientes com a doença apresentavam contagem plaquetária significativamente menor do que o grupo controle ($p < 0,001$) e, TP e TTPa mais elevados ($p < 0,001$). Mais da metade dos pacientes apresentaram CID, entretanto a trombocitopenia foi o único fator relacionado à hemostasia independentemente associado ao sangramento clínico, concluindo que esta deve ser considerada como preditor de gravidade em pacientes positivos para a doença.

Wagenaar e colaboradores (2010) realizaram um estudo prospectivo com 52 pacientes humanos positivos para leptospirose e em apresentação clínica grave, observando que a presença de sangramento grave estava associada a um TP elevado. Ainda em seu estudo, verificaram que o aumento de TP ou TTPa estava associado à maior mortalidade.

Já Threeswaran e colaboradores (2020) incluíram em seu estudo 101 pacientes humanos com suspeita clínica de leptospirose, destes, 20 tiveram

confirmação laboratorial da doença, observando também elevação no TTPa nos quadros positivos da doença. Entretanto, quando classificaram a leptospirose em forma grave ou leve, observaram elevação do TP, concluindo que alterações nas avaliações convencionais para distúrbios de coagulação estão presentes nas infecções por *Leptospira spp.*

3 REFERÊNCIAS

ADLER, Ben; DE LA PEÑA MOCTEZUMA, Alejandro. Leptospira and leptospirosis. **Veterinary microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 287-296, 2010.

AKTAS, M. et al. Creatine kinase in the dog: a review. **Veterinary Research Communications**, v. 17, n. 5, p. 353-369, 1993.

ANDERSEN-RANBERG, Emilie U.; PIPPER, Christian; JENSEN, Per M. Global patterns of Leptospira prevalence in vertebrate reservoir hosts. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 3, p. 468-477, 2016.

Argyle SA, Batchelor D, Bexfield N, Chan DL, Featherstone H, Frowde P, Helm J, Hodgkiss-Geere H, Jackson H, Maddox T, et al. 2017. **BSAVA Small Animal Formulary**. Part A: Canine and Feline. 9th ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary. p.26; 133-134.

BARTHÉLEMY, A. et al. Hemorrhagic, hemostatic, and thromboelastometric disorders in 35 dogs with a clinical diagnosis of leptospirosis: a prospective study. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 31, n. 1, p. 69-80, 2017.

BOAS, Walkíria Wingester Vilas; OLIVEIRA, Gustavo Henrique Silva de. Perioperative blood coagulation monitoring. **Revista Médica de Minas Gerais**, [s.l.], v. 24, p. 20-29, 2014. GN1 Genesis Network.

BOUVET, J. et al. A canine vaccine against Leptospira serovars Icterohaemorrhagiae, Canicola and Grippotyphosa provides cross protection against Leptospira serovar Copenhageni. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 219, p. 109985, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net**. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leptopr.def> > . Acesso em: 06 jan. 2022.

BRITES, Márcia Gomes. Trombocitopenia imunomediada em cães: revisão bibliográfica e relatos de casos. 2007.

BROOKS, M. - Coagulopatias e Trombose. In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. - Tratado de medicina interna veterinária - Doenças do cão e do Gato. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan 5ª edição brasileira, 2004. Volume 2, p. 1927 - 1941.

BURGENER, Iwan A. et al. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 20, n. 2, p. 277-283, 2006.

CHIERAKUL, Wirongrong et al. Activation of the coagulation cascade in patients with leptospirosis. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 2, p. 254-260, 2008.

COLLINSON, P. O.; BOA, F. G.; GAZE, D. C. Measurement of cardiac troponins. **Annals of clinical biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 423–449, 2001.

DE BRITO, Thales; SILVA, Ana Maria Gonçalves da; ABREU, Patrícia Antonia Estima. Pathology and pathogenesis of human leptospirosis: a commented review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 60, 2018.

DETMER, Susan E. et al. Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 28, n. 2, p. 144-149, 2016.

DIAZ GONZÁLEZ, F. H.; SILVA, S. C. Patologia Clínica Veterinária: Texto Introdutório. **Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2008.

DINIZ, P. P. V. P. et al. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 5, p. 1136-1143, 2008.

ESCOSTEGUY, Cláudia Caminha et al. Análise do envolvimento cardíaco na leptospirose. **Arq. bras. méd.**, pág. 42-8, 1991.

FAINE, S. et al. Leptospira and leptospirosis, Melbourne. **Australia: MediSci**, v. 259, 1999.

FAINE, S. Guideline for control of leptospirosis. **World Health Organization Geneva**, v. 67, p. 129, 1982

FONFARA, S. et al. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 184, n. 3, p. 334-339, 2010.

FORD, Jordan et al. Parvovirus infection is associated with myocarditis and myocardial fibrosis in young dogs. **Veterinary pathology**, v. 54, n. 6, p. 964-971, 2017.

FRAGA, Tatiana Rodrigues et al. Leptospira and leptospirosis. In: **Molecular medical microbiology**. Academic Press, 2015. p. 1973-1990.

GOARANT, Cyrille. Leptospirosis: risk factors and management challenges in developing countries. **Research and reports in tropical medicine**, v. 7, p. 49, 2016.

GOLDSTEIN, Richard E. Canine leptospirosis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 40, n. 6, p. 1091-1101, 2010.

Greene CE, Sykes JE, Moore GE, Goldstein RE, Schultz RD. 2012. Leptospirosis. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p.431-447

GRIFFIN, Alison. Use of the D-dimer test in veterinary clinical practice. **Small Animal Medicine Chapter Meeting**, [s.i.], p.30-32, 2004. Levett, P.N., 2001. Leptospirosis.

Clinical Microbiology Reviews 14, 296–326.

GUEDES, Paulo MM et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 130, n. 1-2, p. 43-52, 2009.

HALL, J. E.; AC, Guyton. Hemostasia e coagulação sanguínea. **Tratado de fisiologia médica**, v. 12, p. 475-78, 2002.

HAMACHER, L. et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 1, p. 164-170, 2015.

HERDY, Gesmar Volga Haddad et al. Miocardite na leptospirose: correlação clínico-patológica de 14 casos. **Arq. bras. méd.** , pág. 79-84, 1993.

HENTSCHEL, José Luis López-Sendón. Troponinas y otros marcadores de daño miocárdico: Mitos y realidades. **Revista española de cardiología**, v. 56, n. 1, p. 16, 2003.

JANUS, Izabela et al. Myocarditis in dogs: etiology, clinical and histopathological features (11 cases: 2007–2013). **Irish veterinary journal**, v. 67, n. 1, p. 28, 2014.

JORGE, Sérgio et al. Human and animal leptospirosis in Southern Brazil: A five-year retrospective study. **Travel medicine and infectious disease**, v. 18, p. 46-52, 2017.

KAMAL, A. H.; TEFFERI, A.; PRUTHI, R. K. How to interpret and pursue an abnormal prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and bleeding time in adults. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2007. p. 864-873.

KIKUTI, M. et al. Occurrence and risk factors associated with canine leptospirosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, p. 124-127, 2012.

KJOS, S. A. et al. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. **Veterinary parasitology**, v. 152, n. 3-4, p. 249-256, 2008.

KNÖPFLER, S. et al. Evaluation of clinical, laboratory, imaging findings and outcome in 99 dogs with leptospirosis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 58, n. 10, p. 582-588, 2017.

KO, Albert I.; GOARANT, Cyrille; PICARDEAU, Mathieu. Leptospira: the dawn of the molecular genetics era for an emerging zoonotic pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 736-747, 2009.

KOHN, B. et al. Pulmonary abnormalities in dogs with leptospirosis. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 6, p. 1277-1282, 2010.

LAKHDIR, S. et al. Clinical presentation, cardiovascular findings, etiology, and

outcome of myocarditis in dogs: 64 cases with presumptive antemortem diagnosis (26 confirmed postmortem) and 137 cases with postmortem diagnosis only (2004–2017). **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 30, p. 44-56, 2020.

LAMBERT, Ambroise et al. Chemotactic behavior of pathogenic and nonpathogenic *Leptospira* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 78, n. 23, p. 8467-8469, 2012.

LANGSTON C. 2017. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Cote E, editors. **Acute Kidney Injury**. Textbook of Veterinary Internal Medicine. 8th ed St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; p. 1919-1934

LEVETT, Paul N. et al. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 349-351, 2001.

LEVETT, Paul N. Systematics of leptospiraceae. **Leptospira and Leptospirosis**, p. 11-20, 2015.

LIPPI, Giuseppe; FAVALORO, Emmanuel J. Activated partial thromboplastin time: new tricks for an old dogma. In: **Seminars in thrombosis and hemostasis**. © Thieme Medical Publishers, 2008. p. 604-611.

LOPES, S. T. DOS A. et al. Valores de referência do tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) em cães. **Ciência Rural**, v. 35, n. 2, p. 381–384, abr. 2005.

LÓPEZ, Maria Cristina et al. *Leptospira* seroprevalence in owned dogs from Spain. **Heliyon**, v. 5, n. 8, p. e02373, 2019.

LUBAS, George et al. Laboratory testing of coagulation disorders. In: WEISS, Dj; WARDROP, Kj. **Schalm's Veterinary Hematology**. New York: Wiley-blackwell Publishing, Inc, 2010. p. 1082-1100.

MASTRORILLI, Cinzia et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001–2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 1, p. 3-10, 2007.

Mattoon J, Nyland T. 2014. **Small Animal Diagnostic Ultrasound**. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders

MCCALLUM, Katie E. et al. Hepatic leptospiral infections in dogs without obvious renal involvement. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 1, p. 141-150, 2019.

MCCONNELL, M. F. Overview of haemostasis. **Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine**. 1st ed. Gloucester: BSAVA, p. 165–171, 2000.

MENDES, R. S. et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*: aspectos clínicos e patológicos. **Arquivo brasileiro de medicina veterinária zootecnia**, p. 79-84, 2014.

MESECK, Emily K. et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 17, n. 6, p. 565-568, 2005.

MEYERS, Alyssa C. et al. Risk factors and select cardiac characteristics in dogs naturally infected with *Trypanosoma cruzi* presenting to a teaching hospital in Texas. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 4, p. 1695-1706, 2019.

MISCHKE, Reinhard. Optimization of coagulometric tests that incorporate human plasma for determination of coagulation factor activities in canine plasma. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 625-629, 2001.

MURPHY, Lisa A.; NAKAMURA, Reid K. Myocarditis. **Textbook of Small Animal Emergency Medicine**, p. 385-387, 2018.

MURRAY, Gerald L. The molecular basis of leptospiral pathogenesis. **Leptospira and Leptospirosis**, p. 139-185, 2015.

NILOOFA, Roshan et al. Diagnosis of leptospirosis: comparison between microscopic agglutination test, IgM-ELISA and IgM rapid immunochromatography test. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0129236, 2015.

OYAMA, M. A.; REYNOLDS, C. Biomarkers in the diagnosis of canine heart disease. **Veterinary Focus**, v. 18, n. 3, p. 1-6, 2008.

PALEYEV, N. R.; PALEYEV, F. N. Non-coronarogenic myocardial diseases and their classification. **Russian Cardiological Journal**, n. 3, p. 77, 2009.

PEIXE, M.; RODRIGUES, F.; GALVÃO, I. Determinação dos intervalos de referência do Tempo de Protrombina e do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 5, n. 1, p. 36–39, 2016.

PENNINCK, Dominique; D'ANJOU, Marc-André (Ed.). **Atlas of small animal ultrasonography**. John Wiley & Sons, 2015.

PETERSON, J. L.; COUTO, C. Guillermo; WELLMAN, Maxey L. Hemostatic disorders in cats: a retrospective study and review of the literature. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 9, n. 5, p. 298-303, 1995.

PICARDEAU, Mathieu. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.

RAGHAVAN, R. K. et al. Evaluations of hydrologic risk factors for canine leptospirosis: 94 cases (2002–2009). **Preventive veterinary medicine**, v. 107, n. 1-

2, p. 105-109, 2012.

RAND, M. L. Plasma proteins, immunoglobulins and blood coagulation. **Harper's biochemistry**, p. 721-732, 1996.

REAGAN, Krystle L.; SYKES, Jane E. Diagnosis of canine leptospirosis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 49, n. 4, p. 719-731, 2019.

RIBAS, Thibault et al. Fungal myocarditis and pericardial effusion secondary to *Inonotus tropicalis* (phylum Basidiomycota) in a dog. **Journal of Veterinary Cardiology**, v. 17, n. 2, p. 142-148, 2015.

ROSA, F. A. et al. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum* chagasi. **Veterinary pathology**, v. 51, n. 3, p. 603-606, 2014.

SANTOS, A. L. F. et al. Dosagem sérica de troponina I em cães com desnível do segmento ST utilizando quimioluminescência. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1330–1336, 2011.

SCHOBBER, K. E. Biochemical markers of cardiovascular disease. **Textbook of veterinary internal medicine**, v. 6, p. 940-948, 2005.

SCHOBBER, K. E. Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. **Saunders Elsevier**, p. 804-808, 2014.

SCHOBBER, Karsten E.; KIRBACH, Babett; OECHTERING, Gerhard. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. **Journal of veterinary cardiology**, v. 1, n. 2, p. 17-25, 1999.

SCHULLER, Simone et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 3, p. 159-179, 2015.

SCHULZ, B. S. et al. Ileocolic intestinal intussusception in a dog with leptospirosis. **Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere**, v. 38, n. 06, p. 403-405, 2010.

SILVESTRINI, Angela Ramos; HEINEMANN, Marcos Bryan; DE CASTRO, Alessandra Marnie Martins Gomes. Leptospirese no contexto da Saúde Única e diretrizes de vacinação. **PUBVET**, v. 14, p. 137, 2019.

SIMÕES, Luciana Senna et al. Leptospirese–Revisão. **PubVet**, v. 10, n. 2, p. 138-146, 2016.

SMITH, Amanda M. et al. A cross-sectional study of environmental, dog, and human-related risk factors for positive canine leptospirosis PCR test results in the United States, 2009 to 2016. **BMC veterinary research**, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2019.

SMITH, Stephanie A.. Overview of hemostasis. In: WEISS, Douglas J.; WARDROP, K. Jane. **Shalm's Veterinary hematology**. 6. ed. [s. l.]: Blackwell, 2010. Cap. 84. p. 635-653.

SONET, Juliette et al. Prospective evaluation of abdominal ultrasonographic findings in 35 dogs with leptospirosis. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 59, n. 1, p. 98-106, 2018.

SOUSA, Marlos G. et al. Assessment of the electrocardiogram in dogs with visceral leishmaniasis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 643-647, 2013.

SYKES, Jane E. et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.

SYKES, Jane E. Leptospirosis. **Canine and Feline Infectious Diseases**, p. 474-486, 2014.

TANGEMAN, Lindsay E.; LITTMAN, Meryl P. Clinicopathologic and atypical features of naturally occurring leptospirosis in dogs: 51 cases (2000–2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 243, n. 9, p. 1316-1322, 2013.

TERRI, D. F. **Cardiac biomarkers: A blood test for heart disease?**. Proceeding of the LAVC–Latin American Veterinary Conference, Oct. 3-6, 2008, Lima, Peru. **Anais**, 2008

THREESWARAN, Rasa et al. Hemostatic derangement in leptospirosis: A prospective cross-sectional study. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 10, n. Suppl 1, p. 28, 2020.

TROY, Gregory C. An overview of hemostasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 18, n. 1, p. 5-20, 1988.

TRUCCOLO, Johann et al. Quantitative PCR assay to evaluate ampicillin, ofloxacin, and doxycycline for treatment of experimental leptospirosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 848-853, 2002.

TRUEBA, Gabriel et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. **International microbiology**, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.

TSENG, Laura W.; HUGHES, Dez; GIGER, Urs. Evaluation of a point-of-care coagulation analyzer for measurement of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and activated clotting time in dogs. **American journal of veterinary research**, v. 62, n. 9, p. 1455-1460, 2001.

VIDAL FREITAS, Millena et al. CREATINAFOSFOQUINASE-ISOENZIMA MB MASSA (CK-MB MASSA) E TROPONINA I (cTnl) EM CÃES (*Canis familiaris*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, n. 3, 2015.

VITAL, A. F. Distúrbios hemostáticos em cães com neoplasia: revisão de literatura. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, v. 8, n. 1, p. 12–19, 2014.

WAGENAAR, J. F. P. et al. Coagulation disorders in patients with severe leptospirosis are associated with severe bleeding and mortality. **Tropical Medicine & International Health**, v. 15, n. 2, p. 152-159, 2010.

WARD, Michael P.; GLICKMAN, Lawrence T.; GUPTILL, Lynn F. Prevalence of and risk factors for leptospirosis among dogs in the United States and Canada: 677 cases (1970–1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 1, p. 53-58, 2002.

WARE, Wandy A. Distúrbios do sistema cardiovascular. In: NELSON, Richard W.; COUTO, C. Guilherme. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. 1. p. 140-144. Tradução: Cinthia Raquel Bombardieri, Marcella de Melo Silva, et. al.

YONEZAWA, L. A. et al. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. **Ciência Rural**, v. 40, n. 1, p. 222–230, 2010.

ZAIDI, Sara et al. Urinary shedding of pathogenic *Leptospira* in stray dogs and cats, Algiers: A prospective study. **PLoS One**, v. 13, n. 5, p. e0197068, 2018.

ZORZO, C. et al. Valores de referência de tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada para felinos domésticos (*Felis catus*) com kit reagente humano. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, p. e744974819-e744974819, 2020.

4 HIPÓTESE

O presente trabalho teve como hipóteses:

1. Os tempos de tromboplastina parcial ativada e protrombina se alteram em cães com leptospirose;
2. Os níveis de biomarcadores de lesão miocárdica podem estar elevados em cães com leptospirose;
3. Cães com leptospirose apresentam alterações eletrocardiográficas;
4. Cães com leptospirose apresentam alterações nos índices ecocardiográficos de função sistólica e diastólica;
5. Cães com leptospirose podem desenvolver miocardite.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os parâmetros hemostáticos e os as alterações cardíacas em cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.* atendidos no setor de Clínica Médica de Animais de Companhia do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar e comparar os valores de tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada em animais com leptospirose e animais hígidos;
2. Determinar e comparar os valores de creatinoquinase fração MB e troponina cardíaca I em animais com leptospirose e animais hígidos;
3. Determinar e comparar parâmetros eletrocardiográficos e ecocardiográficos em cães com leptospirose e em cães hígidos;
4. Verificar a ocorrência de miocardite em cães com leptospirose.

6 ARTIGO

Artigo a ser submetido a revista: Journal of Veterinary Internal Medicine - ISSN: 1939-1676. As normas da revista estão disponíveis no ANEXO II.

PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E AVALIAÇÃO CARDÍACA EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS POR *LEPTOSPIRA SPP.*

Patrick E. Luz¹ | Ana Paula Maingué¹ | Mariana Podleskis¹ | Lucienne G. P. Giordano² | Danielle Venturini³ | Fabio N. Gava¹ | Patrícia M. Pereira¹

¹ Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

² Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

³ Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

Autor correspondente: Patrícia M. Pereira, Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

Email: pmendes@uel.br

Resumo

Revisão: A leptospirose é uma doença de distribuição global com caráter zoonótico, ocasionada pelas bactérias do gênero *Leptospira spp.*, enquanto a miocardite é uma doença caracterizada pela lesão miocárdica, inicialmente inflamatória, que pode ser ocasionada por leptospirose e outras doenças infecciosas.

Hipóteses/Objetivos: Verificar alterações de TP, TTPa, CK-MB, cTnI e a ocorrência de alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas em cães com leptospirose.

Animais: 16 cães, provenientes do atendimento clínico, constituíram os seguintes grupos: cães hígidos, denominados GC (n = 7) e cães com leptospirose, denominados GL (n = 9).

Métodos: Estudo transversal. Foram realizados aferição da pressão arterial sistêmica (PAS), mensuração de TP e TTPa, dosagem de CK-MB e cTnI, eletrocardiografia e ecodopplercardiografia. As medidas morfológicas foram normalizadas pelo peso.

Resultados: Cães com leptospirose apresentaram maiores valores de cTnI (GC:

0,004 ± 0,002 ng/ml; GL: 0,22 ± 2,70 ng/ml, p = 0,001), PAS (GC: 130 ± 23,8 mmHg; GL: 178 ± 34,1 mmHg; p = 0,009), duração do complexo QRS (GC: 41,4 ± 3,64 ms; GL: 50,0 ± 5,17 ms, p = 0,002), duração do intervalo QT (GC: 164 ± 13 ms, GL: 225 ± 24,3 ms, p < 0,001) e espessura do septo interventricular em diástole normalizada pelo peso (GC: 0,34 ± 0,15 mm; GL 0.54 ± 0,20 mm; p = 0,031) do que cães hígidos. 5/9 cães apresentaram diagnóstico possível de miocardite.

Conclusões: A leptospirose gera distúrbios de coagulação e alterações cardíacas, evidenciadas principalmente pela disfunção diastólica e aumento da troponina.

Palavras-chave: miocardite, leptospirose, disfunção diastólica, troponina.

HEMOSTATIC PARAMETERS AND CARDIAC EVALUATION IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH *LEPTOSPIRA SPP.*

Abstract

Review: Leptospirosis is a disease of global distribution with zoonotic character, caused by bacteria of the genus *Leptospira spp.*, while myocarditis is a disease characterized by myocardial injury, initially inflammatory, which can be caused by leptospirosis and other infectious diseases.

Hypothesis/Objectives: To verify alterations in PT, aPTT, CK-MB, cTnI and the occurrence of electrocardiographic and echocardiographic alterations in dogs with leptospirosis.

Animals: 16 dogs, from clinical care, constituted the following groups: healthy dogs, called GC (n=7) and dogs with leptospirosis, called GL (n=9).

Methods: Cross-sectional study. Measurements of systemic blood pressure (SBP), PT and aPTT, CK-MB and cTnI measurements, electrocardiogram and echodopplercardiogram were performed. The morphological measurements were normalized by weight.

Results: Dogs with leptospirosis had higher cTnI values (GC: 0.004 ± 0.002 ng/ml; GL: 0.22 ± 2.70 ng/ml, $p = 0.001$), SBP (GC: 130 ± 23.8 mmHg; GL: 178 ± 34.1 mmHg; $p = 0.009$), QRS complex duration (GC: 41.4 ± 3.64 ms; GL: 50.0 ± 5.17 ms, $p = 0.002$), QT interval duration (GC: 164 ± 13 ms, GL: 225 ± 24 ms, $p < 0.001$), interventricular septum thickness in diastole normalized by weight (GC: 0.34 ± 0.15 mm; GL 0.54 ± 0.20 mm; $p = 0.031$) than healthy dogs. 5/9 dogs had a possible diagnosis of myocarditis.

Conclusions: Leptospirosis generates coagulation disorders and activated partial thromboplastin times and cardiac alterations, evidenced mainly by diastolic dysfunction and increase in troponin.

Keywords: myocarditis, leptospirosis, diastolic dysfunction, troponin.

INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma doença de distribuição global com caráter zoonótico, ocasionada pelas bactérias do gênero *Leptospira spp.*, sendo classificadas em mais de 250 sorovares.¹ A transmissão pode ocorrer de forma direta ou indireta, sendo a primeira pelo contato com a urina de animais infectados e a segunda pelo contato com água ou solo contaminados.^{2,3} Estudos em cães com leptospirose tem demonstrado tempos alargados de ativação da protrombina (TP) e tromboplastina parcial ativada (TTPa), além de casos de coagulação intravascular disseminada (CID).^{4,5,6}

A miocardite é uma doença caracterizada pela lesão miocárdica, inicialmente inflamatória, que pode decorrer de diversas doenças infecciosas, como a leptospirose, leishmaniose, parvovirose, toxoplasmose, neosporose, erliquiose e tripanossomíase e não infecciosas.⁷⁻¹⁵ Por se tratar de uma doença miocárdica, o diagnóstico se torna um desafio, sendo a biópsia endomiocárdica o único meio de se obter um diagnóstico definitivo. Usualmente se obtém um conjunto de dados, incluindo hemograma, creatininoquinase (CK), concentração sérica de cTnI, radiografias torácicas e abdominais, eletrocardiograma, ecocardiograma, hemocultura, triagem sorológica para causas infecciosas.¹⁶⁻¹⁹

Recentemente, um estudo propôs a avaliação de critérios maiores e menores para o diagnóstico de miocardite, considerando diversos achados clínicos, como a concentração sérica de cTnI, resultados positivos em hemocultura ou outros fluidos para agentes infecciosos, presença de febre e/ou sopro, hiperecogenicidade do miocárdio observada na ecocardiografia, presença de efusão pericárdica e arritmias ventriculares.²⁰

Inúmeras doenças cardíacas têm sido associadas a altas concentrações de cTnI, como nas cardiomiopatias dilatada e hipertrófica, doença degenerativa da valva mitral, arritmias graves, miocardites e contusão cardíaca.²¹ A liberação da cTnI na circulação está relacionada às áreas de necrose de cardiomiócitos, sendo que o aumento de sua concentração é proporcional a gravidade da lesão.²²

De forma geral, a alteração cardíaca mais encontrada em cães com miocardite é a disfunção sistólica,²⁰ embora em um estudo de evidências de lesão cardíaca e arritmias em cães com insuficiência renal aguda (IRA) tenha demonstrado que a função sistólica nesses pacientes estava normal. Contudo, tal avaliação foi

realizada dentro das primeiras 48 horas de apresentação e a função diastólica não foi avaliada posteriormente. Neste mesmo estudo, 18/24 pacientes apresentavam leptospirose (75%) e as concentrações de cTnI estavam elevadas em 22/24 pacientes inicialmente. A associação entre a leptospirose e a lesão miocárdica permaneceu incerta, não sendo possível saber se tais lesões são decorrentes da IRA ou da leptospirose.²³

Na década de 90, foram publicados dois estudos em humanos associando as formas graves de leptospirose à miocardite.^{24,25} Especificamente em cães, estudos objetivando tal associação são escassos. Dessa forma, os objetivos desse estudo foram avaliar TP e TTPa, caracterizar os achados eletrocardiográficos e ecocardiográficos em cães com doença clínica ocasionada por leptospirose, bem como os valores de cTnI e creatinoquinase fração MB (CK MB) nesses pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição onde o estudo foi executado.

Animais

Foram avaliados 27 cães de diversas raças, idades e sexo, sendo destes 20 com suspeita de infecção por leptospirose e sete animais saudáveis que constituíram o grupo controle (GC). Dos 20 animais suspeitos de possuírem leptospirose, 11 foram excluídos devido a soroaglutinação microscópica (SAM) e/ou microscopia de campo escuro (MCE) negativas, e/ou presença de outras doenças concomitantes (doença renal crônica, pielonefrite, insuficiência renal aguda, erliquiose cardiopatia já diagnosticada ou presença de neoplasias), permanecendo nove animais no grupo leptospirose (GL).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos foram obtidos pelo prontuário clínico de cada paciente suspeito. Em seguida, os pacientes foram submetidos a aferição de pressão arterial sistólica (PAS) e a eletrocardiografia e ecocardiografia. Amostras de sangue foram obtidas por punção venosa jugular para realização de testes de coagulação e dosagem de CK-MB e cTnI. Resultados da SAM e MCE foram obtidos posteriormente.

Para o GC, foi realizada avaliação física inicial de cada paciente, seguido da aferição da PAS. Em seguida, os pacientes foram submetidos à eletrocardiografia e

ecocardiografia. Por último, obteve-se sangue por punção venosa jugular para realização dos testes de coagulação e dosagem de CK-MB e cTnI.

Aferição da Pressão arterial

A aferição da PAS foi realizada pelo método Doppler vascular, segundo Camacho e Mucha (2014) seguindo as recomendações do consenso sobre hipertensão arterial do *American College of Veterinary Internal Medicine*.²⁶ Após ambientação do paciente no ambulatório, realizou-se a seleção do manguito apropriado, sendo este colocado no membro anterior esquerdo do paciente, na região de rádio e ulna. A aferição foi realizada cinco vezes, procedendo-se com a exclusão do menor e do maior valor, considerando a média dos três valores restantes como o valor da PAS de cada paciente.

Eletrocardiografia

O exame eletrocardiográfico foi realizado por meio do eletrocardiógrafo computadorizado (Módulo de Aquisição de ECG para computador (ECG-PC versão 2.07[®]) – Tecnologia Eletrônica Brasileira (TEB)).

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, seguindo as recomendações de Tilley.²⁷ Para as derivações de membros polares e unipolares aumentadas, os eletrodos torácicos direito e esquerdo foram posicionados acima do olécrano no seu aspecto caudal e os eletrodos pélvicos direito e esquerdo, acima dos ligamentos patelares no aspecto anterior de cada membro. Para melhorar a condutividade elétrica, foi utilizado álcool 70% entre os eletrodos e a pele de cada animal. Os registros foram gravados em sensibilidade N durante cinco minutos para posterior interpretação.²⁷

Ecocardiografia

Todos os animais foram submetidos à tricotomia da região torácica, na região do *ictus cordis*. Para a realização do exame ecocardiográfico foi utilizado o ecocardiógrafo DC-7 Mindray Bio-Medical Electronics Shenzhen.

Os animais foram posicionados, inicialmente, em decúbito lateral direito para localização da janela parasternal direita, cujo seguintes parâmetros foram obtidos em milímetros (mm): espessura do septo interventricular em diástole (ESIVd), diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole (DIVEd), espessura da parede

livre do ventrículo esquerdo em diástole (EPLVE_d), espessura do septo interventricular em sístole (ESIV_s), diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole (DIVE_s) e espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole (EPLVE_s). A fração de encurtamento (FS) e a fração de ejeção (FE) foram calculadas a partir da obtenção desses valores. As médias das mensurações de ESIV_d, DIVE_d e EPLVE_d foram normalizadas pelo peso corporal conforme fórmulas propostas pelo método de Cornell.²⁸

A imagem da aorta e do átrio esquerdo foi obtida no modo bidimensional, para posterior cálculo da relação átrio esquerdo/aorta (AE/AO). Posteriormente, foi obtida a imagem da via de saída do ventrículo direito para obtenção do pico de velocidade do fluxo transpulmônico (PVPUL), com a utilização do Doppler pulsado.

Em seguida, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, para obtenção das imagens apicais quatro e cinco câmaras, para registro dos valores de velocidade de onda E (enchimento ventricular rápido) e onda A (sístole atrial) do fluxo mitral e posterior cálculo da relação E/A. Posteriormente, foi obtida a imagem da via de saída do ventrículo esquerdo, para mensuração do pico de velocidade do fluxo transaórtico (PVAO), com o Doppler pulsado.

A imagem apical quatro câmaras foi obtida para a realização do Doppler tecidual do ventrículo esquerdo, posicionando o *gate* às margens septal e lateral do anel mitral, para as mensurações de medida de enchimento rápido (Em) e a velocidade de enchimento na fase de contração atrial (Am), para posteriormente ser realizado o cálculo da relação Em/Am. A classificação da função diastólica seguiu os critérios descritos por Boon.²⁹

Dosagem de cTnl e CK MB

Para a dosagem de cTnl e CK-MB, 2 ml do sangue total de cada paciente foi colhido e acondicionado em tubo seco e posteriormente centrifugado a 10000 rpm na centrífuga CENTRIBIO 80-2B[®], por cinco minutos para obtenção do soro, sendo divididas em alíquotas em microtubos para posterior dosagem. A dosagem de cTnl foi realizada pelo método enzimaimunoensaio (ELISA) no autoanalisador bioquímico Dimension (Dade Behring, Deerfield, IL, USA). A dosagem de CK-MB foi realizada pelo método biocromático em laboratório terceirizado.

Avaliação de TP e TTPa

Para a determinação de TP e TTPa, 1,8 ml de sangue total de cada paciente foi acondicionado em tubo contendo citrato de sódio como anticoagulante. As amostras foram centrifugadas à 10000 rpm por dez minutos para obtenção do plasma e divididas em alíquotas em microtubos e, posteriormente, os tempos de TP e TTPa foram determinados por meio de análise automática no coagulômetro Coagmaster 4.0 (Wama[®]) com a utilização de kits comerciais (Wama[®]).

Análise estatística

Os valores referentes à eletrocardiografia, ecocardiografia, PAS, cTnl, CK MB, TP e TTPa foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de homogeneidade de variâncias Levene. Dados paramétricos e homogêneos foram submetidos ao teste t de Student para comparação entre os dois grupos, dados não paramétricos e com variâncias não homogêneas foram submetidos ao teste de Mann-Whitney. Todos os dados foram submetidos a análise descritiva e, as interpretações dos resultados à avaliação de frequências. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05. Resultados significativos foram submetidos ao teste de correlação de Pearson, quando paramétricos, ou ao teste de correlação de Spearman, quando não paramétricos. As análises estatísticas foram realizadas com o software Jamovi[®] versão 1.6.23.

RESULTADOS

Dos 27 cães avaliados, 6 animais foram excluídos do estudo devido a presença de doenças concomitantes e outros 5 foram excluídos por apresentarem resultado negativo na SAM e/ou MCE, 16 foram incluídos no estudo, atendendo a todos os critérios estabelecidos previamente. Nove cães constituíram o GL e o GC foi constituído por sete animais hípidos, sem histórico de doenças crônicas e/ou em curso e todos possuíam o esquema vacinal atualizado.

Dos cães do GL, 6/9 (66,7%) eram machos e 3/9 (33,3%) eram fêmeas, a média de idade foi de $6,25 \pm 3,41$ anos e a média de peso foi de 12.1 ± 4.98 kg. A maioria dos cães eram sem raça definida (SRD) 7/9 (77,8%), seguido de 1/9 Pittbull (11,1%) e 1/9 Chow Chow (11,1%). Nenhum cão do GL estava com o esquema vacinal atualizado, 6/9 (66,7%) estavam com o esquema vacinal desatualizado (há mais de um ano ou haviam recebido apenas as doses do primeiro ano de vida) e 3/9

(33,3%) nunca haviam sido vacinados. Entre os cães do GC, 5/7 (71,4%) eram fêmeas e 2/7 (28,6%) eram machos, com média de idade de $2,29 \pm 1,5$ e média de peso de $14,9 \pm 10,1$. Dentre as raças do GC, a maioria 5/7 (71,4%) eram SRD e outros 2/7 (28,6%) eram Shih-Tzu.

A SAM foi realizado nos nove cães do GL após a admissão no internamento, sendo positiva em 5/9 (55,6%). Destes cinco animais positivos, 3/5 (60%) apresentaram titulação para o sorovar canícola, 1/5 (20%) apresentou titulação para mais de um sorovar (canícola, grippotyphosa e icterohaemorrhagiae) e 1/5 (20%) para dois sorovares (canícola e icterohaemorrhagiae). A MCE foi realizada nos mesmos cães, sendo positiva em 6/9 (66,7%) cães, três foram positivos apenas na SAM.

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os valores hematológicos e bioquímicos foram acessados apenas no GL, em que se observou um valor médio de hematócrito (%) de $27,88 \pm 13,23$, hemoglobina (g/dl.) $9,77 \pm 4,95$, plaquetas 225.000 ± 178.084 , leucócitos totais (mm^3) 21089 ± 14046 , bastonetes (mm^3) 3058 ± 3592 , neutrófilos (mm^3) 17320 ± 10134 , linfócitos (mm^3) 1569 ± 1525 e monócitos (mm^3) 1927 ± 1435 . Na avaliação bioquímica, os seguintes valores médios foram encontrados: creatinina (mg/dl.) $5,71 \pm 4,40$, ureia (mg/dl.) $308,5 \pm 168,8$, alanina aminotransferase (U/L.) $65 \pm 42,15$, fosfatase alcalina (U/L.) $198,6 \pm 189,1$, proteína total plásmatica (g/dl.) $7,28 \pm 1,96$, albumina (g/dl.) $2,03 \pm 0,75$ e glicose (mg/dl.) $99,89 \pm 28,45$.

Tempo de protrombina e Tempo de tromboplastina parcial ativada

A mensuração de TP e TTPa foi possível nos sete animais do GC e sete animais do GL. O TP médio no GC foi de $6,60 \pm 0,80$ segundos, enquanto no GL a média foi de $6,90 \pm 1,59$ segundos, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,608$). Quanto ao TTPa, o tempo médio no GC foi de $25,60 \pm 7,98$ segundos e no GL $32,63 \pm 20,50$, não havendo diferença estatística entre os grupos ($p = 0,414$).

No GL, três animais (42,9%) apresentaram aumento dos valores TP e três (42,9%) diminuição desses valores. Quanto ao TTPa, seis animais (85,7%) apresentaram tempos acima dos valores de referência.³⁰ Três animais preencheram os critérios para o diagnóstico de CID (trombocitopenia e aumento de duração de TP

e TTPa).³¹

Creatinoquinase fração MB e Troponina cardíaca I

Não houve diferença estatística entre os grupos nos valores de CK MB (GC: $24,7 \pm 7,17$; GL: $27,0 \pm 46,3$; $p = 1,000$) (Figura 1A). Contudo, os valores de cTnl foram significativamente maiores no GL, quando comparados ao GC (GC: $0,004 \pm 0,002$; GL: $0,22 \pm 2,70$, $p = 0,001$) (Figura 1B).

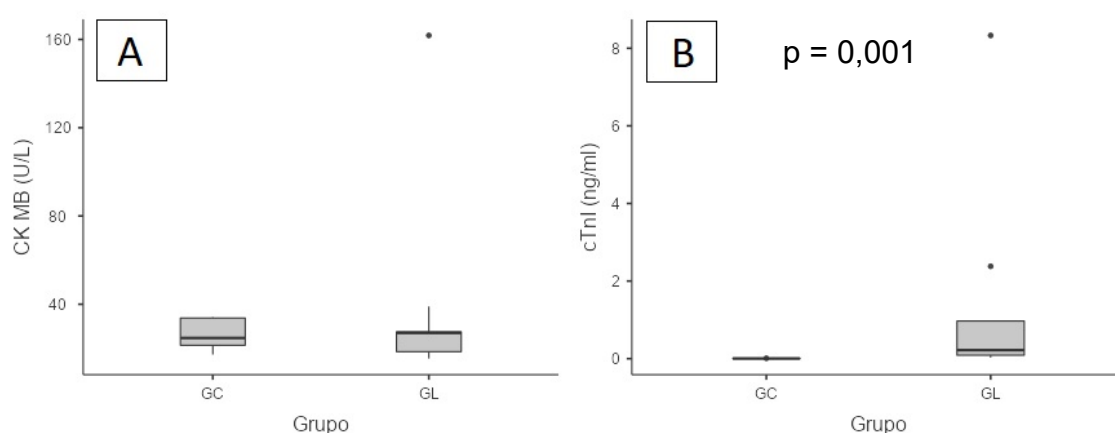


Figura 1. Representação gráfica dos valores de creatinoquinase fração MB (CK MB) (A) e troponina cardíaca I (cTnl) (B) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).

Pressão arterial sistêmica

No GL, apenas em uma paciente não foi possível aferir a PAS, devido a gravidade do estado clínico, havendo hipotensão grave no momento da avaliação. Logo, considerou-se a PAS de oito animais no GL e sete animais no GC, verificando que a PAS dos pacientes do GL foi significativamente maior que a PAS do GC (GC: $130 \pm 23,8$; GL: $178 \pm 34,1$; $p = 0,009$) (Figura 2).

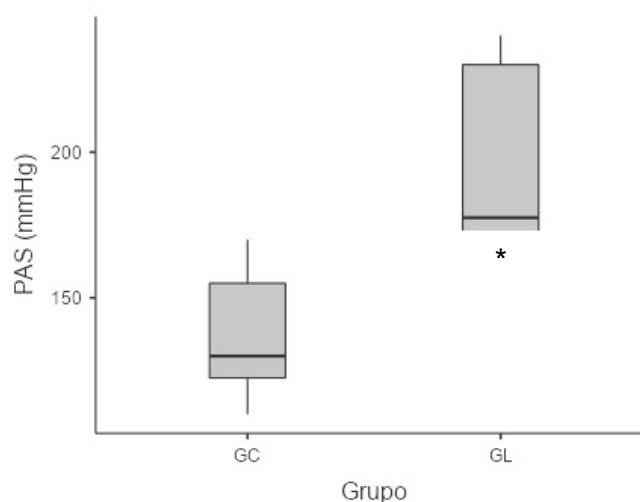


Figura 2. Representação gráfica dos valores de pressão arterial sistêmica (PAS) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose). * $p = 0,009$.

Eletrocardiografia

Todos os pacientes de ambos os grupos foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica. No GL, 5/9 (55,6%) apresentaram ritmo sinusal e 4/9 (44,4%) apresentaram arritmia sinusal, enquanto no GC, 3/7 (42,9%) apresentaram ritmo sinusal e 4/7 (57,1%) taquicardia sinusal. A FC variou de 73 a 148 batimentos por minuto (BPM) no GL e de 108 a 178 BPM no GC.

A duração do complexo QRS foi maior no GL, quando comparado ao GC, apresentando diferença estatística significativa (GC: $41,4 \pm 3,64$; GL: $50,0 \pm 5,17$, $p = 0,002$) (Figura 3A), contudo, o complexo estava com duração normal em todos os animais de ambos os grupos. Já o intervalo QT, apresentou maior duração no GL (GC: 164 ± 13 , GL: $225 \pm 24,3$, $p < 0,001$) (Figura 3B), sendo que apenas 2/9 (22,9%) do GL apresentavam aumento de duração dessa variável.

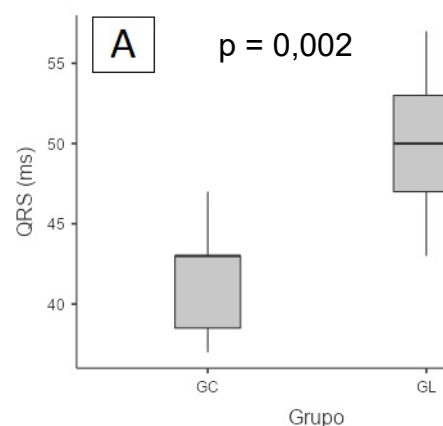


Figura 3. Representação gráfica da duração (ms) do complexo QRS (A) e segmento QT (B) de cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).

Outra alteração observada foi o aumento de duração da onda p em 4/9 (44,4%) pacientes e o aumento da amplitude da onda T em 3/9 (33,3%) pacientes do GL. As demais variáveis eletrocardiográficas não apresentaram diferença estatística.

Ecocardiografia

A mensuração da espessura do septo interventricular em diástole normalizada pelo peso (ESIVDN) demonstrou diferença estatística entre os grupos, sendo maior no GL quando comparado ao GC (GC: $0,34 \pm 0,15$; GL: $0,54 \pm 0,20$; $p = 0,031$), sendo que 3/9 (33,33%) dos pacientes do GL apresentavam aumento da ESIVD e os demais (66,7%) estavam com a espessura dentro dos limites de normalidade.²⁹ As demais variáveis não apresentaram diferença estatística significativa. Os valores das variáveis ecocardiográficas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Variáveis ecocardiográficas de cães hígdos (GC) e cães com leptospirose (GL)

	GC (n = 9)	GL (n = 7)	p valor
ESIVDn (mm)	0,34 ± 0,15	0,54 ± 0,20	0,031*
DIVEDn (mm)	1,16 ± 0,19	1,31 ± 0,23	0,207
EPLVEDn (mm)	0,43 ± 0,17	0,47 ± 0,28	0,210
ESIVSn (mm)	0,69 ± 0,19	0,88 ± 0,36	0,142
DIVESn (mm)	0,59 ± 0,16	0,69 ± 0,24	0,367
EPLVESn (mm)	0,70 ± 0,18	0,67 ± 0,32	1,000
FS (%)	46,50 ± 7,93	44,10 ± 15,90	0,730
FE (%)	79,10 ± 8,20	74,10 ± 18,40	0,515
AE/AO	1,31 ± 0,18	1,33 ± 0,14	0,832
PVPUL (cm/seg)	90,9 ± 32,90	111 ± 37,30	0,272
PVAO (cm/seg)	116 ± 13,20	92,50 ± 28,70	0,536
Vmax mitral (cm/seg)	113 ± 26,90	150 ± 154	0,071
Vmax tricúspide (cm/seg)	122 ± 26,70	134 ± 69,70	0,152

* $p < 0,05$. Abreviações: ESIVDn: espessura do septo interventricular em diástole normalizada pelo peso; DIVEDn: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em diástole normalizado pelo peso; EPLVEDn: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em diástole normalizada pelo peso; ESIVSn: espessura do septo interventricular em sístole normalizado pelo peso; DIVESn: diâmetro interno do ventrículo esquerdo em sístole normalizado pelo peso; EPLVESn: espessura da parede livre do ventrículo esquerdo em sístole normalizada pelo peso; FS: fração de encurtamento; FE: fração de ejeção; AE/Ao: relação átrio esquerdo/aorta; PVPUL: pico de velocidade transpulmonar; PVAO: pico de velocidade transaórtico; GC: grupo controle; GL: grupo leptospirose; Vmax: velocidade máxima.

Avaliação da função diastólica

Doppler espectral e tecidual foram realizados em todos os pacientes e os valores da relação Em/Am septal e Em/Am parietal diferiram entre os grupos. A relação Em/Am parietal foi menor no GL ($p < 0,001$) e a relação Em/Am septal foi maior no GL ($p = 0,005$) (Tabela 2). Curiosamente, apenas um animal do GL apresentou função diastólica normal, 3/9 (33,3%) apresentaram disfunção diastólica do tipo pseudonormal e 5/9 (55,6%) apresentaram disfunção diastólica do tipo 1, enquanto no GC todos os sete pacientes apresentaram função diastólica preservada. As demais variáveis de função diastólica não apresentaram diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2. Avaliação da função diastólica de cães hígdos (GC) e cães com leptospirose (GL)

	GC (n = 9)	GL (n = 7)	p valor
Onda E (cm/seg)	75 ± 13	73,2 ± 16,9	0,824
Onda A (cm/seg)	59,1 ± 17,1	70,4 ± 25,9	0,337
E/A	1,32 ± 0,33	1,18 ± 0,54	0,577
Em parietal (cm/seg)	13,7 ± 8,35	8,97 ± 3,23	0,141
Am parietal (cm/seg)	9,32 ± 8,14	11,5 ± 2,41	0,204
Em/Am parietal	1,19 ± 0,37	0,76 ± 0,17	< 0,001*
Em septal (cm/seg)	11,4 ± 7,55	7,46 ± 2,86	0,265
Am septal (cm/seg)	7,46 ± 7,24	10,3 ± 2,23	0,112
Em/Am septal	1,34 ± 0,24	0,67 ± 0,26	0,005*

Onda E: enchimento ventricular rápido; Onda A: contração atrial; Em: velocidade tecidual diastólica precoce; Am: velocidade tecidual diastólica tardia.

Miocardite

Todos os animais do GL foram submetidos a análise de probabilidade de miocardite com base na tabela de critérios maiores e menores proposta por Lakhdhir e colaboradores (2021),²⁰ onde um possível diagnóstico de miocardite é dado quando há a presença de um critério maior ou dois menores, ou quando há quatro critérios menores, e o diagnóstico de miocardite é confirmado quando há a presença de um critério maior e três menores ou quando há a confirmação histopatológica após biópsia endomiocárdica.

Dos nove animais do GL, cinco (55,55%) apresentaram diagnóstico provável de miocardite. Todos os cinco animais apresentaram miocárdio hiperecogênico à ecocardiografia e anemia. Quatro animais apresentaram hipoalbuminemia, três apresentaram efusão pericárdica leve, três apresentaram trombocitopenia, dois apresentaram leucocitose e um animal apresentou disfunção sistólica (FS: 16%). Destes cinco animais com diagnóstico provável, três apresentaram um critério maior e três menores, confirmando o diagnóstico de miocardite.

Curiosamente, dois animais do GL apresentaram valores de cTnI acima de 1,0 ng/ml, considerado como critério maior, sendo um com 8,33 ng/ml e o outro com 2,38 ng/ml, tendo como desfecho alta e óbito, respectivamente. Tais animais não apresentaram critérios menores suficientes, sendo considerados como livres de miocardite.

Correlações

Não houve correlação significativa dos valores de cTnI com hematócrito ($p = 0,108$; $\rho = 0,583$), hemoglobina ($p = 0,108$; $\rho = 0,583$), creatinina ($p = 0,270$; $\rho = 0,417$) ou ureia ($p = 0,882$; $\rho = 0,071$). Observou-se forte correlação negativa entre os valores de cTnI e relação Em/Am septal ($p = 0,007$; $\rho = -0,601$) (Figura 4A) e cTnI e relação Em/Am parietal ($p = 0,001$, $\rho = -0,703$) (Figura 4B).

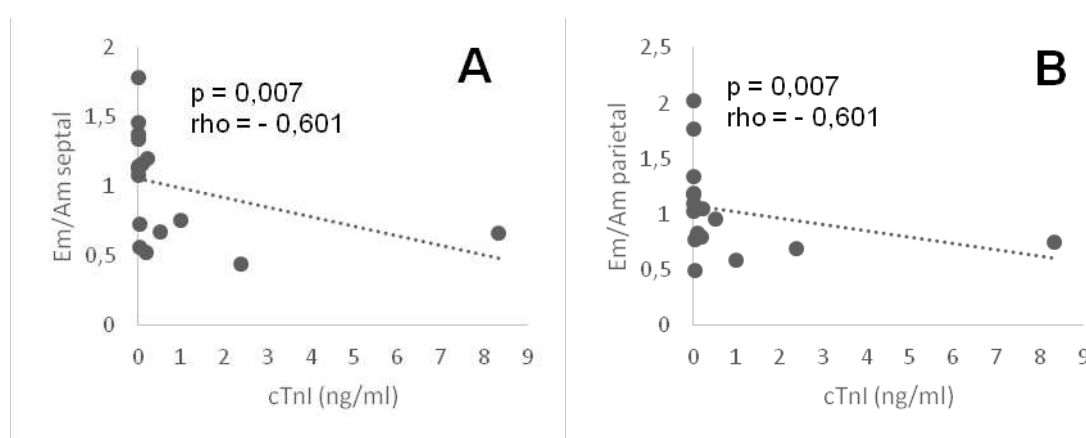


Figura 4. Representação gráfica da correlação negativa existente entre os valores de troponina cardíaca I (cTnI) e os valores da relação Em/Am septal (A) e da cTnI com a relação Em/Am parietal (B), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).

Os valores de PAS se correlacionaram negativamente com os valores da relação Em/Am septal ($p = 0,020$; $r = -0,592$) (Figura 5A) e parietal ($p = 0,004$; $r = -0,693$) (Figura 5B). Foi observada uma correlação positiva e significativa entre os valores de PAS e a duração do complexo QRS ($p = <0,001$; $r = 0,766$) (Figura 6). Não houve correlação significativa entre a PAS e a ESIVDn ($p = 0,313$; $r = 0,280$).

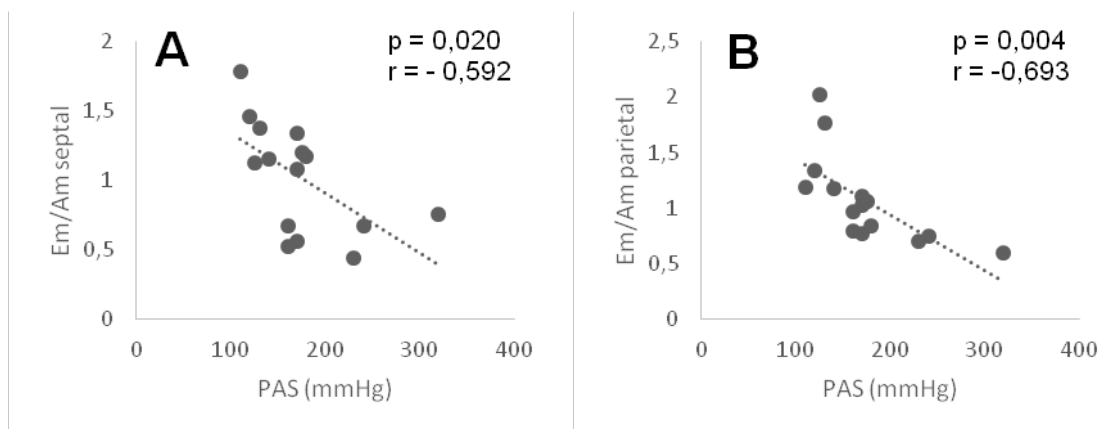


Figura 5. Representação gráfica da correlação negativa existente entre os valores de pressão arterial sistêmica (PAS) e os valores da relação Em/Am septal (A) e da PAS com a relação Em/Am parietal (B), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).

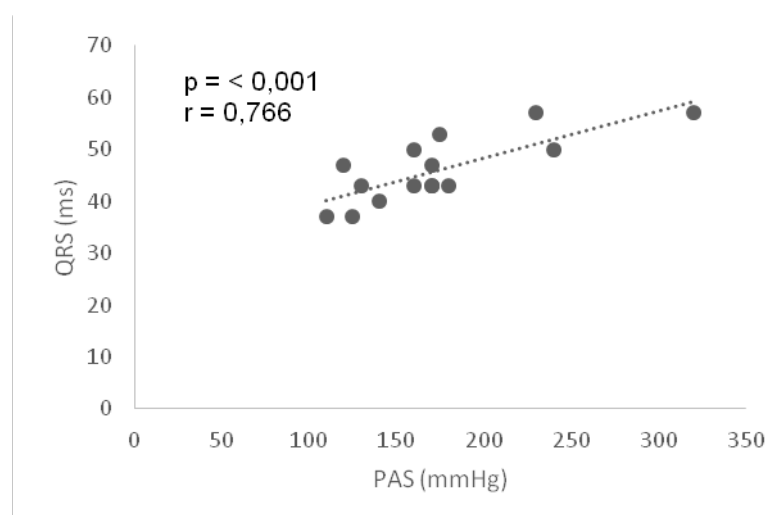


Figura 6. Representação gráfica da correlação positiva entre os valores de pressão arterial sistêmica (PAS) e os valores da duração do complexo QRS (ms), em cães saudáveis (GC: Grupo Controle) e cães com leptospirose (GL: Grupo Leptospirose).

Discussão

Neste estudo, não foi observado diferença estatística significativa entre os grupos quando comparados os valores de TP e TTPa, entretanto, os valores de ambas as variáveis estavam alterados em oito dos nove animais com leptospirose. Ainda, três animais com leptospirose apresentaram resultados compatíveis com CID, o que demonstra que cães com essa doença apresentam distúrbios de coagulação. Semelhante aos resultados aqui apresentados, uma pesquisa foi realizada em 2019 com nove cães com leptospirose, em que apenas três apresentaram alterações nos tempos de coagulação, sendo um com aumento leve a moderado de TP e TTPa, um com aumento prolongado de TTPa e um com sinais sugestivos de CID.⁴ Na

Inglaterra, um estudo retrospectivo de 2019 observou que de 38 cães com leptospirose, nove tiveram TP e TTPa mensurados, sendo que três apresentaram alterações, um cão com aumento de TP, um com aumento de TTPa e outro com aumento de ambas as variáveis.⁵ Entretanto, um estudo retrospectivo realizado em Sidney incluiu 17 cães com leptospirose, dos quais nove animais tiveram os tempos de coagulação mensurados, resultando em 33% com aumento de TP e 83% com aumento de TTPa, destes, três apresentaram elevação nos tempos de TP, TTPa e trombocitopenia, preenchendo os critérios para CID.⁶ Tais resultados demonstram a importância da mensuração dos tempos de coagulação em animais com leptospirose.

Estudos anteriores têm demonstrado que cães com doenças infectocontagiosas, como dirofilariose, leishmaniose e parvovirose, apresentam níveis elevados de CK MB,^{32, 33} diferindo dos achados desse estudo, em que apenas um animal do GL apresentou elevação no valor de CK MB (161,8 U/L) e não houve diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, diversos estudos têm revelado a associação entre diversas doenças miocárdicas e a elevação dos níveis de cTnI.^{20, 21, 33, 34} De fato, alguns estudos já relataram a elevação sérica de cTnI em cães com leptospirose, como em 2007, em que 11 de 16 cães com leptospirose apresentaram aumento dos valores de cTnI, enquanto em um estudo mais recente, avaliando o diagnóstico de miocardite, apenas um paciente apresentava leptospirose.²⁰ De fato, a cTnI apresentou valores maiores no GL quando comparado ao GC, sendo que dos nove animais, seis (66,7%) apresentaram valores acima dos intervalos de referência encontrados em estudos anteriores, e nenhum animal do GC apresentou elevação dessa variável.³⁵ Tal resultado reforça o papel da avaliação de biomarcadores cardíacos em animais com leptospirose.

Sabe-se que a hipertensão arterial sistêmica é comum em casos de insuficiência renal aguda e que, a leptospirose é uma das principais causas de lesão renal aguda em cães.^{1, 36-38} Este estudo demonstrou que, de fato, a PAS foi maior no GL, corroborando o descrito na literatura. Ainda, demonstrou correlação negativa existente entre os valores de PAS e a relação Em/Am, tanto septal, quanto parietal, destacando-se que, 8/9 (88,88%) animais do GL apresentaram algum grau de disfunção diastólica. Essa correlação pode ser explicada pelo aumento excessivo da pré-carga ventricular, o que promove aumento considerável do consumo de oxigênio pelo miocárdio e trabalho cardíaco, e alterações na microvasculatura cardíaca,

contribuindo para a redução do fluxo sanguíneo para o miocárdio, resultando em isquemia e, conseqüentemente, disfunção diastólica.^{39 - 41} Ainda é possível que a disfunção diastólica encontrada seja agravada pelo quadro inflamatório sistêmico, decorrente da infecção por leptospirose, o que também explicaria o aumento significativo da ESIVD, encontrado no GL quando comparado ao GC. Diversos estudos têm reportado o papel da inflamação no aumento transitório da espessura do septo interventricular em humanos e em animais, mostrando correlação entre citocinas inflamatórias e até mesmo a presença de miocardite.^{42 - 45}

Estudos anteriores em humanos e em modelos experimentais têm demonstrado que o aumento da duração do complexo QRS está associado a hipertensão sistêmica,^{46, 47} corroborando os achados apresentados, uma vez que foi demonstrada correlação fortemente positiva entre os valores de PAS e duração de QRS, sendo tal duração maior no GL.

O prolongamento do intervalo QT está presente em diversos distúrbios eletrolíticos, como a hipocalemia, hipocalcemia e hipomagnesemia.⁴⁸⁻⁵³ Os animais do GL apresentavam maior duração do intervalo QT no GL, porém apenas dois animais estavam com os valores acima dos intervalos de referência.²⁷

Atualmente a única maneira de se obter um diagnóstico definitivo de miocardite *ante* mortem é pela biópsia endomiocárdica.¹⁶⁻²⁰ Neste estudo, baseando-se na avaliação proposta por Lakhdhir e colaboradores,²⁰ 5/9 (55,55%) dos animais se enquadraram como possível diagnóstico de miocardite e apenas três animais como diagnóstico definitivo, demonstrando que animais com leptospirose devem ser avaliados quanto a possibilidade do desenvolvimento de miocardite. Em contrapartida, a presença de disfunção sistólica é comumente observada em casos de miocardite,^{20, 54} e como citado anteriormente, 8/9 (88,88%) dos animais do GL apresentaram disfunção diastólica. Isso mostra que, a depender da doença base, como a leptospirose, que frequentemente resulta em hipertensão arterial e inflamação sistêmica, a disfunção diastólica deve ser considerada na avaliação da presença de miocardite.

Como limitações do estudo, acredita-se que um número maior de animais com leptospirose seria interessante, inclusive para caracterizar os diferentes sorovares de *Leptospira spp.* Ainda, a realização de histopatologia poderia confirmar a presença de miocardite, o que não foi possível nesse estudo devido a impossibilidade de realização de biópsia endomiocárdica.

Com os achados do presente estudo, conclui-se que cães com leptospirose podem apresentar alterações nos tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, CID e aumento dos valores de cTnl. A disfunção diastólica encontrada parece ser multifatorial, com contribuição da hipertensão arterial, aumento da espessura do septo interventricular e possível miocardite.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e à Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação da UEL. Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado. Agradecemos à equipe do Hospital Veterinário da UEL por referirem os pacientes ao Serviço de Cardiologia Veterinária da Universidade Estadual de Londrina.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

DECLARAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS OFF-LABEL

Os autores não declaram o uso off-label de antimicrobianos

COMISSÃO INSTITUCIONAL DE CUIDADOS E USO DE ANIMAIS (IACUC) OU OUTRA DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob o número 003.2020.

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO DE ÉTICA HUMANA

Os autores declaram que a aprovação de ética humana não foi exigida para este estudo.

ORCID

Patrick Eugênio Luz <https://orcid.org/0000-0003-4648-0030>

Ana Paula Maingué <https://orcid.org/0000-0002-0780-6133>

Mariana Podleskis <https://orcid.org/0000-0002-5115-7601>

Lucienne G. P. Giordano <http://orcid.org/0000-00017881-298X>

Danielle Venturini <https://orcid.org/0000-0003-3986-9873>

Fabio N. Gava <https://orcid.org/0000-0003-0249-4860>

Patrícia M. Pereira <http://orcid.org/0000-0001-6754-9151>

REFERÊNCIAS

1. Levett PN, et al. Two methods for rapid serological diagnosis of acute leptospirosis. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, n. 2, p. 349-351, 2001.
2. Trueba G, et al. Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International microbiology*, v. 7, n. 1, p. 35-40, 2004.
3. Picardeau M. Diagnosis and epidemiology of leptospirosis. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 43, n. 1, p. 1-9, 2013.
4. McCallum KE, et al. Hepatic leptospiral infections in dogs without obvious renal involvement. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 33, n. 1, p. 141-150, 2019.
5. Raj J, Campbell R, Tappin S. Clinical findings in dogs diagnosed with leptospirosis in England. *Veterinary Record*, v. 189, n. 7, 2021.
6. Griebisch C, et al. Emerging leptospirosis in urban Sydney dogs: a case series (2017–2020). *Australian Veterinary Journal*, 2022.
7. Meseck EK, et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction to rapidly differentiate *Neospora caninum* from *Toxoplasma gondii* in an adult dog with necrotizing myocarditis and myocardial infarct. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, v. 17, n. 6, p. 565-568, 2005.
8. Mastrorilli C, et al. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001–2004). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 21, n. 1, p. 3-10, 2007.
9. Diniz PPVP, et al. Serum cardiac troponin I concentration in dogs with ehrlichiosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 5, p. 1136-1143, 2008.
10. Kjos SA, et al. Distribution and characterization of canine Chagas disease in Texas. *Veterinary parasitology*, v. 152, n. 3-4, p. 249-256, 2008.
11. Paleyev NR, Paleyev FN. Non-coronarogenic myocardial diseases and their classification. *Russian Cardiological Journal*, n. 3, p. 77, 2009.
12. Rosa FA, et al. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. *Veterinary pathology*, v. 51, n. 3, p. 603-606, 2014.
13. Detmer SE, et al. Fatal pyogranulomatous myocarditis in 10 Boxer puppies. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v. 28, n. 2, p. 144-149, 2016.
14. Ford J, et al. Parvovirus infection is associated with myocarditis and myocardial fibrosis in young dogs. *Veterinary pathology*, v. 54, n. 6, p. 964-971, 2017.

15. Meyers AC, et al. Risk factors and select cardiac characteristics in dogs naturally infected with *Trypanosoma cruzi* presenting to a teaching hospital in Texas. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 33, n. 4, p. 1695-1706, 2019.
16. Burgener IA, et al. Cardiac troponins as indicators of acute myocardial damage in dogs. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 20, n. 2, p. 277-283, 2006.
17. Fonfara S, et al. Cardiac troponin I as a marker for severity and prognosis of cardiac disease in dogs. *The Veterinary Journal*, v. 184, n. 3, p. 334-339, 2010.
18. Hamacher L, et al. Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 29, n. 1, p. 164-170, 2015.
19. Ware WA. Distúrbios do sistema cardiovascular. In: Nelson RW, Guilherme CC. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. 1. p. 140-144. Tradução: Cinthia Raquel Bombardieri, Marcella de Melo Silva, et. al.
20. Lakhdhir S, et al. Clinical presentation, cardiovascular findings, etiology, and outcome of myocarditis in dogs: 64 cases with presumptive antemortem diagnosis (26 confirmed postmortem) and 137 cases with postmortem diagnosis only (2004–2017). *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 30, p. 44-56, 2020.
21. Vidal MF, et al. Creatinafosfoquinase-isoenzima mb massa (ck-mb massa) e troponina i (ctni) em cães (*Canis familiaris*). *Ciência Animal Brasileira*, v. 16, n. 3, 2015.
22. Collinson PO, Boa FG, Gaze DC. Measurement of cardiac troponins. *Annals of clinical biochemistry*, v. 38, n. 5, p. 423–449, 2001.
23. Keller SP, et al. Evidence of cardiac injury and arrhythmias in dogs with acute kidney injury. *Journal of small animal practice*, v. 57, n. 8, p. 402-408, 2016.
24. Escosteguy CC, et al. Análise do envolvimento cardíaco na leptospirose. *Arq. bras. méd.*, pág. 42-8, 1991.
25. Herdy GVH, et al. Miocardite na leptospirose: correlação clínico-patológica de 14 casos. *Arq. bras. méd .*, pág. 79-84, 1993.
26. Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 32, p.1803-1822, 2018.
27. Tilley LP. *Essential of canine and feline electrocardiography*. 3.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 470, 1992.
28. Cornell CCC, Kittleson MD, Della Torre P, et al. Allometric scaling of M-Mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J Vet Intern Med*. 2004;18:311-321.

29. Boon JA. *Veterinary Echocardiography*. 2th edition, Local: Wiley-Blackwell; 2011.
30. Baker DC. Diagnóstico das anormalidades de hemostasia. In: Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW. *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Editora Roca; 2015. p. 399-439.
31. Bateman SW, et al. Diagnosis of disseminated intravascular coagulation in dogs admitted to an intensive care unit. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 215, n. 6, p. 798-804, 1999.
32. Yonezawa LA, et al. Marcadores cardíacos na medicina veterinária. *Ciência Rural*, v. 40, n. 1, p. 222–230, 2010.
33. Mendes RS, et al. Miocardite crônica em um cão naturalmente infectado com *Leishmania (Leishmania) infantum* chagasi: aspectos clínicos e patológicos. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária zootecnia*, p. 79-84, 2014.
34. Schober KE, Kirbach B, Oechtering G. Noninvasive assessment of myocardial cell injury in dogs with suspected cardiac contusion. *Journal of veterinary cardiology*, v. 1, n. 2, p. 17-25, 1999.
35. Langhorn R, Willesen JL. Cardiac troponins in dogs and cats. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 30, n. 1, p. 36-50, 2016.
36. Bharti AR, et al. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet infectious diseases*, v. 3, n. 12, p. 757-771, 2003.
37. Sykes JE, et al. 2010 ACVIM small animal consensus statement on leptospirosis: diagnosis, epidemiology, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, n. 1, p. 1-13, 2011.
38. Segev G, et al. A novel clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 22, n. 2, p. 301-308, 2008.
39. Bristow MR. Mechanisms of development of heart failure in the hypertensive patient. *Cardiology*, v. 92, n. Suppl. 1, p. 3-6, 1999.
40. Vasan RS, Levy D. The role of hypertension in the pathogenesis of heart failure: a clinical mechanistic overview. *Archives of internal medicine*, v. 156, n. 16, p. 1789-1796, 1996.
41. Weber KT. Extracellular matrix remodeling in heart failure: a role for de novo angiotensin II generation. *Circulation*, v. 96, n. 11, p. 4065-4082, 1997.
42. Hauser AM, et al. Severe transient left ventricular “hypertrophy” occurring during acute myocarditis. *Chest*, v. 83, n. 2, p. 275-277, 1983.

43. Masiha S, Sundström J, Lind L. Inflammatory markers are associated with left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in a population-based sample of elderly men and women. *Journal of human hypertension*, v. 27, n. 1, p. 13-17, 2013.
44. Fang L, et al. Systemic inflammation is associated with myocardial fibrosis, diastolic dysfunction, and cardiac hypertrophy in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *American Journal of Translational Research*, v. 9, n. 11, p. 5063, 2017.
45. Joseph JL, Oxford EM, Santilli RA. Transient myocardial thickening in a *Bartonella henselae*-positive cat. *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 20, n. 3, p. 198-203, 2018.
46. Dzikowicz DJ, Carey MG. Obesity and hypertension contribute to prolong QRS complex duration among middle-aged adults. *Annals of Noninvasive Electrocardiology*, v. 24, n. 6, p. e12665, 2019.
47. Conceição-Vertamatti AG, et al. Electrocardiographic Abnormalities in Hypertension Models. *International Journal of Cardiovascular Sciences*, v. 33, p. 321-328, 2020.
48. Topol EJ, Lerman BB. Hypomagnesemic torsades de pointes. *The American journal of cardiology*, v. 52, n. 10, p. 1367-1368, 1983.
49. Eryol NK, et al. Effects of calcium treatment on QT interval and QT dispersion in hypocalcemia. *American Journal of Cardiology*, v. 91, n. 6, p. 750-752, 2003.
50. Diercks DB, et al. Electrocardiographic manifestations: electrolyte abnormalities. *The Journal of emergency medicine*, v. 27, n. 2, p. 153-160, 2004.
51. Van Den Bergh WM, Algra A, Rinkel GJE. Electrocardiographic abnormalities and serum magnesium in patients with subarachnoid hemorrhage. *Stroke*, v. 35, n. 3, p. 644-648, 2004.
52. Papademetriou V. Diuretics, hypokalemia, and cardiac arrhythmia: a 20-year controversy. *The Journal of Clinical Hypertension*, v. 8, n. 2, p. 86, 2006.
53. Misbach C, et al. Echocardiographic and Tissue Doppler Imaging Alterations Associated with Spontaneous Canine Systemic Hypertension. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, p. 1025-1035, 2011.

54. De Abreu CB, et al. Systolic dysfunction by two-dimensional speckle tracking echocardiography in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Cardiology*, v. 34, p. 93-104, 2021.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo foi construído a partir de dois fatores importantes: a alta incidência de leptospirose no Brasil e a escassez de estudos voltados a miocardite em cães com leptospirose. Pouco se sabe sobre a patogenia da leptospirose quanto aos diferentes sítios de lesão, sendo um deles o coração e, ainda pouco se fala sobre a miocardite em cães, onde a maioria dos estudos são voltados a doenças como parvovirose e leishmaniose.

No conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo onde se avaliou o protagonismo da leptospirose no desenvolvimento de alterações cardíacas sem a realização de biópsia endomiocárdica, trazendo resultados esclarecedores e com importante correlação clínica.

Nossos resultados despontam a necessidade de se olhar para a possibilidade de distúrbios de coagulação, como a CID e para o funcionamento cardíaco de cães com leptospirose, que em sua maioria encontram-se internados em estado crítico com risco de óbito iminente. A possibilidade de miocardite e a inflamação sistêmica decorrentes da infecção são fatores de risco com comprometimento miocárdico, assim como a lesão renal aguda, mostrando a necessidade do controle imediato da hipertensão nesses pacientes.

A despeito das dificuldades encontradas, destaca-se o momento atual em que vivemos. A pandemia foi responsável pelo fechamento parcial da rotina do Hospital Veterinário da UEL, o que diminuiu drasticamente o número de casos de cães com suspeita de leptospirose e, conseqüentemente, o número de casos confirmados. Outra dificuldade encontrada é em relação a sorologia pareada, uma vez que muitos animais vão a óbito antes dos 12 dias preconizados para a repetição do exame e, muitos outros não retornam após a alta.

Ressalta-se que, pesquisas futuras precisam compreender maiores números de animais positivos e que, a avaliação histopatológica, comparada aos achados preditivos dos animais que forem a óbito, traria resultados mais consistentes quanto a presença de miocardite.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 72/2020

Londrina, 9 de junho de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: "**Parâmetros hemostáticos e avaliação cardíaca em cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.***" protocolo CEUA n° **003.2020** sob a responsabilidade de **Patrícia Mendes Pereira**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **09/06/2020**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os parâmetros hemostáticos e os achados preditores de miocardite em cães naturalmente infectados por *Leptospira spp.* atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina. **Grau de invasividade: 1.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	09/06/2020 a 28/02/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Cães
N° de animais	110
Peso/ Idade	Variável / adulto
Sexo	Machos ou fêmeas
Origem	Hospital Veterinário e Laboratório de Medicina Transfusional da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Maria Fernanda R. Graciano
Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Profª Drª **Maria Fernanda Rodrigues Graciano**
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Patrícia Mendes Pereira

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Clínicas Veterinárias

C/C para a Direção do Centro de Ciências Agrárias/ CCA

C/C para o Hospital Veterinário da UEL/ CCA

Aprovação CEUA

ANEXO II

Normas para a publicação

... procedures in research manuscripts

PLEASE NOTE that, for all types of manuscripts, **word count** includes text starting at the beginning of the introduction and ending at the end of the discussion; it does not include title page, abstract, references, tables or figure legends.

Standard Paper

Maximum length: 5,000 words

Abstract (structured): The abstract should stand alone (i.e. accurately convey the essential features of the study without the necessity of having read the entire article). It must be included in the manuscript document and be uploaded to the submission website. The abstract must be < 250 words and formatted using the following subheadings:

Background – Brief explanation of why the study was performed.

Hypothesis/Objectives – A brief statement of the principal hypothesis tested in the study, the major objectives of the study, or both.

Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g., research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g., disease status).

Methods – A statement of overall study design (e.g., randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; cohort study; case-control study; case series;) and principal interventions or methods.

Results – All important results of the study, along with summary statistics (a measure of central tendency and variation such as mean and standard deviation or median and range), confidence intervals (where appropriate) and P values for all important numerical results. For studies comparing ≥ 2 interventions, the effect size and 95% (or similar) confidence intervals for the effect size should be reported.

Conclusions and clinical importance – A summary of the study's conclusions and a statement of the clinical importance of these conclusions. Do not restate the results.

Introduction (titled as such)

Length maximum: 500 words