

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA

André Luiz Baptista Galvão
Médico Veterinário

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA RENAL
CRÔNICA**

André Luiz Baptista Galvão

Orientadora: Profa. Dra. Marileda Bonafim Carvalho

Coorientadora: Profa. Dra. Luciane Helena Gargaglioni Batalhão

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (área de concentração em Clínica Médica Veterinária).

2014

Galvão, André Luiz Baptista
G182e Estresse oxidativo em cães com doença renal crônica / André
Luiz Baptista Galvão. -- Jaboticabal, 2014
xvii, 95 p.:il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientadora: Marileda Bonafim Carvalho
Banca examinadora: Paola Castro Moraes, Márcia Ferreira da
Rosa Sobreira, Juliana Corrêa Borges Silva, Evelin Capellari Cárnio
Bibliografia

1. Creatinina. 2. Hipertensão. 3. Óxido nítrico. 4. Peroxidação. 5.
Proteinúria. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:616.63:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

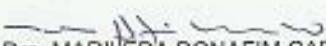
TÍTULO: ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

AUTOR: ANDRÉ LUIZ BAPTISTA GALVÃO

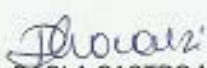
ORIENTADORA: Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. LUCIANE HELENA GARGAGLIONI BATALHÃO

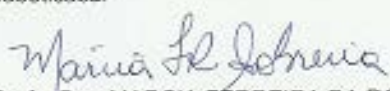
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. MARILEDA BONAFIM CARVALHO

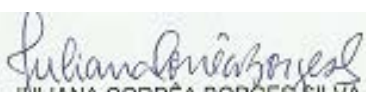
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal


Profa. Dra. MARCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA

Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP


Profa. Dra. JULIANA CORRÊA BORGES SILVA

Pós-Doutoranda / Universidade de São Paulo / Piracicaba/SP


Profa. Dra. EVELIN CAPELLARI CARNIO

Universidade de São Paulo / Ribeirão Preto/SP

Data da realização: 07 de fevereiro de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANDRÉ LUIZ BAPTISTA GALVÃO – nascido em Bauru – SP, aos 13 de janeiro do ano de 1982, filho de Paulo Roberto Galvão e Marihyte Baptista Galvão. Em março de 2005, graduou-se em Medicina Veterinária na Universidade Para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal (UNIDERP) em Campo Grande - MS. Nos anos de 2006 e 2007 participou do programa de aprimoramento em Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”– Câmpus de Jaboticabal – SP. Em Fevereiro de 2010, obteve o título de mestre na área de Clínica Médica – do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da mesma instituição de ensino superior (IES). Em Março de 2010 ingressou no curso de doutorado na área de Clínica Médica – do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da mesma IES. Atualmente é integrante do grupo de pesquisa em nefrologia e urologia veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”– Câmpus de Jaboticabal – SP e do grupo de pesquisa em parasitologia e enfermidades parasitárias dos animais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”– Câmpus de Araçatuba – SP.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão da bolsa de doutorado **Processo FAPESP 2011/08767-3**, sem a qual não seria possível a realização deste estudo;

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Clínica Médica da FCAV/Unesp Jabotibacal;

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Marileda Bonafim Carvalho, não só pela oportunidade oferecida e orientação na residência, mestrado e doutorado, mas também pela paciência, atenção dedicada e principalmente pelos conhecimentos inigualáveis transmitidos, durante todo este período;

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a Luciane Helena Gargaglioni Batalhão pelo auxílio e orientação na realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a Juliana Corrêa Borges Silva pelo auxílio e orientação na realização deste trabalho.

Aos profissionais do Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária da FCAV/Unesp Jaboticabal, Amanda Leal de Vasconcellos, Marcelo Augusto Moraes Koury Alves, e Guadalupe Ferreira Sampaio pela amizade, apoio e conhecimentos passados;

Ao Prof. Dr. Antonio Sergio Ferraudo, pela colaboração e orientação na realização das análises estatísticas;

Aos funcionários Eugênio de Campos Filho, Matheus A. S. Nogueira, as pós-graduandas Andressa Nogueira, Letícia Anai e a aprimoranda Nathan pela presteza na realização dos exames laboratoriais;

As funcionárias do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - FCAV/Unesp Jaboticabal, Shizuko Ota e Marilde Nascimento Matos Bento sempre dispostas a colaborar no que fosse preciso;

À funcionária Maria Luísa Alves de Oliveira da Supervisão do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/Unesp Jaboticabal, pela paciência, disposição e ensinamento em relação as compras e prestações de contas deste estudo;

Aos funcionários do Serviço de Enfermagem de Pequenos Animais do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - FCAV/Unesp Jaboticabal, Carlos Roberto Januário, Anésia Alves de Oliveira, Maria Cacilda Bazei e Márcia Aparecida Simoni que estavam sempre dispostos a colaborar;

Aos residentes, e todos os funcionários da recepção do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/Unesp Jaboticabal, pela colaboração na prestação disposta de seus serviços.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a São Bento, a São Jorge, a Nossa Senhora de Fátima por terem me auxiliado em todos os momentos, transmitindo-me paciência, saúde, força e sabedoria para vencer os obstáculos, e pelas bênçãos recebidas durante esta jornada. Que São Jorge continue abençoando os meus campos de batalha diários e dos que me são queridos!

Ao conselheiro e mestre espiritual Padre Paulo Cezar Mazzi pela paciência e amizade.

Agradeço a minha família, pois os laços espirituais e sanguíneos têm os seus significados e formaram o homem que sou. Assim, os meus modelos de vida, o meu Pai, exemplo e significado do trabalho, não importando as adversidades e glórias da vida, trabalho, e trabalho sempre, com honestidade, dedicação e respeito ao próximo, bem como esta descrição vale para meus avôs. Mãe, significado de luta e perseverança, vencendo os obstáculos e dificuldades da vida, lutando, guerreando e vencendo, desistir nunca! Ao meu Pai e minha Mãe agradeço a educação, a minha formação como pessoa e como profissional, agradeço o ensinamento de respeito, compaixão e igualdade ao próximo, não somos melhores que ninguém, e não existe ninguém melhor do que nós. Somos iguais. Respeite o seu próximo, como você quer que te respeitem. Ainda, ambos me ensinaram o significado da força e da fé. Que na vida para ser algo, fazer algo exige trabalho, amor, respeito, luta e fé! Muito Obrigado!!

Agradeço aos meus irmãos da República Antro da HV, que compartilharam comigo toda a minha história de permanência em Jaboticabal, a residência, o mestrado e o doutorado. Tive a oportunidade ímpar de o ser o morador do “ponto de corte”, o primeiro a integrar esta família entre a transição entres os mais antigos e os mais novos moradores. Agradeço a todos! E tenho orgulho de todos. E torço pelo Sucesso de todos!

Agradeço aos amigos, Mildre Loraine Pinto, Elzylene Lega, Karina Ferreira Duarte, André Grotta, Luciano Andreane, Junior, Thiago Pavam (Thiagão), Juliana Ribeiro da Silva, Cristiano Rodrigues, Carla Bonafini, Beatrice Macente, Rafael Lima e Michele Ruaro pela amizade sincera, pelo respeito, paciência e consideração. Agradeço pelos conselhos e pela paciência. Com vocês aprendi o significado do sentido da palavra fraternidade! Obrigado!

Meus sinceros agradecimentos a família Sfrizo, Sr. Luiz Carlos, Sra. Angela, Luiza e Luciana por terem me aceito como membro da família.

Agradeço a lealdade, o respeito, a fidelidade e o voto de confiança da Prof^a. Dr^a Kênia Cardoso Bicego, Prof^a. Dr^a Luciane Helena G. Batalhão, Prof. Dr. Marcelo Batalhão, Prof^a. Dr^a Juliana Corrêa Borges da Silva e do Prof. Dr. Luis Henrique Montresor, que desde o início do doutorado sem me conhecerem direito, me incentivaram, orientaram, ajudaram, e acalmaram em momentos de dúvidas e de medos. E os considero como grandes amigos, e os levo como exemplo profissional.

Oito anos de orientação! A Prof^a. Dr^a Marileda Bonafim Carvalho agradeço a orientação, a paciência, a confiança, a dedicação, os testes, pois a convivência os ensinamentos, e a sua orientação, me tornaram um profissional Integro, Responsável e Ético, e fez com que eu aprendesse e desenvolvesse o estado de espírito de serenidade. Muito Obrigado!

Agradeço aos pacientes que participaram deste experimento, e aos pacientes do atendimento do Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária, o meu Obrigado!

Dos pacientes do Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária, sou eternamente grato, que como presentes de Deus, eu tive a oportunidade de atender, conviver e aprender com eles, animais mais que especiais, destes animais na sua grande maioria encantadores, alguns que se destacaram com manifestação carinho, proteção, lealdade, confiança e amor e outros com suas particularidades de

personalidade, como o Alfredo, que durante os retornos adorava assistir lutas de MMA, ou o filme “Procurando Nemo” no computador do ambulatório da nefrologia. O Catatau e o Yuki que quando no momento da determinação da pressão arterial sistólica, se mostravam tão tranquilos, confiantes e calmos que cochilavam. A Laisa uma Rottweiler com DRC, que ao me ver no estacionamento do Hospital, não se continha de alegria, e vinha em direção ao carro pulava na porta no vidro do carro, arrastando a proprietária que a reprimia por medo de riscar o carro. A Lili uma Border Collier, com DRC, que como todo cão de guarda, não permitia que ninguém se aproximasse de mim, sendo um amor comigo, mas se alguém encostasse em mim, ou falasse alto comigo, ela em forma proteção avançava mesmo, para morder. O Mufasa o cão labrador, que adotou a nefrologia como segunda casa, que ao ver me sair da recepção se apresentava em alerta, me seguia até a sala de atendimento e depois da consulta pegava a coleira com a boca ia em direção a porta e me acompanhava até a saída do hospital. Em especial ele, o Vinny, um boxer, o meu primeiro paciente da residência, que mesmo que com suas limitações, pois já nascido cego, ao escutar minha voz se dirigia sozinho no ambulatório em que eu estava, colocando sua cabeça sobre minha perna, pedindo carinho, foram 7 anos de tratamento. O propósito do Vinny ser o meu primeiro paciente, hoje vejo que foi muito além do conhecimento científico, este anjo veio com o propósito de me ensinar o respeito, a fraternidade e compaixão. O Lin, outro paciente, sendo o primeiro paciente no meu segundo ano de residência, hoje vive muito bem, com qualidade de vida, com os seus 18 anos, também portador de DRC. Agradeço em especial um paciente que me ensinou o valor da vida, agradeço ao Iron, os meus sinceros agradecimentos, com ele aprendi que o qualquer tratamento envolve muito mais que prescrição veterinário-proprietário, envolve carinho, ética, respeito, compromisso e amor familiar, sendo um exemplo vivo do poder do amor para manutenção da vida, onde teoricamente a vida na situação em que se encontrava seria impossível, devido ao seio familiar que se encontrava, o Iron se mostrava ali firme, vivo e com qualidade de vida, me deixando um ensinamento: “Nunca desista do seu paciente, pois ele não desiste de você!”

Aos outros pacientes especiais, agradeço não somente a oportunidade de aprender sobre a doença em que eram portadores, mais do que trabalhos em

congressos, mais do que artigos em periódicos, agradeço a esses anjos, por me ensinarem algo mais profundo e compensador: a **GRATIDÃO** em sua total pureza! Se pudesse agradecer a cada um dos meus pacientes, mas seria outra tese, assim deixo cientes que cada olhar, cada expressão, cada nome tenho comigo guardado com muito carinho, amor e gratidão!

Pelos meus pacientes e para os meus pacientes a minha eterna gratidão!

Obrigado...

"sendo em forma de Deus, não teve por usurpação ser igual a Deus, mas esvaziou-se a si mesmo, tomando a forma de servo, fazendo-se semelhante aos homens; e, achado na forma de homem, humilhou-se a si mesmo, sendo obediente até à morte, e morte de cruz"
(Carta de Paulo aos Filipenses 2:6-8, ARC).

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Estresse oxidativo	28
2.2. Óxido nítrico	31
2.3. Marcadores do estresse oxidativo	33
3. HIPÓTESE E OBJETIVOS	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Laboratórios	34
4.2. Animais	34
3.2.1. Avaliação preliminar e constituição dos grupos	35
4.3. Protocolo experimental	36
4.4. Metodologia das avaliações	37
4.4.1. Considerações gerais sobre a obtenção e preparo das amostras	37
4.4.2. Análises laboratoriais	38
4.4.3. Avaliação de indicadores do estresse oxidativo	39
4.5. Delineamento experimental e análise estatística	41
5. RESULTADOS	42
5.1. Características físicas e aspectos clínicos	42
5.2. Caracterização clínica e laboratorial dos animais	44
5.3. Perfil bioquímico sérico complementar	48
5.4. Perfil hematológico	54
5.5. Indicadores do estresse oxidativo	58
5.6. Estudo de correlação entre as variáveis avaliadas	60

6. DISCUSSÃO	73
7. CONCLUSÃO	83
8. REFERÊNCIAS	84
APÊNDICE I – Idade, a partir das quais, os cães e gatos são considerados idosos	94
APÊNDICE II – Valores de referência dos parâmetros avaliados ..	95



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 013690/11 do trabalho de pesquisa intitulado "**Avaliação do estresse oxidativo em cães com nefropatia crônica considerando os diferentes estágios da doença renal crônica**", sob a responsabilidade da Profª Drª Marileda Bonafim Carvalho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 07 de julho de 2011.

Jaboticabal, 11 de julho de 2011.

Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA

ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA

RESUMO - A instalação do estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, ocasionando a geração e acúmulo de espécies reativas do oxigênio (ERO). Estudos realizados nos estágios terminais da doença renal crônica (DRC) no homem e em ratos demonstraram que ocorre aumento na produção de ERO. O presente estudo foi conduzido com o objetivo de determinar se o mesmo ocorre em cães clinicamente estáveis nos diferentes estágios da DRC naturalmente adquirida. O protocolo experimental do presente trabalho foi previamente aprovado, pela Comissão de Ética no uso de Animais conforme processo n.º 013690/11. Foram estudados cinco grupos de cães, com idade variando entre quatro a 18 anos, compreendendo o grupo controle, composto por animais sadios (controle, n=17), grupo com DRC estágio 1 (DRC-1, n=12), grupo com DRC estágio 2 (DRC-2, n=10), grupo com DRC estágio 3 (DRC-3, n=13) e grupo com DRC estágio 4 (DRC-4, n=10). Os cães com DRC estavam com o quadro clínico estável e sem receber qualquer tipo de tratamento. Os animais sadios ou com DRC foram submetidos a duas coletas de sangue, com intervalo de 24 horas (amostras repetidas), para obtenção de soro e plasma. O estresse oxidativo foi avaliado pelo poder antioxidante, estimado pelo delta, e pela determinação plasmática indireta de óxido nítrico (NO) por meio da dosagem de nitrato/nitrito. O ensaio foi realizado em duplicatas das amostras de cada avaliação. Os dados obtidos (médias das duplicatas) foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) ($\alpha=0,05$). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Os valores de creatinina sérica, que definiram a classificação dos pacientes do grupo controle, DRC-1, DRC-2, DRC-3 e DRC-4 foram 1,02 $\pm$ 0,02mg/dL; 1,06 $\pm$ 0,05mg/dL; 1,80 $\pm$ 0,03mg/dL; 3,39 $\pm$ 0,21mg/dL e 6,00 $\pm$ 0,28mg/dL, respectivamente. Os resultados relativos ao delta foram (Controle) 0,032 $\pm$ 0,002nmol/ μ L, (DRC-1) 0,030 $\pm$ 0,002nmol/ μ L, (DRC-2) 0,028 $\pm$ 0,003nmol/ μ L, (DRC-3) 0,027 $\pm$ 0,001nmol/ μ L e (DRC-4) 0,025 $\pm$ 0,002nmol/ μ L. Houve diferença significativa entre a média dos cães sadios e as dos cães com o grupo DRC-3. Os resultados das concentrações plasmáticas de NO não diferiram significativamente quando comparados os dados do controle (10,81 $\pm$ 0,51 μ M), DRC-1 (15,49 $\pm$ 1,97 μ M), DRC-2 (19,82 $\pm$ 3,31 μ M). No entanto, o NO plasmático do grupo DRC-3 (17,01 $\pm$ 1,73 μ M) e DRC-4 (83,55 $\pm$ 13,63 μ M), foi significativamente maior, em relação às médias dos cães sadios. Concluiu-se que cães com DRC naturalmente adquirida que se encontram clinicamente estáveis e sem intervenção terapêutica tendem a diminuir o poder antioxidante, e que a concentração plasmática de NO tende a aumentar em parte dos pacientes e torna-se significativamente alta quando os pacientes atingem o estágio 3 e 4 da doença.

Palavras-chave: creatinina, hipertensão, óxido nítrico, peroxidação, proteinúria

OXIDATIVE STRESS IN DOGS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE

ABSTRACT - The establishment of oxidative stress results from an imbalance between oxidants and antioxidants compounds, which generates accumulation of reactive oxygen species (ROS). Studies conducted in terminal stages of chronic kidney disease (CKD) in humans and mice demonstrated an increase in ROS generation. The aim of this study was to determine if the same pattern of response occurs in dogs clinically stable at different stages of naturally occurring CKD. The experimental protocol of this study was previously approved by the Ethics Committee on the use of Animals n.º 013690/11. Five groups of dogs, all aged between four to 18 years old. Were studied the control group was composed of healthy animals (CG, n = 17), CKD stage 1 group (CKD-1, n = 12), CKD stage 2 group (CKD-2, n = 10), CKD stage 3 group (CKD-3, n = 13) and CKD stage 4 group (CKD-4, n = 10). CKD dogs were clinically stable with no treatment. Two blood samples were collected at intervals of 24 hours (repeated measures) to obtain serum and plasma. Oxidative stress was measured by antioxidant power and indirectly by determination of nitric oxide (NO) by nitrate/nitrite. Data (means of duplicates) were submitted to analysis of variance (One-way ANOVA) nonparametric (Kruskal-Wallis) ($\alpha = .05$). The results were expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. The serum creatinine values guided the classification of patients as CG, CKD-1, CKD-2, CKD-3 and CKD-4 and were 1.02 $\pm$ 0.02mg/dL, 1.06 $\pm$ 0.05 mg/dL, 1.80 $\pm$ 0.03 mg/dL, 3.39 $\pm$ 0.21 mg/dL and 6.00 $\pm$ 0.28 mg/dL, respectively. The results related to antioxidant power (GC) 0.032 $\pm$ 0.002 mmol/ μ L, (CKD-1) 0.030 $\pm$ 0.002nmol/ μ L, (CKD-2) 0.028 $\pm$ 0.003nmol/ μ L, (CKD-3) 0.027 $\pm$ 0.003 nmol/ μ L and (CKD-4) 0.025 $\pm$ 0.002 nmol/ μ L were different between the healthy dogs and dogs with CKD, but not differ significantly among groups. The results of the NO plasma concentrations did not differ significantly when comparing the GC data (10.81 $\pm$ 0.51 μ M), CKD-1 (15.49 $\pm$ 1.97 μ M) and CKD-2 (19.83 $\pm$ 3.31 μ M). However, the plasma concentration of CKD-3 (17.01 $\pm$ 1.73 μ M) and CKD-4 (83.55 $\pm$ 13.63 μ M) was significantly higher compared to healthy dogs. In conclusion dogs with naturally acquired CKD, clinically stable, without therapeutic intervention, presented an increased lipid peroxidation, the intensity is independent of the stage of the disease, and the NO plasma concentration can increase in these patients and becomes significantly higher stage 3 and 4 patient.

Keywords: creatinine, hypertension, nitric oxide, peroxidation, proteinuria

LISTA DE ABREVIATURAS

All	angiotensina II
AMDA	dimetil argininas assimétricas
AP	área postrema
CAT	catalase
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CHGM	concentração de hemoglobina globular médio
CKD-1	“group with chronic renal disease stage 1”
CKD-2	“group with chronic renal disease stage 2”
CKD-3	“group with chronic renal disease stage 3”
CKD-4	“group with chronic renal disease stage 4”
cNOS	isoforma constitutiva da NO-sintase
DNA	ácido desoxirribonucléico
DRC	doença renal crônica
DRC-1	grupo doente renal crônico estágio 1
DRC-2	grupo doente renal crônico estágio 2
DRC-3	grupo doente renal crônico estágio 3
DRC-4	grupo doente renal crônico estágio 4
D.U.	densidade urinária
EDRF	“endothelium-derived relaxing factor”
eNOS	NOS endotelial
ERO	espécies reativas do oxigênio
ERS	“electron spin resonance”
GC	“group control”
GPNUV	grupo de pesquisa em nefrologia e urologia veterinária
GPx	glutathione peroxidase
GSH	glutathione reduzida
GSSH	glutathione oxidada
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio

HAS	hipertensão arterial sistêmica
He	hemácia
Hb	hemoglobina
HOCL	ácido hipocloroso
Ht	hematócrito
IL	interleucina
ICAM	molécula de adesão intercelular
iNOS	isoforma induzível da NO-sintase
IRIS	“international renal interest society”
kg	quilogramas
Le	leucócitos
Linf.	linfócitos
LPS	lipopolissacarídeo
MDA	malondialdeído
mg/dl	miligramas por decilitro
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nNOS	NOS - neuronal
NO	óxido nítrico
NOS	NO-sintase
NS	neutrófilos segmentados
O ₂ -	anion superóxido
OH-	radical hidroxila
ONOO	perioxinitrito
OSF	órgão subfornicial
OVLT	órgão vascular da lâmina terminal
PA	pressão arterial
PAS	pressão arterial sistólica
Plaq.	plaquetas
PU	poliúria
PD	polidipsia
SAIb	concentração sérica de albumina
SALT	concentração sérica de alanina aminotransferase

SBP	systolic blood pressure
SCai	concentração sérica de cálcio ionizado
SCat	concentração sérica de cálcio total
Scr	concentração sérica de creatinina
SFA	concentração sérica de fosfatase alcalina
SK	concentração sérica de potássio
SNa	concentração sérica de sódio
SNS	sistema nervoso simpático
SNUV	serviço de nefrologia e urologia veterinária
SOD	enzima superóxido dismutase
SP	concentração sérica de fósforo
SPt	concentração sérica de proteína total
SRAA	sistema renina-angiotensina-aldosterona
SRD	sem raça definida
Sureia	concentração sérica de ureia
TBA	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBA-SG	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – sistema gerador
TFG	taxa de filtração glomerular
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
U-P/C	razão proteína/creatinina urinária
VCAM	molécula de adesão vascular
VGM	volume globular médio

1. INTRODUÇÃO

Ao longo do curso da doença renal crônica (DRC), o paciente pode passar por diferentes estágios em função do grau de comprometimento e severidade da enfermidade. De acordo com a classificação estabelecida pela “International Renal Interest Society” (IRIS, 2009 “staging of” CKD)¹, no que concerne à condição renal, cães e gatos podem ser classificados como estágio 0, pacientes sob risco de desenvolver DRC; e pacientes com diagnóstico de DRC que podem ser categorizados em quatro estágios distintos de acordo com dados clínicos e laboratoriais. Além da presença de sinais que alicerçam o diagnóstico de DRC como alteração renal detectada à palpação ou ao exame de imagem, inadequação da capacidade de concentrar a urina sem causa extrarrenal identificável, proteinúria de origem renal, resultados anormais de biópsia renal, aumento progressivo da concentração sérica de creatinina que devem estar presentes em todos os pacientes, a classificação é baseada na ausência ou presença de graus variados de azotemia e uremia. A classificação é constituída de pelo menos duas mensurações da creatinina sérica, obtidas em jejum, e só é possível em pacientes que se encontram clinicamente estáveis. Para cães, no estágio 1, o paciente não é azotêmico (creatinina sérica $< 1,4$ mg/dL); o estágio 2 é caracterizado por azotemia renal leve (creatinina sérica $1,4 \geq 2,0$ mg/dL) e os sinais clínicos geralmente são leves ou ausentes; no estágio 3 existe azotemia renal moderada (creatinina sérica $2,1 \geq 5,0$ mg/dL) e os sinais clínicos podem estar presentes; e no estágio 4, o paciente apresenta azotemia renal severa (creatinina sérica $> 5,0$ mg/dL) e os sinais clínicos geralmente estão presentes. Também é possível estabelecer subcategorias, dentro de cada estágio, baseadas na excreção urinária de proteína e na pressão sanguínea arterial.

Quando se analisa o mecanismo fisiopatológico básico dos transtornos renais, observa-se a existência de fatores que predispoem ao desequilíbrio oxidativo (NEWMAN, 2012). A instalação do estresse oxidativo decorre da existência de um

¹ www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml

desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, favorecendo a geração e acúmulo de espécies reativas do oxigênio (ERO). Tal evento conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

A hipertensão arterial sistêmica (HAS) (URSO; CAIMI, 2011; ZATZ et al., 2012; BALASUBRAMANIAN, 2013), inflamação e disfunção endotelial que estão relacionadas no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (URSO; CAIMI, 2011; BALASUBRAMANIAN, 2013) e proteinúria são implicadas como consequências do estresse oxidativo na progressão da DRC (WILCOX, 2005; ZATZ et al., 2012; BALASUBRAMANIAN, 2013).

Animais com DRC têm, frequentemente, condições concorrentes que aumentam a geração das ERO, tais como idade avançada, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e desordens sistêmicas diversas. A existência de anemia nestes pacientes exacerba o problema em razão da redução da ação antioxidante renal normalmente exercida pelos eritrócitos (CACHOFEIRO et al., 2008; SCOTT, 2008).

Entretanto, a participação do estresse oxidativo nos diferentes estágios da DRC em cães clinicamente estáveis e sem tratamento, ainda não foi estudada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção de ERO ultrapassa a capacidade de defesa do sistema antioxidante, resultando em dano tecidual (CACHOFEIRO et al., 2008). A geração de ERO é resultante do metabolismo de oxigênio. A mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou minimizar os efeitos deletérios provocados pela ação das ERO (BARBOSA et al., 2010). Acredita-se que o estresse oxidativo seja fator potencialmente importante na mortalidade dos pacientes com DRC e na mediação de muitas complicações, pois está envolvido nas patogêneses da HAS, disfunção endotelial e inflamação (SCOTT, 2008; URSO; CAIMI, 2011; ZATZ et al., 2012).

As mais importantes ERO incluem: o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (BARBOSA et al., 2010). O O_2^- é produzido continuamente por diversos processos celulares como na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria, no microssomo, através de enzimas como xantina oxidase e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH oxidase), ou pela redução monoelétrica de O_2 . O H_2O_2 é formado pela reação da dismutação de O_2^- catalizada pela enzima superóxido dismutase (SOD), pela redução de $2 e^-$ na molécula de O_2 , tratando-se de uma molécula muito difusível entre as células. O OH^- é o mais reativo de todos os radicais livres e o mais lesivo radical conhecido, uma vez formado, causa modificações no DNA, danos nas proteínas e inativação enzimática com consequente peroxidação lipídica (VASCONCELOS et al., 2007).

Também são considerados como ERO: (a) o ácido hipocloroso (HOCl) que oxida um grande número de compostos biológicos, como tióis e tioésteres, aminas, fenóis e ligações insaturadas, sendo mais seletivo que o radical hidroxila, oxida ferro e proteínas; (b) os lipídios, em que a peroxidação lipídica é causada pela ação de uma ERO, geralmente OH^- , que abstrai um átomo de hidrogênio (H^+) de um grupo metileno alílico, normalmente de um ácido graxo poliinsaturado, deixando um elétron

desemparelhado de carbono, caracterizando a etapa de iniciação; (c) o peróxido nitrito (ONOO-) trata-se de um radical livre instável, potente, com propriedades similares ao radical OH^- e causa danos a muitas moléculas biológicas (VASCONCELOS et al., 2007).

Frente à ação potencialmente lesiva promovida pelas ERO, o organismo possui o sistema de defesa antioxidante. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação como: inibindo a formação das ERO, impedindo a ação das ERO e favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA et al., 2010).

O sistema antioxidante é dividido em enzimático e não enzimático. No sistema enzimático estão incluídas as enzimas SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de ERO, envolvidos com a iniciação das reações em cadeia que culminam com a propagação e amplificação do processo e, conseqüentemente, com a ocorrência de danos oxidativos (VASCONCELLOS et al., 2007; BARBOSA et al., 2010). No sistema não-enzimático estão incluídos os compostos antioxidantes de origem dietética, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol e β -caroteno, precursores da vitamina E e A, respectivamente, são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes. São ainda considerados importantes antioxidantes os carotenóides sem a atividade da vitamina A, como licopeno, luteína e zeaxantina. Entre os minerais destacam-se o zinco, cobre, selênio e magnésio (BARBOSA et al., 2010).

Considerando a potencialidade da ação do radical OH^- e o fato da inexistência de defesa enzimática especializada, é de extrema importância a manutenção do perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes, com o propósito de promover a manutenção da integridade celular. Desse modo, merece destaque a ação da GPx, uma vez que sua ação depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e glutathione oxidada (GSSG) (BARBOSA et al. 2010).

O paciente com transtornos renais, geralmente, apresenta-se mal nutrido, com carências em reservas de vitaminas e minerais, o que diminui os mecanismos

de defesa antioxidante e favorece a instalação do estresse oxidativo (LOCATELLI et al., 2003). Nestas condições, consideram-se as implicações da síndrome urêmica (anorexia, vômitos, paladar seletivo e gastrite) concomitante à dieta restrita, à má absorção de nutrientes e às perdas urinárias de vitaminas hidrossolúveis e proteína (WILCOX; TISHER, 2008).

No parênquima renal as células glomerulares, células tubulares e os macrófagos são geradores potenciais de ERO (GALLE, 2001). As ERO com ações importantes nos rins incluem o O_2^- , H_2O_2 , OH^- , $HOCl$, lipídios, $ONOO^-$, entre outros (LOCATELLI et al., 2003).

Animais com DRC têm, frequentemente, condições concorrentes que aumentam a geração das ERO, tais como idade avançada, ativação do SRAA e distúrbios sistêmicos diversos. A presença de fibrose intersticial no parênquima renal resulta em deficiência na atividade mitocondrial local, promovendo, assim, a geração das ERO (SCOTT, 2008).

A redução da taxa de filtração glomerular (TFG) na evolução da DRC em cães e gatos constitui um fator para a instalação do estresse oxidativo no rim. Em condições normais é produzida uma variedade de ERO dentro das células renais, como resultante do metabolismo aeróbico, porém, na vigência de DRC ocorre aumento das ERO. Na DRC, caracteristicamente, ocorre hipertrofia e hipertensão glomerular dos néfrons remanescentes, o que pode, mesmo que temporariamente, manter a TFG. Este processo resulta em incremento da fosforilação oxidativa celular renal e aumento das ERO potencialmente lesivas. Em adição, os sistemas de defesa antioxidantes dos doentes renais crônicos são relativamente deficientes (SCOTT, 2008). A ativação crônica de substâncias oxidativas, tal qual ocorre na uremia, atinge proporções patológicas, contribuindo para dano celular e tecidual sistêmico (LOCATELLI et al., 2003; CAMPBELL, 2013).

Segundo Shimizu (2005) e Syme et al. (2007), a HAS contribui significativamente para a morbidade cardiovascular e mortalidade dos pacientes renais crônicos e está diretamente relacionada com o SRAA e também com a peroxidação lipídica. De acordo com Scott (2008), a disfunção endotelial dos vasos sanguíneos é caracterizada por alterações na capacidade de dilatação vascular, decorrente da deficiência de óxido nítrico (NO), que, por sua vez, promove

vasoconstrição e aderência de moléculas tais como VCAM-1 (molécula de adesão vascular), ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) e P e E-selectina. Estas moléculas servem como receptores de leucócitos circulantes nas artérias, que são atraídos por meio da transcrição do fator nuclear Kappa B (NF- κ B), TNF- α (fator de necrose tumoral – alfa) e IL-1, estabelecendo assim o processo inflamatório e a hipertensão arterial (ZAFARULLAH et al., 2003; SCOTT, 2008; URSO; CAIMI, 2011; CAMPBELL, 2013; BROWN, 2013).

A ativação do SRAA desempenha um papel importante no desenvolvimento e na fisiopatologia de doenças do sistema cardiovascular, em especial na HAS e DRC (SAVOIA; SCHIFFRIN; 2006). A angiotensina II (All) atua como potente agente pró-inflamatório, modulando repostas com quimiotaxia, proliferação e diferenciação de monócitos em macrófagos, através do aumento da liberação de moléculas de adesão e citocinas, induzindo a aderência de células inflamatórias às células endoteliais. Este peptídeo promove vasoconstrição da arteríola eferente glomerular, que reduz o fluxo sanguíneo e aumenta a filtração glomerular, contribuindo para o acréscimo do estresse oxidativo no néfron (SCOTT, 2008).

A interação da All e seu receptor AT1 modulam a resposta inflamatória envolvida com estresse oxidativo, podendo promover efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos no coração, induzir hipertrofia e apoptose das células cardíacas. A administração da All por via subcutânea em camundongos demonstrou hipertrofia da camada média da artéria aorta e infiltração perivascular por linfócitos T e macrófagos, com consequente espessamento da parede vascular, bem como lesão aos miócitos e fibrose intersticial em células cardíacas. Entretanto, quando administrada pela via intravenosa a All pode estar relacionada com a HAS, lesão glomerular, proteinúria e fibrose intersticial no tecido renal (CAMPBELL, 2013).

Segundo Ganta et al. (2005) e Santisteban et al. (2013) a administração de All, aumenta a atividade do SNS do baço, gânglios linfáticos e da medula óssea, resultando em liberação mediadores inflamatórios como IL-1, IL-2, IL-6 e IL-16 na circulação e de linfócitos T, este efeito pode estar associado a disfunção endotelial e inflamação vascular.

No sistema nervoso central, a All atua particularmente no órgão subfornicial (OSF), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), área postrema (AP) e núcleo

paraventricular do hipotálamo. A ação da All ao atuar no OSF e OVLT ativa as fibras pós-ganglionares simpáticas, e estas promovem a vasoconstrição periférica, aumento do inotropismo e liberação de renina nas células justaglomerulares. No núcleo paraventricular do hipotálamo a All promove aumento da atividade simpática renal. No sistema nervoso periférico a All atua nos gânglios simpáticos facilitando a liberação da acetilcolina, e nas terminações simpáticas cardíacas e vasculares facilitando a liberação de noradrenalina. Com a hiperatividade simpática induzida pela All ocorre vasoconstrição, que provoca o aumento da resistência vascular periférica total, aumento da pós-carga e, subsequentemente, da pressão arterial (PA) (GUYENET; 2006; DURAND et al. 2012). A All também é responsável por atenuar de forma importante o barreflexo, agindo principalmente no núcleo do trato solitário (SANTOS et al., 2012).

Na zona glomerular da glândula adrenal a All, promove a liberação da aldosterona, a qual possui ação nos túbulos renais induzindo a reabsorção de sódio e retenção de água, com significativo aumento do volume extracelular, com comprometimento sobre a regulação da PA (DURAND et al., 2012).

Estudos demonstraram que a aldosterona pode promover a liberação de mediadores inflamatórios, como a ciclo-oxigenase-2, proteína de atração de monócitos (MPC-1) e ICAM-1, recrutando monócitos e macrófagos nos vasos sanguíneos do coração e dos rins, com conseqüente fibrose tecidual (BROWN, 2013; SCHIFFRIN, 2013).

A aldosterona contribui para a instalação de estresse oxidativo através do aumento da atividade de macrófagos nas células mesangiais e podócitos nos rins, células endoteliais do coração e da artéria aorta, bem como pelo aumento da atividade enzima NADPH, condições estas descritas que predispõe a disfunção endotelial (BROWN, 2013).

A aldosterona e a All também podem induzir a liberação da endotelina-1, que contribui para a fibrose do tecido cardíaco, devido ao aumento da síntese de colágeno pelos fibroblastos no coração (BROWN, 2013). A endotelina-1 por si só, trata-se de um importante mediador do processo inflamatório no sistema cardiovascular, pois está envolvida com a liberação de IL-6 e ICAM-1 (SAVOIA; SCHIFFRIN, 2006).

A ativação crônica do SRAA provoca proteinúria em decorrência de hipertensão e aumento da permeabilidade capilar glomerular, além da interferência na expressão de nefrina. O aumento de oferta de proteínas ao túbulo resulta em inflamação tubulointersticial (SHIMIZU, 2005; BROWN, 2013; CAMPBELL, 2013). Assim, a proteinúria constitui outro fator de risco importante para o paciente doente renal (SYME et al., 2007; ZATZ et al., 2012).

Buranakarl et al. (2008) avaliaram possíveis indicadores de estresse oxidativo e características dos eritrócitos em cães saudáveis e em cães azotêmicos, tendo concluído que os cães doentes azotêmicos apresentaram aumento dos marcadores de estresse oxidativo, principalmente o malondialdeído (MDA) urinário.

O aumento da atividade da ERO pode comprometer a produção de NO nas células endoteliais, limitando sua disponibilidade, aumentando a resposta de vasoconstritores, principalmente da AII (LEE, 2008). Estudos demonstraram que a deficiência de NO na DRC é atribuída por diversos fatores, que resultam em vasoconstrição e conseqüentemente hipertensão glomerular, HAS, proteinúria e evolução do agravamento da função renal (MODLINGER et al., 2004).

2.2. Óxido nítrico

O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, que possui sete elétrons de nitrogênio e oito de oxigênio, possuindo um elétron desemparelhado (DUSSE et al., 2003). Trata-se de um radical abundante que age em uma variedade de processos biológicos, em especial, quando produzido pelas células endoteliais desempenha um papel significativo no controle cardiovascular, tanto no controle da resistência vascular como na agregação plaquetária (FÖRSTEMANN; SESSA, 2011). Este radical livre, também possui a função de neurotransmissor e de regulador do sistema imune. Originalmente o NO foi identificado como fator relaxante derivado do endotélio (“endothelium-derived relaxing factor”: EDRF) sendo um potente vasodilatador, difundindo-se rapidamente entre e dentro das células (MONCADA et al., 1991; VASCONCELOS et al., 2007).

O NO é formado a partir do nitrogênio da guanidina presente na L-arginina, sob a ação catalítica da enzima NO-sintase (NOS), gerando a formação de NO e um co-produto, a L-citrulina (BAYLIS, 2008; ZATZ et al., 2012). Sendo um radical livre, o NO reage rapidamente com o oxigênio tanto na fase gasosa como em solução aquosa, formando o gás dióxido de nitrogênio na forma gasosa (NO_2) ou nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-) em solução, ambos podem ser dosados e podem estimar a produção de NO (ZATZ et al., 2012).

A detecção do NO em amostras biológicas apresenta um desafio, em função de sua pequena concentração e sua meia vida extremamente curta. Desse modo, a determinação deste composto pode ser estimada de forma indireta, através da dosagem plasmática ou urinária de NO_2^- e NO_3^- , utilizando-se metodologias complexas, como a quimioluminescência (DUSSE et al., 2003).

No rim são atribuídas ao NO, funções como: (a) regulação da hemodinâmica glomerular e da função tubuloglomerular, (b) participação na natriurese pressórica, (c) manutenção da perfusão medular, (d) inibição da reabsorção de sódio tubular, e (e) modulação da atividade do sistema nervoso simpático (LEE, 2008).

A produção contínua de NO é indispensável à manutenção da homeostase do sistema circulatório. Existem isoformas de NOS, que possuem funções distintas. A isoforma neuronal (nNOS), comumente denominada de isoforma I ou βNOS é encontrada no encéfalo, na medula espinhal, nos gânglios simpáticos, nas glândulas adrenais, nos neurônios nitrérgicos e em outras estruturas como células endoteliais de pulmões, útero e estômago, células da mácula densa do rim, células da ilhota pancreática e da musculatura esquelética (LEE, 2008). A isoforma endotelial (eNOS), também denominada de isoforma III, está ligada à membrana das células endoteliais, bem como a adesão e agregação plaquetária. A eNOS pode ser encontrada em sinciciotrofoblastos, células epiteliais tubulares do rim, células intersticiais do cólon e hipocampo (MONCADA et al., 1994; DAVIS et al., 2013). A isoforma induzível (iNO) ou isoforma NOSII é ativada a partir de alguns estímulos patológicos como: (a) lipopolissacarídeos bacterianos (LPS), (b) interleucina-1, (c) endotoxinas e (d) fator de necrose tumoral, e são independentes de íons de cálcio. Essa isoforma pode ser expressa em uma grande variedade de tipos celulares,

incluindo macrófagos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, células de Kupffer, hepatócitos e células endoteliais (ZATZ et al., 2012).

Inicialmente as isoformas eNOS e a nNOS foram caracterizadas como constitutivas, ou seja, eram expressas e produzidas rotineiramente, sem a necessidade de indução gênica. Já iNOS para ser expressa seria dependente de condições específicas, como em infecções. Entretanto, hoje é sabido que estas diferenças são menos delimitadas, pois a eNOS e a nNOS podem ser induzidas em determinadas circunstâncias, enquanto que a iNOS é expressa constitutivamente em vários tecidos (ZATZ et al., 2012).

Nos rins é descrita a presença da isoforma eNOS no endotélio vascular da alça de Henle ramo ascendente e ducto coletor, sendo encontrada também a isoforma nNOS na mácula densa, arteríola aferente, alça de Henle ramo ascendente, cápsula de Bowman e ducto coletor. A expressão da isoforma iNOS tem sido associada às condições de inflamação (LEE, 2008).

Estudos realizados demonstraram que a deficiência de NO na DRC resulta em vasoconstrição e consequentemente hipertensão glomerular, HAS, proteinúria e evolução do comprometimento da função renal (MODLINGER et al., 2004; FÖRSTEMANN; SESSA, 2011; ZATZ et al., 2012). São atribuídas como causas prováveis da deficiência de NO na DRC: (a) limitações na disponibilidade do substrato (L-arginina), devido sua diminuição na biossíntese renal, (b) transporte diminuído de L-arginina em células endoteliais em pacientes urêmicos, (c) concentração elevada de inibidores da síntese de NO, em particular dimetil-argininas assimétricas (ADMA), (d) redução da massa renal (córtex renal), relacionado a uma lesão e (e) na DRC com comprometimento tubular ocorre como consequência uma diminuição na reabsorção da L-arginina (BAYLIS, 2008). Outra causa implicada na diminuição da disponibilidade de NO trata-se do estresse oxidativo, pois, as ERO podem atuar inibindo o NO, por reagir com a molécula de NO produzida, diminuindo a sua disponibilidade para as células, favorecendo os processos tromboembólicos, isto se relaciona-se também com a formação de O_2^- (BAYLIS, 2008).

O estresse oxidativo nos vasos sanguíneos contribui para as doenças tromboembólicas. O NO produzido pela eNOS induz a produção da enzima SOD na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O_2^- disponível e,

consequentemente, a produção de ONOO^- . O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livre e previne a geração de O_2^- . Na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos ativados produzem O_2^- , expressam iNOS e produzem NO. Desse modo, são produzidos ONOO^- e $\text{OH}^\cdot$, comprometendo ainda mais a integridade tissular, favorecendo a ativação da coagulação e contribuindo para obstrução da luz vascular (FÖRSTEMANN; SESSA, 2011).

2.3. Marcadores do estresse oxidativo

Quando a produção de radicais livres e/ou ERO supera a atividade de ação do sistema antioxidante, a oxidação de biomoléculas é favorecida, gerando metabólitos específicos, que são os marcadores do estresse oxidativo, estes podem ser identificados e quantificados. Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e do ácido desoxirribonucleico (DNA), sendo os primeiros de maior expressão (BARBOSA et al., 2010).

Em condições de comprometimento da função renal associada com o estresse oxidativo, ocorre a elevação de biomarcadores no sangue, tal como o MDA (CACHOFEIRO et al., 2008). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivada da β -ruptura de endociclicização de ácidos graxos poliinsaturados com mais de duas duplas ligações, tais como ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico. Atualmente, o MDA é considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral do dano oxidativo no soro e no plasma (VASCONCELOS et al., 2007).

O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA). O MDA reage com o TBA e forma um cromógeno de cor rosa fluorescente, cuja absorção ocorre em λ de 535nm e fluorescência de 553nm. Considerando-se o teste não é específico para MDA, pois outros aldeídos participam da mesma reação (VASCONCELOS et al., 2007).

Na condição do estresse oxidativo, os marcadores estimam o dano causado pelas ERO sobre o sistema biológico e a eficiência da defesa antioxidante

(VASCONCELOS et al., 2007).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

A hipótese do presente estudo é que o estresse oxidativo tem participação fundamental não só nos mecanismos de lesão renal, mas também nos que culminam com diversas alterações extrarrenais dos doentes renais crônicos (síndrome urêmica). Assim, objetiva-se com este estudo (1) quantificar o estresse oxidativo em cães com DRC considerando os quatro estágios de progressão da doença, utilizando como marcadores as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a concentração plasmática de NO; bem como (2) investigar a possível existência de correlação entre estes indicadores de estresse oxidativo e o estágio da DRC, o grau de proteinúria e elevação da pressão arterial sistólica (PAS).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Laboratórios

Os experimentos foram realizados nas dependências dos Laboratórios de Nefrologia e Urologia do Grupo de Pesquisa em Nefrologia e Urologia Veterinária (GPNUV), Patologia Clínica Veterinária, Reprodução Animal e Patologia Veterinária, localizados na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista – Unesp – Câmpus de Jaboticabal – SP, bem como no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Enfermagem da Escola de Enfermagem geral e especializada de Ribeirão Preto-SP da Universidade de São Paulo (USP).

4.2. Animais

O protocolo experimental do presente trabalho foi previamente aprovado, pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) conforme processo n.º 013690/11.

Foram avaliados 62 cães provenientes do canil do GPNUV e do atendimento do Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária (SNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária - Unesp – Câmpus de Jaboticabal - SP.

A inclusão de pacientes do SNUV foi feita sob anuência dos proprietários que se dispuseram a trazer o seu cão para duas avaliações respeitando o intervalo de 24 horas de acordo com o preconizado pela IRIS, 2009 – “staging of CKD”. Para tanto, os proprietários foram devidamente esclarecidos sobre o desenho experimental.

Todos os animais doentes foram devidamente assistidos e foram iniciadas as intervenções terapêuticas, recomendadas para cada caso, após a segunda coleta de amostras.

4.2.1. Avaliação preliminar e constituição dos grupos

Para a formação dos grupos, os cães foram avaliados clínica e laboratorialmente, de acordo com a abordagem semiológica descrita por Carvalho (2008). Os cães foram incluídos no estudo, à medida que deram entrada no SNUV, até que cada grupo tivesse pelo menos 10 animais.

Critérios de inclusão – para compor o grupo controle os cães deviam ser adultos saudáveis, sem restrição de sexo ou raça. Para compor os grupos de animais doentes os cães deveriam ser adultos, sem restrição de sexo ou raça e apresentar sinais clínicos e laboratoriais de DRC, nos estágios 1, 2, 3 ou 4, em condição clínica estável.

Critérios de exclusão – os motivos de exclusão compreenderam existência de urolitíase, obstrução urinária, infecção ou neoplasia de trato urinário, crise urêmica, comorbidades, necessidade de tratamento imediato, pacientes já em tratamento farmacológico, alimentar ou de reposição e desistência antes da segunda coleta de amostras.

Em conformidade com a classificação proposta pela IRIS (2009 – “staging of CKD”) os cães com DRC foram distribuídos em quatro grupos denominados DRC-1, DRC-2, DRC-3 e DRC-4 de acordo com o estágio da doença conforme sumarizado na Tabela 1. Os cães saudáveis foram reunidos no grupo denominado Controle.

Tabela 1 - Sumário da composição dos grupos de cães sadios (Controle) e de cães com doença renal crônica no estágio 1 (DRC-1), estágio 2 (DRC-2), estágio 3 (DRC-3) e estágio 4 (DRC-4), de acordo com o preconizado pela IRIS, 2009 – “staging of CKD”.

GRUPOS	Creatinina sérica (mg/dL)	Características clínicas
Controle (n=17)	< 1,4	<u>Normalidade</u> – cães clinicamente sadios.
DRC-1 (n=12)	< 1,4	<u>Não azotêmico</u> . Características de DRC - habilidade inadequada de concentração da urina sem causa extrarrenal identificável; anormalidade renal à palpação ou em imagem; proteinúria renal persistente; anormalidade à biópsia renal quando realizada; aumento progressivo da creatinina sérica.
DRC-2 (n=10)	1,4 ≥ 2,0	<u>Azotemia renal leve</u> . Com sinais sistêmicos leves ou ausentes. Existência das características de DRC.
DRC-3 (n=13)	2,1 ≥ 5,0	<u>Azotemia renal moderada</u> . Presentes sinais sistêmicos. Existência das características de DRC.
DRC-4 (n=10)	>5,0	<u>Azotemia renal severa</u> . Presentes sinais sistêmicos. Existência das características de DRC.

4.3. Protocolo experimental

Sendo elegíveis para compor os grupos, os pacientes sadios ou com DRC, foram submetidos a duas sessões de avaliação (exame clínico de rotina e coletas de amostras de sangue e urina) com intervalo de 24 horas.

Para a determinação da pressão arterial sistólica, foi utilizado o aparelho doppler vascular², dotado de módulo de coleta não-invasiva. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e o manguito³ foi colocado no membro torácico esquerdo, entre o olecrano e o carpo. Os manguitos utilizados apresentaram aproximadamente 40% da circunferência do local em que foram colocados no membro torácico. Foram realizadas sete determinações e os valores limítrofes superiores e inferiores descartados para a obtenção de uma média mais acurada (TILLEY, 2008) Depois de estabelecida as médias os valores foram classificados utilizando os critérios estabelecidos pela Renal Interest Society (IRIS 2009 staging CKD).

² Doppler Vascular DV10 Pastilha Microem – Ribeirão Preto – SP..

³ Manguito Neonatal dois tubos.

A avaliação dos animais incluiu exame físico de rotina, mensuração da pressão arterial sistólica, urinálise, avaliação da excreção urinária de proteína, análise do perfil bioquímico e eletrolítico sérico (ureia, creatinina, proteína total, albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, sódio, potássio, fósforo, cálcio total e cálcio iônico), hemograma e os ensaios para mensuração de indicadores de estresse oxidativo (concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinação plasmática indireta de NO).

4.4. Metodologia das avaliações

4.4.1. Considerações gerais sobre a obtenção e preparo de amostras

Foram necessárias amostras de urina, sangue total e soro para realização de exames laboratoriais indicados para cada uma das avaliações que foram feitas. A seu tempo, de cada animal, e a cada avaliação, foram coletadas amostras de 12mL de sangue por venopunção jugular. De cada amostra coletada, 2mL foram acondicionados em um frasco com ácido etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA) a 10%, para execução do hemograma, 7mL foram colocados em tubos sem anticoagulante para obtenção da fração sérica utilizada para as análises bioquímicas séricas e para a determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os outros 3mL foram acondicionados em um frasco heparinizado para obtenção de plasma a se empregado na determinação indireta de NO. As alíquotas de sangue destinadas à determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, e para determinação indireta de NO foram centrifugadas a 2.000g por 20 minutos a 4°C. Frações das amostras de soro para análise bioquímica sérica foram congeladas a -20°C para eventuais repetições de análises laboratoriais. Para a determinação plasmática de NO e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, as amostras de plasma foram congeladas a -70°C.

4.4.2. Análises laboratoriais

Análises bioquímicas séricas e urinárias

As amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método Jaffé modificado), ureia (método enzimático), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), cálcio total (método da cresolftaleína complexona), e fósforo (método do fosfomolibdato). Nas amostras de urina foram dosadas creatinina (método Jaffé modificado) e proteína total (método do vermelho de pirogalol). Todas as análises bioquímicas foram feitas com os conjuntos de reagentes do sistema Labtest⁴ para diagnóstico. Para as leituras foi empregado espectrofotômetro⁵ semi-automático.

As concentrações séricas de sódio, potássio e cálcio iônico foram feitas pelo método de eletrodo íon-seletivo⁶.

Para a urinálise e avaliação da proteinúria, as amostras de urina foram obtidas por meio de cateterização transmural e analisadas no máximo 30 minutos após a coleta. Para os testes químicos foram utilizadas fitas reagentes⁷.

Avaliação da proteinúria

A proteinúria foi avaliada por meio da determinação da razão proteína/creatinina da urina (U-P/C), a partir dos valores de concentração de creatinina e de proteína obtidas na mesma amostra de urina.

Hemograma

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos, e plaquetas, bem como a taxa de hemoglobina e hematócrito, VGM e CHGM foram obtidas com o auxílio de um

⁴ LABTEST – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

⁵ LABQUEST-LABTEST – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

⁶ ISELAB – Drake – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

⁷ COMBUR 10 Test UX® - Boehringer Mannheim S.A. – Buenos Aires – Argentina.

contador automático⁸. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, May-Gruwald e Giemsa. As amostras foram processadas no período máximo de uma hora após a coleta.

4.4.3. Avaliação de indicadores de estresse oxidativo

Para analisar os indicadores de estresse oxidativo, os ensaios foram conduzidos em duplicata das amostras. Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e determinação indireta de NO foram realizados ensaios únicos, para evitar erros entre ensaios.

Determinação da concentração sérica das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A extensão da degradação da desoxirribose por radicais hidroxí (OH-) gerados neste sistema foi mensurada pelo ensaio do ácido Tiobarbitúrico (TBA) descrito por Payá et al. (1992). Alíquotas das amostras foram diluídas em solução tampão Tris-ácido cítrico mantendo-se o padrão 100µL de soro. Das duas alíquotas de soro a primeira foi adicionada a 2mL da solução de TBA (15% de Ácido Tricloroacético, 0,275% de Ácido Tiobarbitúrico e 0,25M de Ácido Clorídrico) para a obtenção da peroxidação lipídica espontânea. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 15 minutos e, então, foram resfriados e centrifugados por 15 minutos a 1200g para formação de precipitado. O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro. O cromógeno desenvolvido foi identificado por meio de leituras de absorbância em um comprimento de onda fixo de 532nm. A segunda alíquota foi adicionada a 2mL de solução de TBA-SG (15% de Ácido Tricloroacético, 0,375% de Ácido Tiobarbitúrico, 0,25M de Ácido Clorídrico, 0,24mM de Cloreto de Ferro e 50µM de Hidroxitoluenobutilado) para obtenção da peroxidação lipídica induzida. Esse procedimento, denominado sistema gerador, tem a mesma função do sistema

⁸ COULTER modelo ABC T8.

gerador para os radicais O_2^- e H_2O_2 . Os resultados da mensuração de peroxidação lipídica foram expressos em nmol/ μ L.

A solução de TBA quantifica a peroxidação lipídica espontânea, enquanto a solução TBA-SG quantifica a peroxidação lipídica induzida ou catalizada. Na diferença entre TBA-SG e TBA, se obtém o Delta, que indica o poder antioxidante (BUEGE; AUST, 1978).

Determinação indireta de NO plasmático por meio da dosagem do nitrato/nitrito

Para a determinação de nitrato/nitrito foi utilizado o método descrito por Archer (1993) e utilizada por Batalhão et al. (2008).

Alíquotas de 100 μ L de amostras de plasma foram desproteinizadas por precipitação utilizando 200 μ L de etanol absoluto, mantido à 4°C, seguindo-se agitação e descanso de 30 minutos em freezer (-20°C). As amostras foram, então, centrifugadas (4.000g, 5 minutos, a 25°C) e os sobrenadantes reservados para análise posterior.

Para a mensuração do NO plasmático, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® "Nitric Oxide Analyzer" 280⁹.

De cada amostra desproteinizada, utilizaram-se 5,0 μ L, que foram injetados na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO sugado para a câmara de quimioluminescência do analisador, onde reage com o ozônio (O_3), formando dióxido de nitrogênio (NO_2^-). O NO_2^- apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, cuja área sob a curva gerada pela corrente

⁹ GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA.

elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 25, 50 e 100 μM . Os valores de nitrato foram expressos em μM .

4.5. Delineamento experimental e análise estatística dos resultados

O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados com distribuição dos animais de acordo com o diagnóstico. Os resultados foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis), considerando o fator grupo, seguida de teste de Dunn de comparação múltipla das médias ($\alpha = 0,05$).

Tomando os dados de cada parâmetro em conjuntos únicos ($n=124$), foram testadas as correlações (Pearson) entre eles. Analisaram-se as correlações tendo como base (1) a concentração sérica de creatinina que reflete a condição clínica dos animais (de sadio até DRC-4), (2) o poder antioxidante dado pelo delta TBASG-TBA e (3) a concentração de óxido nítrico, que foram testadas com cada um dos demais parâmetros avaliados ($\alpha = 0,05$).

A correlação foi considerada de forte intensidade entre as variáveis quando $r > 0,60$, moderada intensidade quando o valor de r encontrava-se entre 0,30 e 0,60 e fraca intensidade quando $r < 0,30$ (DANCEY; REIDY, 2006).

As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prisma version 6.02 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA.

5. RESULTADOS

5.1. Características físicas e aspectos clínicos gerais dos animais

Dos 62 cães incluídos no estudo, 18 eram sem raça definida e os demais totalizaram 15 raças distintas, o que resultou em ampla variedade de porte e peso corporal. Quanto à faixa etária, 27% eram adultos (≥ 4 anos) e 73% eram idosos (APÊNDICE I). Dos 34 (55%) cães machos, apenas um era castrado, enquanto das 28 (45%) fêmeas incluídas no estudo, a maioria (25) era castrada. Na Tabela 2, esses dados estão apresentados de acordo com a frequência em cada um dos cinco grupos avaliados.

As causas que motivaram a avaliação inicial dos 62 cães estudados incluíram solicitação de check-up em 23% dos casos, avaliação pré-operatória de cirurgias para correção de problemas localizados e sem comprometimento sistêmico em 32% dos animais e manifestação de sinal clínico em 45% dos casos. Foram identificados 17 (27%) cães sadios e 45 (73%) cães com DRC. Nestes pacientes, os sinais clínicos relatados incluíram poliúria e polidipsia, noctúria, halitose, variação do apetite, e perda de peso lenta e progressiva, que se apresentavam de forma isolada ou combinada.

Tabela 2 – Valores de peso e idade (média $\pm$ erro padrão) e frequência e distribuição dos dados relativos ao porte, à faixa etária, ao sexo, à condição do trato genital e à raça dos animais avaliados, que incluíram cães saudáveis (Controle) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1), 2 (DRC-2), 3 (DRC-3), e 4 (DRC-4). Unesp - Jaboticabal, 2013.

Características	Grupos Avaliados				
	Controle n=17	DRC-1 n=12	DRC-2 n=10	DRC-3 n=13	DRC-4 n=10
Peso corporal (kg)	20,90 $\pm$ 3,09	13,95 $\pm$ 3,32	15,78 $\pm$ 3,21	17,53 $\pm$ 4,28	27,38 $\pm$ 4,25
Idade (anos)	9,0 $\pm$ 0,86	11,58 $\pm$ 1,25	10,50 $\pm$ 1,17	11,23 $\pm$ 0,87	9,90 $\pm$ 1,01
Pequenos (até 10kg)	5 (29%)	7 (58%)	4 (40%)	7 (54%)	1 (10%)
Médios (11 a 25kg)	6 (36%)	4 (34%)	4 (40%)	1 (8%)	3 (30%)
Grandes (26 a 45)	5 (29%)	-	2 (20%)	5 (38%)	5 (50%)
Gigantes (>45)	1 (6%)	1 (8%)	-	-	1 (10%)
Adultos ($\geq$4 anos)	8 (47%)	3 (25%)	3 (30%)	1 (8%)	2 (20%)
Idosos	9 (53%)	9 (75%)	7 (70%)	12 (92%)	8 (80%)
Machos intactos	7 (41%)	6 (50%)	5 (50%)	11 (85%)	4 (40%)
Machos castrados	1 (6%)	-	-	-	-
Fêmeas intactas	-	1 (8%)	-	-	2 (20%)
Fêmeas castradas	9 (53%)	5 (42%)	5 (50%)	2 (15%)	4 (40%)
Sem raça definida	6 (35%)	5 (42%)	3 (30%)	-	4 (40%)
Pinscher	-	-	1 (10%)	2 (15%)	-
Shitzu	1 (6%)	-	-	1 (8%)	-
York Shire	-	-	-	1 (8%)	-
Pequinês	-	1 (8%)	-	-	-
Poodle	3 (17%)	3 (25%)	1 (10%)	1 (8%)	2 (20%)
Teckel	-	2 (17%)	1 (10%)	1 (8%)	-
Boston Terrier	1 (6%)	-	-	-	-
Coker	-	-	1 (10%)	2 (15%)	-
Border Colie	1 (6%)	-	-	-	-
Pit Bull	1 (6%)	-	1 (10%)	2 (15%)	-
Bull Terrier	1 (6%)	-	-	-	-
Labrador	-	-	2 (20%)	2 (15%)	1 (10%)
Boxer	2 (12%)	-	-	-	-
Pastor Alemão	-	-	-	1 (8%)	2 (20%)
Rottweiler	1 (6%)	1 (8%)	-	-	1 (10%)

5.2. Caracterização clínica e laboratorial dos animais

De acordo com a apresentação clínica e resultados de exames complementares, os 45 cães com diagnóstico de DRC foram distribuídos em quatro grupos em função do estágio da doença. Seguindo os critérios da IRIS 2009, para classificação da DRC, do total de 45 animais, foram identificados 12 (27%) cães em estágio 1, 10 (22%) cães em estágio 2, 13 (29%) cães em estágio 3, e 10 (22%) cães em estágio 4. Os valores de normalidade para espécie canina das análises laboratoriais estão expressos no apêndice II. Na Tabela 3 encontram-se os resultados (média±erro padrão da média e comparação múltipla das médias) das concentrações séricas de creatinina (Scr), densidade urinária (DU), razão proteína/creatinina urinária (U-P/C) e pressão arterial sistólica (PAS), que alicerçam a classificação.

As médias de Scr não diferiram significativamente entre si quando comparados os grupos Controle e DRC-1, mas houve diferença significativa entre estes e os grupos DRC-2, DRC-3 e DRC-4. Também foi constatado aumento significativo progressivo das médias de Scr relacionado com os estágios da doença. O comprometimento da capacidade de concentrar a urina, estimada pela DU, foi evidenciado por diminuição gradativa das médias, que diferiram significativamente nos grupos DRC-2, DRC-3 e DRC-4 em relação à do Controle (Tabela 3 e Figura 6).

Os dados relativos à U-P/C resultaram em médias significativamente maiores que a do Controle, nos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4, mas não no grupo DRC-2. O mesmo quadro foi observado em relação à PAS, cuja média do grupo DRC-2 não diferiu significativamente das do Controle e DRC-1, embora as médias dos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4 tenham sido significativamente maiores que a do Controle (Tabela 3 e Figura 7).

Tabela 3 – Resultados (média $\pm$ erro padrão) referentes aos parâmetros considerados como critérios para inclusão dos animais no grupo de cães saudáveis (Controle; n=17) ou nos grupos de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13), e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Variável	Grupos avaliados				
	Controle 34 amostras	DRC-1 24 amostras	DRC-2 20 amostras	DRC-3 26 amostras	DRC-4 20 amostras
Scr (mg/dL)	1,02 $\pm$ 0,02c	1,07 $\pm$ 0,04c	1,81 $\pm$ 0,03b	3,40 $\pm$ 0,15ab	6,00 $\pm$ 0,20a
DU	1,034 $\pm$ 0,00a	1,023 $\pm$ 0,00ac	1,017 $\pm$ 0,00bc	1,013 $\pm$ 0,00b	1,012 $\pm$ 0,00b
U-P/C	0,13 $\pm$ 0,01c	1,14 $\pm$ 0,12b	0,59 $\pm$ 0,16c	1,96 $\pm$ 0,25ab	1,53 $\pm$ 0,25ab
PAS (mmHg)	137,9 $\pm$ 1,9b	181,3 $\pm$ 6,1a	159,0 $\pm$ 6,1ab	186,9 $\pm$ 6,1a	180,0 $\pm$ 7,3a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn $\alpha=0,05$).

Scr = creatinina sérica; DU = densidade urinária; U-P/C = razão proteína/creatinina da urina, PAS = Pressão arterial sistólica.

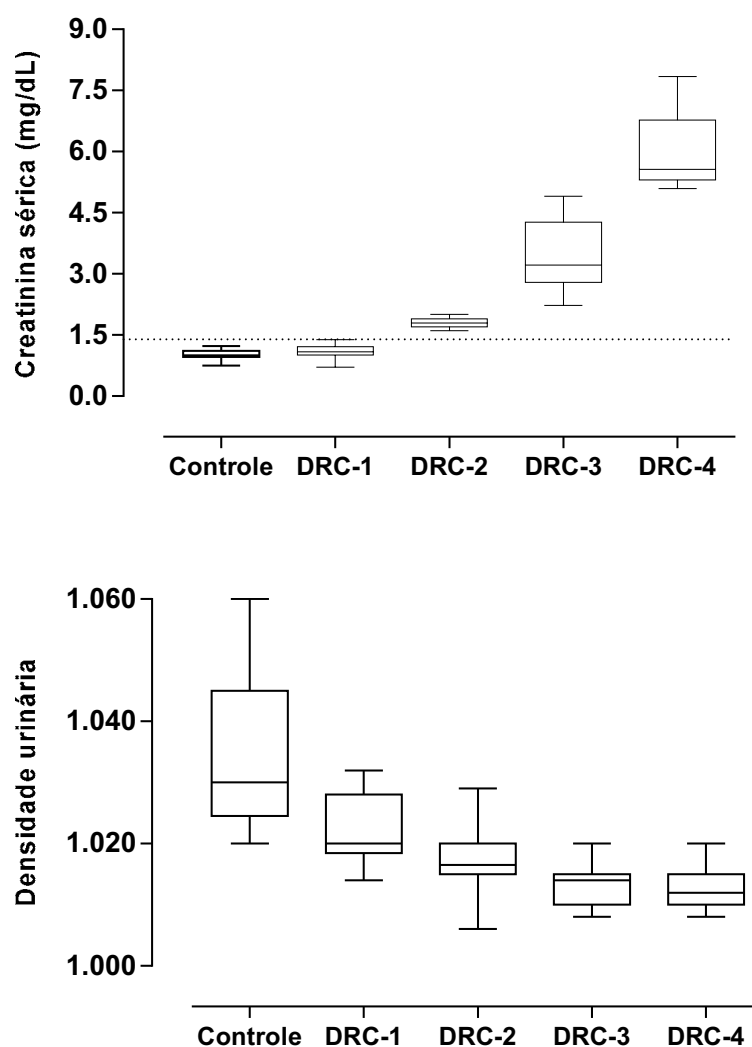


Figura 6 – Representações gráficas dos dados referentes à concentração sérica de creatinina e densidade de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. A linha pontilhada no primeiro gráfico indica o limite superior estabelecido para a creatinina sérica. Unesp – Jaboticabal, 2013.

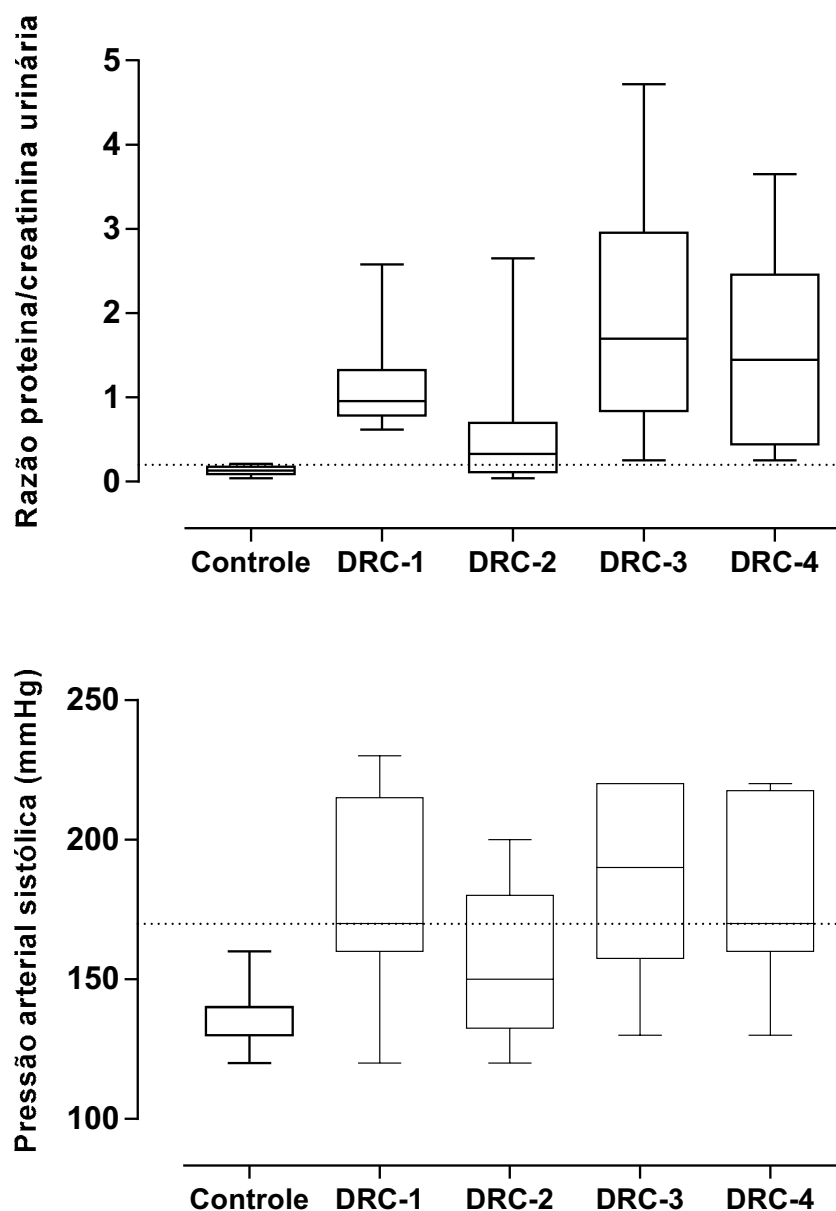


Figura 7 – Representações gráficas dos dados referentes à razão proteína/creatinina urinária e pressão arterial sistólica de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. A linha pontilhada indica o limite superior de normalidade. Unesp – Jaboticabal, 2013.

5.3. Perfil bioquímico sérico complementar

Além da Scr, utilizada como critério para composição dos grupos, foram avaliados diversos outros parâmetros da bioquímica sérica dos cães estudados (Tabela 4). A média de concentração sérica de ureia (Sureia) do grupo DRC-2 foi significativamente maior do que a do Controle e as médias dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente maiores em relação às dos demais. Um quadro semelhante foi observado com as médias de concentração sérica de fósforo (SP) (Figura 8).

As médias de concentrações sérica de cálcio total (SCat) dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente maiores que a do Controle e somente a média do DRC-4 foi significativamente maior que as dos grupos DRC-1 e DRC-2. Contudo, as concentrações séricas de cálcio ionizados (SCai) não variaram significativamente entre os grupos (Figura 9).

Quanto às concentrações séricas de sódio (SNa) e de potássio (SK), as diferenças mais marcantes foram observadas no grupo DRC-2 que apresentou média de SNa significativamente maior que as dos grupos DRC-1 e DRC-4 e a média de SK significativamente menor que as observadas nos outros quatro grupos (Figura 10).

As médias de concentrações séricas de proteína total (SPt) e de albumina (SAIb) dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente menores que as respectivas médias do grupo Controle (Figura 11).

As médias das concentrações séricas de alanina aminotransferase e de fosfatase alcalina não variaram significativamente entre os grupos avaliados.

Tabela 4 – Resultados (média $\pm$ erro padrão) do perfil bioquímico sérico de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13), e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Variável	Grupos avaliados				
	Controle 34 amostras	DRC-1 24 amostras	DRC-2 20 amostras	DRC-3 26 amostras	DRC-4 20 amostras
Sureia (mg/dL)	31,18 $\pm$ 1,73c	51,85 $\pm$ 5,33cd	80,17 $\pm$ 11,22bd	177,30 $\pm$ 14,73a	223,10 $\pm$ 11,23a
SP (mg/dL)	4,16 $\pm$ 0,16c	3,90 $\pm$ 0,30c	5,28 $\pm$ 0,36bc	6,41 $\pm$ 0,46ab	8,26 $\pm$ 0,73a
SCat (mg/dL)	10,17 $\pm$ 0,19c	10,37 $\pm$ 0,18bc	10,28 $\pm$ 0,15bc	10,97 $\pm$ 0,20ab	11,52 $\pm$ 0,30a
SCai (mg/dL)	1,07 $\pm$ 0,03a	1,16 $\pm$ 0,02a	1,10 $\pm$ 0,05a	1,03 $\pm$ 0,05a	1,08 $\pm$ 0,06a
SNa (mEq/L)	148,10 $\pm$ 0,42ab	146,30 $\pm$ 1,00b	150,60 $\pm$ 0,71a	148,26 $\pm$ 1,14ab	146,70 $\pm$ 0,87b
SK (mEq/L)	4,70 $\pm$ 0,07ab	4,60 $\pm$ 0,10b	4,20 $\pm$ 0,09c	5,15 $\pm$ 0,11a	5,02 $\pm$ 0,16ab
SPT (g/dL)	7,60 $\pm$ 0,09a	7,29 $\pm$ 0,11ab	7,43 $\pm$ 0,17ab	6,99 $\pm$ 0,16b	6,88 $\pm$ 0,26b
SAIb (g/dL)	3,33 $\pm$ 0,08a	3,18 $\pm$ 0,11ab	3,28 $\pm$ 0,09ac	2,75 $\pm$ 0,13b	2,86 $\pm$ 0,12bc
SALT (mg/dL)	55,39 $\pm$ 3,22a	51,67 $\pm$ 4,44a	52,28 $\pm$ 4,33a	61,04 $\pm$ 3,37a	44,43 $\pm$ 4,02a
SFA (mg/dL)	63,23 $\pm$ 6,66a	57,34 $\pm$ 5,47a	71,20 $\pm$ 8,54a	70,31 $\pm$ 7,50a	49,40 $\pm$ 4,36a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$).

Sureia = ureia sérica; SP = fósforo sérico; SCat = cálcio total sérico; SCai = cálcio ionizado sérico; SNa = sódio sérico; SK = potássio sérico; SPT = proteína total sérica; SAIb = albumina sérica; SALT = alanina aminotransferase sérica; SFA = fosfatase alcalina sérica;

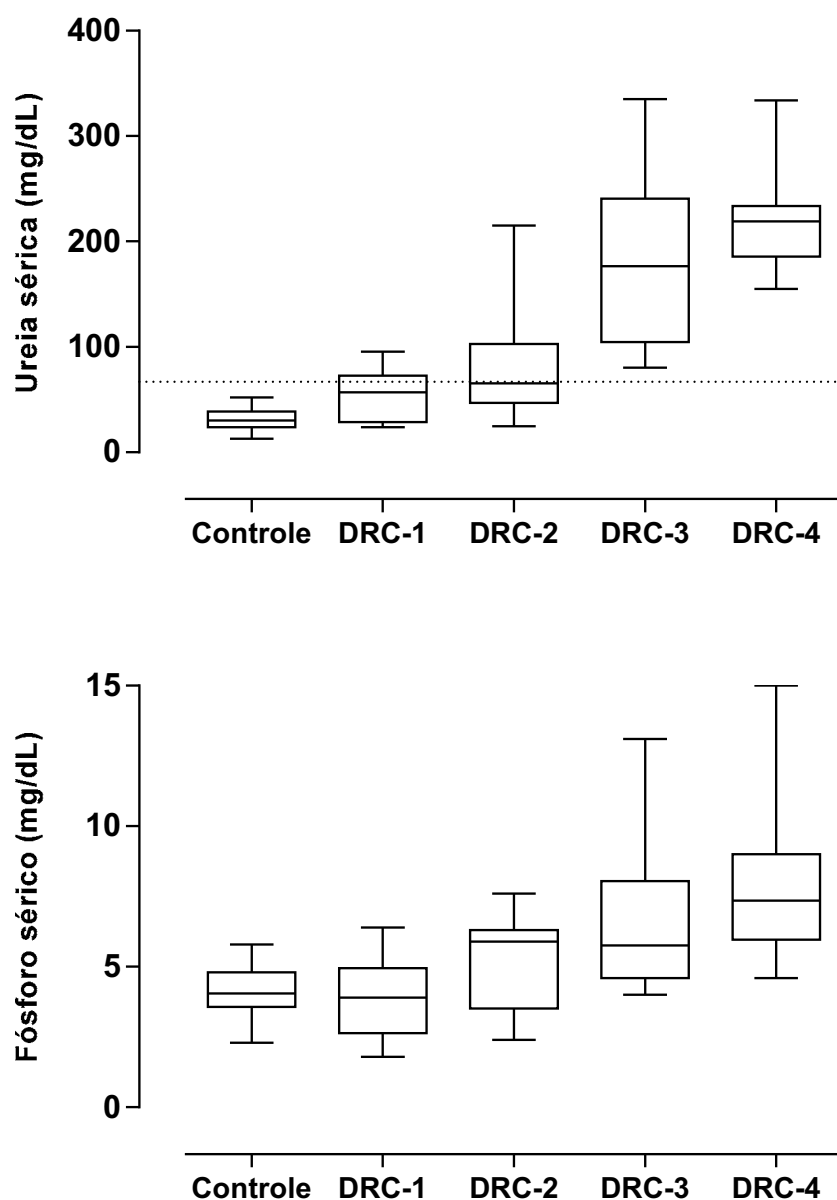


Figura 8 – Representações gráficas dos dados referentes às concentrações séricas de ureia e fósforo de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

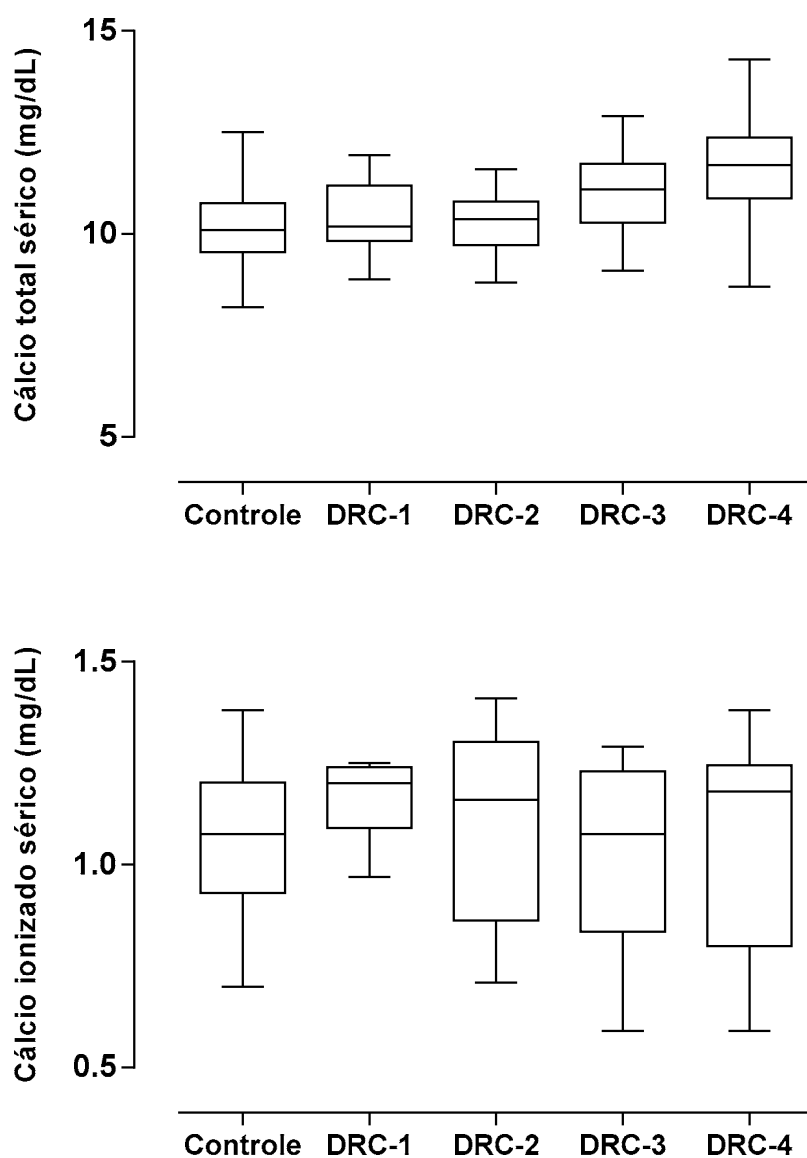


Figura 9 – Representações gráficas dos dados referentes às concentrações séricas de cálcio total e cálcio ionizado de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

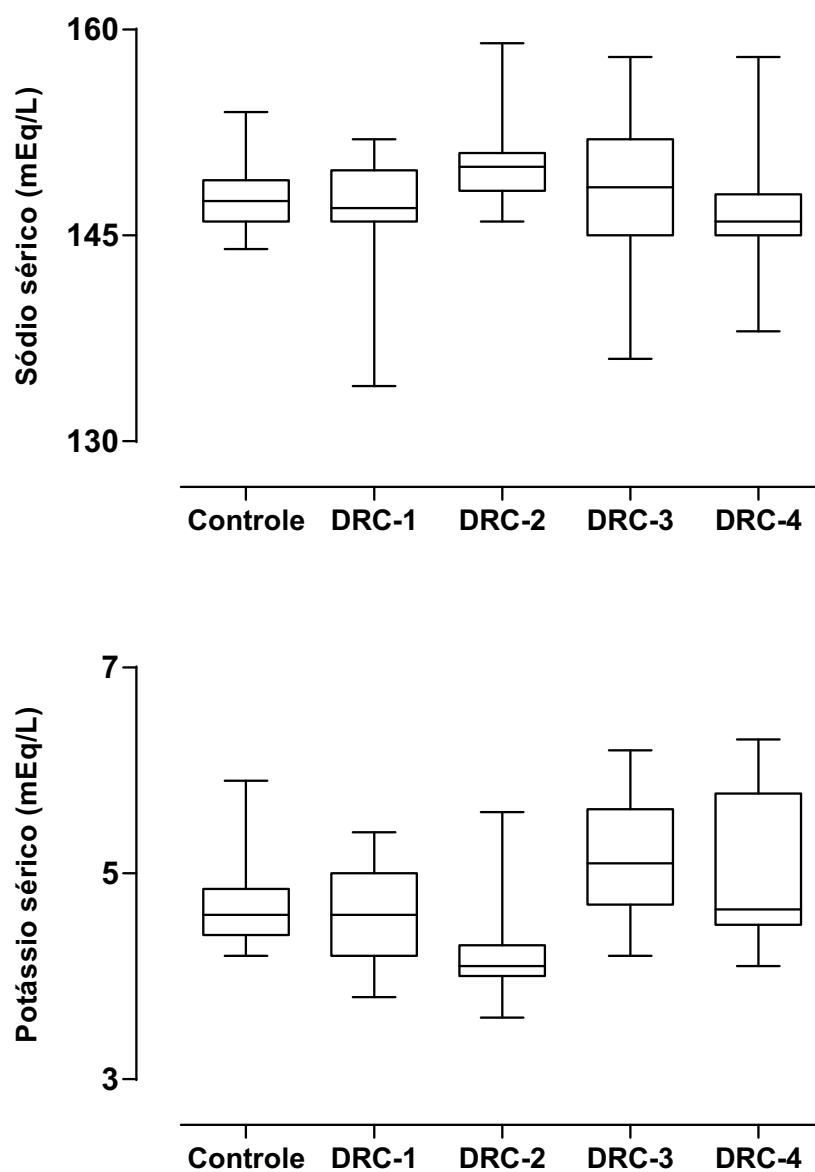


Figura 10 – Representações gráficas dos dados referentes às concentrações séricas de sódio e potássio de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

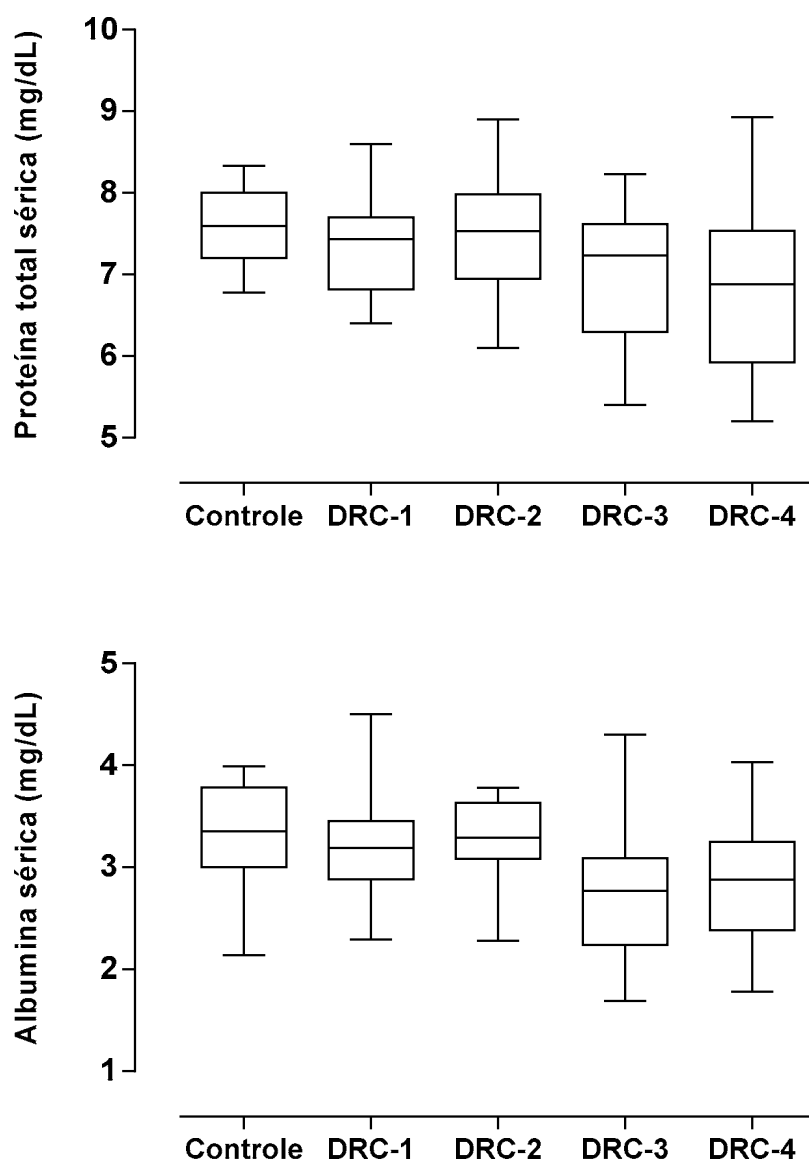


Figura 11 – Representações gráficas dos dados referentes às concentrações séricas de proteína total e albumina de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

5.4. Perfil hematológico

Os dados (média $\pm$ erro padrão da média) relativos ao número de hemácias (He), à concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM) e os números de plaquetas (Plaq), leucócitos (Le), neutrófilos segmentados (Ns) e linfócitos (Linf) estão apresentados na Tabela 5.

As médias de número de He, da concentração de Hb e do Ht dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente menores do que as respectivas médias dos grupos Controle e DRC-1. Quanto às médias dos valores de VGM e CHGM, e dos números de plaquetas, não houve diferença estatística entre os grupos (Figura 12).

A média dos números de Le do grupo DRC-2 foi significativamente maior que as médias dos grupos Controle e DRC-1, mas não diferiu significativamente das dos grupos DRC-3 e DRC-4. A média dos números de Ns do grupo DRC-2 foi significativamente maior que as médias dos grupos Controle, DRC-1 e DRC-3, mas não diferiu significativamente da média do grupo DRC-4. Não houve variação significativa das médias de números de linfócitos (Figura 13).

Tabela 5 – Resultados (média $\pm$ erro padrão) do perfil eritrocitário, plaquetário e leucocitário de cães sadios (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13) e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Variável	Grupos avaliados				
	Controle 34 amostras	DRC-1 24 amostras	DRC-2 20 amostras	DRC-3 26 amostras	DRC-4 20 amostras
He ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	7,31 $\pm$ 0,16a	6,93 $\pm$ 0,33a	6,17 $\pm$ 0,22ab	4,87 $\pm$ 0,29bc	4,35 $\pm$ 0,24c
Hb (g/dL)	17,59 $\pm$ 0,39a	15,54 $\pm$ 0,75a	14,97 $\pm$ 0,56ab	11,98 $\pm$ 0,80bc	10,54 $\pm$ 0,63c
Ht (%)	53,66 $\pm$ 1,24a	48,21 $\pm$ 2,30ab	43,85 $\pm$ 1,65bc	36,54 $\pm$ 1,97cd	31,88 $\pm$ 1,81d
VGM (fL)	73,18 $\pm$ 0,57a	71,79 $\pm$ 0,78a	73,50 $\pm$ 0,67a	73,85 $\pm$ 0,46a	72,00 $\pm$ 0,77a
CHGM (g/dL)	32,56 $\pm$ 0,42a	31,83 $\pm$ 0,62a	33,40 $\pm$ 0,54a	33,74 $\pm$ 0,47a	32,19 $\pm$ 0,89a
Plaq ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	328,41 $\pm$ 12,71a	315,33 $\pm$ 18,55a	324,60 $\pm$ 23,71a	385,30 $\pm$ 24,81a	336,10 $\pm$ 17,19a
Le ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8,57 $\pm$ 0,36b	8,36 $\pm$ 0,49b	11,82 $\pm$ 0,80a	8,98 $\pm$ 0,64ab	10,48 $\pm$ 1,00ab
Ns ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	6,11 $\pm$ 0,30b	6,02 $\pm$ 0,41b	9,06 $\pm$ 0,70a	6,26 $\pm$ 0,45b	7,30 $\pm$ 0,69ab
Linf ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	1,60 $\pm$ 0,12a	1,49 $\pm$ 0,17a	1,90 $\pm$ 0,21a	1,85 $\pm$ 0,22a	1,46 $\pm$ 0,10a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$).

He = Hemácias; Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; VGM = volume globular médio; CHGM = concentração de hemoglobina globular média; Plaq = Plaquetas; Le = Leucócitos totais; Ns = Neutrófilos segmentados; Linf = Linfócitos.

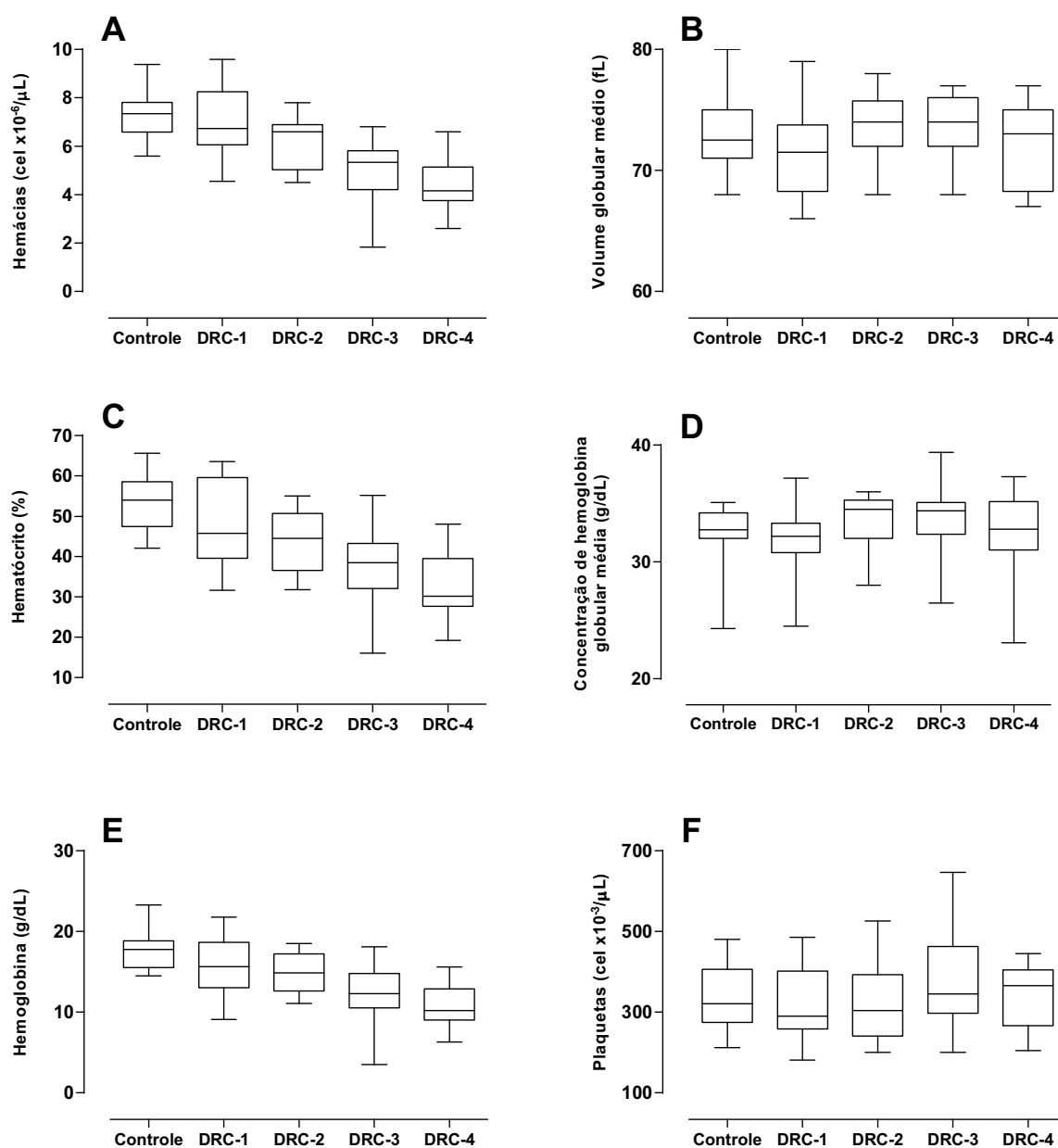


Figura 12 – Representações gráficas dos dados referentes ao perfil eritrocitário (A, B, C, D e E) e ao número de plaquetas (F) de cães saudáveis (Controle; $n=17$) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; $n=12$), 2 (DRC-2; $n=10$), 3 (DRC-3; $n=13$) e 4 (DRC-4; $n=10$). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

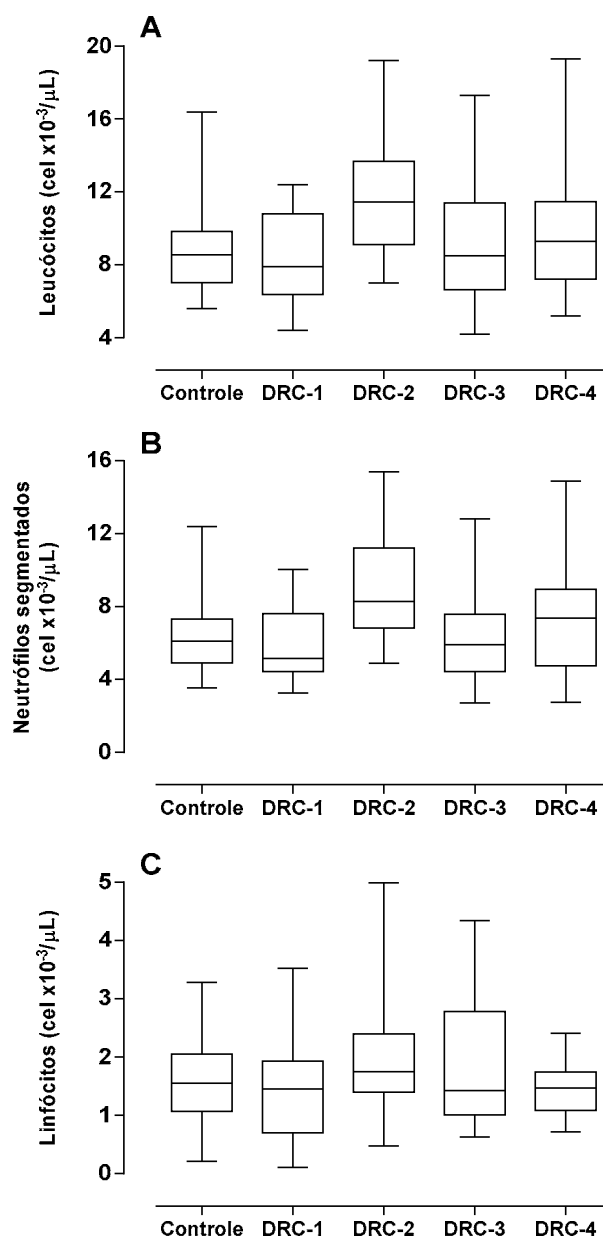


Figura 13 – Representações gráficas dos dados referentes aos números de leucócitos totais (A), neutrófilos segmentados (B) e linfócitos (C) de cães saudáveis (Controle; $n=17$) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, $n=12$), 2 (DRC-2; $n=10$), 3 (DRC-3; $n=13$) e 4 (DRC-4; $n=10$). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

5.5. Indicadores do estresse oxidativo

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – lipoperoxidação espontânea (TBA) - A média de TBA do grupo DRC-3 foi significativamente maior do que a do grupo Controle. As demais médias (DRC-1, DRC-2 e DRC-4) não diferiram significativamente entre si ou em relação às médias do Controle e do DRC-3 (Tabela 6, Figura 14).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – lipoperoxidação induzida (TBASG) – As médias não diferiram significativamente entre si (Tabela 6, Figura 14).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – poder antioxidante (Delta TBASG-TBA)– As médias não diferiram significativamente entre si (Tabela 6, Figura 14).

Óxido nítrico estimado por meio do nitrato/nitrito plasmático – As médias dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente maiores que a do grupo Controle. As médias dos grupos DRC-1 e DRC-2 foram significativamente menores que a média do DRC-4, mas não diferiram significativamente dos grupos Controle e DRC-3 (Tabela 6, Figura 15).

Tabela 6 – Dados (média $\pm$ erro padrão da média) das concentrações séricas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, referente à lipoperoxidação induzida TBASG, lipoperoxidação espontânea – TBA, delta TBASG-TBA, e da determinação indireta de óxido nítrico plasmático por meio da dosagem de nitrato, de cães saudáveis (Controle; n=17), e cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13) e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Variável	Grupos avaliados				
	Controle 34 amostras	DRC-1 24 amostras	DRC-2 20 amostras	DRC-3 26 amostras	DRC-4 20 amostras
TBASG (nmol/ μ L)	0,057 $\pm$ 0,003a	0,060 $\pm$ 0,002a	0,053 $\pm$ 0,002a	0,057 $\pm$ 0,003a	0,055 $\pm$ 0,003a
TBA (nmol/ μ L)	0,025 $\pm$ 0,001b	0,030 $\pm$ 0,001ab	0,030 $\pm$ 0,001ab	0,031 $\pm$ 0,001a	0,030 $\pm$ 0,002ab
Delta (nmol/ μ L)	0,032 $\pm$ 0,002a	0,030 $\pm$ 0,002a	0,028 $\pm$ 0,003a	0,027 $\pm$ 0,003a	0,025 $\pm$ 0,002a
NO (μ M)	10,81 $\pm$ 0,51c	15,49 $\pm$ 1,97bc	19,83 $\pm$ 3,31bc	17,02 $\pm$ 1,73b	83,56 $\pm$ 13,63a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$).

TBASG = lipoperoxidação induzida; TBA = lipoperoxidação espontânea; Delta = poder antioxidante (diferença entre TBASG e TBA); NO = óxido nítrico, estimado pelo nitrato/nitrito plasmático.

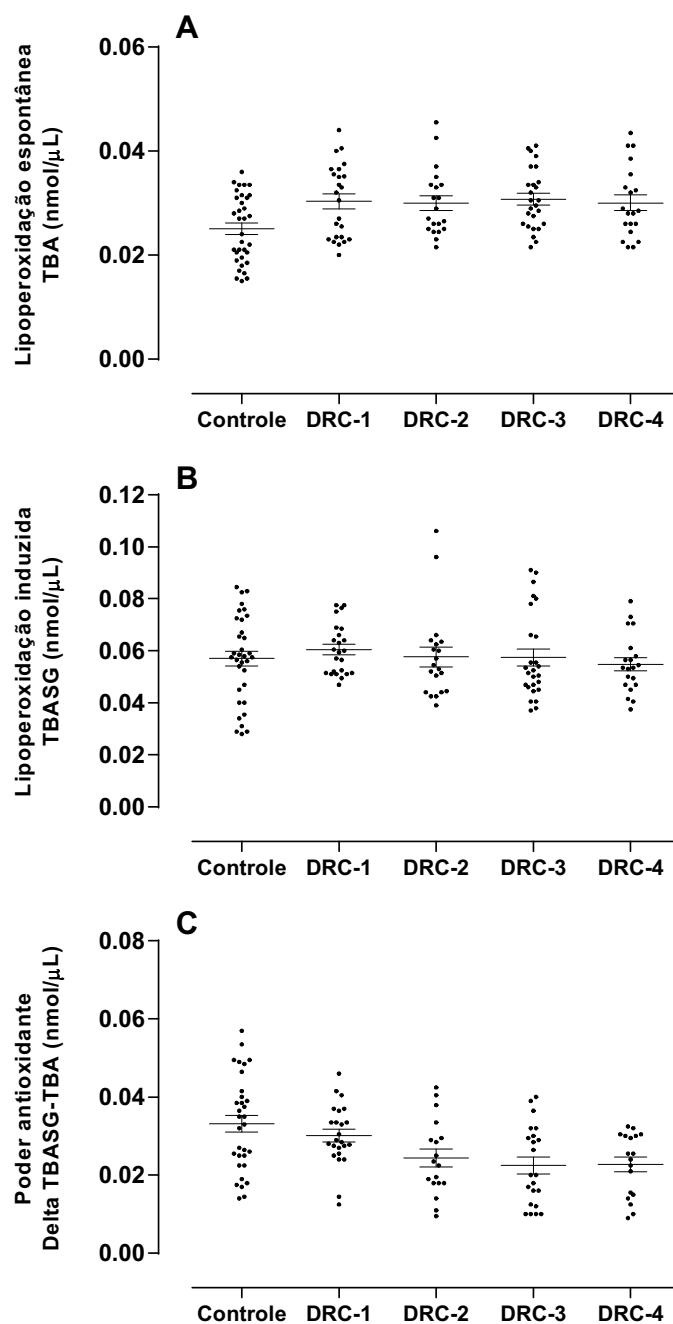


Figura 14 – Representações gráficas dos dados de lipoperoxidação pelo método do ácido tiobarbitúrico (A e B) e de poder antioxidante (C) de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

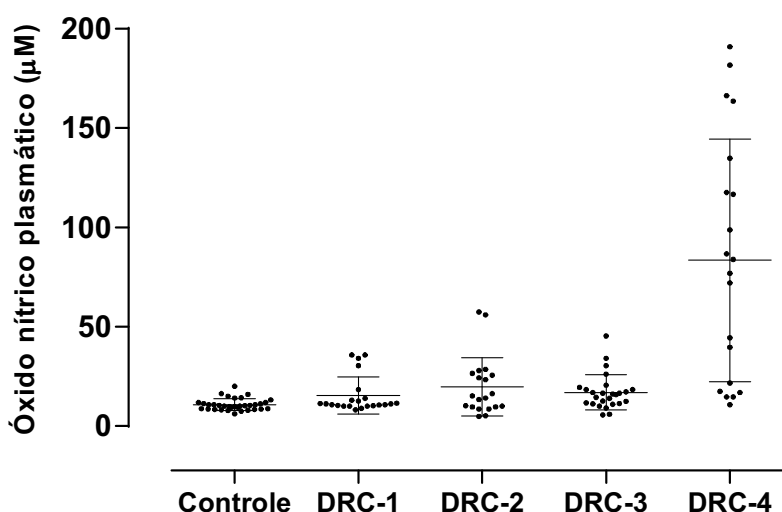


Figura 15 – Representações gráficas dos dados de concentração plasmática de óxido nítrico, obtidos por determinação indireta por meio da dosagem de nitrato/nitrito, de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As caixas representam o intervalo que compreende de 25% a 75% dos dados e a mediana. As hastes indicam os valores mínimo e máximo obtidos. Unesp – Jaboticabal, 2013.

5.6. Estudo de correlação entre as variáveis avaliadas

Foram avaliadas as correlação (Pearson) entre os diversos parâmetros do estudo e as concentrações séricas de creatina, que refletem, diretamente, a constituição dos grupos estudados. Houve correlação significativa entre os valores de Scr e os de DU, U-P/C, PAS, Sureia, SP, SCat, SK, SPt, SAlb, He, Hb e Ht (Tabela 7; Figuras 16, 17, 18 e 19).

Os dados relativos ao poder antioxidante, estimado pelo Delta TBASG-TBA, foram testados para verificar a existência de correlação (Pearson) com os demais parâmetros avaliados no estudo. Constataram-se correlações significativas somente com os dados de Sureia, SALT, He e Plaq. (Tabela 8; Figura 20).

As mesmas análises feitas com os dados de NO, indicaram a existência de correlação com diversos parâmetros, que incluíram Scr, DU, U-P/C, PAS, Sureia,

SP, SCat, SCai, SK, SALT, He, Hb, Ht e Plaquetas (Tabela 9; Figuras 21, 22, 23 e 24).

Tabela 7 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores de creatinina sérica e outros parâmetros avaliados em cães sadios (n=17) e em cães com DRC em estágio 1 (n=12), estágio 2 (n=10), estágio 3 (n=13) e estágio 4 (n=19). As coletas de amostras foram feitas em dois momento, com intervalo de 24 horas, totalizando 124 avaliações. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Correlações	Coefficiente de Pearson (r)	IC (95%)	P
Scr vs DU	-0,5640	-0,6734 a -0,4304	<0,0001**
Scr vs U-P/C	0,4782	0,3297 a 0,6037	<0,0001**
Scr vs PAS	0,3565	0,1922 a 0,5013	<0,0001**
Scr vs Sureia	0,5691	0,4315 a 0,6808	<0,0001**
Scr vs SP	0,7207	0,6236 a 0,7959	<0,0001**
Scr vs SCat	0,4639	0,3132 a 0,5919	<0,0001**
Scr vs SCai	-0,1728	-0,3395 a 0,004388	0,0559
Scr vs SNa	-0,1006	-0,2722 a 0,07708	0,2661
Scr vs SK	0,3267	0,1595 a 0,4757	0,0002*
Scr vs SPt	-0,2467	-0,4066 a -0,07202	0,0062**
Scr vs SAlb	-0,3161	-0,4694 a -0,1443	0,0005**
Scr vs SALT	-0,1439	-0,3124 a 0,03327	0,1107
Scr vs FA	-0,1373	-0,3063 a 0,04001	0,1283
Scr vs He	-0,6494	-0,7409 a -0,5343	<0,0001**
Scr vs Hb	-0,6077	-0,7081 a -0,4831	<0,0001**
Scr vs Ht	-0,6292	-0,7251 a -0,5094	<0,0001**
Scr vs Plaq.	0,1449	-0,03375 a 0,3146	0,1112
Scr vs Le	0,1595	-0,01735 a 0,3267	0,0768
Scr vs Ns	0,09650	-0,08124 a 0,2683	0,2863
Scr vs Linf	-0,06033	-0,2356 a 0,1187	0,5092

Scr = creatinina sérica; DU = densidade urinária; U-P/C = razão proteína/creatinina da urina; PAS = pressão arterial sistólica; Sureia = ureia sérica; SP = fósforo sérico; SCat = cálcio total sérico; SCai = cálcio iônico sérico; SNa = sódio sérico; SK = potássio sérico; SPt = proteína total sérica; SAlb = albumina sérica; SALT = alanina aminotransferase sérica; SFA = fosfatase alcalina sérica; He = Hemácias; Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; Plaq = Plaquetas; Le = Leucócitos totais; Ns = Neutrófilos segmentados; Linf = Linfócitos.

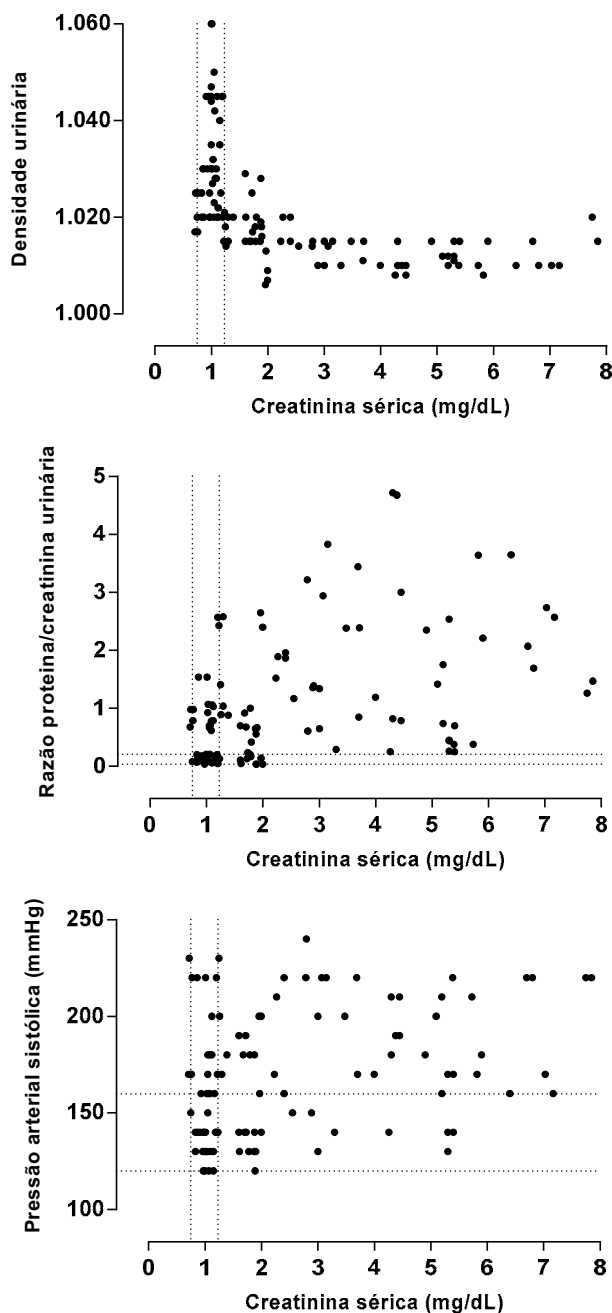


Figura 16 – Representações gráficas das correlações (Pearson) da concentração sérica de creatinina com a densidade urinária, razão proteína/creatinina urinária e pressão arterial sistólica de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

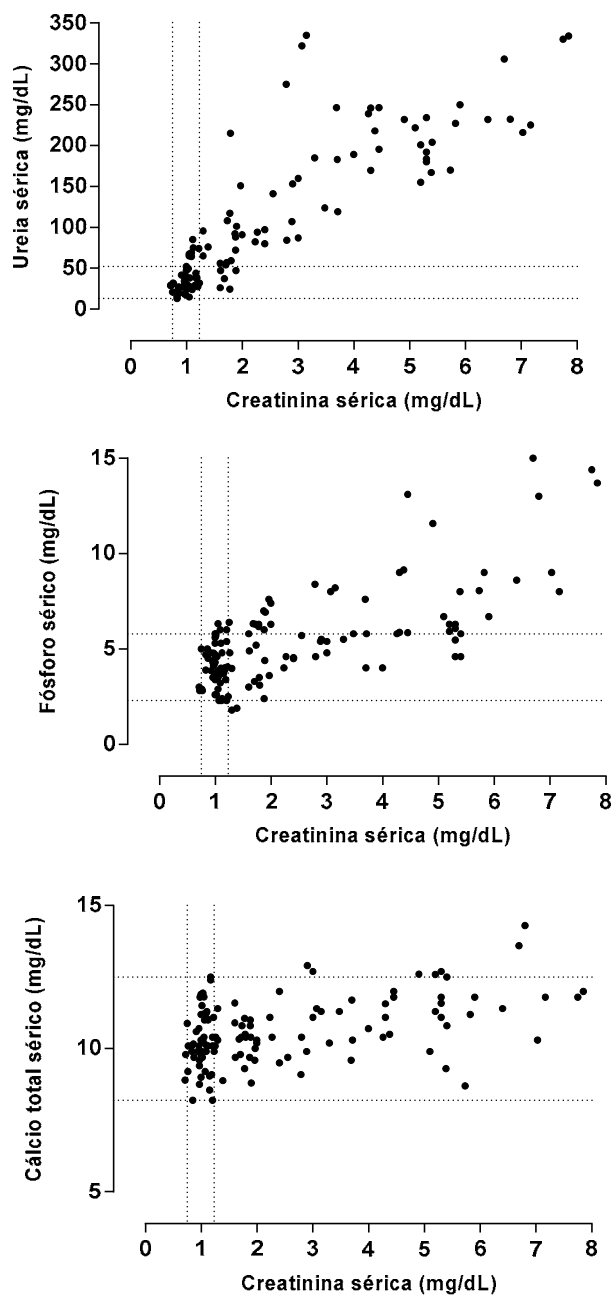


Figura 17 – Representações gráficas das correlações (Pearson) da concentração sérica de creatinina com a ureia sérica, fósforo sérico e cálcio total sérico de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

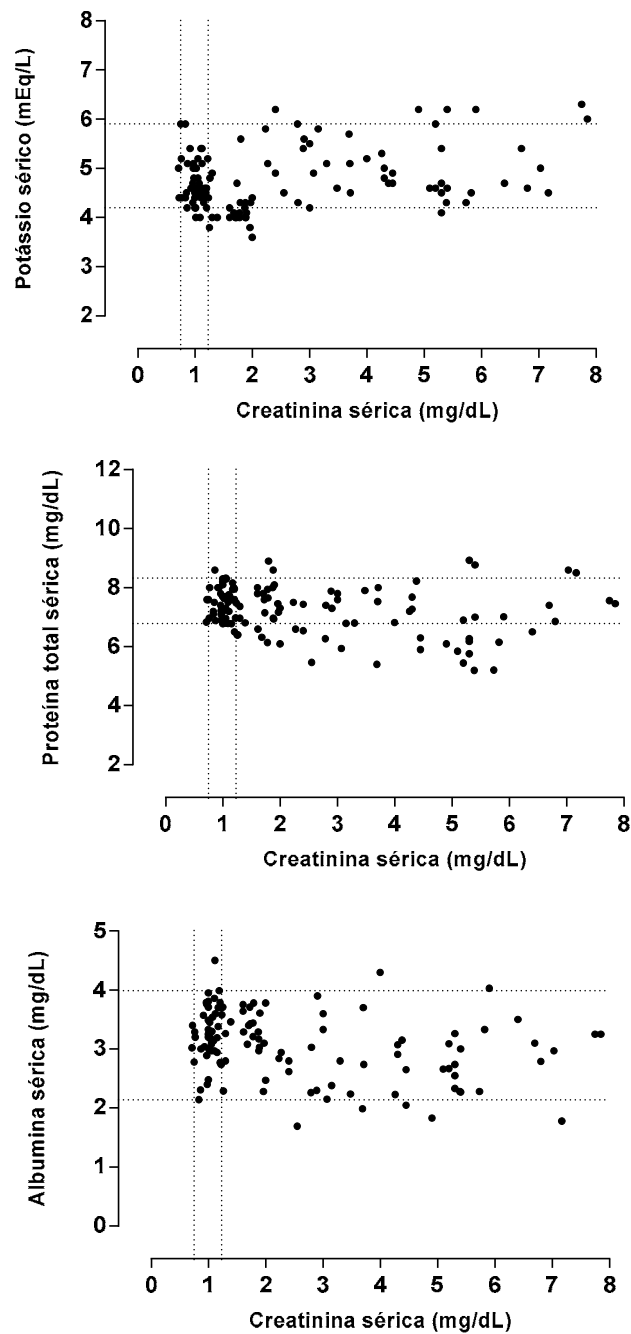


Figura 18 – Representações gráficas das correlações (Pearson) da concentração sérica de creatinina com o potássio sérico, proteína total sérica e albumina sérica de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

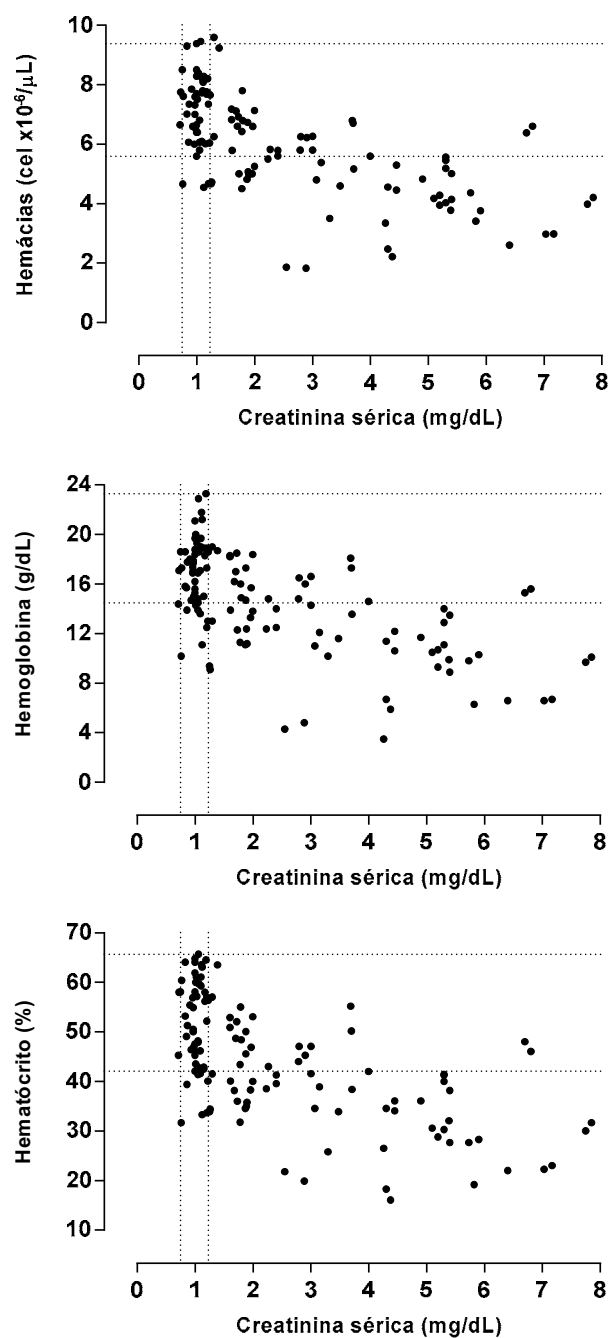


Figura 19 – Representações gráficas das correlações (Pearson) da concentração sérica de creatinina com os dados de hemácias, hemoglobina e hematócrito de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Tabela 8 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores do delta TBASG-TBA plasmático (Delta) e outros parâmetros avaliados em cães saudáveis (n=17) e em cães com DRC em estágio 1 (n=12), estágio 2 (n=10), estágio 3 (n=13) e estágio 4 (n=19). As coletas de amostras foram feitas em dois momentos, com intervalo de 24 horas, totalizando 124 avaliações. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Variáveis	Coefficiente de Pearson (r)	IC (95%)	P
Delta vs Scr	-0,1255	-0,2954 a 0,05198	0,1648
Delta vs DU	0,01568	-0,1611 a 0,1915	0,8628
Delta vs U-P/C	-0,03373	-0,2088 a 0,1435	0,7100
Delta vs PAS	-0,1276	-0,2973 a 0,04989	0,1579
Delta vs Sureia	-0,2176	-0,3833 a -0,03831	0,0179*
Delta vs SP	0,07332	-0,1044 a 0,2465	0,4184
Delta vs SCat	0,06389	-0,1137 a 0,2376	0,4808
Delta vs SCai	-0,1410	-0,3104 a 0,03698	0,1197
Delta vs SNa	-0,01659	-0,1924 a 0,1602	0,8549
Delta vs SK	0,02539	-0,1516 a 0,2008	0,7795
Delta vs SPt	0,009640	-0,1685 a 0,1871	0,9161
Delta vs SAlb	-0,01621	-0,1957 a 0,1643	0,8611
Delta vs ALT	0,1800	0,003753 a 0,3454	0,0455*
Delta vs FA	0,1037	-0,07403 a 0,2750	0,2518
Delta vs He	0,2162	0,04142 a 0,3781	0,0159*
Delta vs Hb	0,1075	-0,07019 a 0,2786	0,2347
Delta vs Ht	0,1465	-0,03064 a 0,3147	0,1044
Delta vs Plaq.	0,2839	0,1117 a 0,4395	0,0015**
Delta vs Le	-0,009951	-0,1860 a 0,1667	0,9127
Delta vs Ns	-0,01362	-0,1895 a 0,1631	0,8807
Delta vs Linf	0,02828	-0,1503 a 0,2051	0,7571
Delta vs NO	-0,09838	-0,2714 a 0,08084	0,2810

TBASG= lipoperoxidação induzida; TBA = lipoperoxidação espontânea; Scr = creatinina sérica; DU = densidade urinária; U-P/C = razão proteína/creatinina da urina; PAS = pressão arterial sistólica; Sureia = ureia sérica; SP = fósforo sérico; SCat = cálcio total sérico; SCai = cálcio iônico sérico; SNa = sódio sérico; SK = potássio sérico; SPt = proteína total sérica; SAlb = albumina sérica; SALT = alanina aminotransferase sérica; SFA = fosfatase alcalina sérica; He = Hemácias; Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; Plaq = Plaquetas; Le = Leucócitos totais; Ns = Neutrófilos segmentados; Linf = Linfócitos; NO = óxido nítrico.

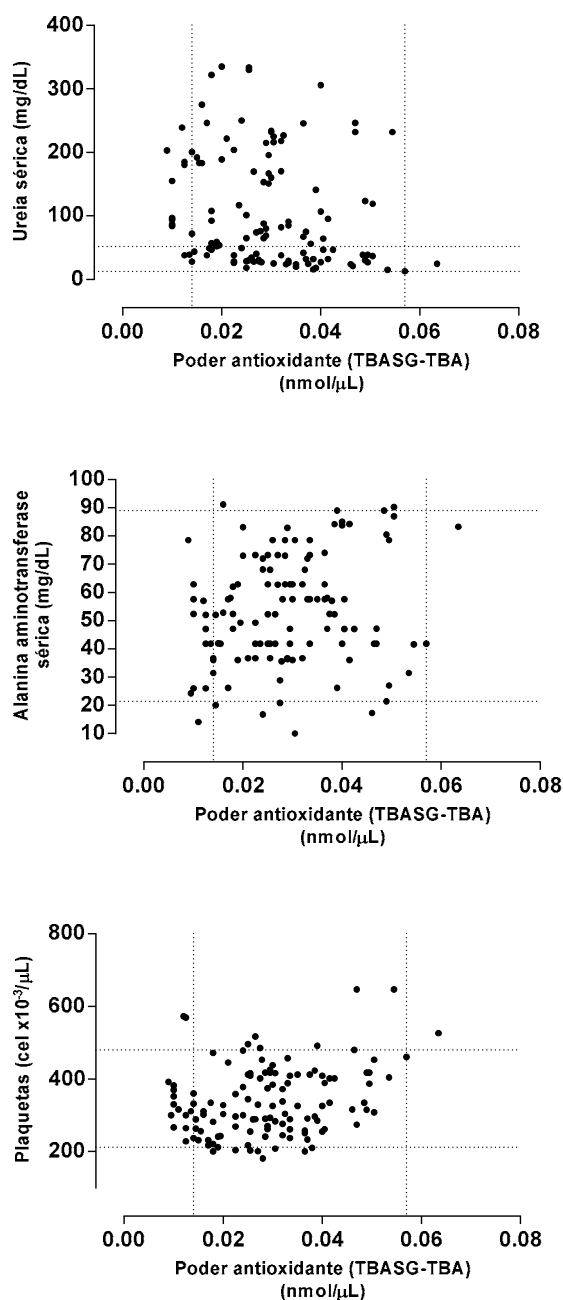


Figura 20 – Representações gráficas das correlações (Pearson) dos valores do delta TBASG-TBA plasmático (Delta) com os dados de ureia sérica, alanina aminotransferase sérica e número de plaquetas de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

Tabela 9 – Resultados dos testes de correlação de Pearson entre os valores de óxido nítrico estimado pelo nitrato plasmático e outros parâmetros avaliados em cães saudáveis (n=17) e em cães com DRC em estágio 1 (n=12), estágio 2 (n=10), estágio 3 (n=13) e estágio 4 (n=19). As coletas de amostras foram feitas em dois momentos, com intervalo de 24 horas, totalizando 124 avaliações. Unesp - Jaboticabal, 2013.

Correlações	Coefficiente de Pearson (r)	IC (95%)	P
NO vs Scr	0,6646	0,5521 a 0,7534	< 0,0001**
NO vs DU	-0,2788	-0,4351 a -0,1063	0,0019**
NO vs U-P/C	0,1898	0,01239 a 0,3556	0,0363*
NO vs PAS	0,2950	0,1236 a 0,4492	0,0010**
NO vs Sureia	0,5691	0,4315 a 0,6808	< 0,0001**
NO vs SP	0,5557	0,4193 a 0,6675	< 0,0001**
NO vs SCat	0,3479	0,1813 a 0,4951	< 0,0001**
NO vs SCai	-0,1851	-0,3520 a -0,006815	0,0421*
NO vs SNa	-0,1610	-0,3294 a 0,01727	0,0764
NO vs SK	0,3058	0,1353 a 0,4587	0,0006**
NO vs SPt	-0,1447	-0,3158 a 0,03555	0,1149
NO vs SAlb	-0,06098	-0,2399 a 0,1219	0,5137
NO vs SALT	-0,1828	-0,3492 a -0,005158	0,0439*
NO vs FA	-0,05490	-0,2305 a 0,1241	0,5481
NO vs He	-0,3870	-0,5284 a -0,2246	< 0,0001**
NO vs Hb	-0,3690	-0,5131 a -0,2046	< 0,0001**
NO vs Ht	-0,3856	-0,5273 a -0,2231	< 0,0001**
NO vs Plaq.	0,2012	0,02270 a 0,3672	0,0276*
NO vs Le	0,09555	-0,08367 a 0,2688	0,2951
NO vs Ns	0,09765	-0,08157 a 0,2708	0,2846
NO vs Linf	-0,1206	-0,2935 a 0,05997	0,1895

NO = óxido nítrico; Scr = creatinina sérica; DU = densidade urinária; U-P/C = razão proteína/creatinina da urina; PAS = pressão arterial sistólica; Sureia = ureia sérica; SP = fósforo sérico; SCat = cálcio total sérico; SCai = cálcio iônico sérico; SNa = sódio sérico; SK = potássio sérico; SPt = proteína total sérica; SAlb = albumina sérica; SALT = alanina aminotransferase sérica; SFA = fosfatase alcalina sérica; He = Hemácias; Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; Plaq = Plaquetas; Le = Leucócitos totais; Ns = Neutrófilos segmentados; Linf = Linfócitos.

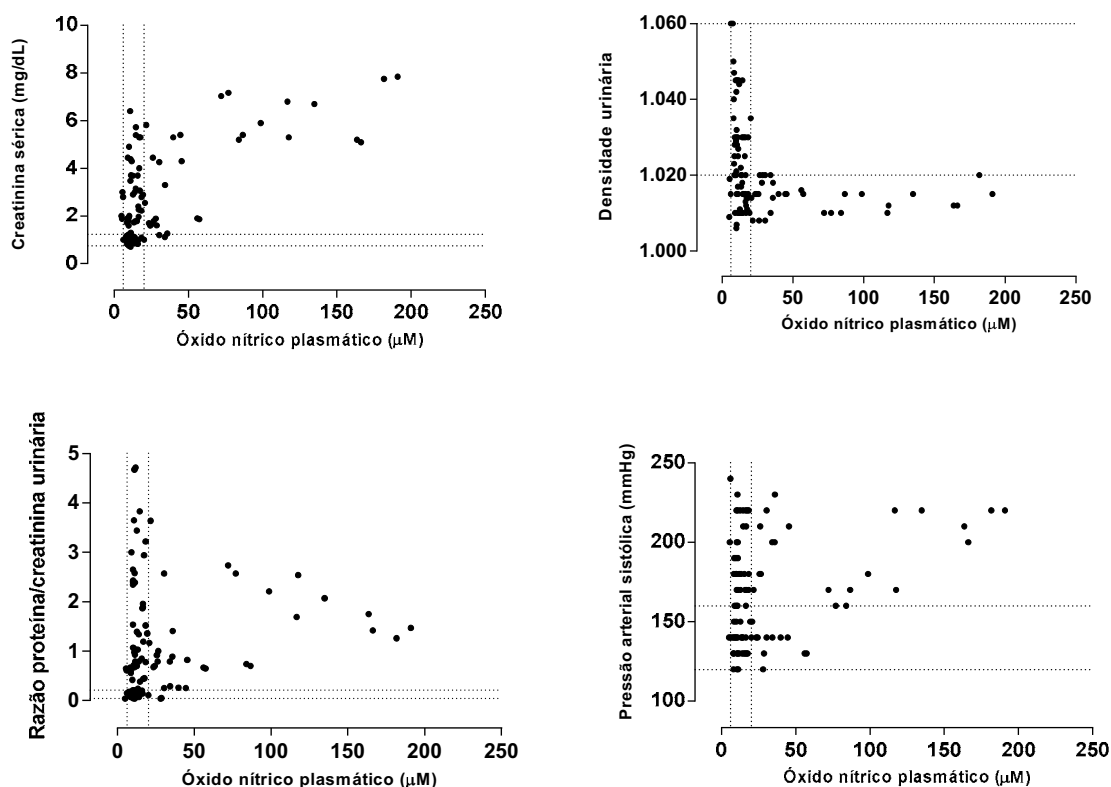


Figura 21 – Representações gráficas das correlações (Pearson) dos valores de óxido nítrico estimado pelo nitrato plasmático com os dados de creatinina sérica, densidade urinária, razão proteína/creatinina urinária e pressão arterial sistólica de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

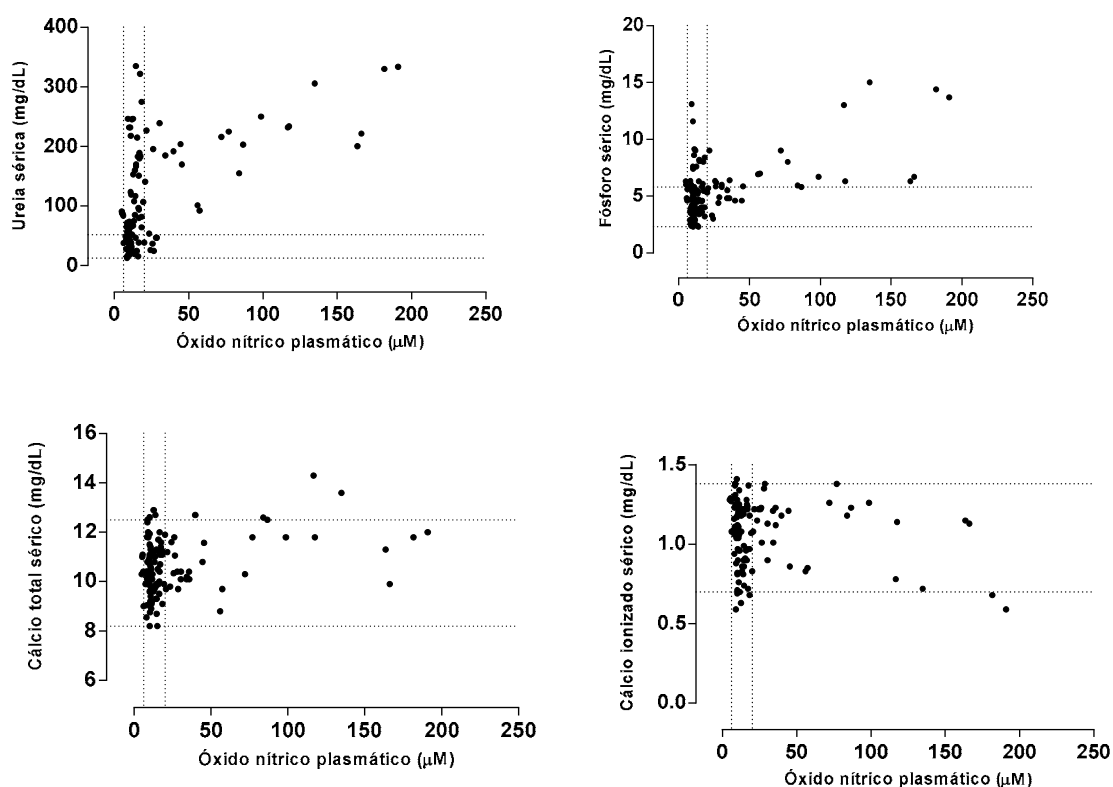


Figura 22 – Representações gráficas das correlações (Pearson) dos valores de óxido nítrico estimado pelo nitrato plasmático com os dados de concentrações séricas de ureia, fósforo, cálcio total e cálcio ionizado de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

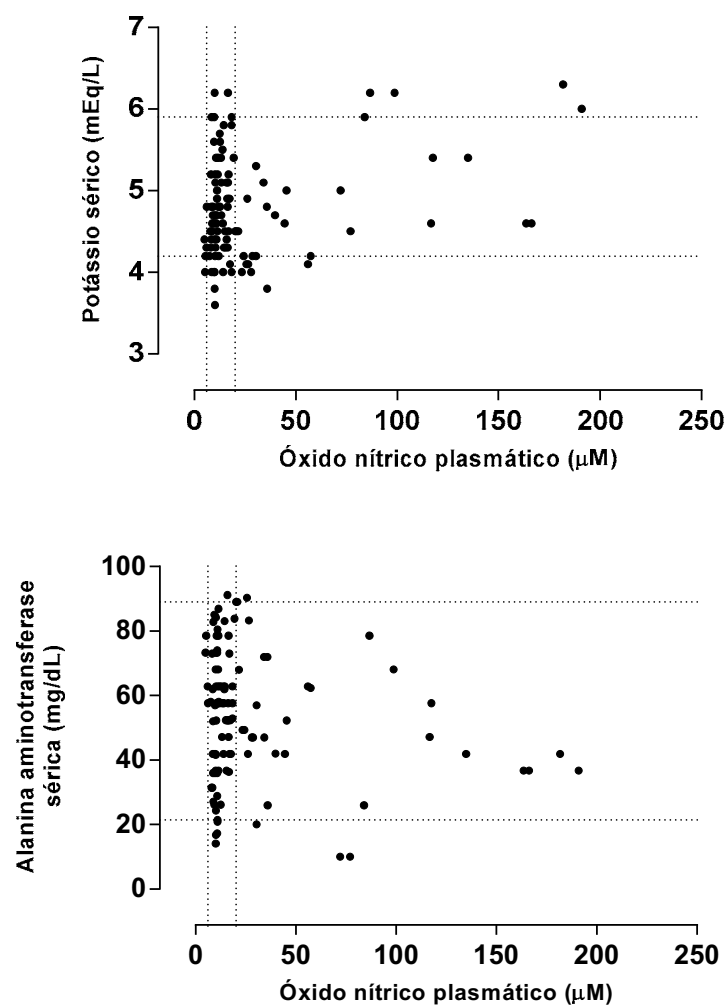


Figura 23 – Representações gráficas das correlações (Pearson) dos valores de óxido nítrico estimado pelo nitrato plasmático com os dados de concentrações séricas de potássio e alanina aminotransferase de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

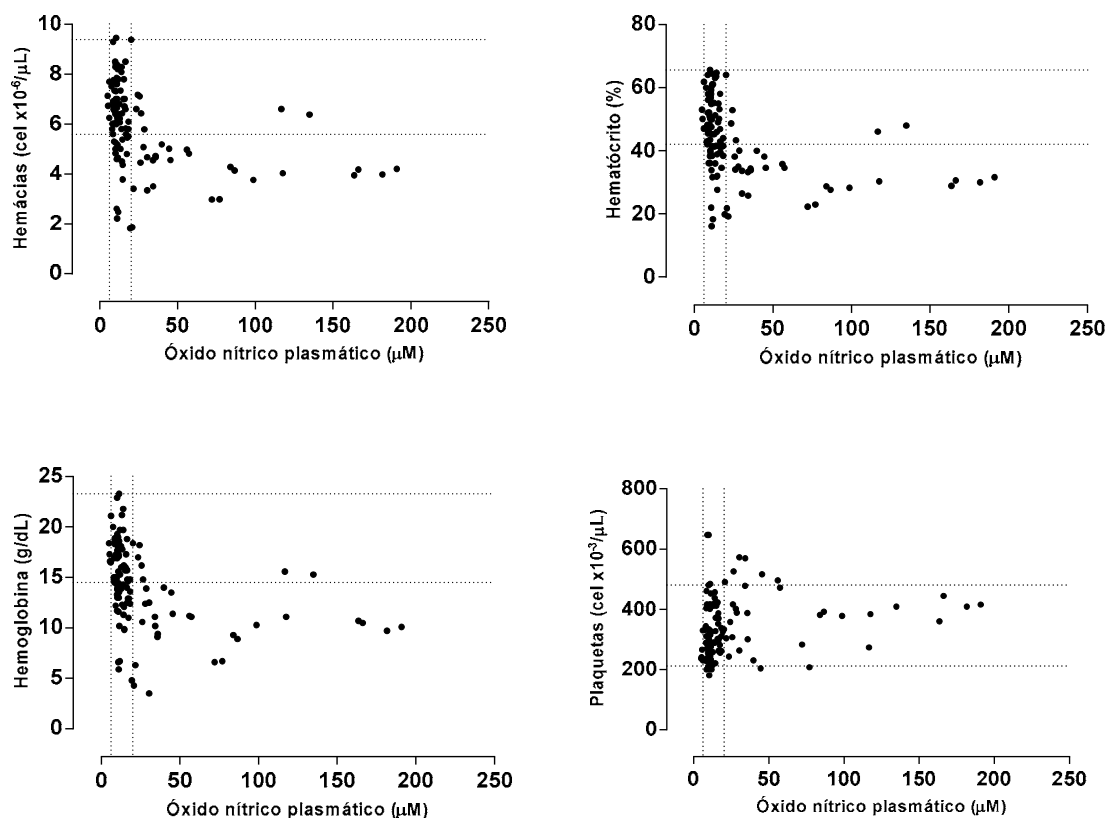


Figura 24 – Representações gráficas das correlações (Pearson) dos valores de óxido nítrico estimado pelo nitrato plasmático com os dados de número de hemácias, hematócrito, concentração de hemoglobina e número de plaquetas de valores obtidos em dois momentos (intervalo de 24 horas) de 17 cães saudáveis e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1, n= 12), 2 (DRC-2; n= 10), 3 (DRC-3; n= 13) e 4 (DRC-4; n= 10). As linhas pontilhadas indicam os valores mínimo e máximo obtidos no grupo controle (cães saudáveis). Unesp – Jaboticabal, 2013.

6. DISCUSSÃO

Depois de estabelecida a DRC, a magnitude da disfunção renal geralmente permanece estável por meses ou declina vagarosamente no decorrer de meses a anos (SHIMIZU, 2005). Segundo Bricker, Morrin e Kime (1960) após a instalação do dano renal no cão ocorrem mudanças estruturais e adaptativas dos néfrons remanescentes, a adaptação inicial decorre em hipertrofia e hipertensão glomerular, na tentativa de manter a TFG, que promove alterações funcionais. Devido ao intenso fluxo de líquido tubular, ocorre a incapacidade de reabsorção de água, bem como, o fluxo rápido na alça de Henle e dos ductos coletores impede que o mecanismo contracorrente opere de forma efetiva, consequentemente a capacidade de concentração urinária fica comprometida (HALL, 2011). Nestas condições, as manifestações clínicas observadas são poliúria, polidipsia e noctúria, de intensidade variada. Quando no comprometimento de 70% a 75% dos néfrons, além da perda de capacidade de concentração da urina, inicia-se o acúmulo de compostos nitrogenados não protéicos na circulação sanguínea, desse modo as consequências sistêmicas do quadro de DRC são inúmeras e a uremia pode estar presente em graus variados (NICHOLS, 2001; POLZIN et al., 2005). Nos pacientes com DRC do presente estudo, foi relatado pelos proprietários a poliúria, polidipsia e noctúria, além disso, foi evidenciado a diminuição da capacidade de concentração da urina estimada pela D.U., sendo observado redução gradativa das médias nos grupos DRC-2, DRC-3 e DRC-4 em relação ao grupo Controle, tal como foi notado a correlação negativa moderada entre Scr e DU ($r=-0,5640$ e $p<0,0001$). Nas médias de Scr e Sureia houve o aumento significativo conforme a progressão dos estágios da DRC, sendo evidenciado uma correlação positiva moderada entre estas variáveis ($r=0,5691$ e $p<0,0001$).

Akamatsu (2002) realizou avaliações histopatológicas em fragmentos de córtex renal obtidos por biópsia percutânea guiada por ultrassom de dez cães com insuficiência renal crônica, e observou uma maior percentagem de glomérulos alterados (70,27%) em contraste com menor número de glomérulos no padrão de normalidade (29,73%). De acordo com Zatz et al. (2012) a hipertensão glomerular

promove uma agressão ao glomérulo ao aumentar a tensão mecânica em suas paredes, resultando em lesões de células endoteliais, estiramento de células mesangiais, lesão em podócitos, deposição mesangial de macromoléculas e passagem de ultrafiltrado para o interstício renal. Dessa forma, uma lesão na barreira glomerular pode estender-se ao interstício, resultando em atrofia tubular e facilitando a progressão da DRC (PEIXOTO; ORIAS; DESIR, 2013). As condições descritas acima estão diretamente relacionadas com a progressão da DRC, bem como podem estar associadas a HAS e proteinúria, que podem se apresentar de intensidade variada no paciente com DRC, como pôde ser evidenciado no presente estudo, pois as médias significativamente maiores em relação a U-P/C e a PAS foram dos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4 quando comparadas a do grupo Controle.

A disfunção renal é frequentemente associada às condições de desequilíbrio oxidativo. Os diferentes marcadores de tal processo, como o MDA ou TBA, podem se mostrar elevados em graus variados conforme o grau de progressão da enfermidade e condição clínica do paciente humano (CACHOFEIRO et al., 2008; KARAMOUZIS et al., 2008). No entanto, Small et al. (2012) descreveram que o TBA para o estudo do estresse oxidativo em amostras séricas de pacientes humanos consiste de uma metodologia inespecífica por ser muito sensível a artefatos. No presente estudo buscou-se estimar a atividade do estresse oxidativo em cães com DRC estágios 1 a 4, utilizando como parte desta avaliação a concentração sérica de TBA e o delta, sendo observado apenas a média do DRC-3 em relação ao TBA significativamente maior quando comparada aos demais grupos estudados. Entretanto, os valores das médias de TBA observados nos grupos Controle, DRC-1, DRC-2 e DRC-4 não diferiram significativamente entre si, mesmo em condições de estagiamento diferente da enfermidade, porém, em se tratando de animais clinicamente estáveis, mesmo com graus variados de disfunção renal, o sistema de defesa antioxidante enzimático, desses pacientes, poderia estar satisfatório, o que pode ter contribuído para que a concentração sérica de TBA não elevasse conforme o estágio da doença. Em relação ao delta as médias dos grupos não diferiram entre si, entretanto, observamos que ocorre uma tendência de diminuição do poder antioxidante conforme o estagiamento da DRC, segundo Scoot (2008) o paciente paciente doente renal crônico apresenta-se mal nutrido, com carências em reserva

de vitaminas e minerais, o que diminui os mecanismos de defesa antioxidante, e favorece a instalação do estresse oxidativo.

Em nosso estudo, os pacientes com DRC a elevação das médias da pressão arterial foi constatada nos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4. A Scr apresentou correlação positiva moderada com PAS ($r=0,3565$ e $p < 0,0001$). Vários estudos mostraram que, durante a HAS em ratos, a AII é responsável pela instalação de processo inflamatório e, conseqüentemente, estresse oxidativo (HARRISON et al. 1997, 2003, 2012; HARRISON 2011; 2013; SCHIFFRIN et al. 2013). A AII na situação de HAS promove o aumento da atividade de linfócitos T e macrófagos no endotélio vascular, como também, o aumento na liberação de substâncias quimiotáticas. Tais condições contribuem para a instalação do processo inflamatório no endotélio vascular, causando disfunção endotelial, produção de ERO, diminuição da disponibilidade de NO, conduzindo a hipertrofia e hiperplasia da parede dos vasos, conseqüentemente vasoconstrição (HARRISON et al. 1997, 2003, 2012; HARRISON 2011; 2013). A aldosterona também estimula a formação de ERO, e estas aumentam a atividade inflamatória, com a liberação de substâncias mediadores inflamatórios, promovendo o aumento da atividade de linfócitos T e macrófagos, causando disfunção endotelial e fibrose tecidual (SCHIFFRIN et al. 2013). A produção de AII intrarrenal foi demonstrada, nas células epiteliais tubulares, macrófagos e fibroblastos, sendo também expressa pelas células justaglomerulares e células intersticiais, estas células desempenham um papel importante no processo inflamatório e lesão renal progressiva (NORONHA et al., 2002). A liberação de mediadores inflamatórios pela AII, aldosterona e endotelina-1 promove disfunção mitocondrial nas células do túbulo contorcido proximal, resultando em estímulo da produção de colágeno que excede a degradação pelas metaloproteinases resultando em fibrose tecidual, também estão associadas a lesão glomerular caracterizada pelo enrugamento dos capilares glomerulares e acúmulo de matriz mesangial, que evoluem para colapso de áreas do glomérulo e fibrose progressiva. As alterações tubulointersticiais são caracterizadas por atrofia tubular, fibrose intersticial e processo inflamatório crônico (ALMEIDA et al., 2012; BROWN, 2013).

Segundo Ferreira e Matsubara (1997) e Schmid e Schiffli (2010) anemia é um dos achados mais comuns em pacientes com DRC, que predispõe ao estresse

oxidativo, pois as hemácias representam o principal componente de defesa antioxidante, por possuírem altas concentrações de enzimas (glutathione), capazes de metabolizar as ERO. A hipóxia tecidual aumenta consideravelmente a produção das ERO e o componente lipídico da membrana eritrocitária está também sujeito à agressão oxidativa. Os produtos desta lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular e, na ocorrência de deficiência da defesa do sistema antioxidante, ocorrerá a hemólise, em nosso estudo notamos a correlação fraca positiva entre delta e He ($r=0,2162$ e $p= 0,0159$), sugerindo que quanto maior o número de hemácias, maior o poder antioxidante, adicionalmente, Lustoza (2004) descreveu que o aumento da produção das ERO que ocorre em estados anêmicos crônicos, é seguida da diminuição das defesas antioxidantes do sangue, em nosso observamos uma tendência de diminuição do delta conforme o estagiamento da DRC, adicionalmente, notamos a diminuição dos parâmetros do perfil eritrocitário conforme o grau de estagiamento da DRC, conforme o valor da média observado de cada grupo com DRC em relação ao grupo Controle, observamos a significativa correlação negativa da Scr com a He ($r= -0,6494$ e $p < 0,0001$), Hb ($r = -0,6077$ e $p < 0,0001$) e Ht ($r = -0,6292$ e $p < 0,0001$) semelhante aos achados de Lustoza (2004) e Buranakarl et al. (2008). Suliman et al. (2002) avaliaram as concentrações plasmáticas da enzima glutathione em pacientes humanos renais crônicos com graus diferentes de anemia, sendo constatado que, quanto menor o hematócrito, maior a diminuição das concentrações de glutathione no interior das hemácias, indicando o consumo de mecanismos defesa antioxidantes intracelulares em pacientes doentes renais. Adicionalmente, Lustoza (2004) avaliou as concentrações plasmáticas de GPx, GSH e GSSH, SOD e o marcador de peroxidação lipídica, o TBA, em cães saudáveis e com DRC anêmicos, e constatou ausência de diferença das concentrações eritrocitárias da GPx e GSH entre os grupos. Entretanto, foi detectado aumento considerável das concentrações eritrocitárias de GSSG e da atividade enzimática eritrocitária SOD nos cães com DRC estudados. Nos cães com DRC anêmicos foram observadas concentrações plasmáticas maiores de TBA, quando comparado aos cães normais. O autor sugere o aumento do estresse oxidativo nos cães anêmicos com DRC, sendo descrita também a correlação negativa significativa entre o Ht e TBA. Embora os nossos pacientes não apresentassem graus de anemia

severa, os achados dos autores supracitados, são semelhantes aos nossos achados. Adicionalmente, quanto ao perfil eritrocitários dos nossos cães, observamos que o VGM e CHGM dos pacientes com DRC, independente do estágio, encontravam-se em valores de normalidade para espécie, mesmo na presença de anemia, segundo Garcia-Navarro (2005) a anemia normocítica normocrômica não regenerativa é comum em pacientes com DRC.

Segundo Galvão et al. (2013), o aumento do fósforo sérico e a azotemia são alterações comuns durante a evolução da DRC, sendo decorrentes da diminuição da TFG. Em nosso estudo notamos a correlação positiva entre a creatinina sérica e fósforo sérico ($r = 0,7207$ e $p < 0,0001$). A hiperfosfatemia e a hipercalcemia também são parâmetros importantes no acompanhamento de pacientes doentes renais, devido à particularidade em que as células endoteliais são susceptíveis a lesões induzidas por estes compostos, pois ambos promovem a apoptose celular em decorrência do aumento da produção de ERO (PENG et al., 2011; GALVÃO et al., 2013). No estudo de correlação, foi observado correlação positiva moderada entre o SP e NO ($r = 0,5557$ e $p < 0,0001$), bem como, entre o Cat e NO ($r = 0,3479$ e $p < 0,0001$). O desequilíbrio do fósforo sérico pode causar doenças cardiovasculares e o avanço da DRC, em decorrência da disfunção endotelial. Com o propósito de investigar tal situação, Peng et al. (2011), estudaram os efeitos da hipercalcemia e da hipocalcemia no aspecto funcional das células endoteliais no cordão umbilical de humanos "in vitro", e descreveram que em ambas as condições, ocorre uma diminuição da expressão da eNOS resultando em diminuição da produção de NO, resultado semelhantes aos relatados por Cozzolino et al (2005) e Di Marco et al. (2008).

Varizi et al., (1998) demonstraram uma redução urinária de metabólitos de NO e a diminuição da expressão da NOS na aorta torácica e no rim remanescente em um modelo experimental realizado em ratos com DRC em estágio terminal. Segundo Baylis (2008) existem diversas causas prováveis implicadas na deficiência de NO em pacientes com DRC, dentre elas, as limitações da disponibilidade de seu precursor a L-arginina. Entretanto, no estudo realizado por Tiazenello et al., (1980) foi demonstrado que a síntese de L-arginina na DRC, não é comprometida, pois

pacientes com DRC apresentaram concentrações adequadas do aminoácido no fluido tubular quando comparados a indivíduos normais.

YU et al., (1996) demonstraram que os rins, não são os únicos órgãos produtores de L-arginina, em seu estudo realizado em cães, foi referido que 40% da L-arginina é produzida de forma extrarrenal, certamente a partir da regeneração da L-citrulina, derivada do intestino e células endoteliais. De acordo com Baylis (2008), a concentração plasmática de L-arginina não difere significativamente de pacientes com DRC dos indivíduos saudáveis, pois ocorre aumento da síntese de L-arginina nos néfrons remanescentes, esta medida adaptativa mantém a produção renal de L-arginina em concentrações adequadas.

Lau et al. (2000) estudaram a concentração plasmática de L-arginina e a produção de NO em pacientes humanos com DRC em estágio final, hipertensos e clinicamente estáveis, utilizando a metodologia de conversão de $[^{15}\text{N}_2]$ arginina em $[^{15}\text{N}]$ citrulina para estimar a concentração de NO plasmático. Como resultado foi observado que a concentração plasmática L-arginina se manteve adequada e devido ao aumento da produção de NO, a concentração de NO plasmático foi significativamente maior nos indivíduos com DRC, quando comparados aos indivíduos normais. Esses dados são semelhantes com nossos resultados, pois os cães do presente estudo estavam clinicamente estáveis e apresentaram elevação plasmática de NO significativa nos estágio 3 e 4 da DRC. No entanto, Wever et al. (1999) utilizando o método da L-[guanidina- $^{15}\text{N}_2$], compararam a concentração plasmática de NO em pacientes com DRC com pressão arterial controlada por medicação anti-hipertensiva, e relataram a redução de NO plasmático. Aiello et al., (1997) estudaram ratos com DRC induzida por redução da massa renal, e demonstraram que nestes pacientes ao contrário do rim, na circulação sistêmica aumenta a produção de NO, como demonstrado pelo aumento plasmático de nitrato/nitrito. Neste estudo, foi encontrado aumento na expressão da eNOS e iNOS nas células endoteliais de grande vasos. Entretanto, o aumento da expressão da eNOS não se restringiu as células endotélio, mas também foi observado nas células da musculatura lisa destes grandes vasos. Os autores acreditam que a provável justificativa para o estímulo do aumento na produção de NO nestes sítios, seja o aumento da força de tensão do fluxo sanguíneo exercido nas células endoteliais dos

vasos, que promove alterações mecanoelásticas no vaso e estimula a expressão da eNOS. No referido estudo, os ratos eram hipertensos, e como se sabe na HAS ocorre um estiramento pulsátil e distensão da parede de artérias que favorece a síntese de NO. Adicionalmente, os ratos também estavam urêmicos, o que também provavelmente estimulou a expressão da iNOS pela ação de mediadores inflamatórios, como TNF α (AIELLO et al., 1997). Nava et al., (2000) estudaram a concentração plasmática de NO no sistema cardiovascular em ratos com HAS espontânea, e relataram que a expressão da NOS do coração e que as eNOS de microvasos aumentaram a produção de NO, de tal modo que a concentração de nitrato no plasma foi significativamente maior nos ratos hipertensos, quando comparados aos ratos saudáveis. Contudo, mesmo com o aumento de NO, este não é vasoativo para estimular uma vasodilatação adequada.

Considerando a hipertensão como um fator estimulante a produção de NO plasmático, como os achados dos autores supracitados, tal condição pode justificar e/ou contribuir para a elevação da concentração plasmática de nitrato/nitrito encontrada em nossos pacientes com DRC do presente estudo. Embora, o nitrato/nitrito plasmático tenha apresentado correlação positiva fraca com a PAS ($r = 0,2945$ e $p = 0,0008$).

A concentração plasmática de L-arginina é considerada normal em pacientes com DRC, entretanto, se o transporte da L-arginina para as células endoteliais for comprometido, devido ao desequilíbrio hemodinâmico que o paciente com DRC se encontra, isto reduziria a ação da L-arginina nas células endoteliais, e ocultaria uma redução de sua disponibilidade para o meio intracelular (WAGNER et al., 2001; BAYLIS, 2008). Xiao et al., (2001) estudaram a exposição da L-arginina em diferentes concentrações de ureia artificial, após sete dias de exposição, observou o efeito inibitório da ureia sobre o transporte da L-arginina, ocorrendo redução da atividade da eNOS, sugerindo que a deficiência prolongada de L-arginina limitaria a produção de NO. No entanto, Aiello et al., (1997) ao estudar ratos com DRC com massa renal reduzida, relataram que a uremia pode estimular a produção de NO sistemicamente, pois o aumento da expressão da iNOS vascular pode ser provocada pela guanidina succinato, que é uma toxina que se acumula em animais e humanos com DRC. Os autores sugerem que o aumento da atividade das enzimas

iNOS e da eNOS pode ser um mecanismo de defesa frente à uremia e hipertensão. Em nosso estudo, os pacientes que apresentaram concentração plasmática de NO significativamente maior, estimada pelo nitrato/nitrito plasmático foram os pacientes com a maior concentração de uréia e creatinina sérica, conforme demonstrado quando comparada as médias dos grupos. Em nosso estudo, no teste de correlação foi observado correlação positiva moderada da Sureia ($r = 0,5691$ e $p < 0,0001$) e Scr ($r = 0,6646$ e $p < 0,0001$) em relação ao NO.

Outros estudos demonstraram que o aumento de nitrato/nitrito plasmático como forma de estimar a concentração plasmática de NO em pacientes com DRC em estágio terminal seria provavelmente devido à diminuição da excreção renal dos mesmos (SCHMIDT et al., 1999; SCHMIDT; BAYLIS, 2000). Neste contexto, Blum et al., (1998) estudaram três grupos de pacientes humanos com graus diferentes de disfunção renal, e demonstraram que o aumento de nitrato/nitrito plasmático se correlacionava com a diminuição da TFG, pois a concentração plasmática de nitrato/nitrito no plasma foi significativamente maior nos pacientes com DRC, quando comparados aos indivíduos normais, os autores concluíram que na condição da DRC, ocorre uma deficiência de NO, mas que o aumento de nitrato/nitrito no plasma está relacionado a excreção renal diminuída. Em nosso estudo, nossos pacientes certamente estavam com redução da TFG, conseqüentemente diminuição da excreção renal de nitrato/nitrito, condição esta, que também pode justificar a elevação plasmática de NO encontrada, pois o método utilizado em nosso trabalho para estimar o NO plasmático, foi através do nitrato/nitrito. Entretanto, Tatematsu et al. (2007) induziram a DRC em cães machos por heminefrectomia e nefrectomia, e estudaram a concentração plasmática de nitrato/nitrito como forma de estimar a concentração plasmática de NO, e relataram a redução plasmática de nitrato/nitrito nos cães estudados, bem como a redução do NO plasmático, mesmo em condições de redução da TFG. No referido, estudo os autores atribuem a redução do NO plasmático encontrada, devido ao fato dos cães estudados não terem desenvolvido a hipertensão. Em um estudo realizado por Kim et al., (2000) com ratos nefrectomizados, não foi constatado alteração na concentração plasmática de nitrato/nitrito mesmo com a TFG reduzida. Diante da possibilidade de que o aumento de nitrato/nitrito no plasma esteja relacionado à excreção renal diminuída, Modlinger

et al. (2004) descreveram que a metodologia mais adequada para mensuração de NO plasmático em pacientes com DRC trata-se do estudo da conversão da [$^{15}\text{N}_2$] arginina em [^{15}N] citrulina. Utilizando esta metodologia, Lau et al. (2000) obtiveram como resultado a concentração de NO plasmático significativamente maior nos indivíduos com DRC, quando comparados aos indivíduos normais.

Em nosso estudo, a concentração plasmática de NO estimada por nitrato/nitrito tendeu-se a aumentar em pacientes com DRC, tornando significativamente alta no estágio 3 e 4 da doença. Sobre o efeito biológico do aumento de NO Clancy et al. (1998) e Wever et al. (1999) relataram que em pacientes com DRC pode ocorrer o aumento ou redução da expressão de iNOS, estando níveis elevados associados a mecanismos de lesão de tecidos e à progressão das patologias. O principal mecanismo pelo qual o NO em excesso pode exercer os seus efeitos envolvem a sua reação com ânion superóxido e posterior formação do radical peroxinitrito, este pode desencadear processos de peroxidação lipídica de membranas e modificação de proteínas estruturais, causando efeitos deletérios (SHAH e BILLIAR, 2008). Contudo, o radical peroxinitrito pode nitrosilar grupos sulfidril, formando S-nitrosotióis que podem participar da vasodilatação, inibição de agregação plaquetária e de adesão de monócitos ao endotélio, ações estas benéficas ao organismo (STAMLER et al. 1992). Segundo Shah e Billiar (2008) a ação deletéria ou benéfica do radical peroxinitrito depende do local e da velocidade de produção de ERO, e principalmente do estado de equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes. Harrison (2013) descreveu que as ERO podem participar de funções normais das células, portanto, toda a presença das ERO deve ser avaliada antes de ser considerada deletéria. Recentes pesquisas conduzidas por Jankowski et al. (2007) e Lautner et al. (2013) descobriram um novo componente do sistema renina angiotensina, um peptídeo denominado de alamandina, que aumenta conforme a progressão da DRC em ratos, camundongos e humanos. Este peptídeo possui ação vasodilatadora por incremento do NO, entretanto, a formação de NO independente da participação do inositol trifosfato e de íons de cálcio, permanecendo desconhecida a via de formação de NO. Em nosso estudo, todos os pacientes estavam clinicamente estáveis, portanto o aumento de NO pode ser um mecanismo contrarregulatório devido as diversas disfunções hemodinâmicas

provocadas pela DRC. Pesquisas demonstraram a capacidade de conversão do nitrato/nitrito em NO, e que a utilização de suplementação via oral de nitrato de sódio em humanos resultou em diminuição dos riscos no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, com melhora da função endotelial e vasodilatação (GILCHRIST et al., 2010; CARLSTRÖM et al., 2010).

7. CONCLUSÃO

As avaliações relativas às concentrações séricas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico revelaram resultados pouco conclusivos, que podem indicar inespecificidade dos métodos empregados ou amostragem insuficiente. Contudo, os resultados sugerem tendência a aumento da peroxidação lipídica espontânea e diminuição do poder antioxidante nos pacientes com DRC.

As concentrações plasmáticas de NO, estimadas pelas concentrações de nitrato/nitrito, são maiores em cães com DRC em relação aos valores encontrados em cães saudáveis. Entretanto as diferenças são significativas somente em pacientes em estágio 3 e 4. No estágio 4, quando a síndrome urêmica atinge a condição mais severa, as concentrações plasmáticas de nitrato/nitrito podem ser cerca de oito vezes o valor observado em cães saudáveis e cerca de cinco vezes o valor obtido no estágio imediatamente anterior (DRC-3). Contudo, as avaliações realizadas não permitiram estabelecer se os resultados decorreram de incremento da geração de NO ou diminuição de excreção renal de nitrato/nitrito. Todavia, uma vez que o aumento gradativo teve início na DRC-1, caracterizada por ausência de azotemia, é possível que o fator “geração de NO” tenha contribuído.

Embora os resultados deste estudo tenham evidenciado que as ocorrências de hipertensão e proteinúria são eventos marcantes na DRC em cães, não foi demonstrada correlação entre estas manifestações e os indicadores de estresse oxidativo analisados.

8. REFERÊNCIAS

ARCHER, S. Measurement of nitric oxide in biological models. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 1, n. 7, p. 349-360, 1993.

AIELLO, S.; NORIS, M.; TODESCHINI, M.; ZAPPELLA, S.; FOGLIENI, G.; BENIGNI, A.; CORNA, D. Z.; CAVALLOTTI, D.; REMUZZI, G. Renal and systemic nitric oxide synthesis in rats with renal mass reduction. **Kidney International**, New York, v. 52, n. 1, p. 171-181, 1997.

AKAMATSU, A. **Análise morfológica e funcional dos rins de cães normais e com insuficiência renal crônica**. 2002. 51f. Dissertação de mestrado em medicina veterinária – área de concentração Clínica Médica Veterinária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2002.

ALMEIDA, F. A.; CADAVAL, R. A. M.; GUERRA, E. M. M.; RODRIGUES, C. I. S. Acometimento renal na hipertensão arterial. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. **Hipertensão**. 2º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, cap, 25, p. 181-187, 511p.

BALASUBRAMANIAN, S. Progression of chronic kidney disease: Mechanisms and interventions in retardation. **The Apolo Medicine Journal**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 19-28, 2013.

BARBOSA, K. B. R.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BATALHÃO, M. E.; MORETO, V.; STABILE, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO E. C. Role of dexametasone on vasopressin release during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides**, Amsterdam, v. 147, n. 1-3, p. 60-67, 2008.

BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 294, n. 1, p. F1-F9, 2008.

BLUM, M.; YACHNIN, T.; WOLLMAN, Y.; CHERNILHOVSKY, T.; PEER, G.; GROSS-KOPF, I.; KAPLAN, E.; SILVERBERG, D.; CABILI, S.; LAINA, A. Low oxide nitric production in patients with chronic renal failure. **Nephron**, New York, v. 79, n. 3, p. 265-268, 1998.

BROWN, N. J. Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis. **Nature reviews practice - Nephrology**, London, v. 9, n. 8, p. 459-468, 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v.52, p. 302-10, 1978.

BURANAKARL, C.; TRISIRIROJ, M.; PONDEENANA, T.; TUNGIITPEANPONG, P.; JARUTAKANON, R.; PENCHOME, R. Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. **Research in Veterinary Science**, London, v. 10, n. 2 p. 1010-103, 2008.

CACHOFEIRO, V.; GOICOCHEA, M.; VINUESA, S. G.; OUBINA, P.; LAHERA, V.; LUNO, J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. **Kidney International**, New York, v. 111, n. 74, p. 54-59, 2008.

CAMPBELL, D. J. Evolving concepts of the renin – angiotensina system: Do intravenous and subcutaneous angiotensina II increased blood pressure by different mechanisms? **Clinical and experimental pharmacology and physiology**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 560-570, 2013.

CARVALHO, M. B. Semiologia do sistema urinário. In: FEITOSA, L. **Semiologia Veterinária: A arte do Diagnóstico**, 2º ed. São Paulo: Roca, 2008, cap. 09, p. 389-409.

CARLSTRÖM, M.; PERSSON, A. F.; LARSSON, E. Dietary nitrate attenuates oxidative stress, prevents cardiac and renal injury, and reduces blood pressure in salt-induced hypertension. **Cardiovascular Research**, Oxford, v. 89, n. 3, p. 574-585, 2011.

CLANCY, R.; AMIN, A. R.; ABRAMSON, S. B. The role of nitric oxide in inflammation and immunity. **American Rheumatism Association**, Atlanta, v. 41, n. 7, p. 1141-1151, 1998.

COZZOLINO, M.; BRANCACCIO, D.; GALLIENI, M.; SLATOPOLSKY, E. Pathogenesis of vascular calcification in chronic kidney disease. **Kidney International**, New York, v. 2, n. 68, p. 429-436, 2005.

DANCEY, C.; REIDY, J. Estatística sem matemática para Psicologia: usando SPSS para Windows. Porto Alegre: Artmed, 2006.

DAVIS, D.; W.; LEWIS, M. L.; QI, W.; HART, D. A.; SMITH, F. G. Age dependent expression and distribution of nitric oxide (NO) synthase isoforms in the ovine kidney. **Open Journal of Molecular and Integrative Physiology**, Hubei, v. 3, n. 2, p. 61-70, 2013.

DI MARCO, G. S.; HAUSERG, M.; HILLEBRAND, U.; RUSTEMEYER, P.; WITTOWSKI, W.; LANG, D.; PAVENDÄDT, H. Increased inorganic phosphate induces human endothelial cell apoptosis in vitro. **American Journal Physiology – Renal Physiology**, Bethesda, v. 294, n. 6, p. F1381-F1387, 2008.

DURAND, M., T.; FAZAN, R.; SALGADO, H. C. Fisiologia da Pressão Arterial Normal. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. **Hipertensão**. 2° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, cap, 4, p. 29-39, 511p.

DUSSE, L., M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, Oxford, v. 31, n. 33, p. 829-837, 2011.

GALLE, J. Oxidative stress in chronic renal failure. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 16, n. 11, p. 233-235, 2001.

GALVÃO, J. F. B.; NAGODE, L. A.; SCHENCK, P. A.; CHEW, D. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, San Antonio, v. 23, n. 2, p. 134-162, 2013.

GUYENET, P. G. The sympathetic control of blood pressure. **Nature reviews. Neuroscience**. London, v. 7, n. 5, p. 335-346, 2006.

GANTA C. K.; LU, N.; HELWING, B.G.; BLECHA, F.; GANTA, R. R.; ZHENG, L.; ROSS, C. R.; MUSCH, T. I.; FELS, R. J.; KENNEY, M. J. Central angiotensina II-enhanced splenic cytokine gene expression is mediated by the sympathetic nervous system. **American Journal Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, Bethesda, v. 58, n. 4, p. H1683-H1691, 2005.

GILCHRIST, M.; WINYARD, P. G.; BENJAMIN, N. Dietary nitrate – good or bad? **Nitric Oxide**, Orlando, v. 22, n. 2, p. 104-109, 2009.

HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 422-433.

HARRISON, B. L. M.; NAVAR, L. G.; VINSON, G. P.; DAHR, S. E. Immunohistochemical localization of ANG II AT1 receptor in adult rat kidney using a monoclonal antibody. **American Journal of Physiology –Renal Physiology**, Bethesda, v. 273, n. 1, p. F170-F177, 1997.

HARRISON, D. G.; CAI, H.; LANDMESER, U.; GRIENDLING, K. K. Interactions of ANGII with NADPH oxidase, oxidative stress, and cardiovascular disease. **Journal of Renin Angiotensin Aldosterone Systems**, Birmingham, v.4, n. 2, p. 51-61, 2003.

HARRISON, D. G.; GUZIK, T. J.; LOB, H. E.; MADHUR, M S.; MARVAR, P. J.; THABET, S. R.; VINH, A.; WEYAND, C. M. Inflammation, immunity, and hypertension. **Hypertension**, Dallas, v. 57, n. 2, p. 132-140, 2011.

HARRISON, D. G.; MARVAR, P. J.; TITZE, J. M. Vascular inflammatory cells in hypertension. **Frontiers Research Foundation**, Switzerland, v. 3, n. 7, p. 1-11, 2012.

HARRISON, D. G. The mosaic theory revisited: common molecular mechanisms coordinating diverse organ and cellular events in hypertension. **Journal of the American Society of Hypertension**, New York, v. 7, n. 1, p. 68-74, 2013.

IRIS. International Renal Interest Society. **Staging Chronic Kidney Disease (CKD) 2009**. Disponível em: <<http://www.iriskidney.com/pdf/IRIS%20A4%20Poster.pdf>>. Acesso em 29/04/2013.

JANKOWSKI, V.; VANHOLDER, R.; GIET, M. V. D.; KARADOĞAN, S.; GOBOM, J.; FURKET, J. OKSCHE, A.; KRAUSE, E.; TRAN, T. N. A.; TEPEL, M.; SCHUCHARDT, M.; SCHÜTER, H.; WIEDON, A.; BEYERMANN, M.; BADER, M.; TODIRAS, M.; JANKOWSKI, J. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.27, n. 2, p. 297-302, 2007.

KARAMOUZIS, I.; SARAFIDIS, P. A.; KARAMOUZIS, M.; ILLIADIS, S.; HAIDICH, A.; SIOULIS, A.; TRIANTOS, A.; CHRISTAKI, N.; GREKAS, D. M. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. **American Journal Nephrology**, New York, v. 28, n. 1, p. 397-404, 2008.

KIM, S. W.; LEE, J.; PAEK, Y. W.; KANG, D. G.; CHOI, K. C. Decreased nitric oxide synthesis in rats with chronic renal failure. **The Journal of Korean International of Medicine Science**, Korean, v. 15, n. 4, p. 425-430, 2000.

LAU, T.; OWEN, W.; YU, Y. M.; NOVISKI, N.; LYONS, J.; ZURAKOWSKI, D.; TSAY, R.; AJAMI, A.; YOUNG, V.; CASTILHO, L. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage disease patients. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 105, n. 9, p. 1217-1225, 2000.

LAUTNER, R. Q.; VILLELA, D. C.; FRAGA-SILVA, R.; SILVA, N.; VERANO-GRAGA, V.; COSTA-FRAGA, F.; JANKOWSKI, V.; SOUZA, F. S.; ALZAMORA, A.; SOARES, E.; KJEDSEN, C. B. F.; OLIVEIRA, A.; BRAGA, J.; SAVERGNININ, S.; MAIA, G.; PELUSO, A. B.; PASSOS-SILVA, D.; FERREIRA, A. F.; ALVES, F.; MARTINS, A.; RAIZADA, M.; PAULA, R.; MOTTA-SANTOS, D.; PIMENTA, F. K. A.; ALENINA, N.; SINISTERRA, R.; BADER, M.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. L.; SANTOS, R. A. S. Discovery and characterization of Alamandine – A novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, Baltimore, v.112, n. 11, 1104-1111, 2013.

LEE, J. U. Nitric oxide in kidney: Its physiological role and pathophysiological implications. **Electrolyte & Blood Pressure**, Korean, v. 6, n. 27, p. 27-34, 2008.

LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K. U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C., ZOCCATLI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.

LUSTOZA, M. D. **Avaliação do estresse oxidativo em cães com insuficiência renal crônica e anemia**. 2004. 96 f. Dissertação de mestrado em medicina veterinária – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.

MODLINGER, P. S.; WILCOX, C. S.; ASLAM, S. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. **Seminars in Nephrology**, New York, v. 24, n. 4, 2004.

MONCADA, S. PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Bethesda, v. n. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S. Physiological effects of nitric oxide. *Journal of the Hypertension*, London, v. 12, n. 3, p. 35-39, 1994.

NAVA, E.; FARRÉ, A.; MORENO, C. A.; SANTOS, C.; PIERRE, M.; FRANCESCO, C.; LÜSCHER, T. F. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. **Journal of hypertension**, London, v. 16, n. 5, p. 609-615, 1998.

NAVARRO-GARCIA, C. E. K. Manual de hematologia veterinária. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005, p. 48-49.

NICHOLS, R. Polyuria and Polydipsia. **Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 31, n. 5, p. 833, 2001.

NEWMAN, S. J. The urinary system. In: McGAVIN, M. D. & ZACHARY, J. F. **Pathologic basis of veterinary disease**. 5° ed. St. Louis: Elsevier, 2012, p. 589-657, 1322p.

NORONHA, I. L.; FUJIKARA, C. K.; ZATZ, R. The inflammatory component in progressive renal disease – are interventions possible? *Nephrology Dialysis Transplantation*, Oxford, v. 17, p. 363-638, 2002.

PAYÁ, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 44, n. 2, p. 205-214, 1992.

PEIXOTO, A. J.; ORIAS, M.; DESIR, G. V. Does kidney disease cause hypertension? **Current Hypertension reports**, Philadelphia, v. 15, n. 2, p. 89-94, 2013.

PENG, A.; WU, T.; ZENG, C.; RAKHEJA, D.; ZHU, J.; YE, J.; HUTCHESON, J.; VARIZI, N. D.; LIU, Z.; MOHAN, C.; ZHOU, X. J. Adverse effects of simulated hyper and hypo phosphatemia on endothelial cell function and viability. **Public Library of Science one**, San Francisco, v. 6, n. 8, p.e23268, 2011.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6 ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2005, cap 260, p. 1756-1785.

SANTISTEBAN, M. M.; ZUBCEVIC, J.; BACKEY, D. M.; RAIZADA, M. K. Dysfunction brain-bone marrow communication: a paradigm shift in the pathophysiology of Hypertension, **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, London, v. 15, p. 377-389, 2013.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; PINHEIRO, S. V. B. Papel dos principais componentes na gênese da hipertensão arterial: sistema renina-angiotensina. In: BRANDÃO, A. A.; AMODEO, C.; NOBRE, F. **Hipertensão**. 2° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012, cap, 8, p. 61-70, 511p.

SAVOIA, C.; SCHIFFRIN, E. Inflammation in hypertension, **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, London, v. 15, p. 152-158, 2006.

SCHIFFRIN, E. L. The immune system: role in hypertension. **The Canadian Journal of Cardiology**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 543-548, 2013.

SCHMID, H.; SCHIFFL, H. Erythropoiesis stimulating agents and anaemia of end-stage renal disease. **Cardiovascular Hematology Agents**, San Francisco, v.8, n.4, p. 164-172, 2010.

SHAH, N. S.; BILLIAR, T. R. Role of nitric oxide in inflammation and tissue injury during endotoxemia and hemorrhagic shock, **Environ Health Perspect**, United States, v. 106, p. 1139-1143, 1998.

SCHMIDT, R. J.; YOKOTA, S.; TRACY, T. S.; SORKIN, M. I.; BAYLIS, C. Nitric oxide production in low in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis.

American Journal of Physiology - Renal Physiology, Bethesda, v. 276, n.5, p. F794-F797, 1999.

SCHMIDT, R. J.; BAYLIS, C. Total nitric oxide production is low in patients with chronic renal disease. **Kidney International**, New York, v. 58, n. 3, p. 1261-1266. 2000.

SCOTT, A. N. D. Oxidative stress and chronic kidney disease. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, New York, v. 38, n. 1, p. 157-166, 2008.

SHIMIZU, M. H. M. **A N-acetilcisteína atenua a progressão da doença renal crônica**. 2005. 105f. Tese de doutorado em medicina – Universidade de São Paulo USP. Faculdade de Medicina Ribeirão Preto. Departamento de Clínica Médica, Ribeirão Preto, 2005.

SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. **Nephrology**, Carlton, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.

STAMLER, J. S.; SIMON, D. I.; OSBORNE, J. A.; MULLINS, M.; JARAKI, O.; MICHEL, T. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 1, p. 444-448, 1992.

SULIMAN, M. E.; BARANY, P.; DIVINO-FILHO, J.C.; QURESCHI, A.R.; STENVINKEL, P.; HEIMBÜRGER, O.; ANDERSTAM, B.; LINDOHL, B.; BERGSTRÖM, J. Influence of nutritional status on plasma and erythrocyte sulphur amino acids, sulph-hydryls, and inorganic sulphate in end-stage renal disease. **Nephrology Dialysis Transplantation**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 1050-1056, 2002.

SYME, H., M.; FLETCHER, M., G., R.; BAILEY, S., R.; ELIOTT, J. Measurement of aldosterone in feline canine and human urine. The **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 48, n.4, p. 202-208, 2007.

ROSENSON, R. S. Statin in atherosclerosis: lipid – lowering agents with antioxidant capabilities. **Journal of Atherosclerosis Research**, Amsterdam, v.173, n. 1, p. 1-12, 2004.

TATEMATSU, S.; WAKINO, S.; KANDA, T.; HOMMA, K.; YOSHIOKA, K.; HASEGAWA, K.; NAOKI, S.; KIMOTO, M.; SARUTA, T.; HAYACHI, K. Role of nitric oxide – producing and – degrading pathways in coronary endothelial dysfunction in chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 18, n. 3, p. 741-749, 2007.

TIAZENELLO, A.; FERRARI, G.; GARIBOTTO, G.; GURRERI, C.; ROBAUDO, C. Renal metabolism of amino acid and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. **The Journal of Clinical Investigation**, Duke, v.65, n. 5, p. 1162-1173, 1980.

TILLEY, L. [2008]. **Diagnosing and treating hypertension** (Proceedings): CVC Cleveland, Ohio-USA, Out 2008. Disponível em: <
<http://veterinarycalendar.dvm360.com/avhc/Medicine/Diagnosing-and-treating-hypertension-Proceedings/ArticleStandard/Article/detail/588617> >. Acesso em 10/08/2011.

VARIZI, N. D.; NI, Z.; WANG, X. Q.; OVEISI, F.; ZHOU, J. Downregulation of nitric oxide synthase in chronic renal insufficiency: role of excess PTH. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v.274, n.4, p. F642-F649, 1998.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas do oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

URSO, C.; CAIMI, G. Oxidative stress and endothelial dysfunction. **Minerva Medicina**, Torino, v. 102, n. 1, p. 59-77, 2011.

WAGNER, L.; KLEIN, J. D.; SANDS, J. M.; BAYLIS, C. Urea transports are distributed in endothelial cells and mediate inhibition of L-arginine transport. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 283, n. 3, p. F578-F582, 2001.

WEVER, R.; BOER, P.; HIJMERING, M.; STROES, E.; VERHAAR, M.; KASTELEIN, J.; VERSLUIS, K.; LAGERWERF, F.; HERMAN, R.; KOOMANS, H.; RABELINK, T. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, Dallas, v.19, n. 5, p. 1168-1172, 1999.

WILCOX, C. S. Oxidative stress and nitric oxide deficiency in the kidney: a critical link hypertension? **American Journal of Physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, Bethesda, n. 289, n. 4, p. R913-R935, 2005.

WILCOX, C. S.; TISCHER, C. C. **Manual de Nefrologia e Hipertensão**. São Paulo: Teccmed, 2008. 321p.

XIAO, S.; WAGNER; MAHANEY, J.; BAYLIS, C. Uremic levels of urea inhibit L-arginine transport in cultered endothelial cells. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, Bethesda, v. 280, n. 6, p. F989-F995, 2001.

YU, Y. M.; BURKER, J. F.; TOMPKINS, R.; YOUNG, V. Quantitative aspects of interorgan relation among arginine and ciltruline metabolism. **American Journal Physiology – Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 34, n. 271, p. E1098-E1109, 1996.

ZAFARULLAH, M.; LI, W. Q.; SYLVESTER J.; AHMAD, M. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**. New York, v. 60, n.1, p. 6 - 20, 2003.

ZATZ, R.; SEGURO, A. C.; MALNIC, G. **Bases Fisiológicas da Nefrologia**. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 333-362.

APÊNDICE I - Idade, a partir dos quais os cães e gatos são considerados idosos.

Espécie/ Porte	Peso (kg)	Idade em anos
Cães pequenos	0-10	10-13
Cães médios	11-25	9-12
Cães grandes	26-45	7-10
Cães gigantes	>45	6-9
Gatos em geral	variável	10-14

APÊNDICE II - Valores de referência dos parâmetros avaliados.

LABORATÓRIO DE PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA - HOSPITAL VETERINÁRIO "Governador Laudo Natel" - UNESP - Jaboticabal

VALORES DE REFERÊNCIA												
ESPÉCIE	PARÂMETROS ERITROLEUCOCITOMÉTRICOS E PLAQUETÁRIOS										PLAQUETAS. x10 ³ /uL	
	HE X10 ⁶ /uL	LE x10 ³ /uL	HB g/dL	HT %	CONTAGEM DIFERENCIAL %							
					BAS.	EOS.	BAST.	SEG.	LINF.	MON.		
CANINA	5,5 - 8,5	6 - 18	12 - 18	37 - 55	00-01	2 - 10	0 - 3	60 - 77	13 - 30	3 - 10	180 - 400	
FELINA	5,5 - 10	8 - 25	8 - 14	24 - 45	0 - 1	2 - 12	0 - 3	35 - 75	20 - 55	1 - 4	200 - 600	
BOVINA	5,0 - 10	4 - 12	8 - 14	24 - 48	0 - 2	2 - 20	0 - 2	15 - 45	45 - 75	2 - 7	200 - 600	
EQUINA	7,0 - 13	7 - 14	10 - 18	32 - 55	0 - 3	0,5 - 11	0 - 2	30 - 65	25 - 70	1 - 7	200 - 600	
OVINA	8,0 - 16	4 - 12	8 - 16	24 - 50	0 - 3	1 - 10	0 - 2	10 - 50	40 - 75	1 - 6	200 - 700	
CAPRINA	12 - 20	6 - 16	8 - 14	24 - 48	0 - 2	3 - 8	0 - 2	30 - 48	50 - 70	1 - 4	200 - 800	
SUINA	5,0 - 8,0	11 - 12	10 - 16	32 - 50	0 - 2	0,5 - 11	0 - 4	28 - 47	39 - 62	2 - 10	200 - 800	
	FORMULA LEUCOCITÁRIA ABSOLUTA (X10 ³ /uL)											
	VGM fL	HGM pg	CHGM g/dL	RETIC. %	BAS.	EOS.	SEG.	BAST.	LINF.	MON.		
CANINA	60 - 77	19 - 23	31 - 34	0,1 - 1,5	0 - 0	0,12 - 1,8	3,6 - 13,8	0 - 0,5	0,72 - 5,4	0,18 - 1,8		
FELINA	39 - 55	13 - 17	31 - 35	0,1 - 1,8	0 - 0	0,16 - 3,0	2,8 - 17,5	0 - 0,7	1,6 - 13,7	0,08 - 1,0		
BOVINA	40 - 60	14 - 18	26 - 34	-	0 - 0,2	0,08 - 2,4	0,6 - 5,4	0 - 0,2	1,8 - 9,0	0,08 - 0,8		
EQUINA	37 - 52	15 - 19	31 - 35	-	0 - 0,3	0,03 - 1,5	2,1 - 9,0	0 - 0,2	1,75 - 9,8	0,03 - 0,9		
OVINA	23 - 48	09 - 13	29 - 35	-	0 - 0,3	0,04 - 1,2	0,4 - 6,0	0 - 0,2	1,6 - 9,0	0,04 - 0,7		
CAPRINA	10 - 37	05 - 08	30 - 35	-	0 - 0,3	0,18 - 1,3	1,8 - 7,6	0 - 0,3	3,0 - 11,2	0,06 - 0,6		
SUINA	50 - 68	16 - 22	30 - 34	0,1 - 1,6	0 - 0,4	0,05 - 2,4	3,0 - 10,3	0 - 0,8	4,3 - 13,6	0,22 - 2,2		
	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS											
	URÉIA mg/dL	CREA mg/dL	SÓDIO mmol/L	POTÁS. mmol/L	PT g/dL	ALB. g/dL	COLEST mg/dL	FIBR. mg/dL	BIL. D. mg/dL	BIL. T mg/dL	AST U/L	LIPASE U/L
CANINA	15 - 65	0,5 - 1,5	146 - 156	3,8 - 5,1	5,8 - 7,9	2,6 - 4,0	125 - 270	125 - 300	0,06 - 0,12	0,1 - 0,5	10 - 88	27 - 750
FELINA	32 - 75	0,8 - 2,0	151 - 161	3,5 - 5,1	6,1 - 8,8	2,6 - 4,3	90 - 205	100 - 400	0,05 - 0,50	0,1 - 0,5	10 - 88	25 - 750
BOVINA	12 - 65	0,8 - 1,4	138 - 148	3,8 - 5,1	6,3 - 8,9	2,8 - 3,8	80 - 180	200 - 500	0,04 - 0,40	0,0 - 0,50	78 - 132	-
EQUINA	21 - 54	0,9 - 1,8	136 - 143	2,6 - 4,9	5,6 - 8,0	3,0 - 4,0	75 - 150	200 - 400	0,0 - 0,40	1,0 - 2,0	226 - 366	-
OVINA	17 - 43	1,0 - 2,7	139 - 152	3,9 - 5,4	6,0 - 7,9	2,4 - 3,0	50 - 140	100 - 500	0,0 - 0,27	0,1 - 0,5	98 - 278	-
CAPRINA	21 - 60	0,9 - 1,8	135 - 154	4,6 - 9,8	6,4 - 7,8	2,0 - 4,4	50 - 140	100 - 500	0,0 - 0,27	0,0 - 0,1	98 - 278	-
SUINA	17 - 65	1,0 - 3,0	135 - 150	7,8 - 10,6	7,4 - 8,9	2,0 - 3,9	36 - 154	200 - 400	0,0 - 0,30	0,0 - 0,1	9 - 113	-
	GGT U/L	CÁLCIO mg/dL	FÓSF. mg/dL	MAG. mg/dL	ALT U/L	GLIC. mg/dL	CK U/L	LDH U/L	F.ALC. U/L	AMIL. U/L	TRIGL. mg/dL	COLORO mEq/L
CANINA	1 - 10	8,6 - 11,2	2,2 - 5,5	1,8 - 2,4	10 - 88	60 - 110	20 - 200	50 - 495	20 - 150	300 - 2000	27 - 115	105 - 115
FELINA	1 - 10	8,0 - 10,7	1,8 - 6,4	1,5 - 2,5	10 - 88	70 - 150	50 - 450	75 - 490	10 - 80	500 - 1800	20 - 150	117 - 123
BOVINA	11 - 24	9,7 - 12,4	5,6 - 6,5	1,8 - 2,3	14 - 38	45 - 75	66 - 120	08 - 302	90 - 170	126 - 250	-	97 - 111
EQUINA	4 - 13	11,0 - 13,6	3,1 - 5,8	2,2 - 2,8	34 - 113	75 - 115	86 - 140	162 - 412	143 - 395	35 - 100	-	99 - 109
OVINA	-	10,0 - 13,0	5,0 - 7,3	2,2 - 2,8	60 - 84	50 - 80	-	60 - 111	68 - 387	-	35 - 100	98 - 115
CAPRINA	-	10,0 - 13,0	5,5 - 6,5	2,8 - 3,6	60 - 84	50 - 80	-	60 - 111	68 - 387	-	35 - 100	98 - 115
SUINA	-	8,0 - 12,0	5,3 - 9,6	2,7 - 3,7	32 - 84	65 - 95	-	96 - 160	26 - 362	-	-	98 - 115

Referências dos valores Bioquímicos e Hematológicos - Kaneko, J. J. & Cornelius. C.E. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 4ed. Academic Press, San Diego - CA., 1989, 932p.
Feldman, B.F.; Zink, J.G.; Jain, N.C. Schalm's Veterinary Hematology, 5ed. Lippincott Williams, Philadelphia, 2000, 1344p.
Meyer, Coles e Rich. Medicina de Laboratório Veterinária. Interpretação e Diagnóstico. São Paulo: Roca, 1995, 308p.