

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**“PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS SÉRICAS E
URINÁRIAS DE CÃES NORMAIS E DE PORTADORES DE
INSUFICIÊNCIA RENAL CRÔNICA”**

Autor: ÉRICA GIL HERNANDES DE TOLEDO

Orientador: Profa Dra MARILEDA BONAFIM CARVALHO

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – Unesp, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária – Área de Concentração em Patologia Animal.

**JABOTICABAL - SP
Janeiro - 2001**

*A ciência será sempre uma busca, jamais uma descoberta real.
É uma viagem, nunca uma chegada.*

(K. Popper)

DEDICO

Aos meus pais, Edevar e Maria de Lourdes,
pelo exemplo de dedicação, seriedade e
honestidade que sempre representaram.

Ao meu marido Beto,
pelo amor, companheirismo, amizade e
colaboração durante toda essa longa jornada.

Aos meus irmãos, Mara, Olegário e Virginia,
fontes inesgotáveis de amor e incentivo.

Aos meus sobrinhos, Ítalo e Ivan,
por me ensinarem o verdadeiro significado de uma vida nova.

Uma longa viagem começa com um único passo
(Lao – Tse)

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa e auxílio a pesquisa.

Ao conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo auxílio a pesquisa.

A Hill's Pet Nutrition do Brasil, pelo fornecimento gratuito de toda a ração utilizada no experimento.

À Prof^a Dr^a Marileda Bonafim Carvalho, pela orientação, incentivo e principalmente por ter acreditado na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pelos ensinamentos e colaboração que muito me auxiliaram no estabelecimento da metodologia empregada nesse trabalho.

Ao Prof. Dr. Gener Tadeu, pela paciência e disponibilidade na realização das análises estatísticas.

À equipe de Nefrologia, pelo esforço e dedicação, sem os quais esse trabalho não teria sido realizado.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana, e funcionários Eugêneo de Campos Filho, Cláudia A. S. Nogueira, Renata L. N. Jorge e Lígia M. S. Guadanhim, pela prestatividade e disponibilidade na realização dos exames laboratoriais, imprescindíveis para a realização deste estudo.

Aos funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, e do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, pelos serviços prestados e por todos esses anos de convivência que foram tão importantes para meu crescimento profissional e pessoal.

À Sra. Esther, Tia Wilma e Tia Ely, por terem me acolhido como uma filha, pelo carinho e pela torcida oferecidos sempre.

À Karina, que com o decorrer do tempo se tornou uma grande amiga, pelo apoio, incentivo, carinho, companheirismo que só podem ser oferecidos por pessoas que conhecem, de verdade, o sentido de uma amizade.

À Andréa, que tenho certeza, mesmo de longe, torce por mim em todos os instantes...um grande abraço.

Ao Marcelo Roncoletta, pela paciência em ensinar meus primeiros passos no aprendizado da técnica de eletroforese e por estar sempre pronto a ajudar nos momentos de dificuldades.

A todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos cães, pela contribuição involuntária, sem a qual não nos seria viável a realização deste trabalho.

Aos meus queridos animais Paçoca, Pitoco, Gaya, Kami, Bohêmia, Gula e Drake, que pelo carinho e companheirismo que, muitas vezes, tornaram minha caminhada mais fácil.

Muito Obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1. COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS	11
3.2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	12
3.3. TESTES E ANÁLISES LABORATORIAIS.....	13
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4. RESULTADOS.....	18
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES	42
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8. APÊNDICE.....	48
9. ABSTRACT.....	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Médias aritméticas e desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, dos parâmetros relacionados ao clearance de creatinina (Ccr), excreção fracionada de sódio (EFNa), proteína total da urina (PU) e razão proteína:creatinina urinárias (UP:C) de cães com função renal normal (n=20) e de cães com insuficiência renal crônica (n=24).....19
- Tabela 2 - Médias aritméticas e desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de soro de cães com função renal normal e de cães com insuficiência renal crônica (IRC).....22
- Tabela 3 - Médias aritméticas com desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de urina de cães com função renal normal e de cães com insuficiência renal crônica (IRC).....25
- Tabela 4 - Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de urina de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica e resultados do Teste de Wilcoxon.....30
- Tabela 5 - Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de urina de cadelas normais e portadoras de insuficiência renal crônica e resultados do Teste de Wilcoxon.....31
- Tabela 6 - Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de soro de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica (IRC) e resultados do Teste de Wilcoxon.....33

- Tabela 7 - Resultados da análise estatística (Teste Exato de Fisher) para comparação dos percentuais de distribuição de bandas protéicas em SDS-PAGE, de urina de cães normais (N) e de portadores de insuficiência renal crônica com predomínio de lesões glomerulares (G) ou de lesões túbulo intersticiais (T-I).....36
- Tabela 8 - Resultados da análise estatística (Teste Exato de Fisher) para comparação dos percentuais de distribuição de bandas protéicas em SDS-PADE, de soro de cães normais (N) e de portadores de insuficiência renal crônica com predomínio de lesões glomerulares (G) ou de lesões túbulo-intersticiais (T-I).....37

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Média aritmética e respectivos desvios padrão dos valores percentuais (%) das principais bandas protéicas encontradas na urina de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica, por meio de SDS-PAGE.....	34
Quadro 2 – Média aritmética e respectivos desvios padrão dos valores percentuais (%) das principais bandas protéicas encontradas no soro de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica, por meio de SDS-PAGE.....	35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem de gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo 10 amostras de soro de cães normais e, nas margens direita e esquerda, padrões de peso molecular.....16
- Figura 2 -Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, de amostras de soro selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais de bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos.A e entre os sexos B.....23
- Figura 3 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de soro de cães normais.....24
- Figura 4 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de soro de cães normais.....24
- Figura 5 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de soro de cão normal (**B**) e de cão portador de insuficiência renal crônica (**C**), indicadas nas figuras 2a e 2b respectivamente.....24
- Figura 6 -Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, de amostras de urina selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais de bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos.A e entre os sexos B.....27

- Figura 7 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de urina de cães normais.....28
- Figura 8 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de urina de cães com IRC.....28
- Figura 9 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de urina de cão normal (**D**) e de cão portador de insuficiência renal crônica (**E**), indicadas nas figuras 8a e 8b respectivamente.....28

RESUMO

Para este estudo foram avaliados 20 cães adultos saudáveis (10 machos e 10 fêmeas) e 24 cães adultos (16 machos e 8 fêmeas) com insuficiência renal crônica (IRC), com o objetivo de estudar a proteinúria. Foram empregadas técnicas para determinação quantitativa de proteína da urina e para a separação de suas frações por meio de SDS-PAGE. As quantidades de proteínas presentes na urina de cães saudáveis foram pequenas, mas o estudo dos perfis eletroforéticos mostrou haver diferenças entre machos e fêmeas. Apesar da ampla variação das concentrações de proteínas entre os animais, o grupo dos portadores de IRC apresentou proteinúria intensa. Os resultados dos portadores de IRC foram agrupados de acordo com o sexo ou em função do tipo de lesão renal predominante, para comparação dos eletroforetogramas. As análises revelaram que os perfis eletroforéticos seguem um padrão para os machos e outro para as fêmeas. Ainda, o padrão o perfil eletroforético observado quando há predomínio de lesões glomerulares difere do observado quando há predomínio de lesões túbulo-intersticiais.

Palavras-chave: cães, insuficiência renal crônica, proteinúria, eletroforese em gel de sódio dodecil sulfato de poliácridamida, eletroforese de proteína urinária.

1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos envolvidos na perda de proteína na urina vêm sendo amplamente estudados, tanto para determinar o papel do rim no metabolismo de várias classes de proteínas como para definir os modelos de excreção urinária de proteínas encontrados nas diversas doenças sistêmicas, de origem renal ou extra-renal.

A identificação da perda protéica na urina de cães com insuficiência renal crônica (IRC), é de grande interesse para a nefrologia. A IRC se trata de uma doença de caráter progressivo e irreversível, que em estágios avançados de lesão glomerular, determina proteinúria intensa.

Diversos métodos quantitativos para detecção de proteínas na urina são utilizados; cada qual com suas vantagens e limitações. A quantificação das proteínas permite verificação de intensidade das proteinúrias mas o estudo de outras características requer análises qualitativas.

A eletroforese de proteínas urinárias tem se mostrado efetiva na detecção e classificação de proteinúrias. Por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), tem sido possível estudar os diferentes modelos de perda protéica encontrados na IRC e associá-los aos locais de lesão, instalados no parênquima renal, substituindo, em alguns casos, a necessidade de utilização de biópsia renal.

Os estudos aqui descritos tiveram por objetivos (1) estabelecer uma metodologia de eletroforese em gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio, a partir de métodos já descritos, que seja aplicável às nossas condições clínico-laboratoriais (Serviço de Nefrologia e Urologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” - Unesp - Jaboticabal), e (2) avaliar a perda urinária de proteínas em cães normais e comparar os perfis eletroforéticos de proteínas séricas e urinárias de cães normais com os de cães portadores de IRC, buscando identificar e caracterizar as variações apresentadas. Concomitantemente às análises eletroforéticas de proteínas, foram avaliados parâmetros clínicos, laboratoriais, e

histopatológicos para estabelecimento dos tipos de lesões renais apresentadas pelos portadores de IRC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Insuficiência Renal

A Insuficiência Renal Crônica (IRC) é muitas vezes conseqüência de destruição lenta do parênquima renal (FINCO, 1989). Trata-se de doença caracterizada por falha renal intrínseca de longa duração e de natureza progressiva e irreversível, resultante de doença renal primária de curso longo (POLZIN et al., 1995). A capacidade de reserva renal e a ocorrência de processos compensatórios resultam na ausência de sinais clínicos, os quais só aparecem quando resta pouquíssimo tecido renal viável (FINCO, 1989).

Independentemente da natureza da doença renal originária, a IRC progride de forma precisa e ordenada ao longo do tempo, principalmente a partir do momento em que a taxa de filtração glomerular (TFG) cai para menos de 25% do valor normal. Os mecanismos envolvidos com o início e progressão da IRC podem estar relacionados a mudanças no padrão de perfusão dos nefrons funcionantes remanescentes. A lesão glomerular progressiva tipicamente resulta em diminuição contínua da TFG e em esclerose glomerular (GUIJARRO & KEANE, 1994). A progressão das lesões renais nos processos crônicos, além da esclerose glomerular, envolve alterações túbulo-intersticiais caracterizadas por inflamação intersticial, isquemia regional, proliferação fibroblástica e, finalmente, aumento na síntese de matriz extracelular e cicatrização (REMUZZI et al., 1997).

As doenças glomerulares são relativamente comuns em cães e podem ser importantes causas de IRC. As duas principais moléstias glomerulares de cães são a glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos e a amiloidose. Ambas podem levar a proteinúria maciça e a perda progressiva da massa renal funcional (VADEN, 1993). Mas não pode ser desconsiderado que as doenças túbulo-intersticiais também são causas relevantes de IRC. Em estudo realizado por MINKUS et al. (1994), de 36 cães azotêmicos, 21 apresentaram doença túbulo-intersticial crônica, 8 glomerulonefrite membranoproliferativa, 2 glomerulonefrite membranosa, 2 amiloidose e 3 displasia renal.

Como compilado por KOEMAN (1987), diversos estudos já evidenciaram o envolvimento do excesso de proteína do filtrado glomerular, na gênese das lesões túbulo-intersticiais. Estudando 51 cães proteinúricos, o autor encontrou correlação entre a perda urinária de proteínas e o desenvolvimento das lesões túbulo-intersticiais. Segundo NEWMAN et al., (2000), há muitas evidências de que o excesso de proteínas no filtrado, decorrente de lesão glomerular, parece ter um papel muito importante como estímulo inicial para a inflamação intersticial e suas conseqüências. Este estímulo não seria, contudo, dado pela quantidade excessiva de proteína, mas pelo tipo de proteína presente. Os autores demonstraram que, além dos efeitos da própria albumina, a proteína ligante de retinol (peso molecular baixo), potencialmente, pode induzir resposta pró-fibrinogênica em células epiteliais tubulares. Os estudos que vêm sendo realizados nesta área revelam que a proteinúria já não pode mais ser vista apenas como um sinal de lesão glomerular, mas sim como um fator importante para o desenvolvimento de fibrose intersticial e insuficiência renal (OTS et al., 2000).

Proteinúria

O glomérulo normal funciona como um filtro seletivo, tanto para dimensões, quanto para cargas (BRENNER, et al., 1978). A barreira de filtração é composta por três componentes principais, o endotélio fenestrado do capilar glomerular, a membrana basal glomerular, e as células epiteliais viscerais (podócitos). Os processos pediformes interligantes dos podócitos e os diafragmas fissurados entre eles, são negativamente carregados, devido à presença de glicoproteínas ácidas (poliânions glomerulares). A membrana basal e o endotélio, também possuem glicoproteínas carregadas negativamente (CHEW & DI BARTOLA, 1992; WALLER et al., 1989; LULICH & OSBORNE, 1990).

A quantidade de cada proteína dentre as quais são normalmente filtradas através da parede do capilar glomerular é função de suas concentrações plasmáticas e dos seus tamanhos moleculares, formas e cargas (LULICH & OSBORNE, 1990). Segundo WALLER et al. (1989), as partículas carregadas negativamente, presentes na membrana basal, estão envolvidas na diminuição da filtração glomerular de substâncias aniônicas, como por exemplo, a albumina.

Segundo LAPIN et al. (1989), cinco mecanismos básicos de proteinúria podem ser diferenciados, de acordo com o sítio da injúria: (i) Proteinúria glomerular seletiva - alterações brandas nos poros da parede dos capilares glomerulares, bem como alterações nas cargas negativas da membrana basal glomerular, causam filtração aumentada de albumina e sua excreção na urina; (ii) Proteinúria glomerular não seletiva - alterações mais severas da parede glomerular causam transtorno do mecanismo de ultrafiltração, resultando em perda de seletividade glomerular. Proteínas de alto peso molecular ocorrem na urina final; (iii) Proteinúria tubular - insuficiência no mecanismo de reabsorção tubular causa proteinúria de baixo peso molecular; (iv) Proteinúria de “super fluxo” - proteínas de baixo peso molecular (Proteína de Bence Jones, mioglobina, hemoglobina), quando ocorrem em concentração anormalmente alta no plasma sanguíneo, são filtradas pelo glomérulo, saturando a capacidade de reabsorção do sistema tubular. Elas passam para a urina final devido ao “super fluxo”; (v)

Proteinúria pós-renal - injúria no sistema urogenital eferente causa contaminação da urina final por debris teciduais, exsudato ou sangue.

A proteinúria tem sido reconhecida como um sinal específico e sensível de doença renal. A avaliação quantitativa da proteinúria renal possui grande significado no diagnóstico da doença renal (DI BARTOLA et al, 1980; CESATI & DOLCI, 1996). Excreção urinária de proteínas <400 mg/dia ou <30 mg/kg/dia é considerada normal para o cão, utilizando o método quantitativo do ácido tricloroacético-Ponceau-S (WHITE et al., 1984). Perdas urinárias de proteínas excedendo este limite, com a fração albumina excessivamente alta, podem sugerir proteinúria glomerular. Aumento da excreção urinária de proteínas de alto peso molecular (>100.000), e de albumina é indicativo de transtorno severo da permeabilidade seletiva glomerular, reabsorção tubular proximal diminuída, ou ambas (CHEW, 1984). Num estudo feito em 76 cães portadores de doença renal crônica, 52% tinham doença glomerular e 48% doença não glomerular. Além da avaliação histopatológica renal, o único parâmetro clínico ou laboratorial que discriminou o envolvimento glomerular foi a proteinúria (MACDOUGALL et al. 1986).

A quantidade e o tipo de proteínas perdidas na urina variam amplamente em estados normais e em doenças renais. É possível que a composição das proteínas urinárias reflita alterações específicas na estrutura ou função renal. Três fatores básicos dificultam a análise de proteínas urinárias: (i) há uma larga variação na quantidade e composição das proteínas presentes na urina de amostra para amostra. A excreção de albumina pode variar de 20 mg/dia ou menos em condições normais até 20 g/dia em pacientes com síndrome nefrótica; (ii) boa parte das proteínas excretadas na urina é encontrada no soro, e pode ter chegado na urina por mecanismos que não incluem alterações renais; (iii) os produtos da degradação de proteínas são concentrados pelos rins, e podem ser mensurados na urina junto com proteínas intactas. Exemplos de proteínas com produtos de degradação conhecidos incluem a fibrina e as γ -globulinas (PESCE, 1974). Podem ainda ser encontradas na urina, proteínas originárias da secreção de células epiteliais dos túbulos contornados distais. Dentre elas a mucoproteína

de Tamm-Horsfall, que está implicada na formação de cilindros (WALLER et al. 1989).

LULICH & OSBORNE (1990), relataram que a proteinúria, determinada pela identificação de concentrações anormais de proteínas na urina, é um achado laboratorial comum em cães acometidos por diversas doenças. As proteinúrias podem ser classificadas de acordo com sua origem, em pré-glomerular, glomerular e pós-glomerular. A proteinúria pré-glomerular pode estar relacionada a anormalidades presentes em sistemas corporais distintos do trato urogenital, ou pode se tratar de proteinúria funcional que decorre de exercícios intensos, estados de extrema exposição ao frio ou calor, estresse, febre e congestão venosa (proteinúria funcional). Segundo SQUIRES (1994), proteinúria pré-glomerular pode aparecer devido à grande quantidade de proteínas presentes no sangue, que passam pelo filtrado glomerular e superam a capacidade de reabsorção tubular. Esse quadro, segundo o autor, é marcado principalmente pelo aparecimento de proteínas de baixo peso molecular, e pode ser observado em pacientes com hemólise intravasculare, anemias hemolíticas imumomediadas, polimiosites e mieloma múltiplo.

WALLER et al. (1989), classificaram a proteinúria, em função do tempo, em intermitente (benigna, funcional, postural) e persistente. Segundo os autores, a proteinúria persistente, é classificada em pré-renal ou renal. A proteinúria renal pode ser glomerular, tubular ou mista (LULICH & OSBORNE 1990).

A proteinúria pré-glomerular está associada a alteração do perfil bioquímico sérico (Hiperglobulinemias, hiperalbuminemia), enquanto a proteinúria de origem pós-glomerular apresenta-se, geralmente, associada a um sedimento urinário ativo (hematúria, piúria) podendo ser resolvida, rapidamente, por uma terapia apropriada, diferente do que ocorre na proteinúria glomerular (SQUIRES, 1994).

Análise de proteínas na urina – avaliação quantitativa

Os testes semiquantitativos usando fitas reagentes contém indicador colorimétrico, comumente o azul de tetrabromofenol tamponado, que reage quando entra em contato com o grupo amino das proteínas. A sensibilidade desses testes indica quantidades de proteínas em concentrações acima de 5 a 20 mg/dl, sendo maior para a albumina que para outras proteínas como as imunoglobulinas e proteína de Bence Jones. Ainda, podem ocorrer falsos positivos em amostras altamente alcalinas ou contaminadas por anti-sépticos. Falsos negativos podem ocorrer em urinas nas quais a proteína predominante não é a albumina (SQUIRES, 1994).

Para determinar a concentração de proteína urinária, BARSANTI & FINCO (1979), relataram que o teste quantitativo do Azul Brilhante de Coomassie tem sido considerado eficiente. Sua execução para a dosagem de proteínas urinária é simples, pois requer apenas a adição do reagente à amostra antes da leitura espectrofotocolorimétrica da absorbância. Os autores sugeriram que, para a mensuração acurada da perda de proteína urinária, são necessárias amostras de 24 horas.

Segundo PESCE (1974), os métodos quantitativos mais comumente utilizados para detecção de proteína na urina, como por exemplo, o Kjeldahl, Biureto, Folin-Lowry e precipitação com os ácidos Sulfosalicílico e Tricloroacético, possuem vantagens e desvantagens de acordo com a finalidade e com a amostra analisada, além de não identificarem a origem da proteína encontrada.

Outro método vem sendo empregado, atualmente, para dosagem de proteína total em amostras de urina, o do vermelho de pirogalol, como verificado na literatura consultada (MARSHALL & WILLIAMS, 1999; UMBREIT & WIEDEMANN, 2000).

Foi demonstrado que, em cães, existe uma forte correlação entre a excreção de proteína total em 24 horas e a relação proteína/creatinina urinária (UP:C) (WHITE et al., 1984). Proteinúria renal ocorre principalmente devido a lesões envolvendo a parede do capilar glomerular. Entretanto, pela reabsorção de

água do filtrado glomerular, os túbulos renais podem, marcadamente, alterar a concentração de proteína numa amostra de urina. Mas, a UP:C não é influenciada pelo efeito da densidade específica, em diferentes concentrações de proteína urinária. Os valores da UP:C podem auxiliar na determinação de proteinúrias pré-glomerular, glomerular e pós-glomerular. Valores de UP:C < 1,0 são considerados normais para cães (GRAUER et al., 1985).

LULICH & OSBORNE, (1990), relataram boa correlação entre a UP:C de amostras de urina isoladas, tomadas ao acaso, com a quantidade de proteína excreta na urina em 24 horas.

SQUIRES (1994), relacionou o valor de UP:C encontrado para amostras de cães com doença renal, ao local da lesão presente no rim. Segundo o autor, valores menores que 1 são considerados normais. Valores entre 1 e 5 são encontrados em lesões pré-glomerulares, pós-glomerulares e glomerulares brandas. Valores entre 5 e 13 freqüentemente indicam proteinúria severa decorrente de transtorno pós-glomerular ou de glomerulopatia, enquanto valores acima de 13 são indicativos de glomerulopatias severas.

Análise de proteínas na urina – avaliação qualitativa

As proteínas excretadas na urina podem ser analisadas qualitativamente por uma série de métodos que vêm sendo desenvolvidos há décadas. A identificação de proteínas pelo peso molecular permite, ao investigador, inferir sobre a causa da proteinúria, inclusive com localização das lesões renais responsáveis pela perda protéica (RABIN et al., 1973; GÖRG et al., 1985; WEBER, 1988; LAPIN et al., 1989; SCHULTZE & JENSEN, 1989)

A eletroforese se destaca entre as técnicas para análise qualitativa de proteínas presentes na urina. HARVEY & HOE (1966), ao analisarem urina de cães pelo método de eletroforese em celulose, observaram concentrações de albumina na ordem de 60%. Os autores relataram que uma das desvantagens do método foi a baixa sensibilidade, o que dificultou a avaliação da urina dos cães normais. Outras técnicas foram sendo desenvolvidas para a eletroforese, inclusive

em gel de agarose, mas houve superioridade nos resultados alcançados pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Diversos estudos, tanto com urina de humanos como com urina de cães, revelam a qualidade da técnica com SDS-PAGE (PESCE, 1974; WEBER, 1988; SCHULTZE & JENSEN, 1989; WALLER et al., 1989; KAWAKAMI & KAJII, 1990).

WALLER et al. (1989), relataram que melhor resolução das proteínas urinárias é obtida pela técnica em SDS-PAGE. Segundo esses autores, proteínas presentes na amostra se ligam ao SDS na presença de calor produzindo um íon negativamente carregado que se move através do gel. Assim, as frações protéicas são separadas de acordo com o peso molecular. Proteínas de peso molecular variando entre 17.000 e 70.000 são facilmente detectadas, e proteinúria tubular pode ser demonstrada na presença de proteinúria glomerular.

KAWAKAMI & KAJII (1990), empregaram a eletroforese em SDS-PAGE para traçar o perfil eletroforético de proteínas em urinas de humanos sadios. Os autores constataram diferenças significativas entre perfis masculinos e femininos.

SCHULTZE & JENSEN (1989), em estudos com cães apresentando proteinúria, observaram boa correlação entre os modelos encontrados pela eletroforese em SDS-PAGE e as lesões renais observadas histopatologicamente. Os autores concluíram que a técnica de SDS-PAGE é potencialmente valiosa para a localização de lesões renais em cães com proteinúria.

As proteínas de origem plasmática encontradas na urina, refletem o tipo de doença que pode estar acometendo o rim. Assim, danos glomerulares determinam aparecimento de quantidade grande de albumina e quantidade variável de outras proteínas de alto peso molecular, na urina. A ocorrência de lesões tubulares, por sua vez, inclui excreção urinária de proteínas de pesos moleculares menores que o da albumina (PETERSON et al, 1969; PESCE et al., 1972; HARDWICKE, 1975; LULICH & OSBORNE, 1990).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. COMPOSIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para composição dos grupos experimentais os animais foram submetidos a avaliações clínicas e laboratoriais que serviram ao propósito de identificar cães normais e cães portadores de Insuficiência Renal Crônica (IRC), sem outras patologias.

Os exames realizados incluíram exame clínico, hemograma, urinálise e perfil bioquímico sérico (nitrogênio uréico, creatinina, proteína total, albumina, glicose, amilase, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, sódio e potássio). Os exames e as interpretações dos resultados foram realizados conforme a rotina do Serviço de Nefrologia e Urologia e do Laboratório de Patologia Clínica, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp – Câmpus de Jaboticabal, SP (HV).

3.1.1. Grupo I (controle): composto por 20 cães normais (10 machos e 10 fêmeas), sem raça definida, com idade superior a um ano. Os cães foram obtidos dentre aqueles destinados ao ensino e à pesquisa, recebidos pelo HV.

Quanto às fêmeas, foram avaliadas apenas as que se encontravam fora dos períodos de pró-estro, estro, gestação ou lactação.

3.1.2. Grupo II (animais com IRC): composto por 24 animais, 16 machos e 8 fêmeas, com IRC naturalmente adquirida. Selecionados dentre aqueles encaminhados, para atendimento médico, ao Serviço de Nefrologia e Urologia do HV.

3.2. DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Após um período reservado para domínio de técnica, adequação metodológica e consolidação do uso da técnica de eletroforese em SDS-PAGE, foi iniciado o experimento propriamente dito.

Inicialmente foram estudados os animais do Grupo I. Por se tratarem de animais sadios e, portanto, com condição física estável, estes cães serviram ao propósito de obter parâmetros normais para a espécie, dentro das condições experimentais estabelecidas. Eles foram mantidos em gaiolas metabólicas por um período de seis semanas, sendo os primeiros 15 dias destinados à adequação ao ambiente, manejo e alimentação. As coletas de amostras de urina e de soro para eletroforese foram feitas por três vezes consecutivas, a intervalos de 15 dias. Sendo o grupo constituído por 20 animais, foram obtidas 60 repetições, 30 para machos e 30 para fêmeas.

Antes da primeira da primeira coleta de amostras para eletroforese foram realizados testes de função renal e avaliação quantitativa da proteinúria.

Na fase seguinte foi iniciado o estudo dos animais portadores de IRC que vieram a compor o grupo II. Estes animais foram sendo avaliados individualmente, na medida em que se encontravam disponíveis para o estudo. Avaliações preliminares foram realizadas em pelo menos 80 animais, para que fossem encontrados 24 animais com as características clínicas desejadas. Cada um dos cães do grupo II foi avaliado clínico-laboratorialmente em 2 a 4 dias sendo, então, encaminhado, imediatamente, para os testes de função renal, avaliação quantitativa da proteinúria e coleta de amostras de urina e de soro para eletroforese.

3.3. TESTES E ANÁLISES LABORATORIAIS

3.3.1. Testes de Função Renal

Clearance de Creatinina

Para verificação da função glomerular foi estimada a taxa de filtração glomerular por meio do clearance de creatinina. O método utilizado foi o de duas sessões consecutivas de 20 minutos descrito por FINCO (1995).

Excreção Fracionada de Sódio

A função tubular foi avaliada pela excreção fracionada de sódio, a partir das amostras coletadas para avaliação do clearance (duas coletas consecutivas de 20 minutos).

Análises Laboratoriais

Para realização dos testes de função renal foram feitas dosagens de creatinina sérica e urinária (kit Labtest – Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil), e das concentrações de sódio sérico e urinário (ISELAB - leitura por eletrodo de íon seletivo – Drake, SP, Brasil), no Laboratório de Patologia Clínica do HV.

3.3.2. Avaliação da proteinúria

As proteínas excretadas na urina foram avaliadas por quantificação da proteína total e da albumina, pelo cálculo da razão proteína:creatinina urinárias e pelo perfil eletroforético.

3.3.3. Avaliação das proteínas séricas e urinárias

Os animais do Grupo I permaneceram em gaiolas metabólicas, viabilizando coletas de urina de 24 horas, que foram feitas por três vezes, a intervalos de 15

dias. As amostras de sangue, correspondentes às amostras de urina, foram coletadas 12 horas após o início da contagem de 24 horas para coleta de urina.

Para o Grupo II, constituído por pacientes portadores de IRC, as amostras de urina e de sangue foram coletadas em um único momento (amostras pontuais). As amostras de urina foram coletadas por meio de sonda uretral.

Quanto à conservação da urina de 24 horas, recolhida em gaiola metabólica, foram adotados os critérios que se seguem: (1) a urina eliminada naturalmente, foi coletada em recipiente fechado e recolhida, quando presente, a intervalos de uma hora, no período entre 8:00 e 22:00 horas, (2) no período noturno a urina eliminada era conservada por formalina a 40%, adicionada na proporção de uma gota para cada 30ml de urina e, (3) conforme foram sendo recolhidos, os volumes de urina eliminada foram armazenados em geladeira, até a totalização das 24 horas.

Dosagem de proteínas séricas e urinárias

A proteína total sérica foi determinada pelo método colorimétrico do Biureto (kit Labtest – Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil). Para a albumina sérica foi empregado o método do Verde de Bromocresol (kit Labtest – Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil). As proteínas urinárias foram determinadas pelo método colorimétrico do Vermelho de Pirogalol (Kit Sensiprot - Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil).

Estas dosagens, além de fornecerem informação direta sobre as concentrações de proteínas plasmáticas e de proteínas excretadas na urina, foram importantes para orientar o preparo das amostras (concentração) para a eletroforese.

Preparo das amostras de soro e de urina para eletroforese

As amostras de soro foram diluídas com tampão de amostra (Anexo A do Apêndice) para atingir a concentração protéica de 50 mg/ml. Foram aplicados no gel 10 µl da amostra diluída (50 µg de proteína).

As amostras de urina foram concentradas (Minicon B-15 – Amicon; MA, EUA), até 10 mg de proteína por ml de solução. As amostras foram preparadas, segundo PESCE et al. (1972), pela adição de 2 μ l de SDS a 10% (Mallinckrodt Baker, Inc.; Paris, França), 2 μ l de β Mercaptoetanol (Sigma Chemical CO; MO, EUA) e 2 a 3 cristais de sucrose (Vetec – RJ, Brasil) em 20 μ l da solução de urina concentrada. Foi aplicado no gel o volume total obtido para cada amostra preparada, que continha aproximadamente 200 μ g de proteína.

Tanto para o soro como para a urina as amostras preparadas foram submetidas à ebulição durante 5 minutos antes da aplicação no gel.

Perfis eletroforéticos de proteínas séricas e urinárias

Os estudos eletroforéticos das proteínas foram realizados em sistema vertical de eletroforese com gel homogêneo de poliacrilamida (PROTEAN II xi Vertical Electrophoresis Cells – Bio-Rad Laboratories; CA, EUA), segundo o método de preparo de gel descrito por LAEMMLI (1970). Foi utilizado o gel de empilhamento a 4% e separação a 10%, (Anexo A do Apêndice) com espessura de 1,0 mm, largura e altura de aproximadamente 16,0 cm.

Foram aplicadas até 10 amostras por gel. Como padrões para peso molecular foram empregados o MW-SDS-70 Kit (Sigma Chemical CO; MO, EUA) com variação de 14.000 a 70.000 e o MW-SDS-200 Kit (Sigma Chemical CO; MO, EUA) com variação de 30.000 a 200.000, aplicados na coluna da esquerda e da direita do gel, respectivamente.

Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas presentes nos géis foram executadas curvas padrões, a partir da leitura dos padrões de alto peso molecular (direita do gel), como exemplificado na Figura 1.

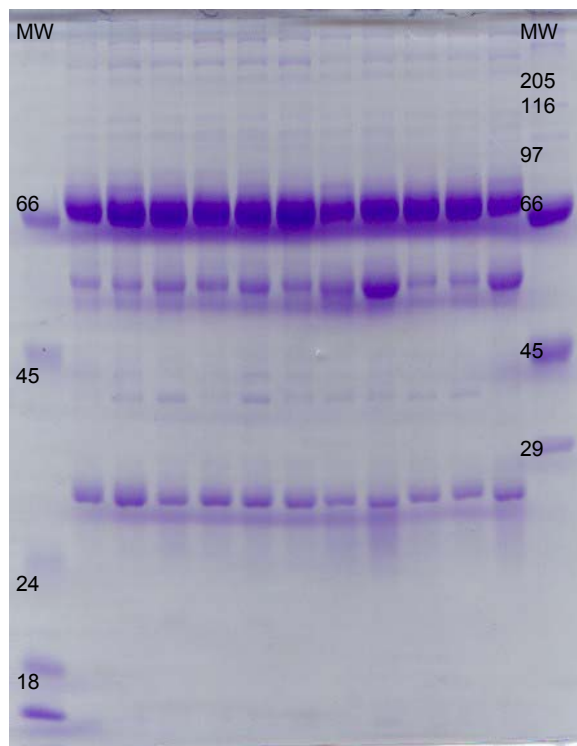


Figura 1 - Imagem de gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo 10 amostras de soro de cães normais e, nas margens direita e esquerda, padrões de peso molecular.

As corridas eletroforéticas foram realizadas com a miliamperagem pré-fixada em 20 e 25 mA para o gel de empilhamento e separação respectivamente. O tempo de corrida para as amostras de soro e urina foi de 8 e 5 horas respectivamente. A coloração dos géis foi feita com Azul brilhante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical CO; MO, EUA) (Anexo B do Apêndice). A leitura do gel foi realizada num sistema de densitometria (SHIMADZU CS-9301PC; Japão), junto ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da FCAV/Unesp - Câmpus de Jaboticabal, SP.

Análise dos perfis eletroforéticos

Para realizar o agrupamento das frações protéicas semelhantes foi utilizada a técnica de sobreposição dos traçados obtidos pela densitometria e da análise visual, conjunta e individual, dos géis. Assim, as bandas protéicas alinhadas

horizontalmente nos géis e com picos localizados na mesma posição nos gráficos de densitometria, foram agrupadas. A cada uma destas bandas semelhantes foi atribuído um valor de peso molecular representado pela média aritmética dos pesos obtidos na densitometria.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos eletroforetogramas de proteínas séricas e de proteínas urinárias e também, os resultados de clearance de creatinina, excreção fracionada de sódio, proteína urinária e a razão proteína:creatinina urinárias foram analisados segundo esquema fatorial 2 x 2 (2 grupo e sexos), em um delineamento inteiramente casualizado (DIC). O grupo I, composto de animais com função renal normal, contou com 10 repetições de machos e 10 repetições de fêmeas. O grupo II, composto de animais portadores de IRC, contou com 16 repetições de machos e 08 repetições de fêmeas.

Testou-se ainda, por meio de teste qui quadrado (Teste exato de Fisher e Teste de Wilcoxon, conforme STELL & TONIE, 1960) a independência entre o tipo de lesão renal encontrado (glomerular e túbulo-intersticial) pela ocorrência (ausente=0) e intensidade (graus 1, 2, e 3) para cada banda protéica identificada por meio de SDS-PAGE.

4. RESULTADOS

Os cães estudados foram submetidos a avaliações clínico-laboratoriais para caracterização do seu estado de saúde. Durante os períodos de avaliações e coleta de materiais os cães permaneceram sob as mesmas condições ambientais e não foram submetidos a qualquer exercício físico intenso. Também não foram observados episódios de febre ou qualquer outra manifestação de alteração clínica.

Os resultados de clearance de creatinina foram menores ($p < 0,01$) nos portadores de IRC evidenciando a diminuição da TFG destes animais (Tabela 1). Na avaliação da função túbulo-intersticial, feita por meio da excreção fracionada de sódio, os resultados foram ($p < 0,01$) maiores no grupo com IRC (Tabela 1), indicando redução na capacidade de reter sódio.

A concentração urinária de proteínas, mensurada pela técnica do vermelho de pirogalol, foi maior ($p < 0,05$) nos portadores de IRC e mesmo quando calculada a UP:C os resultados foram ($p < 0,05$) maiores neste grupo (Tabela 1). Este resultado é indicativo de que a IRC esteve associada a proteinúria patológica.

Tabela 1 – Médias aritméticas e desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, dos parâmetros relacionados ao clearance de creatinina (Ccr), excreção fracionada de sódio (EFNa), proteína total da urina (PU) e razão proteína:creatinina urinárias (UP:C) de cães com função renal normal (n=20) e de cães com insuficiência renal crônica (n=24).

Estatística	Variáveis			
	Ccr (ml/min/kg)	EFNa (%)	PU (mg/dl)	UP:C
F para grupos	67,98 **	12,21 **	10,88 **	13,35 **
F para sexo	3,32 ^{NS}	0,01 ^{NS}	0,17 ^{NS}	0,13 ^{NS}
CV (%)	37,50	151,57	141,29	157,68
	Média ± s	Média ± s	Média ± s	Média ± s
Machos Normais	2,51 ± 0,70	0,56 ± 0,49	45,43 ± 16,06	0,22 ± 0,12
Fêmeas Normais	1,92 ± 0,62	0,40 ± 0,33	25,23 ± 8,97	0,13 ± 0,05
Machos com IRC	0,61 ± 0,42	7,24 ± 9,44	200,78 ± 168,52	5,16 ± 5,80
Fêmeas com IRC	0,47 ± 0,24	7,79 ± 6,90	271,43 ± 396,56	6,34 ± 8,05
F grupo vs sexo	1,22 ^{NS}	0,03 ^{NS}	0,56 ^{NS}	0,17 ^{NS}

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

NS – não significativo

IRC – Insuficiência Renal Crônica

O estudo desenvolvido, pioneiramente em nosso meio, viabilizou a padronização da própria técnica de eletroforese em nossos laboratórios e também contribuiu para o estabelecimento dos perfis eletroforéticos de soro e de urina de cães normais e de portadores de IRC.

Os resultados dos perfis eletroforéticos séricos feitos em SDS-PAGE estão apresentados na Tabela 2. Foram detectadas diferenças significativas para algumas bandas de proteínas quando comparados os dois grupos. Ocorreu importante diminuição ($p < 0,01$) da albumina e de algumas proteínas de peso molecular baixo nos cães com IRC. Ainda outras duas proteínas de pesos moleculares menores do que o da albumina aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) nos portadores de IRC (Tabela 2). Na Figura 2 (A e B) estão representações gráficas das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, em amostras de soro, selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais das bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos (Análise de Variância) e entre os sexos (Teste de Wilcoxon). Nas Figuras 3 e 4 são mostrados exemplos de géis contendo amostras de soro de cães normais e com IRC, respectivamente. A Figura 5 está ilustrando representações gráficas de leitura densitométrica obtida de amostras de soro de cão normal e de cão com IRC.

Para avaliação qualitativa das proteínas excretadas na urina foram feitas leituras densitométricas das eletroforeses (SDS-PAGE). Nas urinas de cães e de cadelas normais foram detectadas, além da albumina, bandas com pesos moleculares aproximados de 117.000, 61.000, 36.000, 27.000, 23.000, 15.000. Adicionalmete, somente nas urinas de machos, foi detectada uma banda com peso molecular de aproximadamente 63.000 e somente na urina de fêmeas, bandas com pesos moleculares de aproximadamente 72.000 e 65.000. Nas amostras de urina de cães com IRC os percentuais de albumina foram maiores ($p < 0,05$) do que os dos normais. A banda com peso molecular aproximado de 117.000, foi menor ($p < 0,01$) na IRC. Nos machos com IRC, foram detectadas, além daquelas que já haviam aparecido nos normais, outras 5 bandas com pesos moleculares maiores do que o da albumina e mais 8 bandas com pesos

moleculares menores do que o da albumina. Para as fêmeas com IRC, além das bandas presentes também nas normais, foram detectadas 2 bandas com pesos moleculares maiores que o da albumina e outras 11 bandas com pesos moleculares menores que o da albumina (Tabela 3). Na Figura 6 (A e B) estão representações gráficas das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, em amostras de urina, selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais das bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos (Análise de Variância) e entre os sexos (Teste de Wilcoxon). Nas Figuras 7 e 8 são apresentados géis contendo amostras de urina de cães normais e com IRC. A Figura 9 está ilustrando representações gráficas de leitura densitométrica obtida de amostras de urina de cão normal e de cão com IRC.

Tabela 2 – Médias aritméticas com desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de soro de cães com função renal normal e de cães com insuficiência renal crônica (IRC).

P.M	Bandas Protéicas identificadas				Estatística			
	Quantificação relativa de cada banda (%)				F grupos	F sexo	F grupo vs sexo	CV (%)
Macho normal (n = 10)	Fêmea normal (n = 10)	Macho com IRC (n = 16)	Fêmea com IRC (n = 8)					
123.000	0,82 ± 0,20	0,34 ± 0,14	0,98 ± 0,67	1,16 ± 0,43	11,49 **	1,04 ^{NS}	5,32 ^{NS}	55,94
114.000	0,81 ± 0,30	0,37 ± 0,12	0,71 ± 0,44	0,53 ± 0,37	0,07 ^{NS}	8,43 **	1,36 ^{NS}	55,76
108.000	0,36 ± 0,08	0,29 ± 0,14	0,41 ± 0,76	0,23 ± 0,15	0,00 ^{NS}	0,73 ^{NS}	0,14 ^{NS}	140,84
ALBUMINA	51,91 ± 7,08	59,66 ± 10,52	33,66 ± 14,46	27,90 ± 13,72	43,74 **	0,07 ^{NS}	3,19 ^{NS}	28,47
66.000	1,49 ± 0,88	1,39 ± 0,69	0,82 ± 1,33	1,65 ± 1,85	0,28 ^{NS}	0,89 ^{NS}	1,45 ^{NS}	93,36
55.000	21,19 ± 6,32	20,28 ± 8,10	28,98 ± 15,85	33,48 ± 15,31	7,15 *	0,21 ^{NS}	0,48 ^{NS}	48,39
51.000	1,28 ± 0,93	1,03 ± 0,80	ausente	ausente	40,39 **	0,47 ^{NS}	0,47 ^{NS}	111,22
39.000	0,23 ± 0,18	0,45 ± 0,15	0,49 ± 0,89	0,64 ± 0,89	1,17 ^{NS}	0,76 ^{NS}	0,03 ^{NS}	149,05
35.000	1,34 ± 1,11	0,70 ± 0,59	4,33 ± 2,53	2,71 ± 3,44	13,34 **	2,71 ^{NS}	0,51 ^{NS}	89,90
22.000	6,23 ± 1,12	10,88 ± 4,39	8,26 ± 4,75	8,24 ± 5,12	0,05 ^{NS}	3,13 ^{NS}	3,19 ^{NS}	50,08
17.000	10,58 ± 2,77	4,99 ± 3,30	0,78 ± 2,14	1,36 ± 2,53	66,21 **	9,21 **	13,99 **	65,12
12.000	0,64 ± 0,21	0,21 ± 0,21	ausente	0,10 ± 0,28	42,02 **	8,13 **	20,98 **	85,48
9.000	0,55 ± 0,69	0,05 ± 0,16	ausente	ausente	8,17 **	5,67 *	5,67 *	247,33

P.M. – peso molecular aproximado

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

NS - não significativo

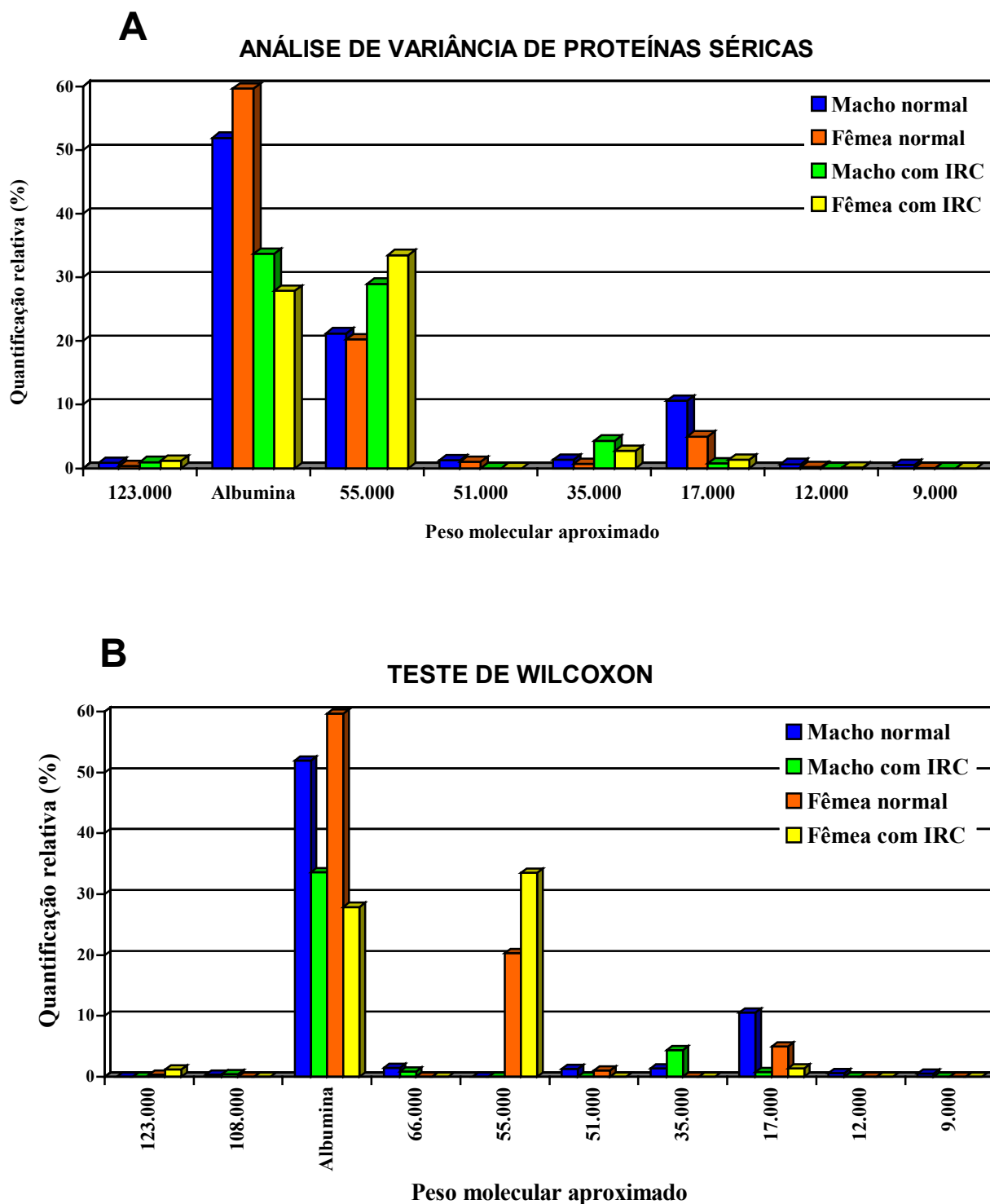


Figura 2 - Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais de bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos **A** e entre os sexos **B**.

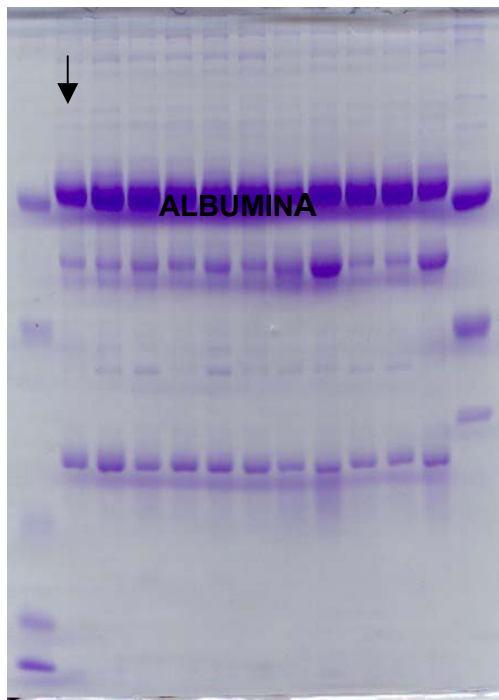


Figura 3 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de soro de cães normais.

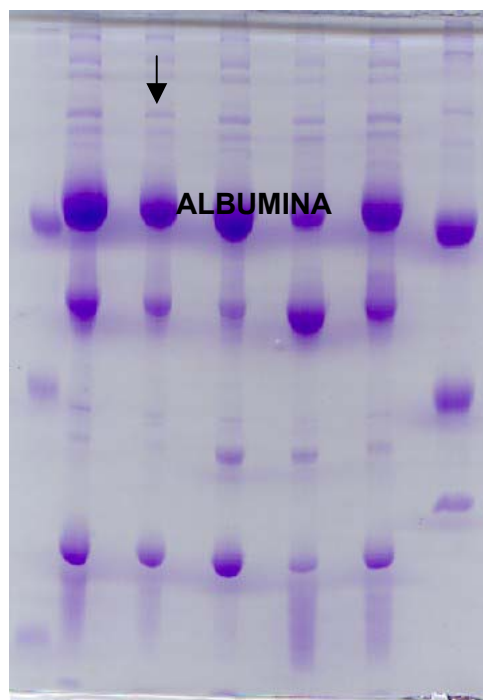


Figura 4 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de soro de cães com IRC.

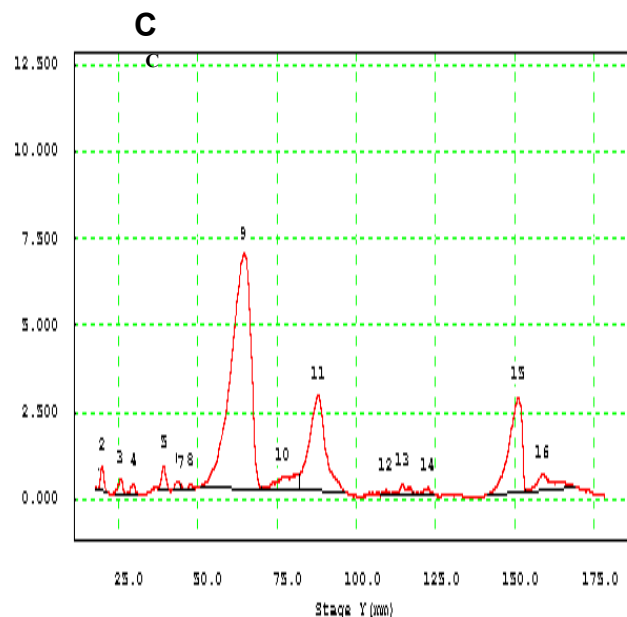
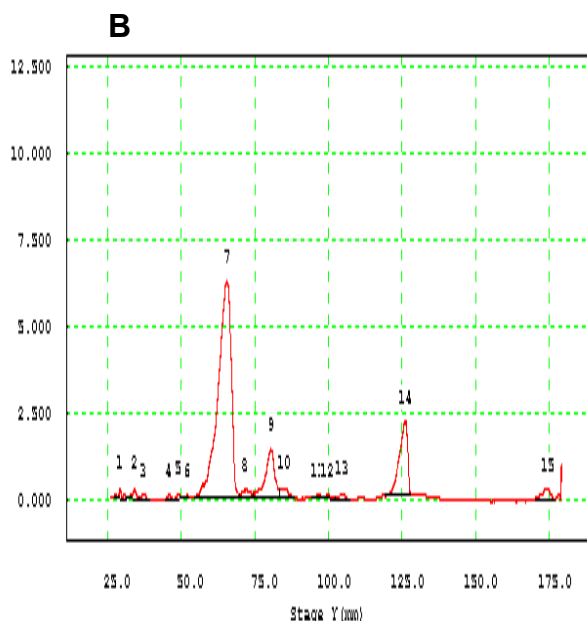


Figura 5 □ Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de soro de cão normal (**B**) e de cão portador de insuficiência renal crônica (**C**), indicadas nas figuras 2a e 2b respectivamente.

Tabela 3 – Médias aritméticas com desvios padrão (s) e resultados da Análise de Variância, da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de urina de cães com função renal normal e de cães com insuficiência renal crônica (IRC).

P.M.	Bandas Protéicas identificadas				Estatística			
	Quantificação relativa de cada banda (%)				F grupos	F sexo	F grupo vs sexo	CV (%)
	Macho normal (n = 10)	Fêmea normal (n = 10)	Macho com IRC (n = 16)	Fêmea com IRC (n = 8)				
153.000	Ausente	ausente	ausente	0,01 ± 0,04	1,84 ^{NS}	1,84 ^{NS}	1,84 ^{NS}	650,77
146.000	Ausente	ausente	ausente	0,03 ± 0,07	1,84 ^{NS}	1,84 ^{NS}	1,84 ^{NS}	650,77
135.000	Ausente	ausente	0,006 ± 0,03	ausente	0,43 ^{NS}	0,43 ^{NS}	0,43 ^{NS}	673,61
124.000	Ausente	ausente	0,003 ± 0,10	ausente	0,43 ^{NS}	0,43 ^{NS}	0,43 ^{NS}	673,61
117.000	7,05 ± 14,22	26,71 ± 25,60	0,38 ± 0,68	1,03 ± 1,34	13,96 ^{**}	5,50 [*]	4,82 [*]	173,94
112.000	Ausente	ausente	0,08 ± 0,22	ausente	0,87 ^{NS}	0,87 ^{NS}	0,87 ^{NS}	473,96
106.000	Ausente	ausente	0,02 ± 0,05	ausente	0,82 ^{NS}	0,82 ^{NS}	0,82 ^{NS}	488,51
89.000	Ausente	ausente	1,67 ± 1,81	ausente	5,83 [*]	5,83 [*]	5,83 [*]	183,01
ALBUMINA	19,18 ± 20,19	26,82 ± 20,06	46,68 ± 14,18	25,80 ± 16,88	5,89 [*]	1,47 ^{NS}	6,83 [*]	54,59
72.000	Ausente	2,68 ± 4,34	ausente	0,60 ± 1,70	2,36 ^{NS}	5,86 [*]	2,36 ^{NS}	303,08
65.000	Ausente	1,03 ± 3,26	ausente	0,75 ± 1,39	0,08 ^{NS}	3,11 ^{NS}	0,08 ^{NS}	450,14
63.000	0,05 ± 0,16	ausente	1,99 ± 1,98	ausente	6,60 [*]	7,30 [*]	6,60 [*]	165,04
61.000	13,29 ± 11,00	6,13 ± 6,65	11,51 ± 6,40	9,55 ± 12,66	0,09 ^{NS}	2,66 ^{NS}	0,87 ^{NS}	86,88
55.000	Ausente	ausente	ausente	3,26 ± 8,71	2,07 ^{NS}	2,07 ^{NS}	2,07 ^{NS}	614,15
52.000	Ausente	ausente	1,79 ± 2,64	ausente	3,16 ^{NS}	3,16 ^{NS}	3,16 ^{NS}	248,54

Continua ...

... Continuação (Tabela 3)

44.000	Ausente	ausente	1,03 ± 1,00	1,64 ± 2,75	10,77 **	0,57 ^{NS}	0,57 ^{NS}	194,40
36.000	23,14 ± 16,16	13,76 ± 8,81	5,03 ± 3,73	2,88 ± 4,19	25,70 **	4,06 ^{NS}	1,60 ^{NS}	85,59
30.000	Ausente	ausente	0,34 ± 0,49	1,04 ± 1,79	7,56 **	1,91 ^{NS}	1,91 ^{NS}	257,34
27.000	4,48 ± 5,12	4,50 ± 2,26	4,85 ± 5,84	4,24 ± 5,88	0,00 ^{NS}	0,04 ^{NS}	0,04 ^{NS}	111,19
25.000	Ausente	ausente	3,30 ± 4,90	0,93 ± 1,34	4,95 *	1,56 ^{NS}	1,56 ^{NS}	223,08
23.000	17,44 ± 12,12	6,91 ± 5,82	2,59 ± 4,26	2,38 ± 2,38	20,00 **	6,14 *	5,66 *	100,83
21.000	Ausente	ausente	3,63 ± 7,08	ausente	1,81 ^{NS}	1,81 ^{NS}	1,81 ^{NS}	328,55
18.000	Ausente	ausente	3,03 ± 6,99	9,54 ± 13,68	8,37 **	2,25 ^{NS}	2,25 ^{NS}	254,76
15.000	4,50 ± 6,11	0,66 ± 1,17	1,42 ± 3,07	6,04 ± 6,10	0,72 ^{NS}	0,08 ^{NS}	9,84 **	155,49
12.000	Ausente	ausente	ausente	2,20 ± 3,79	4,96 *	4,96 *	4,96 *	396,67
11.000	Ausente	ausente	ausente	8,16 ± 10,07	9,69 **	9,69 **	9,69 **	283,80
10.000	Ausente	ausente	2,04 ± 4,78	12,99 ± 12,48	16,26 **	8,64 **	8,64 **	192,96
9.000	Ausente	ausente	ausente	3,39 ± 3,13	17,27 **	17,27 **	17,27 **	212,61
8.000	Ausente	ausente	ausente	1,76 ± 2,23	9,18 **	9,18 **	9,18 **	291,56
7.000	Ausente	ausente	0,52 ± 1,32	2,85 ± 3,74	9,44 **	4,52 *	4,52 *	249,18

P.M. – peso molecular aproximado

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

NS - não significativo

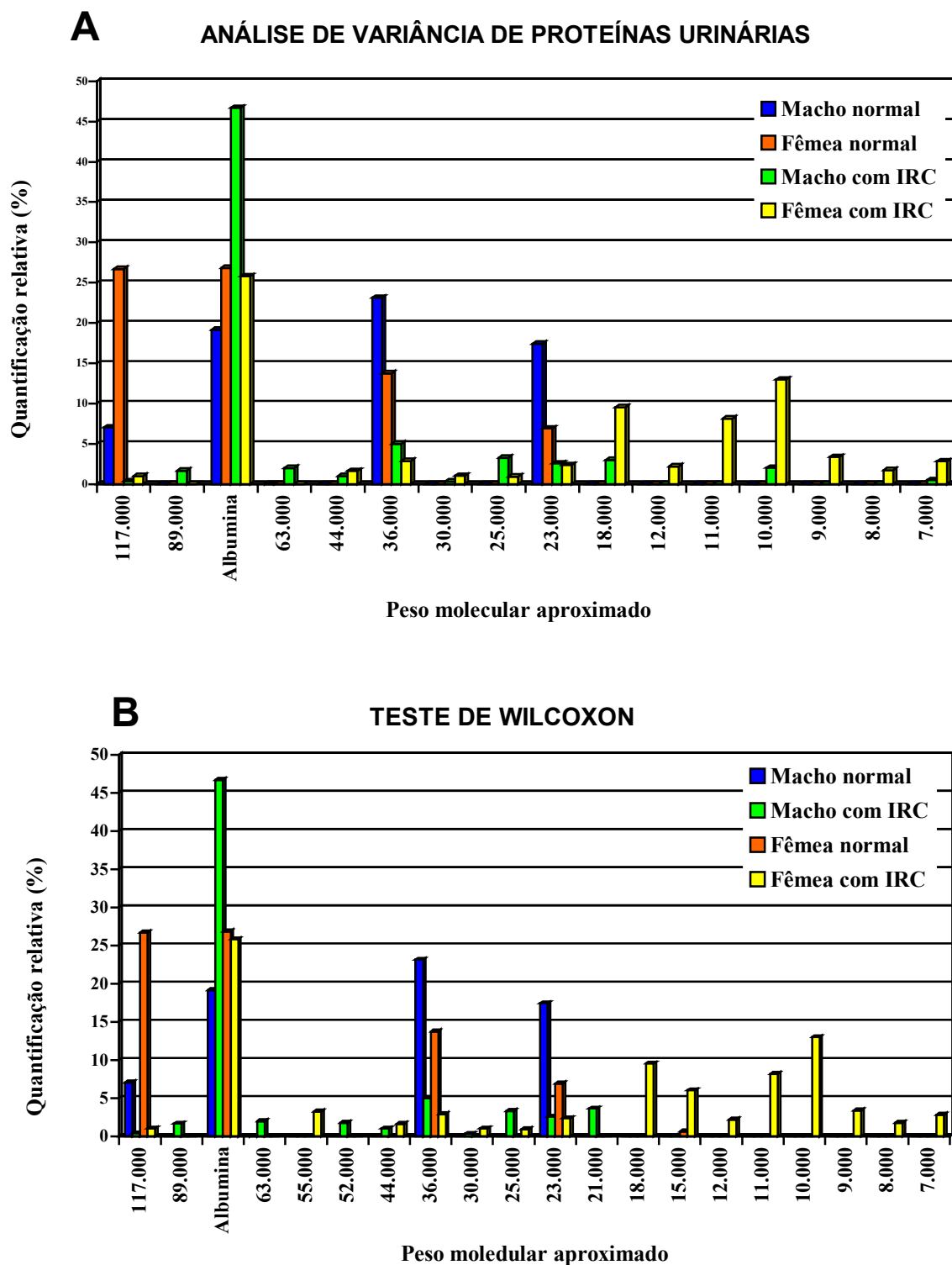


Figura 6 - Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas, detectadas por SDS-PAGE, selecionadas com base na análise estatística dos resultados. Estão representados somente os percentuais de bandas que apresentaram diferença significativa entre os grupos (A) e entre os sexos (B).

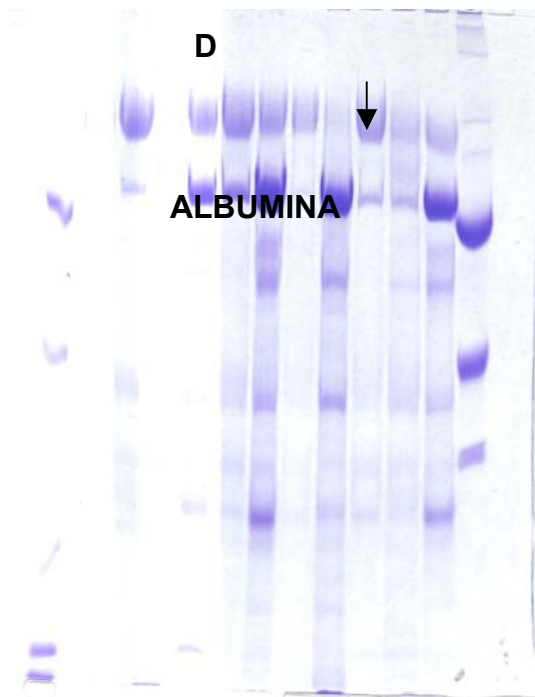


Figura 7 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de urina de cães normais.

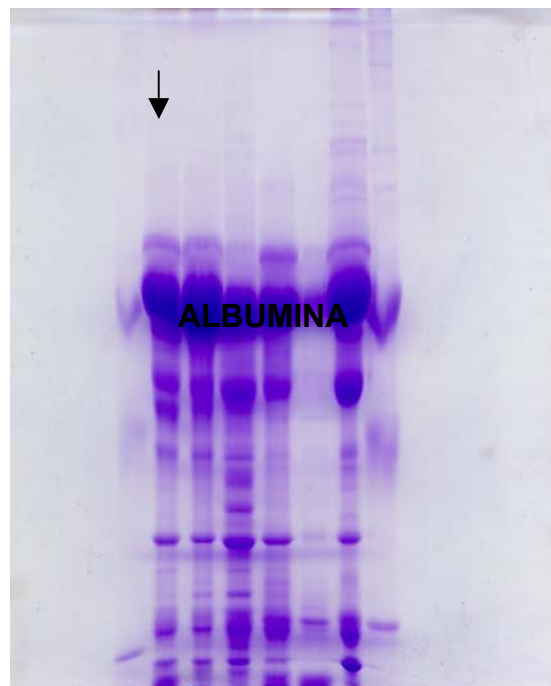


Figura 8 - Gel homogêneo de poliacrilamida a 10%, com dodecil sulfato de sódio, corado com azul brilhante de Coomassie, contendo amostras de urina de cães com IRC.

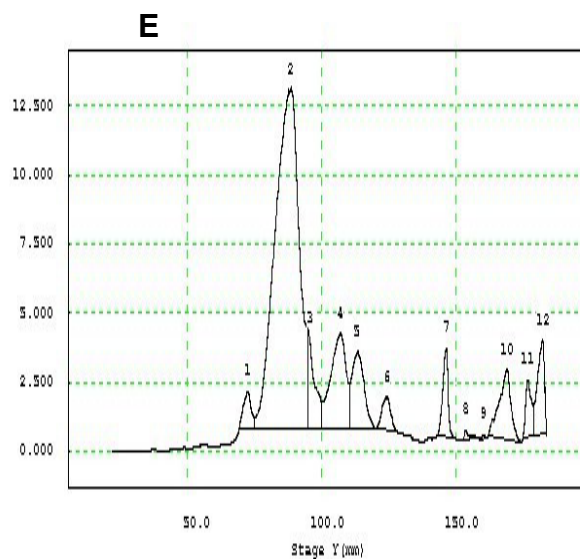
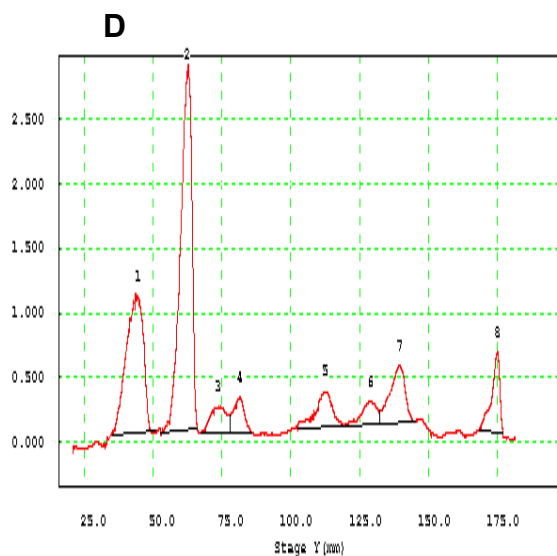


Figura 9 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de urina de cão normal (**D**) e de cão portador de insuficiência renal crônica (**E**), indicadas nas figuras 8a e 8b respectivamente.

Como pode ser verificado na Tabela 3, a análise de variância mostrou que quando foram detectadas diferenças significativas nos percentuais das bandas protéicas identificadas, testadas para fatores grupo e sexo, também houve interação significativa entre os fatores testados. Utilizando análise não paramétrica, foi empregado o teste de Wilcoxon considerando separadamente os sexos. Os machos com IRC, em relação aos machos normais, tiveram aumento ($p < 0,01$) de percentual da albumina (N – 19%, IRC – 47%), diminuição ($p < 0,01$) nas bandas com peso molecular aproximado de 36.000 (N – 23%, IRC – 5%) e de 23.000 (N – 17%, IRC – 3%). Ainda nos machos, embora não tenha havido diferença significativa, a banda protéica com peso molecular aproximado de 117.000 caiu de 7% para 0,4% (Tabela 4). A distribuição percentual das bandas protéicas das urinas das fêmeas com IRC, com relação às normais, foi diferente. A fração albumina não se alterou significativamente (N – 26%, IRC – 25%). A banda com peso molecular aproximado de 117.000 diminuiu ($p < 0,05$) nas fêmeas com IRC (N – 27%, IRC – 1%). Também houve diminuição significativa nos percentuais de distribuição das bandas com pesos moleculares de 36.000 (N – 14%, IRC – 3%) e de 23.000 (N – 7%, IRC – 2%). Ainda para fêmeas com IRC, houve aparecimento de oito bandas com pesos moleculares baixos (de 18.000 a 7.000), enquanto nos machos isso não foi significativo (Tabela 5).

Tabela 4 – Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de urina de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica e resultados do Teste de Wilcoxon.

Bandas Protéicas identificadas			Estatística
P.M.	Macho normal (n=10)	Macho com IRC (n=16)	Teste de Wilcoxon
153.000	Ausente	ausente	NS
146.000	Ausente	ausente	NS
135.000	Ausente	0,006 ± 0,03	NS
124.000	Ausente	0,003 ± 0,10	NS
117.000	7,05 ± 14,22	0,38 ± 0,68	NS
112.000	ausente	0,08 ± 0,22	NS
106.000	ausente	0,02 ± 0,05	NS
89.000	ausente	1,67 ± 1,81	**
ALBUMINA	19,18 ± 20,19	46,68 ± 14,18	**
72.000	ausente	ausente	NS
65.000	ausente	ausente	NS
63.000	0,05 ± 0,16	1,99 ± 1,98	**
61.000	13,29 ± 11,00	11,51 ± 6,40	NS
55.000	ausente	ausente	NS
52.000	ausente	1,79 ± 2,64	**
44.000	ausente	1,03 ± 1,00	**
36.000	23,14 ± 16,16	5,03 ± 3,73	**
30.000	ausente	0,34 ± 0,49	**
27.000	4,48 ± 5,12	4,85 ± 5,84	NS
25.000	ausente	3,30 ± 4,90	*
23.000	17,44 ± 12,12	2,59 ± 4,26	**
21.000	ausente	3,63 ± 7,08	*
18.000	ausente	3,03 ± 6,99	NS
15.000	4,50 ± 6,11	1,42 ± 3,07	NS
12.000	ausente	ausente	NS
11.000	ausente	ausente	NS
10.000	ausente	2,04 ± 4,78	NS
9.000	ausente	ausente	NS
8.000	ausente	ausente	NS
7.000	ausente	0,52 ± 1,32	NS

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – Insuficiência Renal Crônica

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS – não significativo

Tabela 5 – Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de urina de cadelas normais e portadoras de insuficiência renal crônica e resultados do Teste de Wilcoxon.

Bandas Protéicas identificadas			Estatística
P.M.	Fêmea normal (n=10)	Fêmea com IRC (n=8)	Teste de Wilcoxon
153.000	ausente	0,01 ± 0,04	NS
146.000	ausente	0,03 ± 0,07	NS
135.000	ausente	ausente	NS
124.000	ausente	ausente	NS
117.000	26,71 ± 25,60	1,03 ± 1,34	*
112.000	ausente	ausente	NS
106.000	ausente	ausente	NS
89.000	ausente	ausente	NS
ALBUMINA	26,82 ± 20,06	25,80 ± 16,88	NS
72.000	2,68 ± 4,34	0,60 ± 1,70	NS
65.000	1,03 ± 3,26	0,75 ± 1,39	NS
63.000	ausente	ausente	NS
61.000	6,13 ± 6,65	9,55 ± 12,66	NS
55.000	ausente	3,26 ± 8,71	*
52.000	ausente	ausente	NS
44.000	ausente	1,64 ± 2,75	*
36.000	13,76 ± 8,81	2,88 ± 4,19	**
30.000	ausente	1,04 ± 1,79	*
27.000	4,50 ± 2,26	4,24 ± 5,88	NS
25.000	ausente	0,93 ± 1,34	*
23.000	6,91 ± 5,82	2,38 ± 2,38	*
21.000	ausente	ausente	NS
18.000	ausente	9,54 ± 13,68	*
15.000	0,66 ± 1,17	6,04 ± 6,10	*
12.000	ausente	2,20 ± 3,79	*
11.000	ausente	8,16 ± 10,07	**
10.000	ausente	12,99 ± 12,48	**
9.000	ausente	3,39 ± 3,13	**
8.000	ausente	1,76 ± 2,23	**
7.000	ausente	2,85 ± 3,74	*

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – Insuficiência Renal Crônica

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS – não significativo

As distribuições percentuais das bandas protéicas nos géis de SDS-PAGE dos soros também foram avaliadas pelo Teste de Wilcoxon (Tabela 6), separadamente, para machos e para fêmeas. Em ambos os casos houve diferença significativa na distribuição das bandas entre os animais normais e os com IRC. Observou-se, também, diferença nos perfis eletroforéticos entre os sexos.

Com base em achados clínico-laboratoriais, o grupo de insuficientes renais, foi subdividido em indivíduos apresentando predomínio de lesões glomerulares e em indivíduos com predomínio de lesões túbulo-intersticiais. No Quadro 1 estão representados, pelos percentuais de ocorrência das bandas protéicas, os perfis eletroforéticos das proteínas urinárias dos animais normais e dos portadores IRC com predomínio de lesões glomerulares (subgrupo G) ou com predomínio de lesões túbulo-intersticiais (subgrupo T-I). Considerando a presença ou ausência de certas bandas protéicas, é notável a diferença entre os sub grupos G e T-I. E, aqui, é importante salientar que o estudo eletroforético e as avaliações para classificação dos cães com IRC nos subgrupos, foram feitas de forma independente em avaliações cegas. Seguindo a mesma subdivisão do grupo de portadores de IRC, foram representados os perfis eletroforéticos das proteínas séricas, no Quadro 2.

Cada banda protéica foi analisada, considerando ocorrência (ausente=0) e intensidade (graus 1, 2 e 3), para comparação entre os animais normais e os portadores de IRC com predomínio de lesão túbulo-intersticial ou glomerular, por meio do Teste exato de Fisher. Os resultados referentes às amostras de urina estão apresentados na Tabela 7 e os referentes às amostras de soro na Tabela 8.

Tabela 6 – Distribuição percentual das bandas protéicas detectadas por SDS-PAGE, de soro de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica (IRC) e resultados do Teste de Wilcoxon.

Bandas Protéicas identificadas		Estatística
P.M.	MACHOS	Teste de Wilcoxon
	Macho normal (10) Macho com IRC (16)	
123.000	0,82 ± 0,20 0,98 ± 0,67	NS
114.000	0,81 ± 0,30 0,71 ± 0,44	NS
108.000	0,36 ± 0,08 0,41 ± 0,76	*
ALBUMINA	51,91 ± 7,08 33,66 ± 14,46	**
66.000	1,49 ± 0,88 0,82 ± 1,33	*
55.000	21,19 ± 6,32 28,98 ± 15,85	NS
51.000	1,28 ± 0,93 ausente	**
39.000	0,23 ± 0,18 0,49 ± 0,89	NS
35.000	1,34 ± 1,11 4,33 ± 2,53	**
22.000	6,23 ± 1,12 8,26 ± 4,75	NS
17.000	10,58 ± 2,77 0,78 ± 2,14	**
12.000	0,64 ± 0,21 ausente	**
9.000	0,55 ± 0,69 ausente	**

Bandas Protéicas identificadas		Estatística
P.M.	FÊMEAS	Teste de Wilcoxon
	Fêmeas normal (n=10) Fêmea com IRC (n=8)	
123.000	0,34 ± 0,14 1,16 ± 0,43	**
114.000	0,37 ± 0,12 0,53 ± 0,37	NS
108.000	0,29 ± 0,14 0,23 ± 0,15	NS
ALBUMINA	59,66 ± 10,52 27,90 ± 13,72	**
66.000	1,39 ± 0,69 1,65 ± 1,85	NS
55.000	20,28 ± 8,10 33,48 ± 15,31	*
51.000	1,03 ± 0,80 ausente	**
39.000	0,45 ± 0,15 0,64 ± 0,89	NS
35.000	0,70 ± 0,59 2,71 ± 3,44	NS
22.000	10,88 ± 4,39 8,24 ± 5,12	NS
17.000	4,99 ± 3,30 1,36 ± 2,53	**
12.000	0,21 ± 0,21 0,10 ± 0,28	NS
9.000	0,05 ± 0,16 ausente	NS

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – Insuficiência Renal Crônica

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS – não significativo

Quadro 1 – Média aritmética com desvios padrão dos valores percentuais (%) das principais bandas protéicas encontradas na urina de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica, por meio de SDS-PAGE.

P.M.	MACHOS			FÊMEAS		
	N (10)	IRC		N (10)	IRC	
		G (11)	T-I (5)		G (4)	T-I (4)
153.000	-	-	-	-	0,03 ± 0,05	-
146.000	-	-	-	-	0,05 ± 0,1	-
135.000	-	0,01 ± 0,03	-	-	-	-
124.000	-	0,02 ± 0,1	-	-	-	-
117.000	7,05 ± 14,2	0,5 ± 0,7	-	26,7 ± 25,6	0,8 ± 1,0	1,3 ± 1,7
112.000	-	0,1 ± 0,3	-	-	-	-
106.000	-	0,04 ± 0,1	-	-	-	-
89.000	-	1,2 ± 2,0	2,5 ± 0,9	-	-	-
ALBUMINA	19,2 ± 20,2	43,5 ± 14,1	53,7 ± 12,9	26,8 ± 20,1	20,8 ± 13,1	30,8 ± 20,6
72.000	-	-	-	2,7 ± 4,3	-	1,2 ± 2,4
65.000	-	-	-	1,0 ± 3,2	1,4 ± 1,8	0,1 ± 0,3
63.000	0,05 ± 0,1	1,5 ± 1,6	3,0 ± 2,5	-	-	-
61.000	13,3 ± 11,0	12,7 ± 7,1	8,9 ± 3,7	6,1 ± 6,7	15,3 ± 15,6	3,8 ± 6,6
55.000	-	-	-	-	0,3 ± 0,4	6,2 ± 12,4
52.000	-	0,8 ± 1,2	3,9 ± 3,8	-	-	-
44.000	-	1,2 ± 1,4	1,3 ± 0,5	-	1,4 ± 1,8	1,9 ± 3,8
36.000	23,1 ± 16,2	5,8 ± 4,3	3,4 ± 0,9	13,8 ± 8,8	4,8 ± 5,5	1,0 ± 1,1
30.000	-	0,2 ± 0,4	0,6 ± 0,6	-	1,4 ± 2,3	0,6 ± 1,3
27.000	4,5 ± 5,1	4,9 ± 6,4	5,1 ± 4,9	4,5 ± 2,3	4,2 ± 7,5	4,3 ± 5,0
25.000	-	2,5 ± 3,5	6,3 ± 7,8	-	0,7 ± 1,5	1,1 ± 1,4
23.000	17,4 ± 12,1	3,3 ± 5,0	1,1 ± 0,9	6,9 ± 5,8	2,4 ± 2,8	2,4 ± 2,3
21.000	-	1,9 ± 3,3	9,4 ± 12,4	-	-	-
18.000	-	11,2 ± 25,1	-	-	10,8 ± 12,7	8,3 ± 16,5
15.000	4,5 ± 6,1	2,1 ± 3,6	-	0,7 ± 1,2	5,6 ± 6,7	6,5 ± 6,4
12.000	-	-	-	-	1,2 ± 2,3	3,3 ± 5,0
11.000	-	-	-	-	19,1 ± 7,4	2,0 ± 2,4
10.000	-	3,0 ± 5,6	-	-	10,0 ± 11,5	16,0 ± 14,4
9.000	-	-	-	-	3,4 ± 4,2	3,4 ± 2,4
8.000	-	-	-	-	0,9 ± 1,2	8,5 ± 12,0
7.000	-	0,8 ± 1,6	-	-	2,4 ± 3,8	2,7 ± 4,0

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – Insuficiência Renal Crônica

G – predomínio de lesão glomerular

T-I – predomínio de lesão túbulo-intersticial

N – animais normais

() – número de animais

Quadro 2 – Média aritmética com desvios padrão dos valores percentuais (%) das principais bandas protéicas encontradas no soro de cães normais e portadores de insuficiência renal crônica, por meio de SDS-PAGE.

P.M.	MACHOS			FÊMEAS		
	N (10)	IRC		N (10)	IRC	
		G (11)	T-I (5)		G (4)	T-I (4)
123.000	0,5 ± 0,3	1,0 ± 0,7	1,0 ± 0,5	0,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,0 ± 0,5
114.000	0,6 ± 0,3	0,8 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,5
108.000	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,7 ± 1,3	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2
ALBUMINA	56,6 ± 8,8	29,3 ± 15,1	43,2 ± 7,0	57,0 ± 10,4	33,4 ± 16,6	22,3 ± 9,0
66.000	2,0 ± 1,1	1,0 ± 1,4	0,5 ± 1,1	1,5 ± 0,7	2,8 ± 1,8	0,5 ± 0,1
55.000	20,3 ± 8,6	34,2 ± 16,7	17,5 ± 2,2	22,4 ± 8,6	27,2 ± 8,9	39,7 ± 19,0
51.000	1,8 ± 0,8	-	-	1,5 ± 0,4	-	-
39.000	0,2 ± 0,1	0,6 ± 1,1	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,3	0,8 ± 1,3
35.000	0,9 ± 0,9	4,0 ± 2,8	5,1 ± 1,9	1,0 ± 0,8	1,9 ± 1,1	3,4 ± 4,9
22.000	8,0 ± 3,0	13,5 ± 21,7	10,64 ± 2,1	10,3 ± 4,2	11,4 ± 4,2	5,0 ± 4,0
17.000	10,6 ± 2,7	1,1 ± 2,5	-	6,5 ± 4,5	1,2 ± 2,5	1,5 ± 2,9
12.000	0,6 ± 0,2	-	-	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,4	-
9.000	1,1 ± 0,5	-	-	0,05 ± 0,14	-	-

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – insuficiência renal Crônica

G – predomínio de lesão glomerular

T-I – predomínio de lesão túbulo-intersticial

N – animais normais

() – número de animais

Tabela 7 – Resultados da análise estatística (Teste Exato de Fisher) para comparação dos percentuais de distribuição de bandas protéicas em SDS-PAGE, de urina de cães normais (N) e de portadores de insuficiência renal crônica com predomínio de lesões glomerulares (G) ou de lesões túbulo intersticiais (T-I).

P.M.	ESTATÍSTICA – TESTE EXATO DE FISHER		
	N x T-I	N x G	T-I x G
153.000	-	NS	NS
146.000	-	NS	NS
135.000	-	NS	NS
124.000	-	NS	NS
117.000	*	**	NS
112.000	-	NS	NS
106.000	-	NS	NS
89.000	**	**	NS
ALBUMINA	NS	NS	NS
72.000	NS	NS	NS
65.000	NS	NS	NS
63.000	**	**	NS
61.000	NS	NS	NS
55.000	NS	NS	NS
52.000	**	**	NS
44.000	**	**	NS
36.000	NS	*	NS
30.000	**	**	NS
27.000	NS	NS	NS
25.000	**	**	NS
23.000	NS	*	NS
21.000	**	**	NS
18.000	NS	**	NS
15.000	NS	NS	NS
12.000	*	NS	NS
11.000	NS	NS	NS
10.000	**	**	NS
9.000	*	NS	NS
8.000	*	NS	NS
7.000	NS	**	NS

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – insuficiência renal crônica

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS – não significativo

Tabela 8 – Resultados da análise estatística (Teste Exato de Fisher) para comparação dos percentuais de distribuição de bandas protéicas em SDS-PADE, de soro de cães normais (N) e de portadores de insuficiência renal crônica com predomínio de lesões glomerulares (G) ou de lesões túbulo-intersticiais (T-I).

ESTATÍSTICA – TESTE EXATO DE FISHER			
P.M.	N x T- I	N x G	T- I x G
123.000	*	**	NS
114.000	NS	NS	NS
108.000	NS	NS	NS
ALBUMINA	**	**	NS
66.000	**	NS	NS
55.000	NS	NS	NS
51.000	**	**	-
39.000	NS	NS	NS
35.000	**	NS	NS
22.000	NS	NS	NS
17.000	**	**	NS
12.000	**	**	NS
9.000	NS	NS	-

P.M. – peso molecular aproximado

IRC – insuficiência renal crônica

** - significativo ao nível de 1% de probabilidade

* - significativo ao nível de 5% de probabilidade

NS – não significativo

5. DISCUSSÃO

Os animais portadores de IRC avaliados neste estudo além de apresentarem manifestações clínicas e laboratoriais de rotina, compatíveis com o quadro, passaram por testes específicos para a função renal. Todos apresentaram redução na TFG que foi estimada por meio de clearance de creatinina (CCr). A redução observada em relação aos valores de CCr do grupo de animais normais foi cerca de 75%, comprovando a queda na função glomerular, como descrito na literatura (FINCO, 1995). A função tubular, que depende da integridade anatômica e funcional do epitélio tubular e também do interstício foi avaliada por meio da excreção fracionada de sódio (EFNa). Os valores obtidos para os animais normais foram menores que 1,0 enquanto que os portadores de IRC tiveram valores ao redor de 7,0. A EFNa alta refletiu a diminuição da capacidade de conservação da água e de sódio, que se manifesta clinicamente pela poliúria (POLZIN & OSBORNE, 1995).

Na avaliação quantitativa das proteínas da urina, foi verificado que a perda protéica foi muito maior nos portadores de IRC, independentemente do tipo de lesão renal presente. A UP:C foi menor que 0,5 nos animais normais e variou, na média entre 5 e 6 nos portadores de IRC, indicando proteinúria patológica nestes últimos (McCAW et al., 1989).

A avaliação qualitativa da proteinúria por meio de eletroforese em SDS-PAGE, que foi o objetivo central deste estudo, trouxe resultados muito interessantes, assim como ocorreu com os resultados dos perfis eletroforético das proteínas séricas.

Na IRC ocorreu alteração do perfil eletroforético sérico tanto em machos quanto em fêmeas. A albumina é perdida na urina em quantidade substancial quando existe lesão renal e a perda contínua resulta em diminuição da concentração sérica (PESCE, 1974; LULICH & OSBORNE, 1990; SQUIRES, 1994). Nos animais deste estudo foi detectada redução, que chegou a ultrapassar 60%, na albumina sérica dos cães com IRC, como observado nos eletroforetogramas. A redução na fração albumina, na verdade, pode ser

facilmente verificada por meio de testes colorimétricos dispensando a eletroforese. Entretanto, os resultados deste estudo revelaram também que na IRC, além da alteração da albumina, algumas bandas de peso molecular baixo e muito baixo, deixam de existir no eletroforetograma. A caracterização das proteínas destas bandas fica indicada. Este conhecimento pode ser útil para ampliar o que se sabe sobre a fisiologia das doenças renais e da insuficiência renal.

No estudo das proteínas presentes na urina de cães normais foram constatadas diferenças entre machos e fêmeas, como já descrito para humanos (KAWAKAMI & KAJII, 1990). As diferenças observadas incluem tanto a quantidade relativa de determinadas bandas protéicas como a presença/ausência de outras. Assim, parece apropriado recomendar que para determinação de padrões normais para perfil eletroforético de proteínas da urina deva ser considerado cada sexo em separado.

Na IRC, como constatado na avaliação quantitativa, aumenta muito a perda de proteínas na urina. A fração albumina é sempre mencionada em destaque (HARVEY & HOE, 1966; PETERSON et al., 1969; PESCE et al., 1972; HARDWICKE, 1975; LULICH & OSBORNE, 1990). Contudo, no estudo aqui relatado o destaque para perda de albumina pode ser observado nos machos mas não nas fêmeas. Neste caso, deve ser considerada a possibilidade de que, em função de características químicas da urina das fêmeas, possa ter havido partição da albumina resultando na presença de sub-frações detectáveis em outras bandas do perfil eletroforético. Como também ocorreu nos animais normais, os perfis eletroforéticos das proteínas urinárias na IRC diferem para machos e fêmeas.

Os animais com IRC estudados apresentaram comprometimento glomerular e túbulo-intersticial como comprovado pelos resultados de CCr e de EFNa. Apesar do comprometimento de todos os segmentos do nefron e do interstício na IRC (FINCO, 1989; GUIJARRO & KEANE, 1994; POLZIN et al., 1995; REMUZZI et al., 1997), pode ocorrer predomínio das lesões glomerulares sobre as túbulo-intersticiais ou o inverso, em função da doença renal primária e da evolução do processo. Comumente pacientes com perda importante de proteína na urina, com ou sem insuficiência renal, são portadores de glomerulopatias (VADEN, 1993). Os

animais insuficientes avaliados neste estudo, em sua maioria apresentaram predomínio de lesões glomerulares. As avaliações dos perfis eletroforéticos das proteínas urinárias destes animais, considerando o tipo de lesão predominante, revelaram não ter havido diferenças significativas entre os subgrupos glomerular (G) e túbulo-intersticial (T-I). Contudo, vistos os perfis em separado para cada sexo existem diferenças importantes em função do tipo de lesão predominante, como apontado por RABIN et al., (1973); GÖRG et al., (1985); WEBER (1988); LAPIN et al., (1989); SCHULTZE & JENSEN (1989).

Considerando o fator presença/ausência de bandas protéicas na eletroforese em SDS-PAGE, as fêmeas G apresentaram duas bandas com peso molecular alto, não observadas nas fêmeas T-I. Mas quanto às bandas com pesos moleculares baixos ou muito baixos não houve diferença entre os dois subgrupos de fêmeas. Para os machos, entretanto, as diferenças entre os subgrupos foram muito marcadas. Os machos T-I apresentaram, além da albumina, dez bandas com peso molecular baixo, também encontradas nos machos G, não tendo sido detectadas bandas com pesos moleculares altos. No subgrupo de machos G foram detectadas todas as bandas encontradas nos machos T-I e mais quatro bandas com peso molecular muito baixo e cinco bandas com peso molecular alto. Como já verificado por diversos estudos (PETERSON et al., 1969; PESCE et al., 1972; HARDWICKE, 1975; LULICH & OSBORNE, 1990), a ocorrência de bandas de pesos moleculares altos seria observada nos casos de doenças glomerulares e a ocorrência de bandas com pesos moleculares baixos caracterizariam as lesões tubulares. Os resultados obtidos neste estudo, que diferem do que já foi descrito, provavelmente decorrem do fato de que os animais possuíam doenças renais de longa duração, com comprometimento de todo o parênquima renal em grau suficiente para causar insuficiência renal (FINCO, 1989; POLZIN et al., 1995). A ocorrência de bandas de proteínas com pesos moleculares muito baixos nos subgrupos com predomínio de lesões glomerulares (machos e fêmeas), podem indicar que estes animais estavam passando por um importante comprometimento funcional túbulo-intersticial. Este comprometimento pode ter sua gênese no

excesso de proteína do filtrado glomerular como indicado por NEWMAN et al., (2000), se traduzindo por fibrose intersticial e insuficiência renal (OTS et al., 2000).

Outro achado interessante deste estudo foi relacionado à ocorrência de uma banda protéica com peso molecular de aproximadamente 117.000. Esta banda se apresentou com percentual alto nos machos e nas fêmeas normais, tendo desaparecido no subgrupo de machos com predomínio de lesões túbulo-intersticiais e aparecido como resquícios nos demais subgrupos de animais com IRC. Não há referências sobre essa banda protéica na literatura citada. Este achado pode ser muito relevante para estudos relacionados à fisiopatologia da insuficiência renal. O desaparecimento desta banda protéica nos portadores de IRC, é sugestivo de que se trate de proteína produzida nos túbulos renais quando estes estão normais. Esta proteína pode ser a de Tamm-Horsfall. YING & SANDERS (1998) verificaram que o sal da dieta tem papel na regulação da expressão da glicoproteína de Tamm-Horsfall em ratos. Em patologias nas quais esta glicoproteína tem papel patogênico importante, a restrição de sal na dieta poderia ser importante. Seguindo um caminho paralelo ao traçado pelos estudos de YING & SANDERS (1998), os achados deste estudo indicam que deve ser feita a caracterização da proteína contida na banda com peso molecular de aproximadamente 117.000. Se ficar confirmada que se trata da glicoproteína de Tamm-Horsfall, deve ser investigada a importância da ausência desta proteína no desenvolvimento da poliúria característica dos estados de insuficiência renal crônica.

6. CONCLUSÕES

1. Quanto à técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio para avaliação qualitativa de proteína sérica e urinárias de cães, conclui-se que trata-se de técnica exeqüível, mas bastante trabalhosa, adequada tanto para amostras de soro quanto para amostras de urina;

2. Quanto à excreção urinária de proteínas em cães, avaliadas por eletroforese em SDS-PAGE, conclui-se que existem diferenças importantes entre machos e fêmeas, tanto na saúde quanto na insuficiência renal.

3. A insuficiência renal crônica cursa com alteração do padrão de excreção urinária de proteína, independentemente do tipo de lesão renal causadora do problema;

4. Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a necessidade do emprego de técnicas para caracterização de proteínas presentes na urina de cães normais e de cães com IRC. Estudos futuros de tais proteínas poderão trazer contribuições importantes para a fisiopatologia da IRC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARSANTI, J.A.; FINCO, D.R. Protein concentration in urine of normal dogs. **Am. J. Res.**, v.40, n.1, p.1583-8, 1979.

BRENNER, B.M. et al. Molecular basis of proteinuria of glomerular origem. **N. Engl. J. Med.**, n.298, p.826, 1978.

CESATI, R.; DOLCI, A. Simple gold overstaining enhances sensitivity of automated electrophoresis of unconcentrated urine. **Clin. Chem.**, v.42, n.8, p.1293-4, 1996.

CHEW, D.J. Urinalysis. In: BOVÉE, K.C, (Ed). **Canine nephrology**. Media, PA: Harwal Puplishing , 1984. p.235.

CHEW, D.J.; DI BARTOLA, S.P. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1992. v.4, cap.107, p.1976-2045.

DI BARTOLA, S.P. et al. Urinary protein excretion and immunopathologic findings in dogs with glomerular disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.15, n.1, p.73-7, 1980.

FINCO, D.R. Kidney function. In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestics animals**. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1989. cap.18, p.497-537.

FINCO, D.R. Evaluation od Renal Functions. In: OSBORNE, C. A., FINCO D. R. (Ed). **Canine And Feline Nephrology And Urology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. cap 10, p.216-29.

GUIJARO, C.; KEANE, W.F. Lipid-induced glomerular injury. **Nephron**, v.67, p.1-6, 1994.

GÖRG, A. et al. Horizontal SDS eletrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. **Sci. Tools**, v.32, n.1, p.5-9, 1985.

GRAUER, G.F.; THOMAS; C.B.; EICKER, S.W. Estimation of quantitative proteinuria in the dog, using the urine protein-to-creatinine ratio from a random, voided sample. **Am. J. Vet. Res.** v.46, n.10, p.2116-9, 1985.

HARDWICHE, J. Laboratory aspects of proteinuria in human disease. **Clin. Nephrol.**, v.3, p.37-41, 1975.

HARVEY, D.G.; HOE, C.M. The use of paper eletrophoresis for the routine identification of urinary proteins in the dog. **Journal of Small Animal Praticce**, v.32, p.521-4, 1966.

KAWAKAMI, H.; MURAKAMI, T.; KAJII, T. Normal values for 24-h urinary protein excretion: total and low molecular weight proteins with a sex-related difference. **Clinical Nephrology**, v.33, n.5, p.232-6, 1990.

KOEMAN, J.P. Proteinuria in the dog: a pathomorphological study of 51 proteinuric dogs. **Research in Veterinary Science**, n.43, p.367-78, 1987.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature, London**, n.227, p.680-5, 1970.

LAPIN, A.; GABL, F.; KOPSA, H. Diagnostic use of an analysis of urinary proteins by practicable sodium dodecyl sulfate eletrophoresis method and rapid two-dimensional eletrophoresis. **Electrophoresis**, v.10, p.589-95, 1989.

LULICH, J.P.; OSBORNE, C.A. Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular an nonglomerular disorders. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.12, p.59-72, 1990.

MacCAW, D.L. How long before renal damage becomes irreversible (I) Selecting the right diagnostic tests for renal disease (II) Interpreting the results of urinalysis: a key to diagnosing renal disorders (III) Reversing acute renal failure in dogs. **Vet. Med.**, v.84, n.3, p.265-306, 1989.

MacDOUGALL, D.F. et al. Canine chronic renal disease: Prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. **Kidney International**, n.29, p.1144-51, 1986.

MARSHALL, T.; WILLIAMS, K.M. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. **Electrophoresis**, n.20, p.1307-24, 1999.

MINKUS, G. et al. Evaluation of renal biopsies in cats and dogs – histopathology in comparison with clinical data. **Journal of Small animal Practice**, n.35, p. 465-72, 1994.

NEWMAN, D.J.; THAKKAR, H.; GALLAGHER, H. Progressive renal disease: does the quality of the proteinuria matter or only the quantity? **Clinica Chimica Acta**, v.297, p.43-54, 2000.

OTS, M.; PECHTER, Ü.; TAMM, A. Characteristics of progressive renal disease. **Clinica Chimica Acta**, v.297, p.29-41, 2000.

PESCE, A.J. Methods used for analysis of proteins in the urine. **Nephron.**, v.13, p.93-104, 1974.

PESCE, A.J.; BOREISHA, I.; POLLAK, V.E. Rapid differentiation of glomerular and tubular proteinuria by sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis. **Clinica Chimica Acta**, v.40, p.27-34, 1972.

PETERSON, A.; EVRIN, E.; BERGGARD, I. Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of β_2 -microglobulin, albumin and total protein. **The Journal of Clinical Investigation**, v.48, p.1189-98, 1969.

POLZIN, D.J. et al. Chronic renal failure In: ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 4.ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p.1734-60.

POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: OSBORNE, C.A., FINCO D.R. (Ed). **Canine And Feline Nephrology And Urology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. cap.16, p.335-67.

RABIN, B.S.; PRAGAY, D.A.; TOPPIN, M. A rapid technique for the electrophoresis of unconcentrated urine. **Am. J. Pathol.**, v.60, p.359-63, 1973.

REMUZZI, G.; RUGGENENTI, P.; BENIGNI, A. Understanding the nature of renal disease progression. **Kidney International**, n.15, p.2-15, 1997.

SCHULTZE, A.E.; JENSEN, R.K. Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v.18, p.93-7, 1989.

SQUIRES, R. Tackling the problem of proteinuria. **In Pract.**, v.16, n.1, p.30-6, 1994.

STELL, R.G.D.; TONIE, J.H. **Principle and Procedures of Statistics with Special Reference to the Biological Sciences**. 1^a ed, New York: McGraw-Hill Book Company, 1960. 481p.

UMBREIT, A.; WIEDEMANN, G. Determination of protein fractions. A comparison with different electrophoretic methods and quantitatively determined protein concentrations. **Clinica Chimica Acta** , v.297, p. 163-72, 2000.

VADEN, S.L. An approach to proteinuria in the dog. In: ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM 11, 1993, Washington. **Proceedings...** p.245-8.

WALLER, K.V.; WARD, K.M.; MAHAN, J.D.; WISMATT, D.K. Currents concepts in proteinuria. **Clinical Chemistry**, v.35, n.5, p.755-65, 1989.

WEBER, M.H. Urinary protein analysis. **J. Chromatogr.**, v.429, p.315-44, 1988.

WHITE, J.V. et al. Use of protein-to-creatinine ratio in a single urine specimen for quantitative estimation of canine proteinuria. **J. Am. Vet. Assoc.**, v.185, n.8, p.882-5, 1984.

YING, W-Z ; SANDERS, P.W. Dietary salt regulates expression of Tamm-Horsfall glycoprotein in rats. **Kidney International**, v.54, p,1150-6, 1998.

8. APÊNDICE

A - RECEITAS DE SOLUÇÕES EMPREGADAS PARA SDS PAGE

Soluções estoque para SDS PAGE (LAEMMLI, U. K., 1970).

Acrilamida/Bis (30%T, 2,67%C)

Acrilamida	146,0 g
N' N' Metholene – bis Acrilamida	4,0 g

Água destilada para 500 ml. Filtrar e estocar a 4°C em recipiente escuro.
Máximo 30 dias.

1,5M Tris – HCl, PH 8,8

Trizima Base	54,45 g
Água destilada	150,0 ml

Ajustar o pH para 8,8 com HCl. Completar com água destilada para 300 ml.
Estocar a 4°C.

0,5M Tris – HCl, pH 6,8

Trizima Base	6,0 g
Água destilada	60,0 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl. Completar com água destilada para 100 ml.
Estocar a 4°C.

10% (w/v) SDS

Dissolver 10g de SDS em 60 ml de água destilada, mexendo cuidadosamente.
Completar para 100ml de água destilada.

10% (w/v) Persulfato de Amônio

Dissolver 100mg de persulfato de amônio em 1,0ml de água destilada. Usar a solução fresca.

Tampão da Amostra (SDS reducing buffer: 62,5mM Tris – HCl pH 6,8, 20% Glicerol, 2% SDS, 5% β Mercaptoetanol).

Água destilada	3,0 ml
0,5 M tris – HCl pH 6,8	1,0 ml
Glicerol	1,6 ml
10% SDS	1,6 ml
β Mercaptoetanol	0,4 ml
0,5% (w/v) Bromofenol Blue em água	0,4 ml

5X Tampão do Eletrodo (Tampão de corrida)

(1X = 25mM Tris – HCl, 192mM Glicina, 0,1%SDS, pH 8,3)

Trizima Base	45,0 g
Glicina	216 g
SDS	15,0 g

Completar com 3L de água destilada. NÃO ajustar o pH com ácido ou base. Estocar a 4°C. Aquecer a 37°C antes do uso. Diluir 300ml da solução estoque 5X com 1,2 L de água destilada para uma corrida de eletroforese.

A.2 - SDS GEL 10% (Separating Gel) Placa 20,0 cm X 1,0 mm

Acrilamida/Bis (30% T, 2,67% C)	11,67 mL
Água destilada	14,07 mL
1,5M Tris-HCl pH 8,8	8,75 mL
10% SDS	0,35 mL (350 μ L)
10 % Persulfato de Amoneo	0,18 mL (180 μ L)
TEMED	0,02 mL (20 μ L)
TOTAL	35,0 mL

A.3 - STACKING GEL 4% 0,125M TRIS-HCl Ph 6,8) Placa 20,0 cm x 1,0 mm

Acrilamida/Bis (30% T, 2,67% C)	1,3 ml
Água destilada	6,1 ml
0,5M Tris-HCl pH 6,8	2,5 ml
10% SDS	100 μ l
10 % Persulfato de Amoneo	50 μ l
TEMED	10 μ l
TOTAL	10,0 ml

B - COLORAÇÃO COM COOMASIE BRILHANT BLUE R-250**Solução Corante Estoque**

Coomasie Brillant Blue R-250	2,5 g
Dd H ₂ O	Qs to 250,0 ml

Homogenizar com um homogeinizador magnético e filtrar.

Solução corante

Coomasie Stock Solution	125,0 ml
Metanol	500,0 ml
Ácido acético	100,0 ml
Dd H ₂ O	1000,0 ml

Homogenizar magnéticamente

Solução descorante

Metanol	250,0 ml
Ácido acético	100,0 ml
Dd H ₂ O	1000,0 ml

Homogenizar magnéticamente

Solução fixadora

Metano 40%
Glicerol 3%

9. ABSTRACT

This trial was conducted in 20 adult health dogs (10 male and 10 female) and in 24 adult dogs (16 male and 8 female) in chronic renal failure (CRF), in order to study urinary protein loss. Determination of total urinary proteins and their separation with SDS-PAGE were employed. The results show that CRF dogs had higher proteinuria when compared to controls and the amount of detected protein had large difference among them. In the CRF there are different patterns of protein bands occurrence and distribution according to the patient sex and predominant renal lesion. The difference between protein bands occurrence of male and female already exists in normal dogs.

Keywords: dogs, chronic renal failure, proteinuria, sodium dodecylsulfate-polyacrylamida gel electrophoresis, urinary protein electrophoresis