

LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORNELAS

**SERUM AND URINARY PROTEINOGRAM IN HEALTHLY DOGS AND
WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

D713p
2019

Dornelas, Lorraine Rossi Signorelli Machado, 1987-
Serum and urinary proteinogram in healthy dogs and with
chronic kidney disease / Lorraine Rossi Signorelli Machado
Dornelas. – Viçosa, MG, 2019.
xiii, 63 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 50-59.

1. Cães - Doenças. 2. Eletroforese. 3. Biomarcadores.
4. Rins - Doenças. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7089661

LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORNELAS

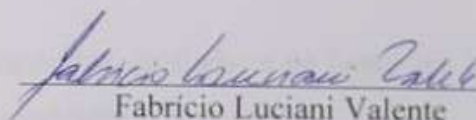
**SERUM AND URINARY PROTEINOGRAM IN HEALTHLY DOGS AND
WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

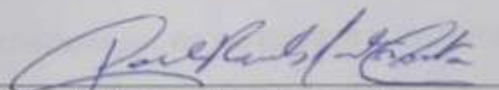
APROVADA: 29 de julho de 2019.



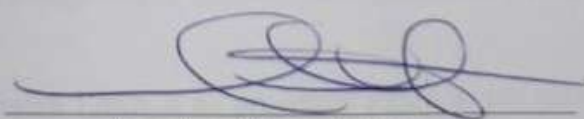
Emily Correna Carlo Reis



Fabricio Luciani Valente



Paulo Renato dos Santos Costa



Leandro Abreu da Fonseca
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

“Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com o seu poder que atua em nós”. Efésios 3:20

A Deus - que é o meu criador, o meu protetor, o meu sustentador, o meu consolador, a minha força, o meu amigo e o meu salvador - por ter me dado a oportunidade de ter vivenciado este sonho que, por um tempo permaneceu hibernado, mas que no tempo certo – porque tudo o que Deus faz é perfeito - acordou e se concretizou.

Aos meus pais por todo amor, esforço, apoio, amizade, exemplo, sustento e companheirismo. Agradeço pelas ligações e orações diárias que fazem toda a diferença no meu dia a dia.

Agradeço ao meu marido, por ter me apoiado, por ter aberto mão do nosso lar, do nosso laboratório, da nossa igreja, da proximidade dos nossos pais, irmãos e amigos, da nossa cidade e do nosso Estado (da nossa praia) para estar ao meu lado todos os dias, me amando, me ajudando e vivendo este sonho que também se tornou seu.

Agradeço aos meus irmãos, sogros, cunhados, cunhadas e tia Ivete, por todo amor, companheirismo, preocupação e cuidado.

Agradeço ao Marquinhos, Ana Cristina, Eunice e Zé, por terem estado ao nosso lado durante todo este tempo e terem cuidado tão bem de nós! Agradeço ao meu sobrinho Mateus por ter me ajudado a, muitas vezes, esquecer das minhas preocupações, tornando meus finais de semana muito mais divertidos e alegres!

Ao meu orientador, Leandro Abreu da Fonseca, por ter aceitado me orientar e por toda competência, ensinamento, paciência e confiança. Muito obrigada!

A professora Emily e ao professor Fabrício por terem me apoiado durante o desenvolvimento deste projeto e dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica, muito obrigada pela companhia, prestatividade e troca de conhecimentos.

Aos professores, funcionários, residentes e estagiários do Laboratório de Patologia Clínica, Hospital Veterinário, Departamento de Veterinária e Núcleo de Biomoléculas, meu agradecimento por todo apoio e auxílio.

A Rosi, por sempre ser tão atenciosa, prestativa, zelosa e carinhosa. Por muitas vezes fazer muito mais do que era de sua responsabilidade. Muito obrigada!

A nossa parceira, UFMG, nas pessoas do professor Paulo Ricardo e do residente Lucas Drumond, muito obrigada pela troca de conhecimento.

A banca, por ter aceito ao convite e por tanto ter agregado e contribuído com o trabalho.

A todos os animais que fizeram parte do projeto, bem como a todos os proprietários pela compreensão e por terem confiado a mim os seus amados mascotes.

A tão admirada e almejada Universidade Federal de Viçosa (UFV) pela disponibilização da sua estrutura física e técnica para o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da UFV pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	vi
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
ABSTRACT	x
RESUMO	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. FUNÇÃO RENAL	3
2.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA	5
2.3. INFLAMAÇÃO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA	7
2.4. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	10
2.5. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	11
2.5.1. Urinalise	11
2.5.2. Bioquímica urinária	13
2.5.2.1. Relação proteína:creatinina urinária	13
2.5.2.2. Microalbuminúria	13
2.5.2.3. Gama Glutamil Transferase (GGT) urinário	14
2.5.3. Bioquímica sérica	14
2.5.3.1. Ureia	15
2.5.3.2. Creatinina	16
2.5.3.3. Eletrólitos	16
2.5.4. Hemograma	18
2.5.5. Perspectivas futuras de novos biomarcadores	19
2.5.5.1. Marcadores endógenos da TFG	19
2.5.5.1.1. <i>Dimetilarginina simétrica (SDMA)</i>	19
2.5.5.2. Marcadores de metabolismo alterado	20
2.5.5.2.1. <i>Fator 23 de crescimento de fibroblastos (FGF-23)</i>	20
2.5.5.3. Biomarcadores urinários	21
2.5.5.3.1. <i>Marcadores de dano/disfunção glomerular</i>	21
2.5.5.3.1.1. Imunoglobulinas	21
2.5.5.3.1.2. Proteína C reativa (PCR)	21

2.5.5.3.2.	<i>Marcadores de dano/disfunção tubular</i>	22
2.5.5.3.2.1.	N acetil β D glicosaminidase (NAG) urinária	22
2.5.5.3.2.2.	Proteína de ligação ao retinol (RBP)	22
2.5.5.3.2.3.	Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)	22
2.5.5.3.2.4.	Proteína de Tamm-Horsfall	23
2.5.5.3.2.5.	Cistatina C	23
2.5.5.3.2.6.	Eletroforese de proteínas urinárias	24
3.	OBJETIVOS	25
3.1.	OBJETIVO GERAL	25
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1.	COMISSÃO DE ÉTICA	26
4.2.	OS ANIMAIS	26
4.3.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	26
4.4.	ANÁLISES LABORATORIAIS	27
4.4.1.	Hemograma	27
4.4.2.	Análises bioquímicas	28
4.4.3.	Urinálise	28
4.4.4.	Obtenção das proteínas séricas totais	28
4.4.5.	Eletroforese de proteínas séricas	29
4.4.6.	Espectrometria de massas	30
4.4.6.1.	Digestão enzimática das bandas no gel e preparo da amostra para análise por espectrometria de massas	30
4.4.6.2.	Aquisição de espectros de massas de MS e MS/MS por MALDI TOF/TOF	31
4.4.6.3.	Identificação das proteínas	31
4.4.7.	Eletroforese do sobrenadante urinário	32
4.4.7.1.	Classificação	33
4.5.	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.	CONCLUSÃO	49
7.	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	60

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
ACTH	hormônio adenocorticotrófico
AMP	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
Da	dalton
dL	decilitro
DRC	doença renal crônica
DVT	departamento de veterinária
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	ensaio de imunoabsorção enzimática
EPO	eritropoetina
FGF-23	fator 23 de crescimento de fibroblastos
G1	grupo 1
G2	grupo 2
G3	grupo 3
GGT	gama glutamil transferase
HDL	lipoproteína de alta densidade
IgA	imunoglobulina A
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL-1	interleucina 1
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-8	interleucina 8
IRIS	Sociedade Internacional de Interesse Renal
kDa	kilodalton
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of Flight</i>
MCP-1	proteína quimiotática para monócitos tipo 1
mg	miligrama
mgf	<i>mascot generic format</i>

mL	mililitro
mmol	milimolar
MS	espectrometria de massa
NAG	N acetil β D glicosaminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ng	nanograma
NGAL	lipocalina associada à gelatinase neutrofílica
NuBioMol	Núcleo de Biomoléculas
PBS	tampão-fosfato
PCR	proteína C reativa
PFA	proteína de fase aguda
RBP	proteína de ligação ao retinol
R.P.M.	rotações por minuto
SDMA	dimetilarginina simétrica
SDS-PAGE	gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sódio
TFG	taxa de filtração glomerular
TNF- α	fator de necrose tumoral
TPCK	tripsina de pâncreas suíno
TGF- β	fator de transformação de crescimento tipo β
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFV	Universidade Federal de Viçosa
V	volt
VG	volume globular
VLDL	lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do néfron	3
Figura 2 – Sistema vertical de eletroforese (soro)	30
Figura 3 – A-B, Sistema vertical de eletroforese (urina). A, Depósito das amostras nas cavidades do gel. B, Conjunto da cuba submetido à corrente elétrica de 80 V	33
Figura 4 – Eletroforese das proteínas séricas	37
Figura 5 – Eletroforese das proteínas séricas. Bandas das proteínas que diferenciaram-se e seus respectivos picos, encontradas na eletroforese, identificadas nominalmente. 1 – complemento C3; 2 – transferrina; 3 – albumina; 4 – apolipoproteína A4	39
Figura 6 – Eletroforese das proteínas urinárias. Lane 1 – Marcador de peso molecular. Lane 2 – Amostra com sedimento urinário ativo (cistite). Lane 3 – Escore de lesão glomerular 1 e tubular 4. Lane 4 – Escore de lesão glomerular 1 e tubular 0. Lane 5 - Escore de lesão glomerular 1 e tubular 0. Lane 6 - Escore de lesão glomerular 3 e tubular 4. Lane 7 - Escore de lesão glomerular 2 e tubular 3	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estágios da DRC em relação à concentração de creatinina sérica de acordo com a IRIS (2017)	10
Tabela 2 – Sistema de subclassificação da DRC pela proteinúria de acordo com a IRIS	11
Tabela 3 – Sistema de subclassificação da DRC pela hipertensão de acordo com a IRIS	11
Tabela 4 – Resumo dos novos biomarcadores, material utilizado para análise e informação fornecida.....	19
Tabela 5 – Algoritmo de escore de lesão glomerular	34
Tabela 6 – Algoritmo de escore de lesão tubular	34
Tabela 7 – Concentração das proteínas séricas em caninos saudáveis e com doença renal crônica (G1, G2 e G3)	37
Tabela 8 – Parâmetros urinários em caninos (G1, G2 e G3)	45
Tabela 9 – Padrão de lesão renal em caninos (G1, G2 e G3)	47
Tabela 10 – Pontuação (grau) de lesão glomerular e tubular em caninos (G1, G2 e G3)	48

ABSTRACT

DORNELAS, Lorraine Rossi Signorelli Machado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2019. **Serum and urinary proteinogram in healthy dogs and with chronic kidney disease.** Advisor: Leandro Abreu da Fonseca.

Chronic kidney disease (CKD) is a common disease in dogs and arises when the kidneys have their structure and function affected, presenting irreversible lesions in the nephrons, occurring accumulation of several toxic substances, resulting in marked pathophysiological, biochemical and urinary changes. The accomplishment of studies in the search for early markers and indicators of the degree and site of renal inflammation in order to assist in the diagnosis and prognosis is extremely relevant. The aim of this study was to evaluate the serum and urinary proteinogram by means of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in healthy dogs with different CKD stages, searching for early markers that have diagnostic and prognostic value for patients with CKD. To this end, 24 blood and urine samples from dogs with random breed, age and sex, health and with CKD seen at the Veterinary Hospitals of the Universidade Federal de Viçosa and the Universidade Federal de Minas Gerais were evaluated by serum biochemistry, gel electrophoresis polyacrylamide (SDS-PAGE) and urinalysis. The animals were divided into three experimental groups: group 1 (G1) composed of healthy animals (serum creatinine < 1.5 mg / dL and protein: urinary creatinine ratio < 1.0); group 2 (G2) composed of animals with serum creatinine levels ≥ 1.5 mg / dL and protein: urinary creatinine ratio > 1.0 and < 2.0 ; and group 3 (G3), composed of animals with serum creatinine levels ≥ 1.5 mg / dL and protein: urinary creatinine ratio ≥ 2.0 . Of the 24 patients, 7 presented serum creatinine levels within the reference parameters for the species (G1) and 17 were azotemic, five of them of G2 and 12 of G3. The creatinine test showed a difference of G3 in relation to G1 and G2. The globular volume (GV) of the patients showed a difference between G1 and G3. Regarding serum electrophoresis, there was a difference between groups related to complement C3, transferrin, albumin and apolipoprotein A4. The evaluation of urine through urinalysis allowed the selection of urine based on the absence of active urinary sediment and evaluated the urinary density, showing a difference of G1 in relation to G2 and G3. In urinary biochemistry, the creatinine and protein: urinary creatinine values differed between G1 and G3. Urinary electrophoresis showed a important difference in the evaluation of the renal lesion pattern and in the glomerular and tubular

lesion score. Based on the results found, it is possible to confirm that the largest casuistry of the routine is of animals with greater renal impairment. Serum proteinogram demonstrated a possibility of apolipoprotein A4 being a marker of CKD. Urinary electrophoresis has been shown to be a good diagnostic and prognostic tool for CKD, demonstrating a more sensitive and effective result than the protein: urinary creatinine ratio.

RESUMO

DORNELAS, Lorraine Rossi Signorelli Machado, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2019. **Proteinograma sérico e urinário de cães saudáveis e com doença renal crônica**. Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

A doença renal crônica (DRC) é uma doença comum em cães e surge quando os rins têm sua estrutura e função afetadas, apresentando lesões irreversíveis em néfrons, ocorrendo o acúmulo sistêmico de substâncias tóxicas, o que resulta em alterações fisiopatológicas, bioquímicas e urinárias marcantes. A realização de estudos na busca por marcadores precoces e indicadores de grau e local de inflamação renal a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico é de extrema relevância. O objetivo desse estudo foi avaliar o proteinograma sérico e urinário por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cães saudáveis e com diferentes estágios de DRC, na busca por marcadores precoces que possuam valor diagnóstico e prognóstico para pacientes com DRC. Para isto, 24 amostras de sangue e urina de cães com raça, idade e sexo aleatórios, saudáveis e com DRC atendidos nos Hospitais Veterinários da Universidade Federal de Viçosa e da Universidade Federal de Minas Gerais foram avaliadas através de bioquímica sérica, da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e da urinálise. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: grupo 1 (G1) composto por animais saudáveis (creatinina sérica $< 1,5$ mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária $< 1,0$); grupo 2 (G2) composto por animais com níveis séricos de creatinina $\geq 1,5$ mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária $> 1,0$ e $< 2,0$; e grupo 3 (G3), composto por animais com níveis séricos de creatinina $\geq 1,5$ mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária $\geq 2,0$. Dos 24 pacientes, 7 apresentavam os níveis séricos de creatinina dentro dos parâmetros de referência para a espécie (G1) e 17 eram azotêmicos, sendo cinco do G2 e 12 do G3. A avaliação da creatinina demonstrou diferença de G3 em relação a G1 e G2. O volume globular (VG) dos pacientes, evidenciou diferença entre G1 e G3. Em relação a eletroforese sérica, notou-se diferença entre os grupos relacionada ao complemento C3, transferrina, albumina e apolipoproteína A4. A avaliação da urina através da urinálise, possibilitou a seleção das urinas com base na ausência de sedimento urinário ativo e avaliou a densidade urinária, demonstrando diferença do G1 em relação aos G2 e G3. Na bioquímica urinária, os valores de creatinina e da relação proteína:creatinina urinária se diferenciaram entre o G1 e G3. A eletroforese urinária apresentou

importante diferença na avaliação do padrão de lesão renal e no escore de lesão glomerular e tubular. Com base nos resultados encontrados pode-se confirmar que a maior casuística da rotina é de animais com maior comprometimento renal. O proteinograma sérico evidenciou uma possibilidade da apolipoproteína A4 ser um marcador da DRC. A eletroforese urinária demonstrou ser uma boa ferramenta diagnóstica e prognóstica para a DRC, demonstrando um resultado mais sensível e eficaz do que a relação proteína:creatinina urinária.

1. INTRODUÇÃO

No ano de 2017, o mercado pet movimentou no Brasil aproximadamente R\$ 20,3 bilhões e no mundo US\$ 119,5 bilhões. É um mercado crescente, no qual o Brasil detém a segunda maior população de cães, gatos, aves cantoras e ornamentais e o terceiro maior faturamento do mundo (ABINPET, 2018). Fatores como a nutrição com dietas equilibradas e vacinações que previnem precocemente doenças infectocontagiosas e avanços na medicina veterinária têm contribuído para a maior longevidade (De Nardi et al., 2002), entretanto, as doenças crônicas e/ou degenerativas como câncer e a doença renal crônica (DRC) vem crescendo anualmente.

A DRC é observada com relativa frequência na rotina da clínica de cães e gatos e é caracterizada por apresentar decurso longo (LUSTOZA; KOGIKA, 2003). Ela surge quando ocorrem lesões que afetam a função ou a estrutura de um ou ambos os rins, instituindo-se esta enfermidade (POLZIN et al., 2004).

Estima-se que entre 0,5% - 1,0% dos cães sejam afetados pela DRC (ROURA, 2016) e que a mesma seja a terceira causa de óbito em cães (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). A prevalência global da DRC em cães tem uma considerável variação de 0.05–3.74% (O'NEILL et al., 2013). Segundo um estudo realizado por Figuera et al. (2008) sobre causas de morte e razões para eutanásia em cães da mesorregião do centro ocidental Rio-Grandense entre 1965 e 2004, a DRC está entre as principais causas de morte nos cães idosos, mas também possui alta frequência em cães adultos.

A incidência da DRC aumenta juntamente com a idade. Um estudo de distribuição da DRC em cães de acordo com a faixa etária demonstra que 18% dos cães possuíam menos de 4 anos de idade, 17% entre 4 e 7 anos, 20% entre 7 e 10 anos e 45% possuíam mais de 10 anos. Grande parte dos cães diagnosticados estão inseridos nos estágios III ou IV da DRC (POLZIN, 2017). Ainda pode-se observar que há aumento da prevalência em algumas raças, como Cocker Spaniel, Cavalier King e Charles Spaniel (O'NEILL et al., 2013).

A inflamação persistente de baixo grau tem sido uma marcante característica na DRC e dentre os fatores envolvidos para o estabelecimento deste estado inflamatório, devem ser considerados o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, o estresse oxidativo, as infecções crônicas e recorrentes (MIHAI et al., 2018). Os sinais

clínicos encontrados são inespecíficos, sendo imprescindível a realização de exames complementares para o diagnóstico (LUSTOZA; KOGIKA, 2003).

A proteinúria, um dos achados laboratoriais da DRC, vem sendo considerada um marcador precoce, sensível e indicador de prognóstico (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017). A presença de proteinúria na ausência de achados compatíveis com hemorragia e/ou inflamação, é fortemente indicativa de lesão glomerular e/ou extravasamento (MEUTEN, 2012).

Entretanto, os métodos rotineiramente utilizados na prática clínica são insuficientes para um diagnóstico precoce, causando consequências graves pela detecção tardia da doença. Sendo assim, existe a necessidade da realização de exames que detectam lesões estruturais e funcionais precoces, permitindo a instituição de protocolos de tratamento, visando preservar a função renal residual, evitando o agravamento e progressão da enfermidade (MENESES, 2011).

Neste aspecto, o proteinograma pode trazer informações importantes sobre as proteínas relacionadas com a resposta inflamatória do paciente (ECKERSALL, 2008). Algumas proteínas detectadas pelo proteinograma podem revelar precocemente doenças subclínicas ou alterações fisiológicas do organismo (CONTIN et al., 2015).

O objetivo desse estudo foi avaliar o proteinograma sérico e urinário por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cães saudáveis e com diferentes estágios de DRC, na busca por marcadores precoces que possuam valor diagnóstico e prognóstico para pacientes com DRC.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FUNÇÃO RENAL

Os rins desempenham diversas funções, sendo estas realizadas por uma variedade de tipos celulares, com respostas específicas a sinais diretos e indiretos, dispostos em um padrão particular, formando a unidade funcional dos rins, denominada néfron (figura 1) (KLEIN, 2014). Cada néfron é composto pelos glomérulos (constituído por um tufo capilar e pela cápsula de Bowman), túbulo contorcido proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal, onde as substâncias filtradas são absorvidas e para onde os componentes plasmáticos são excretados, formando o fluido tubular. No córtex renal, os néfrons intercalam o sistema de ductos coletores que desembocam na pelve renal (KLEIN, 2014; REECE, 2015). Os caninos possuem aproximadamente 415.000 néfrons por rim (REECE, 2015) e em cada néfron três processos básicos culminam com a formação da urina: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular (FINCO, 1995).

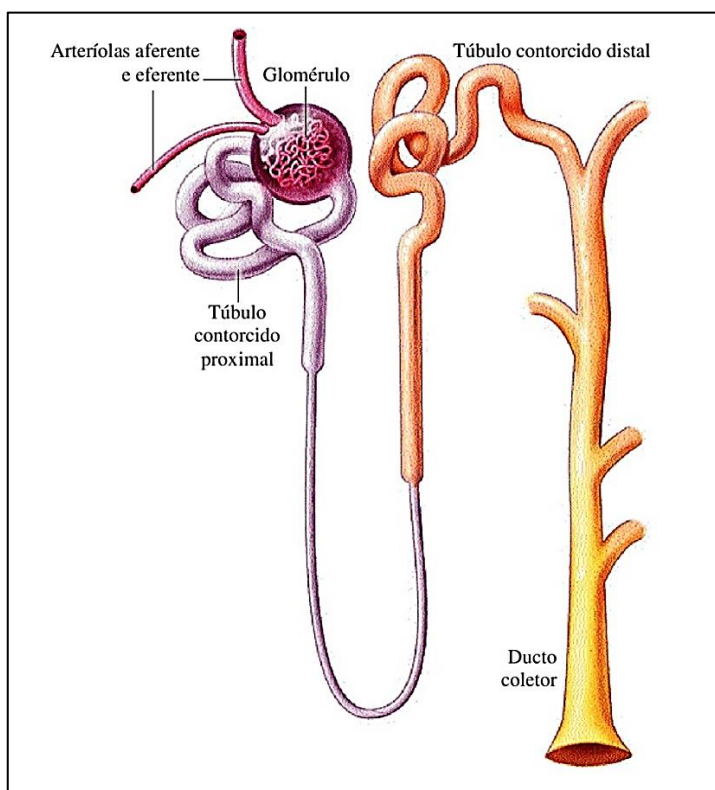


Figura 1 – Estrutura do néfron.

Fonte: Romero, 2015 (adaptada).

Os rins realizam a excreção das substâncias indesejadas do corpo, como os produtos finais do metabolismo (por exemplo, a excreção de resíduos nitrogenados como ureia e creatinina), as toxinas, os fármacos, o excesso de vitaminas hidrossolúveis, fosfato inorgânico e potássio. Essa excreção pode ocorrer através da filtração glomerular e/ou pela secreção ativa na urina pelo sistema tubular (FINCO, 1995; MOYES; SCHULTE, 2010).

Outras funções são: homeostase iônica, ácido-básica e osmótica (FINCO, 1995; KLEIN, 2014; MOYES; SCHULTE, 2010; REECE, 2015). A homeostase iônica realiza a regulação dos níveis de sódio e potássio no organismo. Os níveis de sódio são determinantes na osmolaridade do líquido extravascular, enquanto o equilíbrio do potássio é importante na manutenção do potencial de repouso da membrana. Os rins controlam ainda o equilíbrio de cálcio, cloreto, fosfato, magnésio e ferro (FINCO, 1995; MOYES; SCHULTE, 2010). A homeostase ácido-básica é realizada pelo controle do pH dos líquidos corporais através da eliminação ou retenção de H^+ e HCO_3^- . A homeostase osmótica ou equilíbrio hídrico do organismo é responsável pela tonicidade do plasma e manutenção do teor de água no organismo (KLEIN, 2014). Esta manutenção está relacionada com a determinação de urina produzida pelos rins (MOYES; SCHULTE, 2010), pois para prevenção da desidratação do organismo, os rins reabsorvem grande parte da água no filtrado glomerular, podendo reabsorver mais de 99% da água contida no mesmo, sendo que aproximadamente 60% da reabsorção de água ocorre nos túbulos proximais e o principal hormônio responsável por sua recuperação no túbulo é a vasopressina. Na privação de água, os rins respondem produzindo uma urina mais concentrada, enquanto numa sobrecarga hídrica produzem urina hipotônica (KLEIN, 2014).

Os rins desenvolvem importante papel na regulação da pressão arterial pelo controle do volume sanguíneo. Essa regulação é efetivada principalmente através do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Na hipotensão as células justaglomerulares liberam renina, enzima proteolítica que converte o angiotensinogênio em angiotensina I. Posteriormente, a enzima conversora de angiotensina (ECA) presente no endotélio vascular converte angiotensina I em angiotensina II. A angiotensina II tem efeito sobre os rins, cérebro, coração, córtex adrenal e vasos sanguíneos e ela realiza vasoconstricção arteriolar sistêmica, estimula a reabsorção de sódio e água no túbulo proximal, aumenta a liberação vasopressina e aumenta a secreção de aldosterona do córtex adrenal. A

aldosterona gera aumento da reabsorção de sódio pelos túbulos renais, gerando consequentemente a recuperação de água (MOYES; SCHULTE, 2010; REECE, 2015).

Os rins apresentam ainda funções endócrinas múltiplas, sintetizando e liberando hormônios como eritropoetina (EPO), responsável por regular a síntese de eritrócitos. Eles realizam a hidroxilação da vitamina D na mitocôndria da célula renal, transformando-a em calcitriol que é responsável pela absorção de cálcio intestinal e remodelação óssea (FINCO, 1995). O metabolismo de aproximadamente 40% da gastrina circulante do organismo é efetivado pelos rins (POLZIN, 2004).

O metabolismo de proteínas também é de responsabilidade dos rins. As propriedades moleculares relevantes para a filtração glomerular são: tamanho, forma e carga da superfície, sendo que proteínas com peso molecular < 70 kDa passam pelo filtrado glomerular e aparecem no lúmen tubular. Entretanto, a quantidade de proteínas encontrada no filtrado é baixa devido a maioria ser removida do fluido luminal nos túbulos proximais através da endocitose. Além disso, existe a presença de uma carga elétrica negativa na membrana basal glomerular e na albumina, fazendo com que a albumina seja repelida na barreira de filtração (FINCO, 1995; ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017; SYME; JEPSON, 2017).

2.2. DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal é definida como a presença de anormalidades que afetam a função ou a estrutura de um ou ambos os rins. Trata-se do surgimento de lesões, podendo haver redução da função renal. Tais alterações podem ser micro ou macroscópicas, e são determinadas através da análise de exames laboratoriais (sangue e urina), exames de imagem e pela avaliação histopatológica por meio de biópsia (POLZIN, 2008). Os termos doença renal e insuficiência renal devem ser diferenciados e dependendo da quantidade do parênquima renal afetado, da severidade e duração das lesões, a doença renal pode ou não evoluir para uma insuficiência renal (POLZIN e OSBORNE, 1995).

Trata-se de uma enfermidade comum em cães e gatos, apresentando maior incidência nos animais idosos, todavia, qualquer faixa etária pode ser acometida (POLZIN, 2017). A DRC é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente em cachorros e gatos mais velhos (GRAUER, 2017; ROURA, 2016).

A fisiopatologia da DRC compreende a perda de néfrons que culmina em diminuição da taxa de filtração glomerular, resultando no acúmulo plasmático de substâncias como os compostos nitrogenados, hormônios e eletrólitos que seriam excretados pelos rins. O acúmulo dessas substâncias plasmáticas leva a uma variedade de sinais clínicos conhecidos como síndrome urêmica, que compreende o desequilíbrio no metabolismo de sódio e água, a anemia, a intolerância aos carboidratos, os distúrbios no trato gastrointestinal, a osteodistrofia, a acidose metabólica, os distúrbios neurológicos e a disfunção imunológica (GRAUER, 2010). Polzin (2008) afirma que as manifestações clínicas são diretamente proporcionais a gravidade e a magnitude da doença renal.

Apesar da causa de base poder afetar glomérulos, túbulos, tecido intersticial ou vascularização renal, uma lesão irreversível, independente do local acometido, pode levar à perda de função total do néfron. As lesões iniciais dificilmente têm causa definida, pois o tecido lesado é substituído por tecido cicatricial (GRAUER, 2010). A evolução da DRC pode variar de meses até anos (GRAUER, 2010; POLZIN, 2017). As anormalidades funcionais ou estruturais em um ou ambos rins necessitam estar presentes por no mínimo três meses, gerando uma perda permanente da quantidade de néfrons funcionais (POLZIN, 2017).

Desta forma, a DRC é caracterizada por ser uma doença irreversível e progressiva, não havendo a necessidade da persistência da doença causadora da lesão renal inicial (MATTA, 2000).

Vale ressaltar que mesmo após a correção da doença de base primária, não há uma melhoria na função renal. Isto ocorre porque os mecanismos compensatórios e adaptativos concebidos para sustentar a função renal já se instalaram, promovendo uma perda progressiva do restante néfrons e, conseqüentemente, da função renal. Essa característica da DRC é chamada de “progressão espontânea da DRC”, onde os processos adaptativos renais que objetivam a maximização da função renal residual para sustentar a homeostase levam a um dano contínuo com perda dos néfrons (POLZIN, 2017). Desta forma, a detecção precoce da DRC, antes do início da azotemia renal e dos seus estágios avançados, permite uma adequada intervenção terapêutica, o que favorece a estabilização ou a diminuição do progressivo declínio da função renal (GRAUER, 2005).

2.3. INFLAMAÇÃO NA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A inflamação apresenta envolvimento na instalação e progressão da DRC. Sendo assim, mesmo nos estágios precoces da DRC é possível detectar a presença de citocinas e quimiocinas no plasma e urina destes pacientes (VIANNA et al., 2011), além das proteínas de fase aguda (RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2005).

A inflamação está relacionada com a progressão da doença renal, sendo considerada um potencial catalisador que pode ser responsável por acelerar as complicações da doença renal (RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2005).

Quando ocorre uma lesão renal, seja glomerular ou tubular, há uma liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas e quimiocinas, gerando o recrutamento e acúmulo de células mononucleares no interstício renal. Os macrófagos e linfócitos T, desencadeiam uma resposta imune, ocasionando uma nefrite intersticial. As células tubulares sofrem lesão na sua membrana basal e uma transição epitelial mesenquimal, se transformando em fibroblastos intersticiais. A proliferação dos fibroblastos leva a formação de colágeno, que por sua vez lesiona os vasos e túbulos renais, levando a mais inflamação, e a uma progressiva deposição de matriz extracelular, que culmina em fibrose túbulo intersticial e glomerular, levando a uma perda dos néfrons (RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2015; VIANNA et al., 2011).

Dentre as citocinas envolvidas no processo de progressão da DRC, estão envolvidas: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), antagonista do receptor de interleucina 1, interleucina 8 (IL-8), fator de transformação de crescimento tipo β (TGF- β), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e proteína quimiotática para monócitos tipo 1 (MCP-1) (RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2015; VIANNA et al., 2011).

As quimiocinas, são citocinas quimiotáticas que realizam o direcionamento das células inflamatórias para os locais de inflamação ou microambientes linfoides, além de realizar a ativação da função efetora dos leucócitos e estar relacionada com a proliferação celular e com a angiogênese. Desta forma, elas possuem importante papel numa grande quantidade de doenças, incluindo as doenças renais (SEGERER; NELSON, 2005).

Além das citocinas e quimiocinas, durante a resposta inflamatória de fase aguda, o sistema imune natural responde ao processo infeccioso ou inflamatório produzindo

uma série de proteínas inflamatórias, com atividade inespecífica, conhecidas por proteínas de fase aguda (PFAs) (MURATA ET AL., 2004).

As mudanças nas concentrações de PFAs são, principalmente, devido a sua produção pelos hepatócitos (JAIN et al., 2011), porém existe também síntese extra hepática, sendo o rim um dos locais onde esta ocorre (FOURNIER et al., 2000; JABS et al., 2003).

Segundo Murata et al. (2004), são as citocinas pró-inflamatórias que mediam esta produção, como a IL-1, o TNF- α e a IL-6. As PFAs possuem diversas funções que incluem o auxílio da homeostase corporal pelo controle da infecção e inflamação que se estabelece logo após o dano celular, inibição da quimiotaxia e modulação dos neutrófilos, indução de citocinas e formação de anticorpos. Informou ainda que suas concentrações estão diretamente relacionadas com a gravidade do dano tecidual, sendo assim, a quantificação das mesmas pode fornecer informações diagnósticas e prognósticas.

Algumas das PFAs diminuem a concentração (PFAs negativas) e outras tem sua concentração aumentada (PFAs positivas). Desta forma, as PFAs positivas são subdivididas em PFAs positivas principais, PFAs positivas moderadas (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005) e menores. Em animais hígidos, as PFAs positivas principais possuem baixa concentração sérica, com valores menores que 0,1 μ g/dL. Entretanto, quando estimuladas aumentam acima de 100 a 1000 vezes sua concentração, alcançando seu pico entre 24 a 48 horas, tendo uma rápida regressão aos seus valores basais. Já as PFAs positivas moderadas se comportam aumentando de 5 a 10 vezes sua concentração, atingindo o pico em 2 a 3 dias e regredindo mais lentamente que as PFAs principais. As PFAs menores apresentam um aumento gradual de apenas 50% a 100% dos seus valores basais. Na espécie canina, as PFAs positivas principais mais citadas são PCR e amilóide A sérica, e as PFAs positivas moderadas são representadas pela haptoglobina, α 1 glicoproteína ácida e ceruloplasmina (ECKERSALL, 2008).

Em relação às PFAs negativas, acredita-se que o mecanismo esteja relacionado a uma diminuição da síntese de proteínas hepáticas habituais, como o provável resultado da competição por substratos (TREVISI; MOSCATI; AMADORI, 2016). As principais PFAs negativas são a albumina e a transferrina (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Segundo Neves (2008) em humanos a PCR é um importante marcador de risco em pacientes com DRC. Sasaki et al. (2003) observaram elevação da ASA em felinos com insuficiência renal.

Estudo tem demonstrado o envolvimento do sistema complemento na patogênese das glomerulonefrites (EDELWEISS; MEINE; SCROFERNEKER, 1997).

O sistema complemento é um grupo de proteínas séricas (ECKERSALL, 2008) que tem como uma das funções a geração de fragmentos peptídicos (como o C5a e o C3a) que regulam a resposta imune e inflamatória. Estes fragmentos podem provocar a degranulação de mastócitos, realizar quimiotaxia, promover a adesão intercelular e aumentar ou inibir a resposta imune. Além disso, podem funcionar como mediadores inflamatórios, produzindo opsonização e lise celular em resposta a um agente nocivo ao organismo, desta forma, as proteínas do complemento também podem levar a um processo inflamatório incontrolável, sendo responsável por uma doença imunológica. Na via clássica, o sistema complemento tem a propriedade de se ligar aos complexos imunes fixos (no tecido) ou solúveis (no plasma), através da intermediação do fragmento C1q, que inicia a ativação da cascata do complemento pela via clássica, com liberação de mediadores de inflamação e expressão de uma atividade lítica. Tal fato pode levar a modificações séricas mensuráveis e o depósito de frações do complemento nos tecidos (EDELWEISS; MEINE; SCROFERNEKER, 1997).

Nas glomerulonefrites e túbulo nefrites é possível se observar o depósito de complemento nos complexos imunes. Nas glomerulonefrites crônicas, a ativação do complemento pode ser produzida pela via alternativa, não implicando na presença de complexos imunes e nem na participação das frações C1, C4 e C2 (EDELWEISS; MEINE; SCROFERNEKER, 1997).

Tanto a via clássica como a alternativa resultam na formação de um complexo de ataque à membrana, composto pelos componentes C5, C6, C7, C8 e C9, levando a lise das membranas celulares (ECKERSALL, 2008).

As proteínas inflamatórias podem ser classificadas de acordo com seu tamanho por meio da eletroforese, que é um método utilizado para separar as proteínas baseado no seu peso molecular. Desta forma, na eletroforese, as globulinas podem ser categorizadas em: α -globulinas (α 2-macroglobulina, haptoglobina e ceruloplasmina), β -globulinas (fibrinogênio, proteína C e proteína C-reativa) e γ -globulinas (imunoglobulinas) (BARGER, 2015).

2.4. CLASSIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

O comitê da Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), estabeleceu uma classificação da DRC em quatro estágios, baseando-se nos níveis séricos de creatinina mensurado por pelo menos duas ocasiões em pacientes estabilizados (tabela 1) (IRIS, 2017), objetivando fornecer auxílio no diagnóstico, compreensão e tratamento da DRC (GRAUER, 2010). Elliott e Watson (2016) ressaltam que o estadiamento deve ser realizado após a exclusão da azotemia de causas pré-renais e pós-renais, com DRC estável.

Atualmente, além dos estágios de 1 – 4, existem subestágios baseados na proteinúria, mensurada através da relação proteína:creatinina urinária (tabela 2); e da mensuração da pressão arterial sistêmica (tabela 3) (GRAUER, 2017; IRIS, 2017). A avaliação dessas variáveis são relevantes devido a proteinúria e a hipertensão arterial sistêmica ocorrerem de forma conjunta ou isolada em qualquer fase da DRC, além de serem consideradas pela medicina humana como fatores de risco independentes para lesão renal progressiva (ELLIOTT; WATSON, 2016).

Tabela 1 – Estágios da DRC em relação à concentração de creatinina sérica de acordo com a IRIS (2017):

Estágios	Creatinina (mg/dL)	Alterações
Em risco	< 1,4	Histórico sugere que o animal está em maior risco de desenvolvimento de DRC no futuro devido a presença de uma quantidade de fatores (como, exposição a drogas nefrotóxicas, raça, alta prevalência de doenças infecciosas ou idade avançada).
I	<1,4	Início da doença renal. Não azotêmico e a taxa de filtração glomerular (TFG) está diminuída. Presença de alterações renais: capacidade de concentração urinária inadequada de causa não renal; alteração na anatomia renal (diagnóstico por imagem); proteinúria de origem renal; biópsia com resultados alterados.
II	1,4-2,0	Azotemia renal leve. Sinais geralmente brandos ou ausentes; má adaptação pode levar a hiperparatireoidismo e hipocalcemia.
III	2,1-5,0	Azotemia renal moderada a grave. Muitos sinais clínicos extra renais (sistêmicos) podem estar presentes: dor óssea, gastrite urêmica, anemia e acidose metabólica.
IV	>5,0	Azotemia renal grave. Muitos sinais clínicos extra-renais (sistêmicos) comumente estão presentes e crise urêmica.

Fonte: IRIS, 2017.

Tabela 2 – Sistema de subclassificação da DRC pela proteinúria de acordo com a IRIS.

Relação proteína: creatinina urinária	Classificação
< 0,2	Não proteinúrica
0,2 – 0,5	Proteinúrica marginal
> 0,5	Proteinúrica

Fonte: IRIS, 2017.

Tabela 3 – Sistema de subclassificação da DRC pela hipertensão de acordo com a IRIS.

Pressão arterial sistólica (mmHg)	Classificação	Risco de dano futuro em órgão alvo
< 150	Normotensiva	Mínimo
150 – 159	Hipertensiva marginal	Baixo
160 – 179	Hipertensiva	Moderado
≥ 180	Severamente hipertensiva	Alto

Fonte: IRIS, 2017.

2.5. AVALIAÇÃO LABORATORIAL DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

2.5.1. Urinálise

Dentre os exames complementares, a urinálise é necessária em 100% dos casos de doença do trato urinário (CARVALHO, 2008), sendo considerada um exame simples e barato. Avaliações seriadas podem demonstrar a progressão ou resolução da doença e seus achados podem anteceder alterações na bioquímica sérica, demonstrando que esta pode ser uma análise sensível (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

A maioria dos pacientes com DRC possuem uma densidade urinária entre 1,006 e 1,020, sendo que nos estágios mais avançados da DRC é comum a presença de uma urina isostenúrica (1,008 a 1,012) (POLZIN, 2017). Geralmente, uma urina isostenúrica é observada quando ocorre perda de função em aproximadamente 67% dos néfrons (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Desta forma, o achado de densidade isostenúrica em um paciente desidratado é fortemente sugestivo de DRC (LEES, 2004; SQUIRES, 1996). Entretanto, uma urina hipostenúrica não é típica do DRC, pois provavelmente há uma diluição ativa do filtrado glomerular nos túbulos renais (BROWN, 2007).

A presença de proteinúria é típica nos animais com DRC. A proteinúria é marca registrada de lesão e disfunção glomerular, devido à perda da seletividade da barreira de filtração glomerular (BROWN, 2007). Sabe-se que os distúrbios da hemodinâmica intraglomerular podem provocar proteinúria mesmo na ausência de anormalidades estruturais detectáveis na barreira de filtração. Dietas ricas em proteínas podem provocar uma maior proteinúria, provavelmente por alterações fisiológicas e hemodinâmicas, enquanto dietas pobres em proteína podem provocar a diminuição da proteinúria pela redução da hipertensão glomerular (POLZIN et al., 2004).

Quando uma proteinúria persistente é notada na urinálise, confirmada pela repetição do exame entre 2 a 3 vezes no período de 1 a 2 meses, e na ausência de um sedimento urinário ativo é quase sempre um sinal de doença renal estrutural, mesmo quando outros aspectos da função renal são normais (POLZIN, 2008). De acordo com Roura, Elliott e Grauer (2017) na DRC, a proteinúria é um importante indicador de prognóstico e deve ser considerada como um marcador precoce sensível para o diagnóstico de doença renal em cães.

A urinálise deve ser realizada de forma completa, pois a avaliação do sedimento urinário pode demonstrar causas, como infecção do trato urinário inferior e urolitíases, que predis põem a ocorrência da DRC (LEES, 2004). Sempre que necessário, justifica-se o encaminhamento de material para a realização de urocultura e antibiograma (BROWN, 2007).

A presença de bacteriúria subclínica pode ocorrer em até 30% nos pacientes com DRC (SYME; JEPSON, 2017), ou seja, os sinais clínicos ou outros achados sugestivos de infecção do trato urinário podem estar ausentes, sendo necessário o encaminhamento da urina, preferencialmente coletada por cistocentese, para realização de cultura. A cultura de urina deve ser realizada em pacientes com suspeita de DRC (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017). Aumento da incidência de infecção do trato urinário nesses pacientes devido à perda de propriedades antibacterianas que ocorre na presença de uma urina menos concentrada (GRAUER, 2010).

A presença de cilindrúria pode indicar formação anormal de moldes cilíndricos nos túbulos renais, principalmente no ramo ascendente da alça de Henle e nos túbulos distais, pois nestes locais há uma presença de acidez máxima, da concentração elevada de solutos e de baixa taxa de fluxo. Os cilindros hialinos são derivados proteicos puros (albumina e mucoproteína de Tamm-Horsfall) (SYME; JEPSON, 2017), que podem ser encontrados ocasionalmente em pequena quantidade na urina de animais normais,

entretanto, uma proteinúria de origem renal pode gerar uma elevação da sua ocorrência (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017). Os cilindros granulosos estão relacionados com a degeneração celular ou com a precipitação de proteínas plasmáticas filtradas. Eles sugerem lesão tubular renal isquêmica ou nefrotóxica. Por último, os cilindros céreos são o estágio final da degeneração dos cilindros granulosos e sugerem estase intra-renal (SYME; JEPSON, 2017).

2.5.2. Bioquímica urinária

2.5.2.1. Relação proteína:creatinina urinária

A proteinúria deve ser considerada o primeiro marcador de doença glomerular (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016). A relação proteína:creatinina urinária é um instrumento útil no auxílio diagnóstico da DRC. Esse índice é calculado como a concentração de proteína na urina dividida pela concentração urinária de creatinina, com ambos expressos em mg/100 mL de urina, fornecendo um método eficiente para avaliação da excreção urinária de proteína. É importante recordar que qualquer extravasamento de proteínas plasmáticas na urina (por exemplo, hematúria, trauma por cistocentese, e inflamação do trato urinário de qualquer tipo) pode aumentar drasticamente a relação. Valores para a relação de proteína-creatinina urinária podem variar a depender dos métodos analíticos empregados (BROWN, 2007), porém são geralmente menores que 0,2 em cães hígidos (POLZIN, 2017).

2.5.2.2. Microalbuminúria

Proteinúria persistente com um sedimento urinário inativo tem se tornado uma forma de diagnóstico precoce e de avaliação da progressão da DRC em cães e gatos, sendo assim testes mais específicos, como o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), vêm sendo elaborados para a detecção de microalbuminúria (GRAUER, 2005). A microalbuminúria persistente é um importante achado clínico que pode ser identificado nos animais com disfunção renal precoce (BRAUN; LEFEBVRE, 2008; BROWN, 2007; ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017), sendo resultado da perda da permeabilidade seletiva glomerular e/ou da diminuição da capacidade de reabsorção da albumina pelos túbulos proximais. Sua quantificação

aumenta a suspeita de DRC, mesmo nos casos que ainda não há evidência de proteinúria na urinálise e na relação proteína:creatinina urinária (DRC estágio 1). O ajuste das diferenças nas concentrações pode ser realizado através da relação com as concentrações de creatinina na urina ou da diluição urinária até uma densidade específica uniforme (por exemplo, 1,010) (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017).

2.5.2.3. Gama Glutamil Transferase (GGT) urinário

A avaliação de enzimas urinárias tem potencial para auxiliar a determinação do local primário onde ocorreu o dano renal (CLEMO, 1998). A avaliação deste parâmetro é acessível e possui bom custo benefício (NIVY et al., 2017).

Em cães, a GGT é uma enzima presente na membrana das células epiteliais tubulares renais (BARGER, 2015), mais especificamente localizada na borda em escova (CLEMO, 1998). Desta forma, quando estas células sofrem algum tipo de dano, ocorre o extravasamento desta enzima, sendo liberada na urina (BARGER, 2015). Portanto, o aumento dos níveis de GGT na urina é indicativo de dano tubular proximal renal (CLEMO, 1998; MEUTEN, 2012), permitindo a realização de um diagnóstico precoce (HENNEMANN et al. 1997). A amostra para avaliação da GGT urinária não deve ser congelada, pois o descongelamento prejudica a atividade enzimática (MEUTEN, 2012).

2.5.3. Bioquímica sérica

Embora o melhor material para avaliação da função glomerular seja a urina para detecção de proteinúria, algumas vezes sua avaliação não é possível e outras vezes torna-se necessária a avaliação de marcadores séricos, como no caso da doença tubulointersticial primária que pode não possuir uma proteinúria clinicamente evidente. Entretanto, os marcadores séricos da TFG devem sempre ser interpretados juntamente com a densidade urinária e com a história clínica do paciente, pois a presença de desidratação e a obstrução do trato urinário podem influenciar esses valores e trazer uma interpretação errônea dos resultados (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016).

A bioquímica sérica quando interpretada adequadamente, fornece informações importantes em relação ao estado clínico do animal, ao balanço nutricional, a

monitoração de tratamento e ao prognóstico (GONZÁLEZ et al., 2001). A avaliação da função renal na rotina clínica, geralmente é baseada na avaliação das concentrações séricas de ureia e creatinina, visto que fornecem um índice da TFG (BROWN, 2007; STOCKHAM; SCOTT, 2002).

2.5.3.1. Ureia

A ureia é um composto nitrogenado sintetizado no fígado a partir da amônia resultante da degradação de aminoácidos. Os níveis de ureia são utilizados para avaliar a função renal, uma vez que demonstra a capacidade renal em remover resíduo nitrogenado do sangue (BUSH, 2004; COLVIELE, 2006; STOCKHAM; SCOTT, 2002). Fisiologicamente cerca de três quartos da ureia é excretada nos rins e um quarto no intestino (BUSH, 2004).

A ureia é passivamente filtrada do sangue pelos glomérulos, retornando ao sangue através da reabsorção tubular, sendo que a maior parte dela é excretada na urina. Nos casos de lesões que envolvam ao redor de 75% do tecido renal, os níveis séricos de ureia se elevam (COLVIELE, 2006), pois os néfrons remanescentes não conseguem manter a TFG adequada (BUSH, 2004). Contudo, quando a doença renal provoca perda de néfrons funcionais, os remanescentes menos afetados apresentam hipertrofia compensatória, assim a TFG do néfron aumenta e preserva a TFG geral, mantendo os valores de ureia e creatinina dentro dos intervalos de normalidade. Desta forma é possível que a doença renal tenha se estabelecido muito tempo antes da azotemia aparecer, mesmo que haja perda de mais de 75% dos néfrons (MEUTEN, 2012). A concentração da ureia sérica é inversamente proporcional a TFG (DIBARTOLA, 2004). A presença de hemorragias no trato gastrointestinal pode elevar os níveis séricos da ureia de forma desproporcional aos níveis séricos de creatinina (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

É um teste que não é muito sensível. A hemólise tem pouco efeito nos resultados. Pode haver aumento do nível sérico de ureia caso o animal tenha ingerido dieta rica em proteínas, devido ao aumento da degradação dos aminoácidos (BUSH, 2004; COLVIELE, 2006). A contaminação da amostra sanguínea por bactérias urease positivas pode resultar em decomposição de ureia e, redução dos seus níveis (COLVIELE, 2006). A desidratação, hemorragia grave, diminuição de débito cardíaco e outras causas de diminuição da perfusão renal, assim como aumento do catabolismo

proteico (febre, exercício prolongado, necrose e outros), causas de obstrução do fluxo urinário (doença inflamatória do trato urinário inferior dos felinos, urolitíases, e outros) e ruptura vesical devem ser consideradas como diagnóstico diferencial (BUSH, 2004).

2.5.3.2. Creatinina

A creatinina é formada a partir da condensação e desidratação espontânea da creatina muscular em uma estrutura anelar. A produção de creatinina ocorre diariamente e de forma constante, não tendo influência de fatores extra-renais como ocorre com a ureia. A creatinina formada é excretada pela via renal durante a filtração glomerular (MEUTEN, 2012; STOCKHAM; SCOTT, 2002). Os níveis séricos de creatinina são utilizados para avaliação da função renal baseado na capacidade de filtração glomerular de creatinina e na eliminação pela urina. Assim como a ureia, a creatinina não é um indicador preciso de função renal, pois necessita que haja praticamente 75% do tecido renal afuncional (COLVIELE, 2006). Os valores de creatinina variam inversamente com a TFG (DIBARTOLA, 2004).

A creatinina pode ser influenciada pela idade, sexo e massa muscular do paciente (BROWN, 2007; DIBARTOLA, 2004; MEUTEN, 2012). Animais jovens apresentam menores concentrações. Machos e animais com massa muscular mais desenvolvida apresentam concentrações maiores (DIBARTOLA, 2004). Pacientes com catabolismo muscular endógeno na caquexia causada por septicemia ou neoplasia, podem aumentar a liberação de creatina e a produção de creatinina (MEUTEN, 2012), entretanto, nos animais com baixo escore de condição corporal, que já sofreram significativa perda de massa muscular, a concentração sérica de creatinina pode mascarar a real gravidade da DRC (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Os níveis de proteína na dieta não interferem nos valores de creatinina sérica e a hemólise tem pouco efeito nos resultados (COLVIELE, 2006).

2.5.3.3. Eletrólitos

A hiperfosfatemia pode ser observada em todas as formas de azotemia, mas é raramente observada nos casos de azotemia pré-renal (SQUIRES, 1996). A hiperfosfatemia ocorre quando há aproximadamente 85% dos néfrons afuncionais, não

estando presente nos estágios 1 e 2 da IRIS (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Os rins são a via primária de excreção de fósforo, através da filtração glomerular, assim se a TFG é diminuída, há hiperfosfatemia. A consequência da hiperfosfatemia é o hiperparatireoidismo renal secundário, com a presença de calcificação metastática, mineralização de órgãos, assim como osteodistrofia renal. O PTH é supostamente uma toxina urêmica que pode contribuir para muitos dos sinais da uremia (POLZIN et al., 2004).

Devido a hiperfosfatemia e aos níveis diminuídos de calcitriol, a hipocalcemia ionizada é o mais comum distúrbio de cálcio encontrado nos pacientes com DRC (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012; POLZIN et al., 2004). Estima-se que cerca de 30 a 40% desses pacientes apresentem hipocalcemia (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

A maior parte dos pacientes apresenta nível sérico de potássio dentro dos limites de referência para a espécie (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). A hipercalemia é observada no estágio final da DRC (SQUIRES, 1996), caso os pacientes se tornem oligúricos ou anúricos, sendo um achado menos frequente (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Ela pode ocorrer também nas obstruções pós-renais e na insuficiência renal aguda (SQUIRES, 1996).

A hipocalcemia é um achado mais comum do que a hipercalemia nos pacientes com DRC. O potássio geralmente é regulado pelos rins, sendo eliminado principalmente por secreção tubular renal e, em menor grau por perda fecal e suor. Nos pacientes com DRC, os néfrons remanescentes mantêm o equilíbrio de potássio pela elevação da secreção tubular distal de potássio. Provavelmente também ocorra secreção gastrointestinal de potássio (primariamente no cólon) na DRC, podendo desenvolver papel fundamental na modulação do equilíbrio de potássio (POLZIN et al., 2004). Desta forma, a anorexia, a perda de massa muscular, o vômito e a poliúria, em conjunto, são responsáveis pela diminuição dos níveis séricos de potássio (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

A hipermagnesemia é frequente nos pacientes com DRC, pois os rins são responsáveis por excretar o magnésio (POLZIN et al., 2004).

2.5.4. Hemograma

O paciente com DRC geralmente apresenta quadro de anemia moderada a grave, normocítica, normocrômica de caráter arregenerativo. A gravidade e progressão da anemia dependem do estágio da DRC e pioram progressivamente. A principal causa da anemia é a diminuição da produção de EPO (POLZIN, 2017; SQUIRES, 1996). A anemia também pode ser decorrente do menor período de vida dos eritrócitos, anormalidades nutricionais, substâncias inibidoras de EPO no plasma urêmico, perda sanguínea e mielofibrose (POLZIN, 2017). A hemólise pode também ocorrer pela acidose metabólica que gera maior fragilidade osmótica eritrocitária nos pacientes doentes renais crônicos (ELIAS et al., 2004; SQUIRES, 1996). O surgimento da anemia pode demorar de semanas a meses (SQUIRES, 1996).

A deficiência de ferro é uma importante causa de anemia em cães e gatos com DRC (POLZIN, 1997). Relaciona-se à ingestão inadequada e à perda crônica de sangue gastrointestinal (NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012), sendo comprovada em cerca de 30% dos pacientes com DRC (COTER, 2004). A mensuração do ferro sérico em cães pode não refletir sua reserva corpórea e alguns animais podem apresentar valores normais, mesmo apresentando deficiência deste mineral (POLZIN, OSBORNE; ROSS, 2004).

Em humanos, a deficiência de ferro é frequente em pacientes com DRC. Há evidências recentes de que essa deficiência é uma causa comum e de grande importância na anemia da DRC (MAFRA, 2001). Desta forma, o sucesso da terapia para a anemia nos pacientes com DRC tratados com EPO recombinante depende do suprimento adequado de ferro (MAFRA; COZZOLINO, 2000).

Achados de linfopenia e neutrofilia podem estar presentes devido ao estresse da doença crônica (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). A alteração qualitativa das plaquetas ocorre, assim como anormalidades na interação das plaquetas com os vasos, independente do número de plaquetas e dos fatores de coagulação serem normais na DRC. A disfunção plaquetária na uremia ocorre devido à agregação anormal das plaquetas, diminuição da produção de tromboxano A₂, mobilização anormal do cálcio intracelular e do aumento de monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) intracelular. A função glicoproteica anormal, o aumento da liberação de prostaciclina e também de óxido nítrico podem prejudicar a adesividade

plaquetária ao endotélio. Além disso, as toxinas urêmicas foram associadas à disfunção plaquetária (POLZIN, 1997).

2.5.5. Perspectivas futuras de novos biomarcadores

Os testes convencionais atuais amplamente utilizados para diagnóstico e monitorização da DRC possuem limitações, sendo necessários marcadores adicionais para avaliação da TFG e dos danos tubulares e glomerulares, objetivando-se a realização de um diagnóstico precoce e, portanto, de uma terapia mais eficaz (HOKAMP; NABITY, 2016).

Alguns destes marcadores adicionais já estão em estudo, entretanto, no Brasil ainda não estão sendo amplamente utilizados na rotina de atendimento clínico devido ao custo alto e necessidade de mais informações a respeito das limitações de cada um. Na tabela 4 segue o resumo destes marcadores com o material utilizado para a análise e qual informação fornecida.

Tabela 4. Resumo dos novos biomarcadores, material utilizado para análise e informação fornecida.

MARCADOR	MATERIAL	INFORMAÇÃO FORNECIDA
Dimetilarginina simétrica (SDMA)	Sangue	Estimativa da Taxa de filtração glomerular
Fator 23 de crescimento de fibroblastos (FGF-23)	Sangue	Metabolismo alterado
Imunoglobulinas	Urina	Dano/disfunção glomerular
Proteína C Reativa (PCR)	Urina	Dano/disfunção glomerular
N acetil β glicosaminidase (NAG)	Urina	Dano/disfunção tubular
Proteína de ligação ao retinol (RBP)	Urina	Dano/disfunção tubular
Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)	Urina	Dano/disfunção tubular
Proteína de Tamm-Horsefall	Urina	Dano/disfunção tubular
Cistatina C	Urina e sangue	Dano/disfunção tubular Taxa de filtração glomerular
Eletroforese das proteínas urinárias	Urina	Dano/disfunção glomerular e tubular

Fonte: CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016; GALVAO et al., 2013 (adaptado)

2.5.5.1. Marcadores endógenos da TFG

2.5.5.1.1. Dimetilarginina simétrica (SDMA)

Atualmente, a avaliação de creatinina sérica é a mais utilizada para avaliação da taxa de filtração glomerular. Embora a avaliação seriada da concentração de creatinina sérica aumente a sensibilidade da mesma, diminuições leves a moderadas ainda são difíceis de serem detectadas com este método. Sendo assim, a SDMA tem sido destacada como marcador promissor também utilizado na determinação indireta da adequação da taxa de filtração glomerular. Ela é um subproduto da metilação de proteínas intracelulares seguida da degradação proteica que possui eliminação primária renal (BROWN, 2015). Hall et al. (2016) relataram que a dimetilarginina simétrica (SDMA) é um indicador precoce da função renal comprometida.

Em um estudo, a SDMA permaneceu inalterada em cães não alterados, enquanto que no monitoramento seriado dos cães afetados foi observada a elevação dos níveis séricos de SDMA a partir de 30% de perda da função renal, quando comparado com a elevação dos níveis séricos de creatinina quando houve perda de 50 % da função renal. Desta forma, houve correlação com o aumento dos níveis séricos de creatinina e com a diminuição na TFG, entretanto a SDMA se elevou num prazo anterior a elevação da creatinina (NABITY et al., 2015).

Diferentemente da creatinina, a SDMA parece não sofrer influência da massa muscular (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016). Através das concentrações de SDMA no sangue, algumas modificações nas diretrizes do estadiamento da DRC poderão ser consideradas, especialmente nos pacientes com escores de baixa condição corporal, não subestimando, desta forma, o grau de disfunção renal nesses pacientes (IRIS, 2017). Entretanto, ainda são necessários mais estudos para a elucidação de suas limitações (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016).

2.5.5.2. Marcadores de metabolismo alterado

2.5.5.2.1. Fator 23 de crescimento de fibroblastos (FGF-23)

Na DRC, ocorrem interações complexas entre cálcio ionizado, fósforo inorgânico, hormônio paratireóide, calcidiol, calcitriol e FGF- 23. O hiperparatireoidismo secundário renal pode ocorrer em cães com DRC, principalmente devido aos déficits do metabólito ativo da vitamina D (calcitriol), embora os déficits de calcidiol possam contribuir para sua ocorrência. A carga total de fósforo corporal e

a elevação do fósforo circulante desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal e seus níveis estão relacionados com a dinâmica do calcitriol e do FGF-23. O FGF-23 é um hormônio fosfatúrico secretado no sangue pelos osteoblastos e osteócitos como resposta a elevação dos níveis de fósforo, levando a uma diminuição da reabsorção tubular de fósforo, e também reduzindo os níveis de calcitriol do organismo, inibindo a absorção intestinal deste mineral (GALVAO et al., 2013) .

2.5.5.3. Biomarcadores urinários

2.5.5.3.1. *Marcadores de dano/disfunção glomerular*

2.5.5.3.1.1. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas G (IgG), M (IgM) e A (IgA) são proteínas com alto peso molecular (> 70 kDa) e que não ultrapassam a barreira de filtração glomerular nos rins íntegros, sendo encontradas no filtrado apenas quando há comprometimento renal (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2016).

Hokamp et al. (2016) demonstram forte correlação da excreção fracional de IgM e IgG com a severidade do dano glomerular, sendo esta maior quando comparado com a relação proteína:creatinina urinária. Estes autores relataram ainda que pequenas mudanças na fração de excreção da IgM indicam mudanças significativas do prognóstico, pois como já mencionado a mesma é uma proteína de alto peso molecular, exigindo a existência de graves danos glomerulares para chegar ao filtrado.

2.5.5.3.1.2. Proteína C reativa (PCR)

A PCR é uma proteína de fase aguda positiva sintetizada principalmente pelo fígado (HOKAMP; NABITY, 2016). Raila, Schweigert e Kohn (2011) observaram correlação significativa entre as concentrações de PCR e os parâmetros bioquímicos plasmáticos e urinários da função renal em cães com ocorrência natural de doença renal, sugerindo uma resposta de fase aguda associada a patogênese da doença renal canina. Smets et al. (2010) relataram correlação (de fraca a moderada) da relação PCR:creatinina urinária com o estadiamento da IRIS.

2.5.5.3.2. Marcadores de dano/disfunção tubular

2.5.5.3.2.1. N acetil β D glicosaminidase (NAG) urinária

A NAG é uma enzima lisossômica sintetizada por vários tecidos do organismo e com baixa atividade urinária. Ela está presente nas células epiteliais dos túbulos contorcidos proximais e quando ocorre dano tubular, há aumento na concentração urinária da NAG (MEUTEN, 2012). Atualmente não existem kits laboratoriais disponíveis no Brasil (FREITAS; VEADO; CARREGARO, 2014).

2.5.5.3.2.2. Proteína de ligação ao retinol (RBP)

A RBP é uma proteína de baixo peso molecular (21 kDa), produzida primariamente no fígado, mas também em outros órgãos, como nos rins, pulmões, baço, cérebro, estômago, coração e músculo esquelético. Sua função está relacionada ao transporte do retinol no organismo (HOKAMP; NABITY, 2016). Sua detecção na urina pode ocorrer caso exista algum dano tubular renal ou caso ocorra competição por reabsorção desta proteína devido a grandes quantidades de proteína no filtrado urinário, impossibilitando sua reabsorção tubular de maneira eficiente (CIANCIOLO; HOKAMP; NABITY, 2010). A RBP urinária apresenta importante correlação com a magnitude do dano glomerular e tubulointersticial em pacientes com DRC proteinúrica de ocorrência natural, assim como está significativamente associada com a diminuição do tempo de vida até a morte (HOKAMP et al., 2016).

2.5.5.3.2.3. Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL)

A NGAL é uma glicoproteína de baixo peso molecular, sintetizada pelos neutrófilos, rins, brônquios, estômago, intestino delgado, pâncreas, próstata e timo (HOKAMP; NABITY, 2016). Em humanos, a NGAL é liberada das células tubulares renais após a lesão, agindo como indicador de dano renal ativo, incluindo lesão de doença renal aguda e crônica (HSU et al., 2014).

Hokamp et al. (2016), descreveram que a fração de excreção NGAL demonstra aumentos significativamente progressivos com os estágios mais altos da IRIS e está associado ao tempo de sobrevivência. Segundo Hsu et al. (2014), a NGAL sérica pode ser

considerada melhor do que a concentração de creatinina sérica para prognóstico em cães com DRC.

2.5.5.3.2.4. Proteína de Tamm-Horsfall

A proteína Tamm-Horsfall parece ter relevância clínica no diagnóstico das doenças renais caninas (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004). Ela é uma glicoproteína produzida pelas células epiteliais do ramo ascendente espesso da alça de Henle e do túbulo contorcido distal (HOKAMP; NABITY, 2016). Ela encontra-se presente na urina normal (DEVUYST; DAHAN; PIRSON, 2005). Em caso de dano nestas regiões, sua produção encontra-se diminuída (HOKAMP; NABITY, 2016).

Conforme Raila, Schweigert e Kohn (2011), o nível da proteína de Tamm-Horsfall urinária encontrou-se diminuído na urina de cães azotêmicos e proteinúricos com doença renal de ocorrência natural. De acordo com Hokamp e Nabity (2016) e com Forterre, Raila e Schweigert (2004), esta proteína pode ser uma alternativa para uso como marcador de dano tubular distal em cães.

2.5.5.3.2.5. Cistatina C

A Cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular (13 kDa) inibidora da proteinase, que age como marcador endógeno indireto da taxa de filtração glomerular (HOKAMP; NABITY, 2016). Essa proteína é sintetizada por todas as células nucleadas do organismo e sua liberação ocorre durante a fagocitose e a inflamação (WEHNER; HARTMANN; HIRSCHBERGER, 2008). Devido ao seu baixo peso molecular e sua carga positiva, a cistatina C é livremente filtrada pelos glomérulos. Nas células tubulares, ela é reabsorvida e catabolizada, sendo minimamente eliminada na urina. Entretanto, o dano tubular proximal prejudica sua reabsorção e degradação, aumentando sua concentração na urina (MONTI et al., 2012).

Ghys et al. (2014) afirma que é um biomarcador com fácil mensuração, tornando seu uso viável, entretanto, devido à escassez de estudos torna-se necessário avaliar os fatores biológicos que possam influenciá-la e determinar uma faixa de referência para a mesma.

2.5.5.3.2.6. Eletroforese de proteínas urinárias

A perda de proteína pela urina é uma das consequências que ocorrem em cães com DRC. Desta forma, a análise eletroforética dessas proteínas pode orientar o clínico em relação a identificação do compartimento renal comprometido (glomerular e/ou tubular) e qual a gravidade do dano renal, através da análise das características e padrão das bandas demonstradas no gel de eletroforese (HOKAMP et al., 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o proteinograma sérico e urinário por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em cães saudáveis e com diferentes estágios de DRC, na busca por marcadores precoces que possuam valor diagnóstico e prognóstico para pacientes com DRC.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a creatinina, o volume globular (%) de pacientes saudáveis e com a DRC em diferentes estágios;
- Identificar e quantificar o proteinograma sérico em animais saudáveis e com a DRC em diferentes estágios;
- Analisar a densidade urinária, creatinina urinária, proteinúria e relação proteína:creatinina urinária em cães saudáveis e com a DRC em diferentes estágios;
- Identificar a presença, o padrão de lesão renal e o escore de lesão tubular e/ou glomerular por meio do proteinograma urinário e do algoritmo de pontuação proposto por Hokamp et al. (2018), em animais saudáveis e com DRC em diferentes estágios.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. COMISSÃO DE ÉTICA

A realização do estudo experimental seguiu as Normas de Condutas para o Uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), o Código de Ética Profissional do Médico Veterinário, os princípios éticos para pesquisa animal estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e a Legislação brasileira vigente. O delineamento experimental foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV e aprovado sob o nº 94/2017 (anexo I) e devidamente registrado na Pró Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação sob o número 193431.

4.2. OS ANIMAIS

Foram utilizadas 24 amostras de sangue e urina de cães com raça, idade e sexo aleatórios, hígidos e portadores de DRC, atendidos no Hospital Veterinário da UFV e da UFMG. Amostras de urina com sedimento urinário ativo não foram utilizadas no estudo. Os animais foram incluídos no estudo após o consentimento dos proprietários em utilizar as amostras retiradas para exames, conforme termo de autorização (anexo II).

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O estudo foi composto por caninos atendidos no Hospital Veterinário da UFV e da UFMG, no ano de 2018, sadios e portadores de DRC.

Os animais sadios foram caracterizados após avaliação clínica, laboratorial (hemograma completo, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose, proteína total, albumina, globulina, urinálise e relação proteína:creatinina urinária) e ultrassonográfica para exclusão de patologias.

Os animais caracterizados com DRC foram avaliados clinicamente e laboratorialmente (hemograma completo, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose, proteína total,

albumina, globulina, urinálise e relação proteína:creatinina urinária) para exclusão de possíveis comorbidades.

As coletas das amostras foram realizadas em único momento, após a anamnese e avaliação física do paciente e anteriormente a qualquer procedimento terapêutico.

A coleta de sangue foi realizada por médicos veterinários através da venopunção da jugular, safena ou cefálica, com prévia antissepsia, executada através de seringa e agulhas descartáveis, em tubos de 4 mL com EDTA 10% e em tubos de 4 mL sem nenhum adicional ao frasco. As amostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas a 3000 rotações por minuto (r.p.m.), durante 10 minutos, em seguida congeladas a -20°C para posterior análise no laboratório. Todos os materiais utilizados para as coletas foram estéreis.

Foi coletada também urina, pelo método de cistocentese guiado por ultrassonografia, com prévia antissepsia, executada através de seringa de 10 ml e agulhas descartáveis 30 x 7.

Durante as coletas, os animais foram devidamente contidos, minimizando os riscos de acidentes com os animais e de agressões as pessoas envolvidas.

O estadiamento proposto pela IRIS não foi realizado, pois as amostras foram coletadas em um único momento e não foi possível posterior acompanhamento dos pacientes, entretanto, as amostras foram criteriosamente interpretadas e selecionadas de acordo com a estabilidade dos pacientes.

Os animais foram divididos em três grupos experimentais baseados nos parâmetros séricos de referência da creatinina (BRAUN; LEFEBVRE, 2008) e na relação proteína:creatinina urinária, avaliados pontualmente durante o atendimento clínico:

- Grupo 1 (G1) composto por animais sadios, com níveis séricos de creatinina < 1,5 mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária < 1,0;
- Grupo 2 (G2) composto por animais com níveis séricos de creatinina $\geq 1,5$ mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária $> 1,0$ e $< 2,0$;
- Grupo 3 (G3), composto por animais com níveis séricos de creatinina $\geq 1,5$ mg/dL e com relação proteína:creatinina urinária $\geq 2,0$.

4.4. ANÁLISES LABORATORIAIS

4.4.1. Hemograma

O hemograma foi realizado com o auxílio de um contador automático de células (URIT 3000®). Para contagem diferencial dos leucócitos, realizaram-se esfregaços sanguíneos corados pelo método manual de coloração tipo Romanowsky, com posterior leitura realizada no microscópio óptico. Os processamentos das amostras ocorreram nos Laboratórios de Patologia Clínica Veterinária da UFV e da UFMG.

4.4.2. Análises bioquímicas

Os parâmetros bioquímicos séricos (ureia, creatinina, proteína total e albumina) e urinários (proteína, creatinina e relação proteína:creatinina), foram obtidos por espectrofotometria em analisador bioquímico automático (HumaStar 300®) com reagentes comerciais específicos. Os processamentos das amostras ocorreram nos Laboratórios de Patologia Clínica Veterinária da UFV e UFMG.

4.4.3. Urinálise

A urinálise foi realizada após centrifugação a 1.800 r.p.m. por cinco minutos, através de do uso de tira reativa comercial (avaliação química) e do refratômetro (obtenção da densidade) e de microscopia direta (análise do sedimento).

Os processamentos das amostras ocorreram nos Laboratórios de Patologia Clínica Veterinária da UFV e da UFMG.

4.4.4. Obtenção das proteínas séricas totais

As concentrações das proteínas séricas totais do soro foram mensuradas pelo método de Biureto, com reagentes comerciais específicos e obtidas as leituras em espectrofotômetros (automático) no laboratório clínico.

As amostras que não foi possível a mensuração imediata para dosagem de proteínas totais, foram acondicionadas em frascos estéreis e congeladas à -20°C. Posteriormente, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e a mensuração realizada. Os processamentos das amostras ocorreram nos Laboratórios de Patologia Clínica Veterinária da UFV e da UFMG.

4.4.5. Eletroforese de proteínas séricas

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do soro, realizou-se corrida eletroforética das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI - VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® BIO-RAD).

Para a eletroforese foi utilizado o gel de separação a 10% e o gel de empilhamento a 4%. Para o preparo das amostras e o fracionamento das proteínas, adicionou-se 10 µL de soro diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix e aquecendo sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 10 µL de cada amostra de soro foi depositada em uma determinada cavidade do gel, além da amostra de soro controle (espectrometria de massas, MALDI-TOF) e o marcador padrão de peso molecular¹ como referência, que sempre foi colocado em cavidades pré-estabelecidas. Após colocadas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100 V, fornecida por fonte de energia apropriada. Após 1 hora (as amostras do gel já migraram para o gel de separação), a corrente elétrica foi aumentada em 50% do valor inicial (150 V), e após mais 1 hora foi aumentada para 200 V, até o final da corrida (figura 2).

Terminada a corrida, desligou-se imediatamente a fonte elétrica e o gel foi retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Posteriormente, o gel foi submerso em solução decolorante a base de metanol para retirar o excesso de corante até que todo o gel se apresente nítido.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Software LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular utilizou-se marcadores de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 e 6 kDa. Os processamentos das amostras ocorreram no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária da UFV.

¹Marcador Sigma Marker 6.5 – 200kDa.

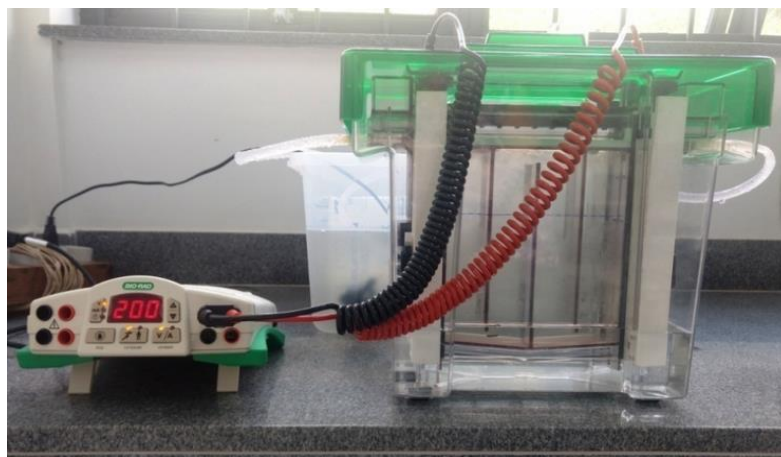


Figura 2 – Sistema vertical de eletroforese (soro).
Fonte: Acervo pessoal, 2018.

4.4.6. Espectrometria de massas

4.4.6.1. Digestão enzimática das bandas no gel e preparo da amostra para análise por espectrometria de massas

Após a separação das proteínas séricas canina por SDS-PAGE, as bandas evidentes foram escolhidas e excisadas para a realização da digestão enzimática, a qual foi efetuada com tripsina pancreática suína (TPCK), referência T-6567 (Sigma Aldrich, EUA), indicada para utilização em proteômica.

A digestão das proteínas foi realizada conforme descrito anteriormente por Shevchenko et al. (2006), com solução de tripsina na concentração de 25 ng/μL, da qual foram adicionados 40 μL em cada amostra. Após a digestão, os peptídeos tripticos foram secos em centrífuga à vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha) e ressuspensos em 10 μL de solução de ácido trifluoracético 0,1 % e dessalinizado em ZipTip® (Millipore, USA), os quais foram eluídos em 3 μL de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. Foram aplicados 1 μL da solução de peptídeo eluído com 1 μL de matriz ácido αciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), a qual foi solubilizada na mesma solução de eluição dos peptídeos, na concentração de 10 mg/mL. Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha), aplicados junto com a matriz nas mesmas condições.

4.4.6.2. Aquisição de espectros de massas de MS e MS/MS por MALDI TOF/TOF

Após a secagem das amostras, os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (BrukerDaltonics). Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flex control, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo Flex Analysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascot generic format (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

A identificação das proteínas foi confirmada com o Software BioTools versão 3.2 (Bruker Daltonics) e Mascot Daemon (Matriz Science, Londres, Reino Unido) contra a base de dados de proteínas para a subespécie *Canis lupus familiaris* obtida do banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

4.4.6.3. Identificação das proteínas

As listas de massas foram confrontadas contra os bancos de dados de proteínas dos táxons *Canis lupus familiaris* (download em 17/09/2018, com 29.589 entradas) ambos depositados no UNIPROT, usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamido metilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC, Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (KELLER et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSKII et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90% de

probabilidade para a identificação tanto das proteínas quanto dos peptídeos, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

As proteínas identificadas pelo MASCOT e validadas pelo SCAFFOLD, denominadas “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”. Os processamentos das amostras ocorreram no Núcleo de Biomoléculas (NuBioMol) da UFV.

4.4.7. Eletroforese do sobrenadante urinário

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do sobrenadante urinário, realizou-se corrida eletroforética das respectivas amostras em mini gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (MINI PROTEAN TETRA CELL® BIO-RAD).

Para a eletroforese foi utilizado o gel de separação a 14% e o gel de empilhamento a 5%. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, adicionou-se 15µL de sobrenadante urinário e 3µL de água ultrapura, em 6µL de tampão de amostra. Uma alíquota de 24µL de cada amostra preparada foi depositada em uma determinada cavidade do gel, além da amostra do marcador padrão de peso molecular² como referência, que sempre foi colocado em cavidades pré-estabelecidas (figura 3A).

Após colocadas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica de 80 V, fornecida por fonte de energia apropriada (figura 3B).

Terminada a corrida, desligou-se imediatamente a fonte elétrica e o gel foi retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Posteriormente, o gel foi submerso em solução decolorante a base de metanol para retirar o excesso de corante até que todo o gel se apresente nítido.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram

²Marcador Sigma Marker 6.5 – 200kDa.

determinados por densitometria computadorizada (Software LabImage 1D, Loccus®), a partir do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular utilizou-se marcadores de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 45, 31, 21, 14 e 6 kDa, além de proteínas purificadas. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

As amostras de urina com hematúria, piúria e/ou bacteriúria, detectadas durante a realização da urinálise, foram excluídas desta análise. Os processamentos das amostras ocorreram no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária da UFV.

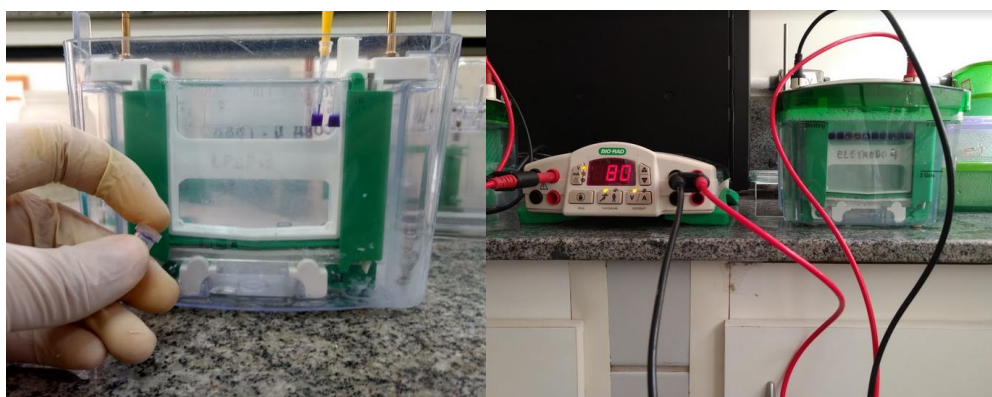


Figura 3 – A-B, Sistema vertical de eletroforese (urina). **A,** Depósito das amostras nas cavidades do gel. **B,** Conjunto da cuba submetido à corrente elétrica de 80 V.

Fonte: Acervo pessoal, 2018.

4.4.7.1. Classificação

Após a obtenção dos resultados da eletroforese, as amostras foram classificadas conforme o algoritmo de pontuação para os padrões de bandas característicos de lesão glomerular (proteínas de alto e moderado peso molecular) e tubular (proteínas de baixo peso glomerular) descrito por Hokamp et al. (2018). De acordo com os autores, os escores lesão glomerular variam entre 0 e 3 (0 = normal / sem proteinúria glomerular; 1 = proteinúria glomerular leve; 2 = proteinúria glomerular moderada; 3 = proteinúria glomerular grave) e os lesão tubular variam entre 0 e 4 (0 = proteinúria normal / não tubular; 1 = proteinúria tubular mínima; 2 = proteinúria tubular leve; 3 = proteinúria tubular moderada; 4 = proteinúria tubular severa), conforme demonstrado nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Algoritmo de escore de lesão glomerular.

Escore de lesão glomerular	Características da banda de albumina	Outras características das bandas
0 (Normal)	Fraca e menor ou menos proeminente que o padrão de peso molecular correspondente da albumina (em ~ 55,4 kDa). Presença de $\pm 1 - 2$ bandas fracas adicionais na mesma região.	± 1 banda fraca a aproximadamente 88-101 kDa, referente a proteína de Tamm-Horsfall.
1 (leve)	Do tamanho correspondente ao padrão de peso molecular correspondente da albumina, podendo variar em até três vezes o tamanho em relação a mesma.	< 10 bandas de alto peso molecular; entre 1 e 2 bandas com aproximadamente 130-150 kDa podem estar proeminentes, porém finas (aproximadamente do mesmo tamanho / intensidade que um padrão de peso molecular).
2 (moderado)	a) Proeminente, com coloração escura e estende $\leq 20\%$ da distância entre o padrão de peso molecular referente a 55,4 e 36,5 kDa. b) Estende $\geq 25\%$ da distância entre o padrão de peso molecular referente a 55,4 e 36,5 kDa.	Se a opção a) das características da banda de albumina: mais que 1 banda ≥ 200 kDa. Se a opção b) das características da banda de albumina: menos de 5 bandas ≥ 200 kDa $\pm$ até 2 bandas escuras a aproximadamente 130 - 150 kDa que se aproximam da escuridão/intensidade da banda de albumina desta amostra.
3 (Severo)	Estende $\geq 25\%$ da distância entre o padrão de peso molecular referente a 55,4 e 36,5 kDa.	Mais que cinco bandas ≥ 200 kDa, e/ou, ≥ 3 bandas escuras a aproximadamente 130-150 kDa que se aproximam da escuridão/ intensidade da banda de albumina desta amostra.

Fonte: Hokamp et al., 2018.

Tabela 6 – Algoritmo de escore de lesão tubular.

Escore de lesão tubular	Ausência ou presença de proteinúria glomerular mínima	Proteinúria glomerular presente
0 (Normal)	Nenhuma banda de baixo peso glomerular deve estar presente, exceto se o cão for macho inteiro, pois podem aparecer até três bandas de proteína do fluido prostático de proeminência variável de aproximadamente 8-9,5 kDa, 15-16 kDa e 26-27 kDa.	Uma banda fraca pode estar presente em aproximadamente 24-25,5 kDa (além das bandas de proteína do fluido prostático, caso seja uma amostra de macho inteiro).
1 (mínimo)	1-2 bandas fracas de baixo peso molecular (excluindo bandas de proteína do fluido prostático).	≤ 5 bandas fracas de baixo peso molecular (excluindo as bandas de proteína de 24-25,5 kDa e do fluido prostático).

2 (leve)	3-9 bandas de baixo peso molecular, com 0-1 bandas escuras/ intensas (excluindo as bandas de proteína do fluido prostático).	≤ 5 bandas de baixo peso molecular com exatamente 1 banda escura / intensa (excluindo as bandas de proteína de 24-25,5 kDa e do fluido prostático), ou, ≥ 6 mas < 10 bandas de baixo peso molecular, com 0 a 1 bandas escuras / intensas (excluindo as bandas de proteína de 24-25,5 kDa e do fluido prostático).
Se houver mais de uma banda abaixo de 24-25,5 kDa (excluindo as bandas de fluido prostático), a pontuação deve ser pelo menos leve.		
3 (Moderado)	≥ 10 e < 13 bandas de baixo peso molecular, com $\leq$ duas bandas de baixo peso molecular escuras/intensas (excluindo as bandas de proteínas do fluido prostático).	< 13 bandas de baixo peso molecular com duas bandas escuras/intensas (excluindo as bandas de 24 a 25,5 kDa e as proteínas do fluido prostático).
4 (Severo)	≥ 13 bandas de baixo peso molecular (excluindo as bandas de proteínas do fluido prostático) e/ou ≥ 3 bandas de baixo peso molecular escuras/intensas.	≥ 13 bandas de baixo peso molecular (excluindo as bandas de proteína de 24-25,5 kDa e do fluido prostático) e/ou ≥ 3 bandas de baixo peso molecular escuras/intensas.

Fonte: Hokamp et al., 2018.

4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram avaliados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene para a verificação da normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, respectivamente. A avaliação entre os grupos, foi realizada por meio da one-way ANOVA. As comparações múltiplas resultantes da ANOVA foram realizadas pelo teste de Tukey. Quando os dados não atendiam às premissas da ANOVA, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn. Variáveis qualitativas foram distribuídas em tabelas de contingência e analisadas pelo teste de qui-quadrado. Foi realizada a correlação de Pearson entre os dados avaliados. Para todos os testes foi considerado nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o estudo, foram avaliadas 24 amostras de sangue e urina de cães de raças, sexo e idade variadas. Destes 24 pacientes, 7 apresentavam os níveis séricos de creatinina dentro dos parâmetros de referência ($< 1,5$ mg/dL) para a espécie e possuíam a relação proteína:creatinina urinária menor que 1,0 (G1), 17 animais eram azotêmicos (níveis séricos de creatinina $\geq 1,5$ mg/dl), sendo que cinco possuíam relação proteína:creatinina urinária entre 1,0 e 2,0 (G2) e 12 possuíam relação proteína:creatinina urinária igual ou maior que 2,0 (G3). Por se tratar de um estudo com casuística clínica, a maioria dos pacientes atendidos com DRC apresentaram alterações laboratoriais compatíveis com a doença em estágios mais avançados.

Em relação aos animais avaliados, pode-se observar diferença nos valores de creatinina do G3 em relação ao G1 ($p = 0,000$) e G2 ($p = 0,024$). Os níveis séricos de creatinina são comumente usados para medir a disfunção renal e constituem a base do sistema internacional de estadiamento da IRIS (IRIS, 2017). Entretanto, autores descreveram que a elevação dos níveis séricos de creatinina ocorrem apenas quando existe comprometimento renal grave, pois é necessário que haja perda de função em aproximadamente 75% do tecido renal (COLVIELE, 2006; GRAUER, 2005). Desta forma, os resultados desta pesquisa reforçam a dificuldade em se notar elevação dos níveis séricos de creatinina nos estágios iniciais da doença, demonstrada pela ausência de diferença entre G1 e G2.

A anemia, avaliada pelo volume globular dos pacientes, demonstrou diferença entre G1 e G3 ($p = 0,0112$), sendo que pacientes em estágios mais avançados da DRC, possuem menores percentuais do volume globular quando comparado a animais hígidos e nos estágios iniciais da DRC. Segundo Polzin (2017) a gravidade e progressão da anemia estão correlacionados com o estágio da DRC e pioram progressivamente devido a diminuição da produção de EPO pelo parênquima renal afetado. Entretanto, a anemia também é decorrente da diminuição do período de vida dos eritrócitos, da deficiência nutricional, da perda sanguínea e da mielofibrose. De acordo com Naigamwalla, Webb e Giger (2012), outra importante causa é a deficiência de ferro relacionada à ingestão inadequada e à perda crônica de sangue gastrointestinal.

Oburai, Vaikunta Rao e Naik (2015) observaram diferença do volume globular (%) entre animais controle e animais portadores de DRC, sendo que 11 dos 31 cães com DRC avaliados apresentavam-se anêmicos. Torres et al. (2017), avaliaram 63 cães

em diferentes estágios da DRC, observando anemia normocítica normocrômica em 84,1% dos pacientes. Os autores notaram que a hipoplasia eritróide estava associada com a anemia persistente em todas as fases da DRC, sendo relacionada com a deficiência de ferro nas fases iniciais e à destruição periférica dos eritrócitos causada pela progressão da azotemia.

Em relação a eletroforese de proteínas séricas (figura 4), notou-se diferença entre os grupos relacionada ao complemento C3, a transferrina, a albumina e a apolipoproteína A4 (figura 5), conforme demonstrado na tabela 7.

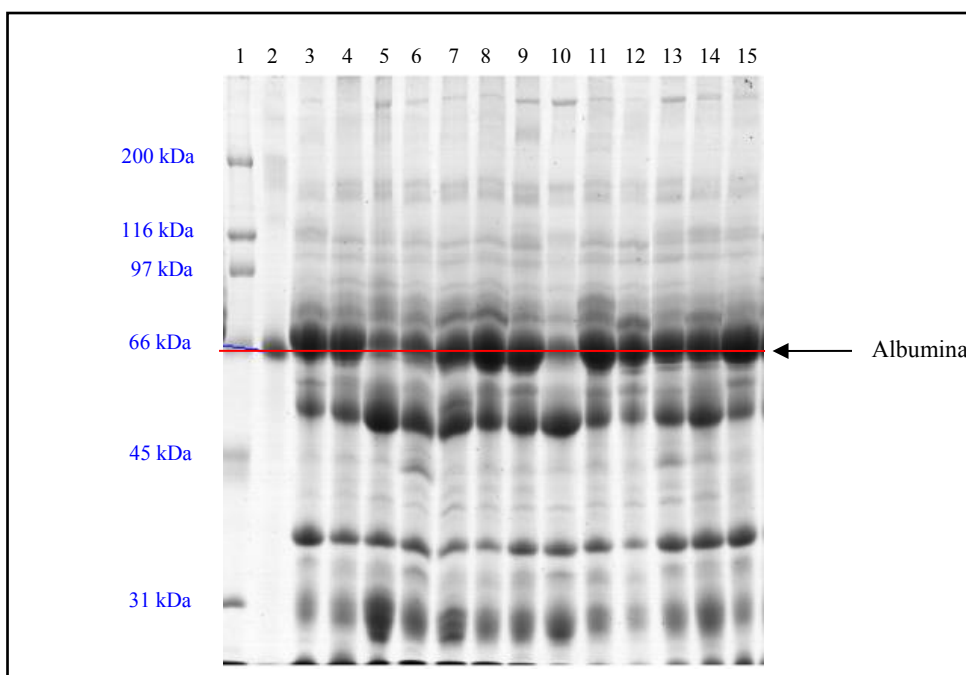


Figura 4 – Traçado eletroforético das proteínas séricas com seu respectivo marcador de peso molecular (lane 1) e amostras de pacientes com DRC (lane 2 a 15).
Fonte: Acervo pessoal, 2018.

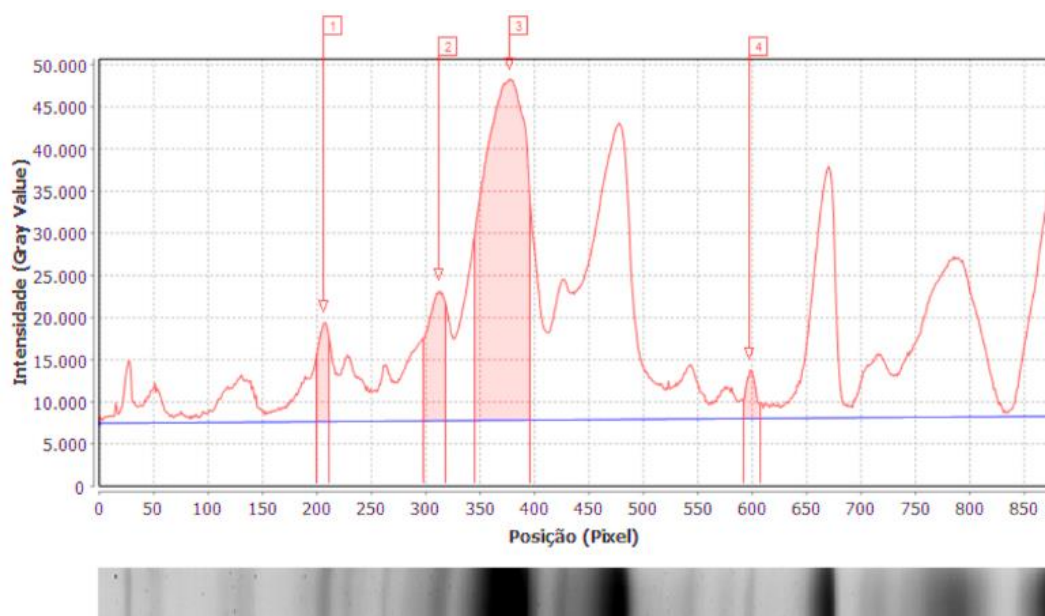
Tabela 7 – Concentração das proteínas séricas em caninos saudáveis e com doença renal crônica (G1, G2 e G3).

Proteína	Grupo	Concentração Sérica (mg/dL)	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mediana (min-máx)
Proteína Total	G1	6,3 $\pm$ 0,7	-
	G2	6,2 $\pm$ 1,2	-
	G3	6,3 $\pm$ 0,9	-
Complemento C3*†	G1	-	144,5 ^B (61,1 - 265,7)
	G2	-	74,5 ^A (32,3 - 111,7)
	G3	-	141,4 ^B (40,9 - 683,2)
Transferrina*	G1	935 $\pm$ 288 ^A	-
	G2	811 $\pm$ 365 ^{A, B}	-

	G3	560,6 ± 190,7 ^B	-
Albumina*	G1	3035,7 ± 232,9 ^A	-
	G2	2826 ± 246 ^{A, B}	-
	G3	2295 ± 543 ^B	-
Apolipoproteína A4*[†]	G1	-	224,3 ^A (140,6 - 319,4)
	G2	-	142,4 ^{A, B} (122,2 - 244,9)
	G3	-	116,4 ^B (79,4 - 268,4)
α 1 Antitripsina	G1	620,3 ± 86,5	-
	G2	597,1 ± 129,1	-
	G3	494,4 ± 163,3	-
IgG	G1	3027 ± 1116	-
	G2	2860 ± 769	-
	G3	2889 ± 698	-
Pentaxina	G1	256,3 ± 135,5	-
	G2	176,8 ± 55,4	-
	G3	225,0 ± 140,0	-
Haptoglobina[†]	G1	-	623,4 (515,2 - 786,4)
	G2	-	710,9 (309,0 - 1120,6)
	G3	-	611,2 (113,4 - 1407,1)
Glicoproteína ácida[†]	G1	-	314,8 (170,1 - 552,3)
	G2	-	262,8 (145,4 - 449,2)
	G3	-	233,4 (159,9 - 468,2)

*Variáveis com $p < 0,05$ (significativamente diferentes).

[†] Variáveis sem distribuição normal; Teste de Kruskal-Wallis, Mediana (min-máx).



Redução de Background: Linha de Base: 0,00, 7.460,43, 880,00, 8.295,28

Figura 5. Eletroforese das proteínas séricas. Bandas das proteínas que diferenciaram-se e seus respectivos picos, encontradas na eletroforese, identificadas nominalmente. 1 – complemento C3; 2 – transferrina; 3 – albumina; 4 – apolipoproteína A4.

Fonte: Acervo pessoal, 2018.

Em relação ao complemento C3, os valores foram significativamente menores no G2 quando comparado ao G1 ($p = 0,042$) e ao G3 ($p = 0,039$).

Segundo Edelweiss, Meine, Scroferneker (1997) uma das propriedades do complemento é a de se ligar a complexos imunes. Estes complexos são compostos de antígenos e anticorpos (IgG e IgM) e podem ser fixos, com anticorpos dirigidos contra antígenos teciduais, ou circulantes (solúveis) plasmáticos. A formação dos complexos imunes fixos ou solúveis pode implicar na ativação do complemento, podendo levar a modificações séricas mensuráveis (hipocomplementemia) e o depósito de frações do complemento nos tecidos. A hipocomplementemia, assim como o decréscimo da concentração das proteínas reguladoras do complemento no soro, acompanha a progressão da deterioração da função renal em vários tipos de glomerulonefrites. Segundo os autores, tal fato também pode ser demonstrado pela detecção da presença de altos níveis de proteínas reguladoras do complemento no sangue de pacientes com função renal normal, sugerindo que o mecanismo de controle do sistema complemento esteja preservado nestes pacientes. Os autores afirmam ainda que, o sistema complemento pode ser implicado na lesão histológica secundária ao depósito, tendo papel de atacante e destruidor de tecidos-alvo, mas também possui ação protetora,

modificando a solubilidade dos complexos, favorecendo sua captação e destruição pelas células fagocitárias.

Schneider et al. (2013) demonstraram, através do seu estudo de prevalência de glomerulonefrite por imunocomplexos em cães biopsiados por suspeita de doença glomerular, que 48,1% (241 de 501) dos cães incluídos no estudo apresentavam glomerulonefrite por imunocomplexos.

No Brasil, há considerável incidência de doenças infectocontagiosas. Num estudo realizado no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília no período de abril de 2011 a dezembro de 2014, observou-se incidência de 14% (992 cães de 7.121 cães atendidos) dos atendimentos de cães diagnosticados com babesiose, cinomose, erliquiose, leishmaniose ou leptospirose (NÓBREGA, 2015). Em relação as hemoparasitoses, em Anápolis (Goiás), há relato da incidência de 33,96% em cães de rua. Dentre as hemoparasitoses diagnosticadas, os autores descreveram incidência de 50% para *Anaplasma platys*, 27,78% para *Mycoplasma haemocanis*, 11,11% para *Babesia canis*, 5,56% para *Ehrlichia canis* e 5,56% para *Hepatozoon canis* (MUNDIM et al., 2008).

As doenças infectocontagiosas, como ehrlichiose (SILVA et al., 2015), babesiose (CAVALCANTE et al., 2006), leptospirose (CHIDEROLI et al., 2016) e leishmaniose (ZARAGOZA et al., 2003; SILVA, 2007), podem levar a glomerulonefrite e nefrite intersticial induzida por deposição de imunocomplexos, com posterior desencadeamento da DRC (CAVALCANTE et al., 2006; CHIDEROLI et al., 2016; KIKUCHI et al., 2015; SILVA, 2007; SILVA et al., 2015; ZARAGOZA et al., 2003). Desta forma, as causas infecciosas devem ser consideradas como importante e possível fator desencadeante da DRC por deposição de imunocomplexos nos animais estudados, lembrando que, conforme descrito por Matta (2000), muitas vezes, quando a DRC é diagnosticada, o agente causador pode não se encontrar no organismo do animal.

Segundo Roura (2016), doenças autoimunes (como o lúpus eritematoso sistêmico) e infecções bacterianas (como ocorre na piometra, na doença periodontal e nas piodermites crônicas) também são consideradas fatores de risco para DRC.

Morita et al. (1997) relataram que o sistema complemento pode ser ativado durante a proteinúria, quando as proteínas plasmáticas, incluindo os componentes do complemento, atingem o lúmen tubular. A ativação do sistema complemento na superfície luminal das células tubulares proximais pode ocorrer pela ativação de C1

(via clássica) pela enzima conversora de angiotensina, como também pela ativação da via alternativa por meio da clivagem da ligação tioéster interna da molécula C3 pela água ou amônia. Uma vez ativadas (via clássica e alternativa), as convertases C3 podem amplificar a clivagem das moléculas C3.

Sendo assim, o achado de menores níveis do complemento C3 no G2 em relação ao G3 e ao G1, sugere que nas fases iniciais da instalação da DRC existe a presença de imunocomplexos levando a hipocomplementemia. Posteriormente, com a DRC completamente instalada, os imunocomplexos deixam de ter papel na instalação e progressão da doença, a qual passa a progredir por outros mecanismos, como a proliferação de fibroblastos levando a formação de colágeno, que lesa os vasos e túbulos renais, gerando mais inflamação, e progressiva deposição de matriz extracelular, que culmina em fibrose túbulo intersticial e glomerular, e posterior perda dos néfrons, conforme descrito por Vianna et al. (2011).

A ativação do sistema complemento por meio das doenças infectocontagiosas sugere a importância das mesmas na etiopatogenia da DRC.

A presença de proteinúria nos animais do estudo que estavam nas fases iniciais da doença também pode ter contribuído com a ativação do complemento e com a diminuição dos níveis do complemento C3.

Em relação aos valores de transferrina ($p = 0,018$) e albumina ($p = 0,004$), eles foram significativamente inferiores no G3 quando comparado ao G1. Sabe-se que estas proteínas são as principais PFAs negativas da espécie canina. Durante a resposta de fase aguda, as PFAs negativas diminuem aproximadamente 25% da sua concentração, de forma rápida (em 24 horas) ou gradual (ao longo de um período de dias) (ECKERSALL, 2008).

Camacho et al. (2005) atribuíram a diminuição dos níveis séricos de transferrina como um dos motivos da não elevação da fração β -globulina encontrada no seu estudo em cães com *Babesia annae*. Segundo os autores, na DRC possivelmente ocorra perda de transferrina pelos rins ou, mais provavelmente, por ser uma PFA negativa, diminua seus níveis durante processos inflamatórios agudos em cães com azotemia.

Segundo Trevisi, Moscati e Amadori (2016), possivelmente o mecanismo relacionado com a diminuição das PFAs negativas esteja relacionado com diminuição da síntese de proteínas hepáticas habituais, como o provável resultado da competição por substratos para produção das PFAs positivas. Entretanto, neste estudo não foi

observado a elevação significativa das PFAs positivas em nenhum dos grupos com DRC.

A transferrina é a proteína transportadora de ferro e frequentemente sua aplicação diagnóstica está relacionada ao seu papel nas doenças do metabolismo do ferro (ECKERSALL, 2008). Na DRC ocorre ingestão inadequada de alimentos e perda crônica de sangue gastrointestinal (NAIGAMWALLA; WEBB; GIGER, 2012), desta forma, a redução dos níveis de ferro pode ser uma das justificativas da diminuição encontrada nos níveis séricos da transferrina.

Em relação a albumina, uma possibilidade da sua diminuição está relacionada a perda urinária desta proteína (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

Os resultados da apolipoproteína A4 ($p = 0,009$) demonstraram níveis significativamente inferiores no G3 quando comparado ao G1.

A apolipoproteína A4 participa do transporte reverso do colesterol (HDL), sendo considerada anti-aterogênica (KRONENBERG et al., 2000). Sua síntese é realizada quase exclusivamente pelos enterócitos, sendo secretada na linfa como uma proteína estrutural do quilomícron e sua liberação está relacionada a quantidade de lipídeos ingerida na dieta (GREEN et al., 1980).

Behling-Kelly (2014) observou a ocorrência da dislipidemia em cães com DRC, sendo caracterizada pelo aumento dos níveis séricos do colesterol (16 de 29 cães com DRC), por uma diminuição nos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e aumento de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), entretanto, a incidência, a gravidade, o mecanismo e as consequências do metabolismo lipídico alterado em cães permanece desconhecida. De acordo com Lima (2007), acredita-se que em humanos o mecanismo da dislipidemia da DRC esteja principalmente relacionado a resistência à insulina, ao aumento do estresse oxidativo e a alterações na estrutura e na função das apolipoproteínas.

Em humanos, a apolipoproteína A4 pode ser considerada um marcador sérico e urinário para DRC. A diminuição da depuração de creatinina mostrou uma forte associação com o aumento dos níveis de apolipoproteína, sugerindo papel metabólico dos rins para essa proteína (LINGENHEL et al., 2006). Além disso, pacientes com elevada concentração de apolipoproteína A4 demonstram uma progressão significativamente mais rápida da doença, sendo considerada um preditor independente de progressão da DRC primária (BOES et al., 2006).

Entretanto, um tipo tubular de proteinúria e a proteinúria grave podem causar uma diminuição nos níveis plasmáticos de apolipoproteína A4. A hipótese do efeito da diminuição da apolipoproteína sobre baixos níveis séricos de albumina na síndrome nefrótica severa pode ser causado pela diminuição da produção intestinal devido ao edema de mucosa pronunciado ou pelo aumento da perda desta proteína pela filtração glomerular. Em condições normais, a apolipoproteína é filtrada pelo glomérulo e é reabsorvida pelas células tubulares proximais (LINGENHEL et al., 2006).

Mais exames relacionados ao perfil lipídico destes pacientes seriam necessários para a melhor compreensão da diminuição da apolipoproteína A4 encontrada nos pacientes do G3 em relação ao G1 e para análise desta proteína como um possível marcador da DRC em cães.

A avaliação da urina através da urinálise, possibilitou a seleção das urinas com base na ausência de sedimento urinário ativo (ex.: hematúria e/ou piúria) com o intuito de evitar a interferência dessas alterações na interpretação da origem da proteinúria (JILLINGS et al., 2019; VIENTÓS-PLOTTTS et al., 2018).

A urinálise também permitiu a avaliação da densidade urinária dos pacientes estudados. Desta forma, observou-se diferença dos valores do G1 em relação aos G2 ($p < 0,001$) e G3 ($p = 0,027$) (tabela 8), sendo que os valores de densidade urinária do G1 foram maiores do que nos outros grupos, demonstrando a conservação da capacidade de concentração urinária neste primeiro grupo. Além disso, os resultados da densidade urinária correlacionaram-se negativamente e moderadamente com os níveis séricos de creatinina ($-0,61$; $p = 0,00166$).

Oburai, Vaikunta Rao e Naik (2015) observaram menor densidade em cães com DRC ($1,020 \pm 0,001$) quando comparados com seu grupo controle ($1,036 \pm 0,02$).

A diminuição da densidade urinária em cães com DRC ocorre devido a diminuição da capacidade renal em concentrar urina, havendo diminuição ou perda da do equilíbrio hídrico do organismo, realizado pela reabsorção de grande parte da água do filtrado glomerular pelos túbulos pela ação do hormônio antidiurético (vasopressina) (BARGER, 2015).

Assim como a elevação dos níveis séricos de creatinina ocorre quando já existe considerável perda da função (MEUTEN, 2012), Chew, Dibartola e Schenck (2012) afirmam que é necessário que haja perda de aproximadamente 67% da função renal para ocasionar a produção de urina isostenúrica ($1,008 - 1,012$) (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012), reforçando que os animais do G3 já apresentavam

grande perda da função renal.

A bioquímica urinária analisou os valores de proteína, creatinina e a relação proteína:creatinina. Sendo assim, não foi observada diferença entre os grupos em relação aos níveis isolados de proteína da urina, enquanto que os valores de creatinina se diferenciaram entre o G1 e G3 ($p = 0,0003$), assim como a avaliação da concentração de proteína em relação a concentração de creatinina urinária (relação proteína:creatinina urinária) ($p = 0,005$) (tabela 8).

Os resultados da relação proteína:creatinina urinária correlacionaram-se positivamente com os níveis séricos de creatinina ($0,5$; $p = 0,0240$), demonstrando que quanto maior a perda de função renal, menor a capacidade de eliminação dos compostos nitrogenados e maior a perda das proteínas pela urina.

Oburai, Vaikunta Rao e Naik (2015) observaram diferença na relação proteína:creatinina urinária entre os grupos controle ($0,68 \pm 0,09$) e DRC ($2,29 \pm 0,25$), observando também diferença ($p < 0,01$) entre os mesmos grupos referente aos níveis de creatinina ($10,14 \pm 0,89$ x $217,42 \pm 21,20$) e proteína ($6,94 \pm 0,55$ x $217,42 \pm 44,95$) urinária.

Forterre, Raila e Schweigert (2004) relataram diferença nos valores de creatinina entre o grupo controle e o grupo com DRC, havendo variação na magnitude entre os animais com DRC. Assim como encontrado nos resultados desta pesquisa, os autores não observaram diferença entre os grupos relacionada aos níveis de proteína urinária, encontrando diferença nos níveis de creatinina e na relação proteína:creatinina urinária.

Os níveis de proteína urinária semelhantes e a diferença entre os níveis de creatinina e da relação proteína:creatinina urinária são explicados pelo fato de apenas uma pequena quantidade de proteína ser excretada juntamente com outros solutos pela urina. Estes resultados reforçam que, para determinar o grau de proteinúria e sua significância, é fundamental que a concentração de proteinúria seja comparada com os níveis da creatinina urinária (COWELL, 2004).

O fato desta diferença ter sido observada apenas entre G1 e G3 reforça que estes marcadores bioquímicos urinários diagnosticam principalmente pacientes com estágios avançados da DRC, onde já ocorreu grande perda da função renal. Isto demonstra a necessidade da descoberta de marcadores mais sensíveis, que possam realizar a diferenciação da DRC entre animais hígidos e animais com DRC nos estágios iniciais, onde há menor perda de função renal e, portanto, onde a intervenção

terapêutica poderá garantir melhor prognóstico para estes pacientes.

Tabela 8 – Parâmetros urinários em caninos (G1, G2 e G3).

Parâmetros	Grupo	Concentração Urinária (mg/dL)	
		Média $\pm$ desvio padrão	Mediana (máx-mín)
Densidade* [†]	G1		1,050 ^A
			(1,018-1,050)
	G2		1,015 ^B
			(1,012-1,016)
	G3		1,011 ^B
			(1,007-1,017)
Proteína	G1	169,8 $\pm$ 62,7	
	G2	216,4 $\pm$ 146,8	
	G3	189,6 $\pm$ 78,7	
Creatinina* [†]	G1		362,3 ^A
			(75,8-485,0)
	G2		83,3 ^{A,B}
			(47,5-154,3)
	G3		55,9 ^B
			(34,9-114,6)
Relação proteína:creatinina urinária*	G1	0,5 $\pm$ 0,2 ^A	
	G2	2,8 $\pm$ 2,0 ^{A,B}	
	G3	3,6 $\pm$ 2,1 ^B	

* Variáveis com $p < 0,05$ (significativamente diferentes).

[†] Variáveis sem distribuição normal; Teste de Kruskal-Wallis, Mediana (min-máx).

Na busca por marcadores mais sensíveis de diagnóstico da DRC, foi realizada a eletroforese das proteínas urinárias, que possibilitou a avaliação do padrão de lesão renal e do escore de lesão glomerular e tubular proposto por Hokamp et al. (2018) (figura 6).

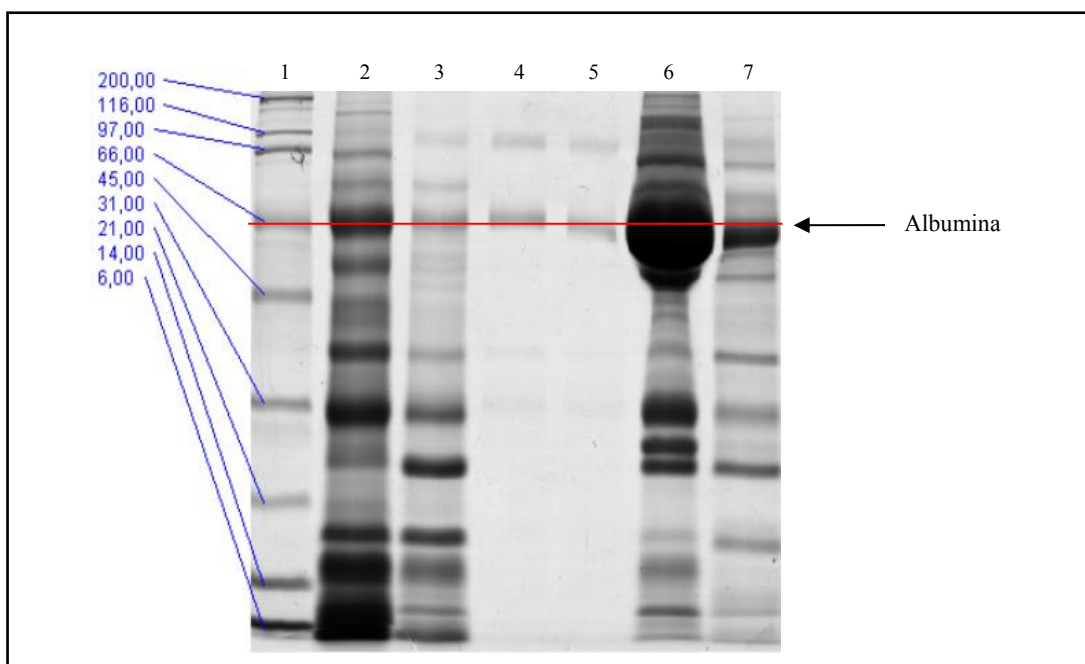


Figura 6 – Eletroforese das proteínas urinárias. Lane 1 – Marcador de peso molecular. Lane 2 – Amostra com sedimento urinário ativo (cistite). Lane 3 – Escore de lesão glomerular 1 e tubular 4. Lane 4 – Escore de lesão glomerular 1 e tubular 0. Lane 5 - Escore de lesão glomerular 1 e tubular 0. Lane 6 - Escore de lesão glomerular 3 e tubular 4. Lane 7 - Escore de lesão glomerular 2 e tubular 3.

Fonte: Acervo pessoal, 2018.

A avaliação do padrão de lesão renal demonstrou que a maioria dos animais do G1 não possuíam (5 de 7) lesão renal ou uma minoria dos animais possuíam lesão glomerular (1 de 7) ou tubular (1 de 7), enquanto os pacientes do G3 possuíam principalmente lesão glomerular e tubular simultaneamente (10 de 12) (tabela 9).

Lees et al. (2005) citaram que resultados da relação proteína:creatinina urinária $\geq 2,0$ são considerados indicativos de proteinúria glomerular, enquanto valores $< 2,0$ parecem ser mais frequentemente relacionados com proteinúria tubular. Entretanto, os resultados da presente pesquisa contrastaram ao descrito por estes autores, demonstrando que no G2, composto por animais azotêmicos e com relação proteína:creatinina urinária $< 2,0$, os pacientes possuíam sobretudo lesão glomerular e tubular concomitantes (tabela 9).

A presença de lesão glomerular e tubular simultaneamente nos pacientes do G3 pode ser explicada pelo que fora descrito por D'Amico e Bazzi (2003). De acordo com os autores, na lesão glomerular ocorre um aumento da carga e mudança na permeabilidade do capilar glomerular. Desta forma, a albumina e as proteínas de alto peso molecular conseguem passagem transglomerular. A elevação da concentração das proteínas que chegam ao túbulo para serem reabsorvidas geram uma sobrecarga de trabalho e/ou uma injúria tóxica nas células tubulares proximais.

Segundo Hokamp et al. (2018), animais com escore de lesão glomerular ≥ 1 demonstraram maior sensibilidade (97%) para detecção de dano glomerular do que às razões proteína:creatinina urinária $\geq 0,2$ (95%), $\geq 0,5$ (93%), ≥ 1 (90%) e ≥ 2 (81%), além de apresentarem 100% de especificidade para dano glomerular. Em relação a avaliação de lesão tubular, animais com escore de lesão tubular ≥ 1 demonstraram maior sensibilidade (90%) para a presença de dano tubulointersticial em comparação com níveis séricos de creatinina $\geq 1,4$ mg / dl (58%) e creatinina $\geq 1,4$ mg / dl + densidade urinária $\leq 1,030$ (48%), e apresentaram 100% de especificidade para dano tubulointersticial. Por meio destes resultados, pode-se verificar a importância da realização da eletroforese urinária para identificação do local de lesão renal.

Tabela 9 – Padrão de lesão renal em caninos (G1, G2 e G3).

	1	2	3	
Ausência	5	0	0	N
	20,8	0	0	Total %
Glomerular	1	1	0	N
	4,2	4,2	0	Total %
Ambos	1	3	10	N
	4,2	12,5	41,7	Total %
Tubular	0	1	2	N
	0	4,167	8,333	Total %

Teste Quiquadrado, $p = 0,004$

Utilizando o algoritmo proposto por Hokamp et al. (2018) para avaliação do escore de lesão glomerular e tubular, observou-se diferença do grau de lesão glomerular do G1 em relação ao G2 ($p = 0,003$) e ao G3 ($p = 0,049$), sendo que G1 apresentou menor escore quando comparado aos outros grupos. Em relação ao escore de lesão tubular, observou-se diferença entre G1 e G2 ($p = 0,022$), tendo G2 maior escore quando comparado ao G1; entre G1 e G3 ($p < 0,001$), tendo G3 maior escore do que G1; e entre G2 e G3 ($p = 0,018$), tendo G3 maior escore do que G2.

Os resultados para o diagnóstico de lesão glomerular e tubular demonstram que a avaliação do escore foi mais sensível que os resultados demonstrados pela avaliação da relação proteína:creatinina urinária, sendo que para lesão tubular observa-se maior sensibilidade do que para lesão glomerular, pois seus resultados demonstraram diferença entre todos os grupos avaliados (tabela 10).

É importante enfatizar que, tanto no escore de lesão glomerular como no tubular, houve diferença entre o grupo sadio (G1) e o grupo representado por animais nos

estágios iniciais da DRC (G2).

Desta forma, a avaliação de pontuação (grau) de lesão glomerular e tubular proposto por Hokamp et al. (2018) é um marcador precoce de diagnóstico para pacientes com DRC e possibilita o acompanhamento destes, sendo um bom marcador de prognóstico.

Ao contrário da relação proteína:creatinina urinária, o algoritmo de pontuação proposto por Hokamp et al. (2018), possibilita ainda a identificação do local de lesão renal, demonstrando mais uma vez a sua sensibilidade.

Devido a sensibilidade demonstrada pela precocidade na detecção de lesão, pela possibilidade de se identificar o local e a gravidade da lesão, a aplicação da eletroforese urinária associada a sua classificação conforme o algoritmo de pontuação para os padrões de bandas característicos de lesão glomerular (proteínas de alto e moderado peso molecular) e tubular (proteínas de baixo peso molecular) descrito por Hokamp et al. (2018) é indicada para a rotina clínica de atendimento e acompanhamento dos pacientes com DRC.

Tabela 10 – Pontuação (grau) de lesão glomerular e tubular em caninos (G1, G2 e G3).

Pontuação de Hokamp et al. (2018)	Grupos	Mediana (máx-min)
Escore de lesão glomerular* [†]	G1	0 ^A
		(0-1)
	G2	2 ^B
		(0-2)
	G3	2 ^B
		(0-3)
Escore de lesão tubular* [†]	G1	0 ^A
		(0-1)
	G2	1 ^B
		(0-4)
	G3	4 ^C
		(1-4)

* Variáveis com $p < 0,05$ (significativamente diferentes).

[†] Variáveis sem distribuição normal; Teste de Kruskal-Wallis, Mediana (min-máx).

6. CONCLUSÕES

A DRC é uma enfermidade com importante morbidade e mortalidade na rotina clínica de pequenos animais. Grande parte dos pacientes diagnosticados com DRC encontra-se nos estágios avançados. Isto ocorre devido aos marcadores utilizados na rotina serem tardios, atrapalhando na resposta clínica destes pacientes, pois o quanto antes a terapia for instituída, menor progressão da doença e, desta forma, maior tempo de sobrevida.

Estudos evidenciam possíveis futuros marcadores promissores para o diagnóstico precoce da DRC, entretanto, os mesmos ainda não estão sendo utilizados na rotina clínica, pois suas limitações estão pouco elucidadas e o custo das suas análises são elevados.

A determinação das concentrações do complemento C3, da transferrina, da albumina e da apolipoproteína A4, realizada neste estudo por meio da eletroforese sérica, pode auxiliar no acompanhamento dos pacientes com DRC.

Através dos resultados, a realização da eletroforese urinária com a classificação por meio do algoritmo de pontuação para os padrões de bandas característicos de lesão glomerular e tubular propostos por Hokamp et al. (2018) demonstra ser uma valiosa ferramenta diagnóstica e prognóstica para DRC, sendo mais sensível que a relação proteína: creatinina urinária amplamente utilizada na rotina clínica. Desta forma, a avaliação do proteinograma urinário é uma alternativa precoce, sensível, simples e de baixo custo, que pode ser instituída na rotina clínica para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes com DRC.

Vale enfatizar ainda que a urina é uma amostra extremamente valiosa para a avaliação do DRC, pois permite grandes possibilidades diagnósticas e prognósticas.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO (ABINPET). **Mercado Pet Brasil 2018**. São Paulo: ABINPET, 2018. Disponível em: <http://abinpet.org.br/mercado/>. Acesso em: 15 mar. 2019.

BARGER, A.M. Clinical Chemistry. In: BARGER, A.M.; MACNEILL, A.L. **Clinical Pathology and Laboratory Techniques for Veterinary Technicians**. 1th ed. United States of America: Wiley-Blackwell, 2015. cap. 4, p. 95-131.

BEHLING-KELLY, E. Serum Lipoprotein Changes in Dogs with Renal Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 28, n. 6., p. 1692-1698, 2014.

BOES, E; FLISER, D.; RITZ, E.; KÖNIG, P.; LHOTTA, K.; MANN, J. F. E.; MÜLLER, G. A.; NEYER, U.; RIEGEL, W.; RIEGLER, P. Apolipoprotein A-IV Predicts Progression of Chronic Kidney Disease: The Mild to Moderate Kidney Disease Study. **Journal of The American Society of Nephrology**. v. 17, n. 2, p. 528-536, 2006.

BRAUN, J. P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney function and damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-150.

BROWN, S. A. Diagnosing Renal Disease. In: THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE, 2007, Orlando. **Proceedings of the NAVC Conference**. Orlando: Gainesville, 2007. p. 676-677.

BROWN, S. A. Symmetric dimethylarginine (SDMA): new biomarker of renal function in cats and dogs (2015). In: **INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY-IRIS**. Sydney: 2015. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/003-5559.001-iris-website-symmetric-dimethylarginine-pdf_220116-final.pdf. Acesso em: 07 out. 2017.

BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004.

CAMACHO, A. T.; GUITIAN, F. J.; PALLAS, E.; GESTAL, J. J.; OLMEDA, S.; GOETHERT, H.; TELFORD, S.; SPIELMAN, A. Serum protein response and renal failure in canine Babesia annae infection. **Veterinary Research**, v.36. p. 713-722, 2005.

CARVALHO, M. B. Semiologia do Sistema Urinário. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 393-397.

CAVALCANTE, L. F. H.; NEUWALD, E. B.; MELLO, F. P. S.; LACERDA, L. A.; OLIVEIRA, S. T.; MARQUES, J. M. V.; PÖPPL, A.G. Síndrome nefrótica em cão associada à *Babesia canis*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 335-338, 2006.

CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e gato**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p.145-148.

CHIDEROLI, R. T.; BRACARENSE, A. P. F. L.; PADOVANI, L.; MARTINS, L. A.; GONÇALVES, D. D.; FREITAS, J. F. Leptospirose canina associada à insuficiência renal aguda - Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 1, p. 79-84, 2016.

CIANCIOLO, R.; HOKAMP, J.; NABITY, M. Advances in the evaluation of canine renal disease. **The Veterinary Journal**, v. 215, p. 21-29, 2016.

CLEMO, F. A. S. Urinary Enzyme Evaluation of Nephrotoxicity in the Dog. **Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 29-32, 1998.

COLVIELE, J. **Procedimentos Laboratoriais para técnicos veterinários**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 94-95.

CONTIN, C. M.; COELHO, S. B.; OLIVEIRA, J. R.; OLIVIO, M. B.; VIEIRA, M. R.; BAGLIOTTI, C. M. F.; CRIVELLENTI, L. Z.; CRIVELLENTI, S. B.; SANTANA, A. E. Proteínas de Fase Aguda: Revisão de Literatura. **Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n.2, p. 73-76, 2015.

COTER, S. M. Anemia Arregenerativa. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1902-1915.

COWELL, R. L. **Veterinary clinical pathology secrets**. United States of America: Elsevier Mosby, 2004. p. 146-154.

D'AMICO, G.; BAZZI, C. Pathophysiology of proteinuria. **Kidney International**, v. 63, p. 809-825, 2003.

DE NARDI, A. B.; RODASKI, S.; SOUSA, R. S.; COSTA, T. A.; MACEDO, T. R.; RODIGHIERI, S. M.; RIOS, A.; PIEKARZ, C. H. Prevalência de neoplasias e modalidades de tratamentos em cães, atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15-26, 2002.

DEVUYST, O.; DAHAN, K.; PIRSON, Y. Tamm–Horsfall protein or uromodulin: new ideas about an old molecule. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, p.1290-1294, 2005.

DIBARTOLA, S. P. Abordagem Clínica e Laboratorial da doença renal. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1687-1701.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117-150.

EDELWEISS, M. I. A.; MEINE, M. H. M. M.; SCROFERNEKER, M. L. Importância do sistema do complemento em Nefrologia. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 19, n. 1, p. 32-41, 1997.

ELIAS, F.; LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; KOGIKA, M. M.; MIRANDOLA, R. M. S. Fragilidade osmótica eritrocitária em gatos acometidos por hepatopatias e gatos com insuficiência renal. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 413-418, 2004.

ELLIOTT, J. WATSON, A. D. J. Overview of the IRIS staging system for CKD (revised 2016). In: **INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY–IRIS**. Sydney: 2016. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/education/staging_system.html. Acesso em: 12 out. 2017.

FIGHERA, R. A.; SOUZA, T. M.; SILVA, M. C.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Causas de morte e razões para eutanásia de cães da Mesorregião do Centro Ocidental Rio-Grandense (1965-2004). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 223-230, 2008.

FINCO, D. R. Applied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C. A., FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: William & Wilkins, 1995. p. 29-48.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using Protein Chip analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, p. 271-277, 2004.

FREITAS, G. C.; VEADO, J. C. C.; CARREGARO, A. B. Testes de avaliação de injúria renal precoce em cães e gatos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 1, p. 411-426, 2014.

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

GHYS, L.; PAEPE, D.; SMETS, P.; LEFEBVRE, H.; DELANGHE, J.; DAMINET, S. CYSTATIN C: A New Renal Marker and Its Potential Use in Small Animal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p. 1152-1164, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D; CARVALHO, V.; MÖLLER, V. A.; DUARTE, F. R. Perfil Bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n. 1, p. 1-6, 2001.

GRAUER, G. F. Early Detection of Renal Damage and Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.35, p. 581-596, 2005.

GRAUER, G. F. Insuficiência renal aguda e doença renal crônica. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 648-662.

GRAUER, G. F. Treatment guidelines for chronic kidney disease in dogs & cats: International Renal Interest Society Recommendations. **Today's Veterinary Practice**, v.7, n.1, p.41-53, 2017.

GREEN, P. H.; GLICKMAN, R. M.; RILEY, J. W.; QUINET, E. Human apolipoprotein A-IV. Intestinal origin and distribution in plasma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 65, n. 4, p. 911-919, 1980.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n.11, p.1045-1056, 2005.

HALL, J. A.; YERRAMILI, M.; OBARE E.; YERRAMILI, M.; ALMES, K.; JEWELL, D. E. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p.794-802, 2016.

HENNEMANN, C. R. A.; SILVA, C. F.; SCHOENAU, W.; KOMMERS, G. D.; POLYDORO, A. S.; LEITZKE, M. R. M. Atividade da gama glutamil transpeptidase urinária, dosagens séricas de ureia e creatinina como meios diagnósticos auxiliares na nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeo em cães. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p.237-244, 1997.

HOKAMP, J. A.; CIANCIOLO, R. E.; BOGGESE, M.; LEES, G. E.; BENALI, S. L.; KOVARSKY, M.; NABITY, M. B. Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, p. 591-601, 2016.

HOKAMP, J. A.; LEIDY, S. A.; GAYNANOVA, I.; CIANCIOLO, R. E.; NABITY, M. B. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, p.425-434, 2018.

HOKAMP, J. A.; NABITY, M. B. Renal biomarkers in domestic species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 28-56, 2016.

HSU, W. L.; LIN, Y. S.; HU, Y. Y.; WONG, M. L.; LIN, F. Y.; LEE, Y. J. Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin in dogs with naturally occurring renal diseases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p.437-442, 2014.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). **IRIS Staging of CKD (modified 2017)**. Sydney: 2017. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf. Acesso em: 01 ago. 2018.

JABS, W. J.; LOGERING, B. A.; GERKE, P.; KREFT, B.; WOLBER, E. M.; KLINGER, M. H. F.; FRICKE, L.; STEINHOFF, J. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. **European Journal of Immunology**, v. 33, p.152-161, 2003.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of pharmacy and bioallied sciences**, v. 3, n. 1, p. 118-127, 2011.

JILLINGS, E. K. P.; SQUIRES, R. A.; AZARPEYKAN, S.; LOPEZ-VILLALOBOS, N. Does blood contamination of urine compromise interpretation of the urine protein to creatinine ratio in dogs? **New Zealand Veterinary Journal**, v. 67, p.74-78, 2019.

KELLER, A.; NESVIZHSHKII, A. I.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5383-5392, 2002.

KIKUCHI, E. S. C. **Glomerulopatias secundárias à Ehrlichiose Monocítica Canina Crônica**. 2015. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Saúde Pública) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2015.

KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 1160- 1245.

KRONENBERG, F.; STÜHLINGER, M.; TRENKWALDER, E. GEETHANJALI, F. S.; PACHINGER, O.; VON ECKARDSTEIN, A.; DIEPLINGER, H. Low apolipoprotein A-IV plasma concentrations in men with coronary artery disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 36, n. 3, p. 751-757, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEES, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, n. 4, p. 867-885, 2004.

LEES, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; VADEN, S. L. Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 377-385, 2005.

LINGENHEL, A.; LHOTTA, K.; NEYER, U.; HEID, I. M.; RANTNER, B.; KRONENBERG, M. F.; KONIG, P.; VON ECKARDSTEIN, A.; SCHOBER, M.; DIEPLINGER, H.; KRONENBERG, F. Role of the kidney in the metabolism of apolipoprotein A-IV: influence of the type of proteinúria. **The Journal of Lipid Research**, v. 20, p. 2071-2079, 2006.

LIMA, J. J. G. Dislipidemia na doença renal crônica. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 17, n. 1, p. 60-65, 2007.

LUSTOZA, M. D.; KOGIKA, M. M. Tratamento da insuficiência renal crônica em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária: Pequenos Animais e Animais de Estimação**, Curitiba, v.1, n.1, p.62-69, 2003.

MAFRA, D. **Anemia na insuficiência renal crônica e suas implicações na distribuição de zinco corporal**. 2001. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Zinco protoporfirina como parâmetro de deficiência de ferro na insuficiência renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 22, n. 3, p. 152-156, 2000.

MATTA, G. C. Da doença renal ao renal crônico. **PHYSIS: Revista de saúde Coletiva**, v.10, n.1, p. 65-70, 2000.

MENESES, T. D. **Diagnóstico Precoce de Insuficiência Renal em Cães**. 2011. Seminário (Disciplina Seminários Aplicados do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiás, 2011.

MEUTEN, D. Laboratory Evaluation and Interpretation of the Urinary System. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2th ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2012. p. 323-377.

MIHAI, S.; CODRICI, E.; POPESCU, I. D.; ENCIU, A. M.; ALBULESCU, L.; NECULA, L. G.; MAMBET, C; ANTON, G.; TANASE, C. Inflammation-Related Mechanisms in Chronic Kidney Disease Prediction, Progression, and Outcome. **Journal of Immunology Research**, p. 1-16, 2018.

MONTI, P.; BENCHEKROUN, G; BERLATO, D.; ARCHER, J. Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. **Journal of Small Animal Practice**, v.53, p. 254-259, 2012.

MORITA, Y.; NOMURA, A.; YUZAWA, Y.; NISHIKAWA, K.; HOTTA, N.; SHIMIZU, F.; MATSUO, S. The Role of Complement in the Pathogenesis of Tubulointerstitial Lesions in Rat Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 9, p. 1363-1372, 1997.

MOYES, C. D; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 496-514.

MUNDIM, E. C. S.; FRANCISCO, M. M. S.; SOUZA, J. N.; ALENCA, M. A. G.; RAMALHO, P. C. D. Incidência de hemoparasitoses em cães (*Canis familiaris*) de rua capturados pelo Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência**, v. 12, n. 2, p. 107-115, 2008.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168. n. 1, p. 28-40, 2004.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; BOGGESS, M. M.; YERRAMILI, M.; OBARE, E.; YERRAMILI, M.; RAKITIN, A.; AGUIAR, J.; RELFORD, R. Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 1036-1044, 2015.

NAIGAMWALLA, D. Z.; WEBB, J. A.; GIGER, U. Iron deficiency anemia. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, p. 250-256, 2012.

NESVIZHSKII, A. I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 17, p. 4646-4658, 2003.

NEVES, P. L. **Inflamação na doença renal crônica**. 2008. Tese (Doutorado em Nefrologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2008.

NIVY, R.; AVITAL, Y.; AROCH, I.; SEGEV, G. Utility of urinary alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase in diagnosing acute kidney injury in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 220. p. 43-47, 2017.

NÓBREGA, K. Q. **Estudo das principais doenças infecciosas em cães atendidos no hospital veterinário da universidade de Brasília entre 2011 e 2014**. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

OBURAI, L. N.; VAIKUNTA RAO, V.; NAIK, B. R. Clinical and nephrosonographic findings in canine chronic renal failure: a prospective study. **Journal of Agriculture and Veterinary Science**, v. 8, n. 6, p. 11-16, 2015.

O'NEILL, D. G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D. B.; MCGREEVY, P. D.; THOMSON, P. C.; BRODBELT, D. C. Chronic Kidney Disease in Dogs in UK Veterinary Practices: Prevalence, Risk Factors, and Survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p.814-821, 2013.

POLZIN, D. J. Diagnosing and Staging Kidney Disease in Dogs and Cats. In: **Chicago Veterinary Medical Association**, Chicago, 2008. Disponível em: <https://www.chicagovma.org/wp-content/uploads/2014/06/Nephrology-2008.pdf>. Acesso em: 15 out. 2017.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. Pathophysiology of renal failure and uremia. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. p.335-367.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; JACOB, F.; ROSS, S. Insuficiência Renal Crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 4. ed. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 1721-1732.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; JACOB, F.; ROSS, S. Insuficiência Renal Crônica. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1721-1749.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. 8th ed. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4693-4734.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 710-715, 2011.

RAJ, D. S.; PECOITS-FILHO, R.; KIMMEL, P. L. Inflammation in Chronic Kidney Disease. In: KIMMEL, P. L.; ROSENBERG, M. E. **Chronic Renal Disease**, Academic Press, p. 199-212, 2015.

REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 67-96.

ROMERO, F.R. **Apostila de Nefrologia UFPR**. Paraná: UFPR, 2015.

ROURA, X. Risk factors in dogs and cats for development of chronic kidney disease (2016). In: **INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY–IRIS**. Sydney: 2016. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/education/risk_factors.html. Acesso em: 27 jun. 2019.

ROURA, X.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. Proteinuria. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; WESTROPP, J. L. **BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology**. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 2017. p.50-59.

SASAKI, K.; ZHIYOUNG, A.; KHATLANI, T. S.; OKUDA, M.; INOKUMA, H.; ONISHI, T. Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.65, p.545-548, 2003.

SCHNEIDER, S. M.; CIANCIOLO, R. E.; NABITY, M. B.; CLUBB JR, F. J.; BROWN, C. A.; LEES, G. E. Prevalence of Immune-Complex Glomerulonephritides in Dogs Biopsied for Suspected Glomerular Disease: 501 Cases (2007–2012). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.27, p.67–75, 2013.

SEGERER, S.; NELSON, P. J. Chemokines in Renal Diseases. **The Scientific World Journal**, v. 5, p. 835-844, 2005.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLIS, J.; OLSEN, J. V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856-2860, 2006.

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**. v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, M. L.; COSTA, C. L.; CINTRA, C. A.; SOUZA, G. C.; RIBEIRO, G. F.; HEITOR, T. F.; NASCIMNETO, M. R.; MAGALHÃES, L. F.; CRIVELLENTI, L. Z. Alterações glomerulotubulares em cães infectados por *Ehrlichia Canis*. **Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n. 6, p. 17-21, 2015.

SMETS, P. M. Y.; MEYER, E.; MADDENS, B. E. J.; DUCHATEAU, L.; DAMINET, S. Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 65-72, 2010.

SQUIRES, R. A. Uraemia. In: BAINBRIDGE, J.; ELLIOTT, J. **Manual of canine and feline nephrology and urology**. Iowa: Iowa State University Press, 1996. p. 52-65.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. Iowa: Iowa State Press, 2002. p. 289-308.

SYME, H. M.; JEPSON, R. Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. 8th ed. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4603-4649.

TREVISI, M.; MOSCATI, L.; AMADORI, M. Disease-Predicting and Prognostic Potential of Innate Immune Responses to Noninfectious Stressors: Human and Animal Models. In: AMADORI, M. **The Innate Immune Response to Noninfectious Stressors: Human and Animal Models**. Amsterdam: Elsevier, Academic Press, 2016. p. 209-235.

TORRES, M. M.; CRUZ, F. A. C. S.; SILVA, E. S.; POLETTO, D.; CAYUELA, M. A. A.; MENDONÇA, A. J.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SOUSA, V. R. F. Relation between anaemia and bone marrow features and serum erythropoietin in dogs with chronic kidney disease. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 6, p. 598-602, 2017.

VIANNA, H. R.; SOARES, C. M. B. M.; TAVARES, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; SILVA, A. C. S. Inflamação na doença renal crônica: papel de citocinas. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p. 351-364, 2011.

VIENTÓS-PLOTTS, A. I.; BEHREND, E. N.; WELLES, E. G.; CHEW, D. J.; GAILLARD, P. R.; BUSLER, J. N.; LEE, H. P. Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine

samples from dogs and cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 79, n. 5, p. 525-531, 2018.

WEHNER, A.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGER, J. Utility of Serum Cystatin C as a Clinical Measure of Renal Function in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 44, p. 131-138, 2008.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; DURÁN, E.; GONZÁLEZ, M.; MAÑÉ, M. C. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, v.34. p. 137-151, 2003.

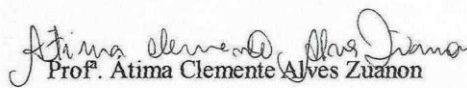
ANEXO I

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 94/2017, intitulado **“Proteinograma sérico por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) em caninos com doença renal crônica”**, coordenado pelo professor Leandro Abreu da Fonseca do Departamento de Veterinária, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 20/02/2018, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 94/2017, named **“Serum proteinogram by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in canines with chronic renal disease”**, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 20, 2018 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon
Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____,
portador de RG nº _____, telefone: _____,
endereço _____,
tutor / responsável pelo animal _____,
espécie _____, raça _____, sexo _____,
registrado no HVT sob o número _____, autorizo a participação do animal
como sujeito de pesquisa para fins científicos pelo Hospital Veterinário da
Universidade Federal de Viçosa.

Após esclarecimentos prévios, estou ciente da participação do animal no projeto,
**“Proteinograma sérico por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-
PAGE) em caninos com doença renal crônica”**, assim como a utilização dos
resultados dessa pesquisa em publicação de artigos científicos e divulgação em eventos
científicos. Para fins de publicações e apresentações científicas, a identidade do
proprietário e do animal serão preservadas. Este estudo foi aprovado pela Comissão
de Ética no Uso de Animais CEUA/UFV sob o protocolo nº _____.

Informo que a qualquer momento poderei suspender a participação do animal na
pesquisa e que caso isso ocorra, o animal não sofrerá prejuízos em seu tratamento ou
retorno a esta instituição. Estou ciente que não serei gratificado monetariamente e que
não receberei qualquer outro benefício pela participação na pesquisa.

Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também
poderei esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável.

Fui informado dos riscos ao animal específicos à realização do estudo em si e que
todos os procedimentos serão realizados sob supervisão Médico Veterinário.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações dos profissionais do HVT-
UFV durante e após a utilização do animal e, caso haja qualquer dano ao animal
referente ao não cumprimento dessas recomendações, não responsabilizarei o HVT-
UFV, tampouco seus servidores e estudantes, pelo evento.

Assinatura do Proprietário

ANEXO III

ANÁLISES REALIZADAS NO SANGUE

GRUPOS	PT	GLOBULINA	COMPLEMENTO C3 (116,99)	TRANSFERRINA (82,80)	ALBUMINA (65,46)	ALFA 1 ANTITRIPSINA (55,68)	IGG (50,12 e 28,77)	APOLIPOPROTEINA A4 (40,76)	HAPTOGLOBINA (36,25)	GLICOPROTEINA ACIDA (33,96)	PENTAXINA (25,79)	CREATININA	VG
Creatinina < 1,5 e relação proteína: creatinina urinária < 1,0	5,6	2,8	144,5	764,7	2850,0	628,3	2443,6	242,0	623,4	316,9	162,0	0,9	47,3
	6,1	3,3	94,7	784,8	2820,0	756,4	3836,2	319,4	655,7	314,8	358,2	0,6	48,6
	6,4	3,6	146,9	996,0	2840,0	636,4	4850,8	222,9	561,3	552,3	486,0	1,0	42,1
	5,9	2,8	150,2	887,8	3090,0	514,8	2020,9	274,6	667,8	187,4	178,1	1,0	48,5
	6,5	3,1	265,7	1388,8	3400,0	694,3	3734,6	224,3	786,4	551,4	326,3	0,8	40,2
	5,9	2,9	134,0	525,4	2960,0	579,0	2391,0	140,6	515,2	302,9	163,2	1,4	37,8
	7,6	4,3	61,1	1194,4	3290,0	532,6	1914,7	141,2	561,4	170,1	120,3	0,9	43,1
Creatinina > 1,5 e relação proteína: creatinina urinária ≥1,0 < 2,0	6,0	3,1	74,5	1195,3	2900,0	673,2	2212,3	244,9	1120,6	262,8	132,2	1,5	37,6
	5,3	2,7	32,3	475,6	2620,0	472,3	2460,2	142,4	309,0	193,8	202,2	1,5	42
	7,1	4,1	111,7	1208,1	3000,0	628,5	4176,2	122,2	710,9	449,2	110,3	1,6	46,2
	7,8	4,7	64,5	680,2	3090,0	457,2	2626,7	184,5	392,4	302,8	247,3	1,7	42
	4,9	2,4	86,9	497,0	2520,0	754,4	2825,5	130,8	911,7	145,4	192,2	1,6	21
Creatinina > 1,5 e relação proteína: creatinina urinária ≥ 2,0	6,1	3,4	226,1	705,1	2730,0	626,6	3398,1	158,5	567,3	279,9	205,9	3,0	25,7
	6,8	5,1	82,5	367,6	1670,0	232,2	4022,8	141,3	622,3	468,2	335,3	3,9	25,6
	6,5	3,3	154,7	534,8	3200,0	482,5	1583,3	81,6	984,9	208,0	166,9	3,2	36
	6,3	4,6	69,1	461,3	1690,0	602,4	3317,5	79,4	654,9	159,9	409,8	2,6	17
	5,4	3,0	213,4	770,6	2370,0	807,7	2913,9	116,5	499,2	227,4	99,3	2,3	43
	6,4	3,6	128,1	814,2	2790,0	346,6	3272,4	268,4	532,1	317,6	285,6	4,9	44
	5,61	3,9	73,0	357,5	1740,0	385,4	2656,6	82,1	600,2	239,3	229,5	6,4	22,5
	8,1	6,2	184,7	560,6	1910,0	469,1	3463,3	116,4	1267,8	442,4	494,7	5,2	36,6
	6,4	3,7	40,9	311,2	2680,0	374,5	2476,7	117,9	113,4	198,9	295,7	6,4	37,4
	5,8	3,2	124,2	886,0	2650,0	630,5	1875,7	106,2	540,0	171,3	44,4	7,4	13
	6,9	4,4	262,3	467,4	2490,0	366,1	2530,3	91,9	938,0	248,1	95,4	8,5	52,3
	4,5	2,9	683,2	490,8	1620,0	609,9	3153,8	261,8	1407,1	227,5	397,2	5,1	34

ANEXO IV

ANÁLISES REALIZADAS NA URINA

GRUPOS	ESCORE DE LESÃO GLOMERULAR (0-3)	ESCORE DE LESÃO TUBULAR (0-4)	CARACTERIZAÇÃO DA LESÃO	DENSIDADE	PROTEÍNA URINÁRIA	CREATININA URINÁRIA	RELAÇÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA
Creatinina < 1,5 e relação proteína:creatinina urinária < 1,0	0	0	Controle	1,050	161,1	449,8	0,4
	1	0	Glomerular	1,050	186,2	485,0	0,4
	0	0	Controle	1,050	148,0	362,3	0,4
	0	0	Controle	1,032	136,6	263,8	0,5
	0	0	Controle	1,048	247,0	449,8	0,6
	0	0	Controle	1,050	242,2	355,8	0,7
	1	1	Ambos	1,018	67,4	75,8	0,9
Creatinina > 1,5 e relação proteína:creatinina urinária ≥1,0 < 2,0	1	0	Glomerular	1,015	65,6	93,5	0,7
	2	4	Ambos	1,016	282,2	154,3	1,8
	0	2	Tubular	1,015	84,1	61,1	1,4
	2	1	Ambos	1,016	230,3	47,5	4,8
	2	1	Ambos	1,012	420,0	83,3	5,0
Creatinina > 1,5 e relação proteína:creatinina urinária ≥ 2,0	2	4	Ambos	1,012	214,7	68,4	3,1
	0	2	Tubular	1,016	264,4	74,8	3,5
	0	4	Tubular	1,010	250,6	35,0	7,2
	2	4	Ambos	1,010	102,0	51,0	2,0
	2	1	Ambos	1,017	287,4	84,0	3,4
	2	4	Ambos	1,014	132,4	114,6	1,2
	2	4	Ambos	1,014	43,3	34,9	1,2
	2	3	Ambos	1,016	263,4	39,8	6,6
	3	4	Ambos	1,010	180,6	76,5	2,4
	2	4	Ambos	1,007	96,7	35,8	2,7
	1	4	Ambos	1,007	232,1	36,5	6,4
	2	4	Ambos	1,010	207,7	60,8	3,4