FERNANDA CHICHARO CHACAR

**Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D
e ao retinol, e de Tamm-Horsfall, em cães com
doença renal crônica**

São Paulo
2015

FERNANDA CHICHARO CHACAR

Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D e ao retinol, e de Tamm-Horsfall, em cães com doença renal crônica

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Márcia Mery Kogika

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3206
FMVZ

Chacar, Fernanda Chicharo
Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D e ao retinol, e de
Tamm-Horsfall, em cães com doença renal crônica / Fernanda Chicharo Chacar. --
2015.
128 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Márcia Mery Kogika.

1. Cães. 2. Proteinúria. 3. Biomarcadores. 4. Eletroforese. 5. Western blotting.
I. Título.

São Paulo, 25 de fevereiro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação urinária das proteínas ligada a vitamina D e ligada ao retinol em cães com doença renal crônica", protocolado sob o CEUA nº 1383161014, utilizando 40 Cães (20 machos e 20 fêmeas), sob a responsabilidade de Márcia Mery Kogika, foi aprovado na reunião de 25/02/2015, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Evaluation of urinary vitamin D-binding protein and urinary retinol-binding protein in dogs with chronic kidney disease", protocol number CEUA 1383161014, utilizing 40 Dogs (20 males and 20 females), under the responsibility Márcia Mery Kogika, was approved in the meeting of day 02/25/2015, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CHACAR, Fernanda

Título: Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D e ao retinol, e de Tamm-Horsfall, em cães com doença renal crônica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: 23/09/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Márcia Mery Kogika_____

Instituição:___FMVZ-USP_____ Julgamento: _aprovada_____

Prof. Dr. Lucia da Conceição Andrade_____

Instituição:___FM-USP_____ Julgamento: _aprovada_____

Prof. Dr. _Maria Cristina Nobre e Castro _____

Instituição: _FV-UFF _____ Julgamento: _aprovada_____

DEDICATÓRIA

À Marília Chacar, ao Jorge Chacar, ao Amyr Chacar e ao Paulo Bogossian.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela boa saúde.

Aos meus pais, Marília Chacar e Jorge Chacar, por nunca medirem esforços para proporcionarem, à mim e ao meu irmão, a melhor formação, e por todo amor dedicado à nossa família. Ao Amyr Chacar, pela amizade e pela compreensão de minha ausência em momentos importantes.

Ao Paulo Bogossian, por todo o companheirismo ao longo destes quase dez anos, e por todo o incentivo e motivação. Estendo estes agradecimentos à sua família, da qual já me sinto parte.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marcia Mery Kogika, por esta preciosa oportunidade e pelo carinho com que me acolheu nesta casa, que é a Universidade de São Paulo (USP), e por toda a confiança. Certa vez, ao ler Paulo Freire, este trecho muito me fez lembrá-la, e diz o seguinte: “(...) para ela, a prática docente de ensinar jamais foi transferência de conhecimento aos alunos...ao contrário, para ela, ensinar é uma aventura criadora”. Agradeço humildemente toda a sua generosidade, muito obrigada.

Aos amigos de pós-graduação, Cinthia Martorelli e Douglas Caragelasco; à Cinthia, por todos os ensinamentos e pela preciosa ajuda na seleção e na condução dos casos deste projeto durante a rotina clínica; ao Douglas, por todo o conhecimento compartilhado e pela ajuda inestimável e imprescindível para a execução da técnica de eletroforese, importante parte deste estudo. Ao Dr. Luciano Giovaninni, uma grande inspiração dentro de nossa equipe, obrigada pelos conselhos e orientações.

À Profa. Dra. Lúcia Andrade, por abrir as portas do laboratório de Pesquisa Básica em Nefrologia (LIM-12, FMUSP) com tamanha generosidade, e por toda a atenção, e em especial, à Dra. Thalita Rojas, por todos os ensinamentos, os quais foram compartilhados com tanto carinho e paciência, e pela inestimável contribuição na execução da técnica de *Western Blotting*.

Às medicas veterinárias do Serviço de Clínica Médica do HOVET-FMVZ/USP, Denise Simões, Bruna Coelho, Vera Wirth, Khadine Kanayama e Andréa Andrade, e

aos enfermeiros Gilberto Pereira, Carlito dos Santos, Milton Gregório e Antônio Malaquias, por toda a colaboração e ensinamentos.

Às funcionárias do Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica do HOVET/FMVZ-USP, em especial, à Clara Mori, Cláudia Stricagnolo e Marli Elisabete Ferreira de Castro, pela colaboração nos exames e nas técnicas laboratoriais.

À Profa. Dra. Tatiana Chalfun Guimarães, por toda a confiança e incentivo.

À Dra. Andreza Conti Patara, por todas as oportunidades e ensinamentos.

Aos tutores dos cães utilizados neste estudo, por permitirem a participação de seus animais.

À CAPES, pela bolsa auxílio.

À FAPESP pelo auxílio financeiro do Projeto Temático, Processo nº 2010/19012-0.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram, muito obrigada.

“Tenho o privilégio de não saber quase tudo. E isso explica o resto.”

(Manoel de Barros)

RESUMO

CHACAR, F. C. **Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D e ao retinol, e de Tamm-Horsfall, em cães com doença renal crônica.** [Evaluation of urinary albumin, urinary vitamin D-binding protein, urinary retinol-binding protein, and Tamm-Horsfall in dogs with chronic kidney disease]. 2015. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A proteína ligada à vitamina D (VDBP) é a principal responsável pelo transporte dos metabólitos da vitamina D e a sua presença na urina pode indicar lesão tubulointersticial, conforme observado em ratos e humanos. A determinação urinária da proteína ligada ao retinol (RBP), responsável por carrear o retinol do fígado para os tecidos periféricos, por sua vez, está associada à fibrose intersticial dos rins. A albuminúria pode estar relacionada a lesões glomerulares e/ou tubulares (não reabsorção). A proteína de Tamm-Horsfall (THP) normalmente é observada na urina, sendo sintetizada exclusivamente pelas células epiteliais da alça de Henle e do túbulo contornado distal, entretanto quando não detectada, pode indicar lesão nestes segmentos do néfron e/ou diminuição do número de néfrons. Em cães, há poucos estudos sobre as referidas proteínas na urina, especialmente nos casos de doença renal crônica (DRC). A hipótese deste estudo seria de que a avaliação da razão proteína:creatinina urinária (RPC) em cães com DRC *per si* não forneceria informações suficientes, pois não identificaria os segmentos dos néfrons comprometidos, mas que a determinação de proteínas específicas, pela análise conjunta da eletroforese e do *Western blotting*, sinalizariam a presença de lesões glomerulares e/ou tubulares, e que a THP poderia estar ausente ou presente em menor intensidade nos estágios avançados da DRC, indicando lesão tubular distal e/ou perda importante do número de néfrons. O presente estudo objetivou avaliar a presença de albumina, VDBP, RBP e THP na urina de cães com DRC, nos estágios 1 ao 4 (IRIS), pela análise conjunta da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting*. O total de 49 cães compuseram os grupos: grupo C – clinicamente normal (n= 9), grupo E1 (estágio 1; n=10), grupo E2 (estágio 2; n=10), grupo E3 (estágio 3; n=10) e grupo E4 (estágio 4; n=10). Houve o predomínio de bandas de proteínas de baixo peso molecular (PM <60kDa) em todos os grupos de cães com DRC (E1, E2, E3 e E4), e especificamente para o grupo E4 que

apresentava média da RPC de 4,37 e, portanto, esperar-se-ia o predomínio de proteínas de alto PM (PM > 60kDa). Neste grupo, além da imunodeteção da albumina, também foi identificada, em grande intensidade, proteínas de baixo PM (VDBP e RBP). No grupo E3 também foram imunodetectadas a VDBP e RBP, com média da RPC de 1,51 e de 3 a 7 bandas de proteínas de baixo PM. Ainda, a imunodeteção da VDBP e RBP foi constatada nos estágios iniciais (E1 e E2) da DRC frente a valores da RPC normais (não proteinúricos), sendo este achado considerado como marcador precoce de lesão renal. A VDBP e RBP não foram identificadas em cães clinicamente normais. A menor intensidade de imunodeteção da THP nos estágios mais avançados pode sugerir mau prognóstico. Conclui-se que o valor da RPC *per si* não foi capaz de indicar a origem da proteinúria, se glomerular e/ou tubular, sendo necessário, portanto, a análise conjunta da eletroforese (PM) e do *Western blotting* (albumina, VDBP, RBP e THP) e que, assim, permitiu identificar o segmento do néfron comprometido que acarretou na perda ou na diminuição urinária de proteínas.

Palavras-chave: Cães. Proteinúria. Biomarcadores. Eletroforese. *Western blotting*.

ABSTRACT

CHACAR, F. C. **Evaluation of urinary albumin, urinary vitamin D-binding protein, urinary retinol-binding protein, and Tamm-Horsfall in dogs with chronic kidney disease.** [Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D e ao retinol, e de Tamm-Horsfall, em cães com doença renal crônica]. 2015. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Vitamin D-binding protein (VDBP) is the main carrier of the Vitamin D metabolites and its presence in urine is associated with the development of tubulointerstitial injury, according to previous studies in rats and humans. Retinol-binding protein (RBP) carries retinol from liver to peripheral tissues, and its urinary detection is also associated with tubulointerstitial injury. Albuminuria suggests glomerular lesion, but also may indicate tubular dysfunction (impairment of reabsorption). The presence of Tamm-Horsfall protein (THP) is expected in the urine of clinically normal people and animals, because it is synthesized exclusively by the epithelial cells of the distal segment of nephron, and when it is not detected it may indicate distal tubular injury and/or massive nephrons loss. However in dogs, there are few studies about these urinary proteins especially in cases of chronic kidney disease (CKD). The hypothesis of the present study was to investigate that not only urinary protein-to-creatinine ratio (UPC) measurements would be enough to localize properly the injury to a specific nephron site, but also the evaluation of specific urinary proteins by electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting could provide information regarding to the presence of glomerular and/or tubular injury; in addition, less excretion of THP, or its absence in urine, could be associated with advanced stages of CKD. The aim of the present study was to evaluate albumin, VDBP, RBP e THP in the urine of 40 CKD dogs, on stages 1 to 4 (IRIS), by using of electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blotting. Forty-nine dogs were subdivided into: C group – healthy dogs (n= 9), E1 group (stage 1; n=10), E2 group (stage 2; n=10), E3 group (stage 3; n=10) e E4 group (stage 4; n=10). The predominance of low molecular weight proteins (MW < 60kDa) was detected in all CKD groups, mainly in E4 group that the mean of UPC was 4.37, and then it would be expected high MW proteins findings (MW >60 kDa). In fact, in E4 group, albumin was immunodetected, however low molecular weight proteins (VDBP and RBP) were also detected and in high intensity. VDBP and RBP

were also observed in E3 group (mean UPC = 1.51) and 3 to 7 bands of low molecular weight were detected. In the early stages of CKD (E1 and E2 groups), VDBP and RBP were also identified but UPC values were normal (non-proteinuric), which may suggest the role of these proteins as an early marker of renal injury. VDBP and RBP were not detected in healthy dogs. THP was observed in less intensity in the advanced stages of CDK that may suggest bad prognosis. In conclusion, UPC measurement per se was not able to indicate adequately the injury to a specific nephron site (e.g. glomerular and/or tubular), and therefore the additional information of electrophoresis (MW) and Western blotting (VDBP, RBP and THP) testing could allow the identification of the nephron site injured that caused loss (proteinuria) or decrease in urinary proteins.

Keywords: Dogs. Proteinuria. Biomarkers. Electrophoresis. Western blotting.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães clinicamente normais (grupo controle C – C#1 a C#10), demonstrando bandas de diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015.....	54
Figura 2 -	Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães no Estagio 1 (grupo E1 – E1#1 a E1#10), demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015.....	58
Figura 3 -	Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães no Estagio 2 (grupo E2 – E2#1 a E2#10), demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares, São Paulo – 2015.....	61
Figura 4 -	Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães no Estagio 3 (grupo E3 – E3#1 a E3#10), demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015.....	64
Figura 5 -	Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães no Estagio 4 (grupo E4 – E4#1 a E4#10), demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares, São Paulo – 2015.....	67
Figura 6 -	<i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da albumina - São Paulo – 2015.....	70
Figura 7 -	<i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da proteína ligada à vitamina D (VDBP) - São Paulo – 2015.....	72
Figura 8 -	<i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da proteína ligada ao retinol (RBP) - São Paulo – 2015.....	74
Figura 9 -	<i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da proteína de Tamm-Horsfall (THP) - São Paulo – 2015.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores individuais e estatística descritiva das concentrações séricas de creatinina (mg/dL) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015.....	49
Tabela 2 -	Valores individuais e estatística descritiva das concentrações séricas de uréia (mg/dL) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015.....	51
Tabela 3 -	Valores individuais e estatística descritiva da RPC dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015.....	53

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Perfis dos valores individuais de creatinina sérica (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	49
Gráfico 2 -	Perfis dos valores individuais de uréia sérica (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	51
Gráfico 3 -	Perfis dos valores individuais da RPC dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	53
Gráfico 4 -	Valores da RPC das Regiões A e B dos cães clinicamente normais (grupo controle – C), São Paulo - 2015.....	57
Gráfico 5 -	Valores da RPC das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no Estágio 1 (grupo E1), São Paulo - 2015.....	60
Gráfico 6	Valores da RPC das Regiões A e B dos cães dos cães doentes renais crônicos no Estágio 2 (grupo E2) - São Paulo – 2015.....	63
Gráfico 7 -	Valores da RPC das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no Estágio 3 (grupo E3) - São Paulo - 2015.....	66
Gráfico 8 -	Valores da RPC das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) - São Paulo - 2015.....	69
Gráfico 9 -	Análise da densitometria das bandas de albumina identificadas por meio de <i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo – 2015.....	71
Gráfico 10 -	Análise da densitometria das bandas de proteína ligada à vitamina D (VDBP) identificadas por meio de <i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	73
Gráfico 11 -	Análise da densitometria das bandas de proteína ligada ao retinol (RBP) identificadas por meio de <i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo	

controle – C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	75

Gráfico 12 -	Análise da densitometria das bandas de proteína de Tamm-Horsfall (THP) identificadas por meio de <i>Western Blotting</i> das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) - São Paulo - 2015.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (A, PM> 60 kDa; B, PM< 60 kDa), referentes aos cães clinicamente normais (grupo controle - C) - São Paulo – 2015.....	56
Quadro 2 -	RPC correspondente às porcentagens das bandas de proteínas por Regiões A (>60kDa) e B (<60 kDa) de cães clinicamente normais (grupo controle - C) - São Paulo – 2015.....	57
Quadro 3 -	Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (A, PM> 60 kDa; B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no Estagio 1 (grupo E1) - São Paulo – 2015.....	59
Quadro 4 -	RPC correspondente às porcentagens das bandas de proteínas por Regiões A (>60kDa) e B (<60 kDa) de cães doentes renais crônicos no Estagio 1 (grupo E1) - São Paulo – 2015.....	60
Quadro 5 -	Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (A, PM> 60 kDa; B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no Estagio 2 (grupo E2), São Paulo – 2015.....	62
Quadro 6 -	RPC correspondente às porcentagens das bandas de proteínas por Regiões A (>60kDa) e B (<60 kDa) de cães doentes renais crônicos no Estagio 2 (grupo E2) - São Paulo – 2015.....	63
Quadro 7 -	Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (A, PM> 60 kDa; B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no Estagio 3 (grupo E3) - São Paulo – 2015.....	65
Quadro 8 -	RPC correspondente às porcentagens das bandas de proteínas por Regiões A (>60kDa) e B (<60 kDa) de cães doentes renais crônicos no Estagio 3 (grupo E3) - São Paulo – 2015.....	66
Quadro 9 -	Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela	

	eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (A, PM> 60 kDa; B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) - São Paulo – 2015.....	68
Quadro 10 -	RPC correspondente às porcentagens das bandas de proteínas por Regiões A (>60kDa) e B (<60 kDa) de cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) - São Paulo – 2015.....	69
Quadro 11 -	Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de <i>western blotting</i> , dos cães clinicamente normais (grupo controle – C).....	79
Quadro 12 -	Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de <i>western blotting</i> , dos cães no Estágio 1 (grupo E1)	81
Quadro 13 -	Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de <i>western blotting</i> , dos cães no Estágio 2 (grupo E2).....	83
Quadro 14 -	Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de <i>western blotting</i> , dos cães no Estágio 3 (grupo E3).....	85
Quadro 15 -	Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de <i>western blotting</i> , dos cães no Estágio 4 (grupo E4).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACVIM	<i>American College of Veterinary Internal Medicine</i>
DRC	Doença renal crônica
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IRIS	<i>International Renal Interest Society</i>
PAdt	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistêmica
PAst	Pressão arterial sistólica
PM	Peso molecular
RBP	<i>Retinol-binding protein</i>
RPC	Razão proteína:creatinina urinária
RPC A	Razão proteína:creatinina urinária da Região A
RPC B	Razão proteína:creatinina urinária da Região B
SCr	Concentração sérica de creatinina
THP	<i>Tamm-Horsfall Protein</i>
VDBP	<i>Vitamin D-binding protein</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	24
2.2	PROTEINÚRIA	26
2.3	ALBUMINÚRIA	30
2.4	PROTEINA LIGADA À VITAMINA D (VDBP)	31
2.5	PROTEINA LIGADA AO RETINOL (RBP).....	33
2.6	PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL (THP)	34
3	HIPOTESE.....	37
4	OBJETIVOS.....	38
5	MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
5.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	39
5.2	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E REALIZAÇÃO DE EXAMES.....	39
5.2.1	Coleta de amostras de sangue.....	40
5.2.2	Determinações séricas de creatinina e ureia.....	40
5.2.3	Coleta de amostras de urina.....	40
5.2.4	Exame de urina	41
5.2.5	Urocultura	41
5.2.6	Determinação da concentração urinária de proteínas	41
5.2.7	Determinação da concentração de creatinina urinária.....	42
5.2.8	Determinação da razão proteína: creatinina urinária (RPC)	42
5.2.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas urinárias.....	43
5.2.10	Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D (VDBP) e ao retinol (RBP), e de Tamm-Horsfall (THP), por meio da técnica de <i>western blotting</i>	45
5.2.11	Exame ultrassonográfico abdominal.....	46
5.3	FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	47
6	RESULTADOS	48

6.1	MARCADORES DE FUNÇÃO RENAL SÉRICOS: CREATININA E UREIA.....	48
6.2	RAZAO PROTEÍNA: CREATININA URINARIA (RPC)	54
6.3	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS – PAGE) DE PROTEÍNAS URINÁRIAS	57
6.3.1	Razão proteína: creatinina urinária das Regiões A (PM >60kDa) e B (PM <60kDa)	57
6.4	<i>WESTERN BLOTTING</i> PARA A DETERMINAÇÃO URINARIA DAS PROTEINAS ALBUMINA, LIGADAS À VITAMINA D (VDBP) E AO RETINOL (RBP), E DE TAMM-HORSFALL (THP)	73
6.4.1	<i>Western blotting</i> para a determinação urinária de albumina.....	73
6.4.2	<i>Western blotting</i> para a determinação urinaria da proteína ligada à Vitamina D (VDBP)	75
6.4.3	<i>Western blotting</i> para a determinação urinaria da proteína ligada ao Retinol (RBP)	77
6.4.4	<i>Western blotting</i> para a determinação urinaria da proteína de Tamm-Horsfall (THP)	79
6.5	ANÁLISE INDIVIDUAL DA RAZÃO PROTEÍNA: CREATININA URINÁRIA, ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E <i>WESTERN BLOTTING</i> DE PROTEINAS URINÁRIAS	81
7	DISCUSSAO	91
8	CONCLUSÃO	102
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE	109

1 INTRODUÇÃO

A ocorrência de proteinúria está associada a altos índices de morbimortalidade e, desta forma, constitui um fator prognóstico negativo na doença renal crônica, além de contribuir para a progressão desta enfermidade, como já demonstrado em estudos prévios nas espécies humana, canina e felina. As características da proteinúria, como a origem, frequência e magnitude, também podem indicar a localização e a extensão da lesão renal, o que confere-lhe, ainda, o papel de biomarcador (JAFAR et al., 2001; JACOB et al., 2005; LEES et al., 2005; SYME et al., 2006; KING et al., 2007; BOYD et al., 2008; SYME et al., 2009; GRAUER, 2011; FRASER et al., 2014).

A detecção de microalbuminúria sinaliza previamente a presença de lesão renal e contribui, assim, para o diagnóstico precoce de nefropatia, e quando em maior magnitude, o que caracteriza a ocorrência de albuminúria, está associada à injúria glomerular e à progressão da doença renal crônica (GRAUER, 2005a; BACIC et al., 2010).

A identificação urinária da proteína ligada à vitamina D (VDBP), por sua vez, indica a presença de lesão tubular proximal e está relacionada ao desenvolvimento de fibrose intersticial, o que já foi descrito em ratos (MIRKOVIĆ et al., 2013). Estudos em humanos demonstraram ainda que a perda massiva desta proteína na urina, como nos casos de síndrome nefrótica, pode levar à deficiência de calcitriol, intimamente associada à progressão da doença renal crônica (YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

A proteína ligada ao retinol (RBP) também é considerada como um marcador de lesão tubular proximal, inclusive em cães e gatos, e sua determinação na urina de pacientes humanos com doença renal crônica está associada à fibrose tubulointersticial (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; PALLET et al., 2014).

A identificação da proteína de Tamm-Horsfall (THP), por outro lado, é esperada na urina de indivíduos clinicamente normais, e quando ausente, ou presente em menores concentrações, pode indicar a ocorrência de injúria renal localizada no segmento distal dos néfrons, uma vez que ela é exclusivamente sintetizada pelas células epiteliais dos ramos ascendentes delgados da alça de Henle e dos túbulos distais. Além disso, a redução do número de néfrons também

causaria a diminuição da quantidade da proteína de Tamm-Horsfall excretada na urina (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

A avaliação da proteinúria é realizada rotineiramente por meio de métodos quantitativos, a exemplo da determinação da razão proteína:creatinina urinária (RPC), a qual, apesar de mensurar a magnitude, não é capaz de definir quais seriam as proteínas presentes na urina, de forma que a utilização de métodos qualitativos seja necessária para a identificação destas proteínas, o que possibilitaria, por conseguinte, determinar a localização e a extensão da lesão renal, informações estas importantes para o prognóstico e a adequada instituição terapêutica (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; YALÇIN; ÇETIN, 2004; VADEN, 2011).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) constitui um método qualitativo de análise de proteínas em que estas são identificadas de acordo com o peso molecular (PM). Assim, as proteínas são classificadas como “proteínas de alto peso molecular”, caso o PM seja superior a 60 kDa, ou de “baixo peso molecular”, quando o PM for inferior a 60 kDa. A técnica de *Western blotting*, por sua vez, permite a identificação das proteínas urinárias por meio de anticorpos específicos, os quais se ligam a estas proteínas, o que possibilita o seu reconhecimento (ZARAGOZA et al., 2003; YANG; MA, 2009).

Ainda que sabidamente reconhecidas como biomarcadores de lesão tubular proximal e distal em humanos, poucas são as informações disponíveis acerca do papel das proteínas urinárias VDBP, RBP e THP em cães com nefropatia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Em 1827, o Dr. Richard Bright, cientista nascido em Londres, descreveu pela primeira vez uma grave enfermidade, cujos pacientes acometidos apresentavam, à ocasião da autópsia, rins de aspecto contraído e granular. Àquela época, esta afecção foi então apelidada de “doença de Bright”, denominação que perdurou por mais de 100 anos, e que foi posteriormente substituída por insuficiência renal crônica, até recentemente, quando a designação doença renal crônica (DRC) foi instituída (ZATZ, 2011).

A DRC é caracterizada por alterações estruturais e/ou funcionais presentes em um ou ambos os rins, persistentes por três meses ou mais, de forma que haja lesão irreversível e, portanto, perda permanente do número de néfrons (POLZIN, 2011).

A prevalência da DRC na espécie canina varia consideravelmente de acordo com a população avaliada. Em 1986, a prevalência de doença renal crônica em cães encontrada em um estudo multicêntrico realizado em Londres, por Macdougall et al. (1986), foi de 0,05%. Anos mais tarde, em 2013, um novo estudo multicêntrico e prospectivo, o qual abrangeu 89 instituições do Reino Unido, verificou a prevalência de 0,37%. Já na República Tcheca, a prevalência de doença renal crônica observada, de acordo com o estudo de Sosnar et al., 2003, foi aproximadamente dez vezes maior, isto é, correspondeu a 3,74%, e a taxa de mortalidade foi de 76,6% (MACDOUGALL et al., 1986; SOSNAR et al., 2003; O'NEILL et al., 2013).

A DRC acomete mais frequentemente animais idosos, embora possa ocorrer em qualquer faixa etária. No Centro Veterinário da Universidade de Minnesota, mais de 10% dos cães acima de 15 anos são diagnosticados com doença renal crônica (BARTGES, 2012). No Reino Unido, 63,6% da população avaliada no estudo previamente citado apresentava mais de 12 anos à ocasião do diagnóstico (O'NEILL et al., 2013). No Brasil, em um estudo retrospectivo realizado no HOVET/FMVZ-USP, com 191 cães com doença renal crônica, verificou-se que a maioria destes animais encontrava-se acima dos 7 anos de idade, e ainda, que dentre os animais

de raça definida, o Cocker Spaniel foi a mais comumente acometida (NOTOMI et al., 2006).

Segundo O'Neill et al. (2013), a raça Cocker Spaniel constitui fator de risco para o desenvolvimento de doença renal crônica, além da idade avançada. Neste mesmo estudo, também foi observada alta prevalência desta enfermidade entre as raças Yorkshire Terrier, Jack Russell Terrier e West Highland White Terrier (O'NEILL et al., 2013).

Quanto à etiologia, a DRC pode ter origem congênita, familiar ou adquirida. Quando congênita, está presente ao nascimento e embora menos comum do que a adquirida, é considerada uma causa frequente de doença renal crônica em cães. Muitas enfermidades congênitas são hereditárias e ocorrem entre parentes, ou seja, apresentam caráter familiar, tais como amiloidose renal, displasia renal, doença renal policística, afecções da membrana basal glomerular e tubulopatias, a exemplo da síndrome de Fanconi (LEES, 1996; GRECO, 2001).

Quanto às causas adquiridas, a DRC apresenta etiologia multifatorial e, desta forma, pode ter origem glomerular (glomerulopatias decorrentes do diabetes mellitus, hipercortisolismo, piometra, erliquiose e leishmaniose), tubular (nefrotoxinas, e eventos inflamatórios e isquêmicos), intersticial (nefrolitíase, leptospirose) e vascular (diabetes mellitus) (JERICÓ; ANDRADE NETO; KOGIKA, 2015).

Dentre as demais causas de doença renal crônica em cães ainda pode-se citar pielonefrite crônica, hipercalcemia, uropatia obstrutiva crônica, neoplasia e hipertensão arterial sistêmica (CHEW; DIBARTOLA; SCHENK, 2011).

Atualmente, além dos fatores mecânicos/hemodinâmicos, são também considerados os eventos imunoinflamatórios, os quais desempenham importante papel na fisiopatologia e progressão da DRC, de forma que as ações vasculotóxicas e inflamatórias promovem danos às células endoteliais e aos podócitos, o que perpetua tanto o estado inflamatório *per si* quanto à indução de fibrose local (ZATZ, 2011).

O diagnóstico da doença renal crônica se baseia nos achados de exames séricos bioquímicos, de urina e de imagem (POLZIN, 2011). Uma vez constatada, é possível realizar a classificação da DRC em estágios, de acordo com as categorias e subcategorais determinadas pela *International Renal Interest Society* (IRIS), 2013. O critério utilizado é a concentração sérica de creatinina (SCr) mensurada ao menos em duas ocasiões, em pacientes clinicamente estáveis e normovolêmicos.

Desta forma, são considerados quatro estágios para a DRC em cães - Estágio 1 ($\text{SCr} < 1,4 \text{ mg/dL}$), Estágio 2 ($1,4 \leq \text{SCr} \leq 2,0 \text{ mg/dL}$), Estágio 3 ($2,1 \leq \text{SCr} \leq 5,0 \text{ mg/dL}$) e Estágio 4 ($\text{SCr} > 5,0 \text{ mg/dL}$). A proteinúria e a pressão arterial sistêmica são também consideradas para o subestagiamento da DRC (IRIS, 2013).

Os valores de pressão arterial sistólica (PAst) e pressão arterial diastólica (PAdt) são classificados em riscos mínimo (PAst $< 150 \text{ mmHg}$ e PAdt $< 95 \text{ mmHg}$), baixo ($150 \text{ mmHg} \leq \text{PAst} \leq 159 \text{ mmHg}$ e $95 \text{ mmHg} \leq \text{PAdt} \leq 99 \text{ mmHg}$), moderado ($160 \text{ mmHg} \leq \text{PAst} \leq 179 \text{ mmHg}$ e $100 \text{ mmHg} \leq \text{PAdt} \leq 119 \text{ mmHg}$) e grave (PAst $\geq 180 \text{ mmHg}$ e PAdt $\geq 120 \text{ mmHg}$), para o desenvolvimento de lesão renal (IRIS, 2013).

A avaliação da proteinúria de origem renal por meio da razão proteína:creatinina urinária (RPC) deve ser realizada ao menos três vezes, com o intervalo mínimo de 15 e máximo de 30 dias, somente após a exclusão das causas pré e pós renais de proteinúria. Os cães podem ser classificados, desta forma, em não-proteinúricos (RPC menor que 0,2), *borderliners* (RPC entre 0,2 a 0,5) e proteinúricos (RPC maior que 0,5) (IRIS, 2013).

Uma vez que a proteinúria possa contribuir para a perpetuação da lesão renal, a monitoração e a avaliação adequada são fundamentais para retardar a progressão da DRC.

2.2 PROTEINÚRIA

A proteinúria pode ser definida pela perda urinária anormal ou excessiva de proteínas na urina. Em condições fisiológicas, as proteínas são filtradas pela barreira de ultrafiltração glomerular, que é composta pelo endotélio capilar, pela membrana basal glomerular e pelos podócitos (LEES, 1996; SCHAEFER et al., 2011).

O endotélio capilar glomerular apresenta fenestras, capazes de discriminar as macromoléculas proteicas conforme o tamanho. A membrana basal glomerular é a segunda “barreira” a oferecer resistência à passagem das macromoléculas, e é composta principalmente por colágeno e proteoglicanos. Por fim, há a camada epitelial, representada pelos podócitos, que restringem a perda urinária de proteínas por meio das pedicelas, as quais, por sua vez, formam entre si a chamada membrana diafragmática, fina e delicada, que preenche os espaços entre as

pedicelas (ZATZ, 2011).

A barreira de ultrafiltração glomerular seleciona, desta forma, a passagem de proteínas de acordo com o seu peso molecular e carga elétrica. Assim, as proteínas de alto peso molecular (maior que 60kDa), como por exemplo, a imunoglobulina G (150 kDa), são retidas pela barreira de ultrafiltração glomerular que, por outro lado, permite a passagem de pequenas quantidades de proteínas de peso molecular considerado intermediário, como é o caso da albumina (67 kDa), e de proteínas de baixo peso molecular (<60 kDa) (GRAUER, 2011; LITTMAN, 2011).

Uma vez que estas proteínas, tanto de baixo como de peso molecular intermediário, tenham ultrapassado a barreira de filtração glomerular, são então reabsorvidas no túbulo contorcido proximal, por meio do complexo de receptores megalina-cubilina. Estes receptores estão expressos na bordadura em escova do túbulo proximal e realizam a endocitose das referidas proteínas, as quais são transportadas por meio de vesículas até os lisossomos, para que sejam degradadas em aminoácidos, ao passo que o complexo de receptores megalina-cubilina é reencaminhado para a membrana apical celular (CHRISTENSEN et al., 2012).

Em condições patológicas nas quais verifica-se a ocorrência de proteinúria, pode haver o comprometimento da permeabilidade dos capilares glomerulares, devido à deposição de imunocomplexos, à inflamação vascular ou à hipertensão intraglomerular. A glomerulonefrite de caráter imunomediado é a mais comumente descrita dentre as glomerulopatias que ocorrem em cães, e sua prevalência varia de 43% a 90% nesta espécie. Quanto aos fatores vasculares, a hipertensão arterial sistêmica (HAS) resulta no aumento da pressão intraglomerular, mecanismo mediado principalmente pela angiotensina II, o que, por sua vez, leva à proteinúria (GRAUER, 2005b; BROWN et al., 2007; MITANI et al., 2012).

O comprometimento da permeabilidade dos capilares glomerulares por meio das alterações previamente descritas implica na passagem de proteínas de alto peso molecular para o lúmen do túbulo proximal, o que, consequentemente, leva à saturação do complexo de receptores megalina-cubilina, e em longo prazo, à perda urinária de proteínas de baixo peso molecular, as quais seriam normalmente reabsorvidas neste segmento do néfron. Ainda, a deficiência de megalina e cubilina constitui a principal alteração primária na reabsorção tubular de proteínas (LEES et al., 2005; LITTMAN, 2011; CHRISTENSEN et al., 2012).

A proteinúria causa lesão às células tubulares e ainda estimula a ativação do

sistema complemento e de mediadores inflamatórios, tais como *Tissue Growth Factor- β* (TGF- β) e endotelina-1, o que resulta em inflamação e fibrose, o que, por sua vez, contribui para a progressão da doença renal crônica (YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

Desta forma, devido a sua importância clínica, a proteinúria deve ser investigada, considerando-se a origem, magnitude e persistência. Quanto à origem, pode ser classificada como pré-renal, renal e pós-renal (LEES et al., 2005).

A proteinúria de origem pré-renal ocorre quando há passagem de proteínas pela barreira de filtração glomerular em virtude do aumento de proteínas plasmáticas, isto é, hiperproteinemia. Nestes casos, a barreira de filtração glomerular está íntegra e mantém a propriedade de seletividade, não havendo, portanto, lesão renal. A hemoglobina, mioglobina e proteína de Bence-Jones são exemplos de proteínas de origem pré-renal (LEES et al., 2005).

A proteinúria renal é caracterizada pela presença de lesão renal estrutural e ou funcional, e pode ser subclassificada em funcional (ou fisiológica) ou patológica (glomerular, tubular, intersticial). A proteinúria funcional é decorrente de fenômenos transitórios e extrarrenais tais como febre, hipertermia e exercício físico intenso, e tem como característica ser de baixa magnitude e não persistente. Já nos casos de proteinúria renal patológica, a persistência é uma característica importante e sua magnitude irá variar de acordo com o segmento do néfron afetado. Desta forma, a lesão glomerular irá resultar em proteinúria de maior magnitude e de alto peso molecular, diferentemente dos casos nos quais a lesão está localizada em nível tubular, cuja proteinúria é caracterizada por baixo peso molecular e de discreta magnitude (LEES et al., 2005).

A proteinúria de origem pós-renal, por sua vez, pode ser subclassificada como urinária ou extraurinária. A proteinúria pós-renal urinária decorre de condições patológicas associadas ao sistema urinário tais como processos inflamatórios, infecciosos, neoplásicos e obstrutivos; a proteinúria extraurinária também está associada às referidas condições, no entanto, localizadas no sistema genital (LEES et al., 2005).

Uma vez determinada a origem da proteinúria, é necessária a determinação de sua magnitude, a qual pode ser mensurada por meio de métodos quantitativos, como por exemplo, a RPC, que reflete a perda urinária de proteínas equivalente a um período de 24 horas (LEES et al., 2005; GRAUER, 2011). A persistência da

proteinúria pode ser avaliada por meio da realização da RPC, em três ocasiões, com o intervalo mínimo de duas e máximo de quatro semanas, e somente após a exclusão das causas pré e pós-renais de proteinúria (LEES et al., 2005).

Por se tratar de um método quantitativo, ainda que a magnitude da proteinúria seja estimada, a RPC não é capaz de identificar especificamente as proteínas presentes na urina, o que é importante na determinação da origem da proteinúria, a qual pode ser glomerular (predomínio de alto peso molecular), tubular (predomínio de baixo peso molecular) ou mista. A identificação da origem da proteinúria é importante para detectar o segmento do néfron acometido que causou a perda daquela proteína, além de ser fundamental para a indicação da terapia adequada (ZARAGOZA et al., 2003).

Os métodos qualitativos, como a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* podem ser utilizados na avaliação da proteinúria. O primeiro deles foi desenvolvido na década de 70 por O'Farrell e colaboradores, e foi amplamente empregado para as mais diversas análises de proteínas, em diferentes fluidos e tecidos. Apesar do surgimento de novas técnicas, a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permanece insubstituível, e ainda desempenha papel central na investigação diagnóstica da proteinúria (CELIS; GROMOV, 1999).

Este método consiste em separar as proteínas de acordo com sua carga elétrica e peso molecular. Desta forma, para a interpretação de seus resultados, considera-se como referência o peso molecular da albumina, aproximadamente, 67 kDa, classificado como PM intermediário. As demais proteínas são então, classificadas como de alto ou de baixo peso, de acordo com suas massas (YALÇIN; ÇETIN, 2004).

A técnica de *Western blotting*, por sua vez, permite a imunodeteção de proteínas específicas e apresenta alta sensibilidade. Assim, no caso da DRC, uma vez que seja determinada a presença urinária de proteínas exclusivamente sintetizadas ou reabsorvidas em determinados segmentos do néfron, é possível identificar portanto, com precisão, o local da lesão renal (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004).

2.3 ALBUMINÚRIA

A albumina é uma proteína plasmática da família das globulinas, não-glicosilada, de aproximadamente 67 kDa, que apresenta em sua estrutura 585 aminoácidos, e resíduos de metionina, triptofano e, predominantemente, de lisina (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

A albumina representa mais de 50% do total de proteínas plasmáticas, sendo a sua concentração de 0,6 mmol/L. Esta proteína apresenta múltiplas funções, como de manutenção da pressão coloidosmótica, de transporte e ação antioxidante (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

A albumina é sintetizada no fígado, e apenas uma pequena parte é estocada neste órgão, de forma que 30-40% permanecem no plasma. A meia-vida desta proteína varia de 08 a 10 dias em cães e gatos, sendo degradada principalmente no músculo, fígado e rins (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005; NELSON; RICHARD COUTO, 2009).

Quando em baixas concentrações plasmáticas, é possível inferir que haja algum processo mórbido, de curso crônico. Dentre as possibilidades estão insuficiência hepática, o que causaria comprometimento da síntese, e síndrome nefrótica, a qual é caracterizada pela intensa perda urinária de albumina (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005).

A relação entre os rins e esta proteína é descrita há muito, pois Hipócrates já descrevera que a ocorrência de espuma na urina de indivíduos era associada à presença de albumina, e que isto era indicativo de DRC (PETERS, 1996).

Ainda hoje, a identificação de albuminúria permanece como um dos métodos diagnósticos mais sensíveis e amplamente utilizada como marcador de lesão renal. A excreção desta proteína é determinada basicamente pela filtração glomerular e pela reabsorção tubular, de forma que alterações em ambos os processos possam resultar em albuminúria, a exemplo do que ocorre nas glomerulopatias, como também nas tubulopatias (ALPERN; CAPLAN; MOE, 2013).

Além de sinalizar a presença de injúria, a albuminúria é sabidamente um marcador de progressão da DRC. Em humanos, intervenções objetivando a redução da perda urinária desta proteína culminaram no retardo do contínuo comprometimento da função renal inerente à esta doença, o que sugeriu que a

albuminúria não é apenas um marcador, mas também um mediador da lesão, envolvido inclusive, na fisiopatologia da progressão da DRC (ALPERN; CAPLAN; MOE, 2013).

Proteínas plasmáticas que ultrapassam o endotélio podem se acumular no tufo glomerular e estimular a proliferação de células mesangiais, e desta forma, aumentar a produção de matriz mesangial. Além disso, o excesso de proteínas no ultrafiltrado glomerular pode ser tóxico às células epiteliais tubulares e culminar em inflamação intersticial, fibrose e morte celular por diversos mecanismos. Alguns destes mecanismos incluem obstrução tubular, ativação do sistema complemento, estresse oxidativo e aumento na produção de citocinas e fatores de crescimento (GRAUER, 2007).

Em cães com DRC de ocorrência natural, o risco relativo de crises urêmicas e mortalidade foi aproximadamente três vezes maior em animais com valores de RPC superiores a 1,0, e também foi constatado o declínio da função renal naqueles cães que apresentaram altos valores de RPC (JACOB et al., 2005).

No entanto, a presença de microalbuminúria também está associada à progressão da DRC. Ela é definida pela concentração urinária de albumina na faixa de 30 a 300 mg/grama de creatinina, e razão albumina:creatinina urinárias (RAC) que variam entre 0,03 a 0,3 (BACIC et al., 2010).

A microalbuminúria é um marcador amplamente utilizado no diagnóstico precoce da nefropatia diabética (THRAILKILL et al., 2011), e também está associado ao desenvolvimento de proteinúria e à progressão para estágios avançados da DRC (*end-stage renal disease*) (BACIC et al., 2010).

A determinação da albuminúria, portanto, é de suma importância nos pacientes doentes renais crônicos, para avaliar a progressão e para estabelecer medidas terapêuticas (GRAUER, 2005a, 2007; BACIC et al., 2010).

2.4 PROTEINA LIGADA À VITAMINA D (VDBP)

A VDBP é uma glicoproteína (51,2 kDa – 55 kDa), composta por uma sequência de 458 aminoácidos, subdivididos em dois domínios homólogos de 186 aminoácidos acompanhados de uma cadeia C-terminal composta por 86

aminoácidos residuais. É sintetizada predominantemente no fígado, e apresenta concentração sérica de 300 a 600 mg/ml e urinária de 125,48 ng/mg, e meia vida de aproximadamente 3 dias (GOMME; BERTOLINI, 2004; DOORENBOS et al., 2012).

A VDBP apresenta como principal função o transporte de 85% dos metabólitos de vitamina D na circulação sanguínea. Cerca de 15% da VDPB é transportado pela albumina enquanto que 1% permanece livre. Além disso, esta proteína ainda desempenha funções no metabolismo ósseo e na modulação das respostas imunoinflamatórias (GOMME; BERTOLINI, 2004; YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

Diversos fatores fisiológicos influenciam a produção da VDBP, tais como raça, idade, sexo, prenhez e condição corporal, como já demonstrado em estudos na espécie humana. Negros apresentaram menores concentrações séricas de vitamina D, o que foi atribuído à menor síntese da proteína transportadora deste metabólito. Os níveis de estrogênio também influenciaram os valores séricos da VDBP, de forma que mulheres apresentaram maior concentração desta proteína do que homens. Ainda, a deficiência de VDBP foi observada em um estudo realizado com adolescentes obesos (POWE et al., 2013; YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

Condições patológicas também afetam os níveis plasmáticos de VDBP, como nos casos das hepatopatias, diabetes mellitus, hiperparatireoidismo primário, neoplasias e nefropatias. No fígado ocorre a primeira hidroxilação da vitamina D, além disso, este órgão é o principal responsável pela síntese de VDBP, logo, o comprometimento de sua função afeta diretamente a biodisponibilidade desta proteína. Em um estudo com mulheres com hiperparatireoidismo primário, foi observada correlação negativa entre os níveis séricos do hormônio da paratireoide (PTH) e VDBP. Pacientes humanos com síndrome nefrótica apresentaram importante perda urinária desta proteína, o que afetou, inclusive, os seus níveis plasmáticos (YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

A VDBP é responsável por transportar o metabólito 25-OH-Vitamina D3 pela circulação sanguínea. Este complexo é filtrado livremente pelo glomérulo e é reabsorvido por meio de endocitose pelos receptores megalina/cubilina, os quais se encontram na bordadura em escova do túbulo proximal. O metabólito 25-OH-Vitamina D3 é então liberado para que possa sofrer hidroxilação por ação da enzima 1- α -hidroxilase, o que origina a forma ativa da vitamina D3, o calcitriol (1,25-OH-

Vitamina D3) (DOORENBOS et al., 2012).

A perda intensa de VDBP em pacientes humanos proteinúricos graves pode, portanto, levar à deficiência de calcitriol. A vitamina D desempenha papel central na regulação do metabolismo ósseo mineral, ao interagir com o eixo FGF-23/Klotho e com o PTH, além de inibir o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), o qual, por sua vez, está envolvido na estimulação da síntese e liberação de mediadores inflamatórios. Logo, a deficiência de vitamina D está associada ao desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário e à fibrose, fatores que contribuem diretamente para a progressão da doença renal crônica (DOORENBOS et al., 2012; DE BRITO GALVAO et al., 2013; YOUSEFZADEH; SHAPSES; WANG, 2014).

Além disso, uma vez que a VDBP é reabsorvida exclusivamente no túbulo proximal, a detecção urinária desta proteína indica a existência de lesão neste segmento, de modo que a VDBP desempenhe o papel de biomarcador. Em estudos com ratos, esta proteína foi mais precoce em sinalizar a presença de lesão tubulointersticial do que alguns marcadores, tal como alpha-SMA (MIRKOVIĆ et al., 2013).

Em humanos, observou-se que houve redução da perda urinária de VDBP após prescrição de terapia antiproteinúrica, no entanto, em comparação aos pacientes normoalbuminúricos, a concentração urinária desta proteína ainda era 100 vezes maior ($p < 0,001$), o que sugeriu lesão tubulointersticial persistente (MIRKOVIĆ et al., 2013).

Em cães, desconhece-se estudos acerca da VDBP sob condições fisiológicas e como marcador de lesão renal, o que ressalta a importância da investigação desta proteína nesta espécie.

2.5 PROTEINA LIGADA AO RETINOL (RBP)

O retinol é uma das formas de vitamina A, e é obtida por meio dos alimentos de origem animal. Esta vitamina desempenha papel fundamental no crescimento e diferenciação celular, no desenvolvimento embrionário e na função visual. A vitamina

A ingerida é absorvida principalmente no intestino delgado e mais de 90% é estocada no fígado, de onde é mobilizada para os tecidos periféricos por meio da RBP, responsável por carrear esta vitamina na circulação sanguínea (ZHANG; ZHAO; HUANG, 2012).

A RBP é considerada uma proteína de baixo peso molecular (21kDa) e é composta por uma sequência de 182 aminoácidos. Esta proteína liga-se à molécula de retinol no retículo endoplasmático dos hepatócitos, de onde é secretada para o plasma, e então forma um complexo com a albumina, que transfere a molécula de retinol aos tecidos periféricos via receptor (RRBP). Após, RBP se dissocia da albumina, é filtrada pela barreira glomerular e reabsorvida no túbulo contorcido proximal dos rins (NEWCOMER et al., 1984).

A presença urinária desta proteína, desta forma, pode estar associada à lesão tubular, como já observado em estudos prévios em cães com piometra, hiperadrenocorticismismo e babesiose (ZARAGOZA et al., 2004; MADDENS et al., 2011; DEFAUW et al., 2012). A identificação da proteína ligada ao retinol na urina pode indicar ainda fibrose intersticial, a qual, por sua vez, está intimamente associada à progressão da doença renal crônica, o que já foi demonstrado em humanos (SMETS et al., 2010; MADDENS et al., 2011; DEFAUW et al., 2012; PALLET et al., 2014).

Em cães com doença renal crônica de ocorrência natural, cuja proteinúria foi avaliada pela técnica de *Western blotting*, a RBP também funcionou como um marcador de lesão tubular (RAILA et al., 2000; NABITY et al., 2011). A presença desta proteína na urina não foi verificada em cães clinicamente normais nos referidos estudos, de forma que, quando detectada, pode sugerir precocemente a ocorrência de lesão renal.

2.6 PROTEÍNA DE TAMM-HORSFALL (THP)

Há mais de 50 anos, os pesquisadores Tamm e Horsfall isolaram uma mucoproteína a partir de urina humana. Posteriormente, descobriu-se, ainda, que esta proteína, denominada de Tamm-Horsfall, normalmente é a proteína mais

abundante presente na urina de indivíduos (DEVUYST; DAHAN; PIRSON, 2005).

A THP, também conhecida como uromodulina, de 90 – 130 kDa, é uma proteína GPI ancorada, que contém 616 aminoácidos, incluindo 48 resíduos de cistina envoltos por 24 pontes dissulfeto. Oito sítios de N-glicosilação também estão presentes, o que explica a alta composição de carboidrato nesta proteína. A THP também apresenta uma porção C terminal, hidrofóbica (DEVUYST; DAHAN; PIRSON, 2005).

A síntese desta proteína ocorre nas células epiteliais do ramo delgado ascendente da alça de Henle e do túbulo contornado distal. O papel fisiológico da THP é pouco compreendido, mas até o momento, estudos sugerem que esta proteína esteja envolvida nos mecanismos de concentração e diluição urinárias e na defesa do hospedeiro contra agentes associados à infecção do trato urinário, devido às suas propriedades imunomoduladoras (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

Esta proteína ainda está envolvida na formação de cilindros e urólitos, e recentemente, foi demonstrado que mutações no gene *UMOD*, que codifica a THP em humanos, foi associada à incapacidade de concentração urinária, hiperuricemia, nefrite tubulointersticial e desenvolvimento de doença renal crônica (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

Em camundongos *knock out* (KO) para a presença de THP observou-se o desenvolvimento de nefrocalcinose, e a deposição de cristais de cálcio nos ductos coletores, na região medular, o que não foi verificado no grupo controle. A associação entre deficiência de THP e urolitíase, no entanto, ainda é controversa, necessitando-se de mais estudos (DEVUYST; DAHAN; PIRSON, 2005).

Em cães com urolitíase, cujos urólitos eram de estruvita, oxalato de cálcio, urato ou cistina, foi encontrada concentração reduzida de THP, em comparação aos animais saudáveis. Na urina de cães doentes renais crônicos, também foi detectada menor concentração desta proteína, porém, seu papel na fisiopatologia nesta doença é desconhecido nesta espécie (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

Até o momento, estudos conduzidos em cães com DRC de ocorrência natural demonstraram que há menor excreção urinária de THP em cães com azotemia e proteinúria intensa ($RPC > 2$). Desta forma, esta proteína não parece atuar como um sinalizador precoce de injúria renal, no entanto, pode ser de grande valia quando detectada a diminuição na excreção urinária, pois este achado pode avaliar a existência de comprometimento do segmento final dos néfrons (ramo ascendente da

alça de Henle e túbulo distal), o que confere-lhe o carácter de marcador de lesão tubular, ou mesmo estar associada a diminuição do número de néfrons funcionais (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

3 HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo seria de que a avaliação da razão proteína:creatinina urinária (RPC) em cães com DRC *per si* não seria o suficiente, pois não identificaria os segmentos dos néfrons comprometidos, mas que a presença de proteínas específicas, pela análise conjunta da eletroforese e do *Western blotting*, traria subsídios importantes, tais como a detecção de albumina e/ou VDBP e/ou RBP urinária que sinalizariam a presença de lesões glomerulares e/ou tubulares e, por outro lado, que a THP poderia estar ausente ou presente em menor quantidade nos estágios avançados da DRC, indicando lesão tubular distal e/ou perda importante do número de néfrons.

4 OBJETIVOS

Assim, os objetivos do presente estudo foram de investigar a presença das proteínas VDBP, RBP e THP, além da albumina, na urina de cães com doença renal crônica, nos estágios 1 ao 4 (IRIS, 2013), por meio da análise conjunta da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting*.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Os cães utilizados neste estudo foram provenientes do atendimento do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica / Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com o devido consentimento de seus tutores e da Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA – FMVZ/USP), sob o protocolo de número: 1383161014.

Foram selecionados 40 cães em atendimento com diagnóstico de DRC nos estágios 1, 2, 3 e 4, conforme diretrizes da IRIS, 2013. O estágio 1 correspondeu ao grupo 1 (grupo E1), o estágio 2 ao grupo 2 (grupo E2), e assim, sucessivamente. Cada grupo foi composto por 10 animais. Também foram utilizados 9 cães saudáveis, os quais constituíram o grupo controle (grupo C), cujo critério de inclusão baseou-se no histórico e nos exames físico, laboratorial e de imagem normais.

Foram excluídos deste estudo animais que apresentassem concomitantemente a doença renal crônica outras afecções, tais como urolitíase, infecção do trato urinário inferior, pielonefrite, prostatopatias, piometra, hiperadrenocorticismos, diabetes mellitus, obesidade, doenças imunomediadas e infecciosas. Ainda foram excluídas quaisquer amostras de urina que contivessem elementos, na avaliação química e do sedimento urinário, que sinalizassem a presença de proteinúria pré ou pós renal.

5.2 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO E REALIZAÇÃO DE EXAMES

Abaixo, seguem as descrições da coleta das amostras biológicas e da realização de exames.

5.2.1 Coleta de amostras de sangue

Amostras de sangue das veias jugulares externas, cefálicas ou safenas, foram colhidas de modo asséptico e acondicionadas em frascos com EDTA, para a realização de hemograma, e em frascos com gel ativador da coagulação, para a obtenção de soro para as determinações bioquímicas, conforme os procedimentos já adotados na rotina de atendimento do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ – USP).

5.2.2 Determinações séricas de creatinina e ureia

As amostras foram processadas conforme as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica do HOVET/FMVZ – USP, utilizando-se kits comerciais (Creatinina K 96, Labtest; Urea FS 1 3101, DiaSys).

5.2.3 Coleta de amostras de urina

Amostras de urina foram colhidas, por meio de sondagem uretral ou cistocentese, de forma asséptica, e processadas em até 12 horas para a realização do exame de urina, e em até 30 minutos ou mantidas sob refrigeração por, no máximo, 2 horas, para a realização da urocultura. Após centrifugação (1000 rpm por 10 minutos), o sobrenadante das amostras de urina foi armazenado em tubos de

microcentrífuga (alíquotas de 1 ml) e estocadas em ultra – freezer, a 80°C negativos, para posterior realização de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE) e *Western blotting*.

Também foram utilizadas amostras previamente estocadas a -80°C, provenientes de material excedente de exames de urina e urocultura, solicitados em casos clínicos da rotina de atendimento do HOVET/FMVZ – USP, que atendessem aos critérios de seleção citados no item 5.1.

5.2.4 Exame de urina

As amostras de urina foram avaliadas quanto às propriedades físicas, químicas e de sedimento urinário, conforme as técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica - HOVET/FMVZ – USP (Vide apêndices).

5.2.5 Urocultura

As técnicas empregadas rotineiramente no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica - HOVET/ FMVZ – USP foram empregadas para a realização da cultura bacteriológica das amostras de urina.

5.2.6 Determinação da concentração urinária de proteínas

A determinação da concentração urinárias de proteínas foi obtida por meio da técnica de Bradford (azul brilhante de Coomassie G-250). O método baseia-se na

ligação do corante azul brilhante de Coomassie G-250 aos resíduos NH_3^+ presentes nas proteínas, e cerca de dois minutos após o início da reação, esta ligação é interrompida, o que é sinalizado pelo desenvolvimento de cor estável por um período de uma hora, passível de absorção em comprimento de onda de 595 nm. Como solução padrão, foi utilizado um padrão aquoso de proteínas totais. Para a execução da técnica, em duplicata, foi utilizado o sobrenadante da urina, obtido após centrifugação das amostras, até então mantidas a -80°C .

5.2.7 Determinação da concentração de creatinina urinária

A determinação da concentração de creatinina urinária foi realizada por meio da diluição das amostras em solução salina para atingir linearidade. O ácido pícrico foi adicionado à solução, pois em meio alcalino, reage com a creatinina produzindo picrato de creatinina, uma substância com comprimento de onda de 515 nm, lida em analisador automático (Randox®). Os valores obtidos de concentração de creatinina urinária foram utilizados para o cálculo da RPC.

5.2.8 Determinação da razão proteína: creatinina urinária (RPC)

A RPC foi obtida por meio da divisão do valor da concentração de proteína urinária pelo valor da concentração de creatinina urinária, ambas com a mesma unidade.

Para a interpretação de seus resultados, considerou-se as diretrizes do “consenso para o diagnóstico, tratamento e monitoramento da proteinúria em cães e gatos”, do *American College of Veterinary Internal Medicine* (ACVIM), e também as recomendações da *International Renal Interest Society* (IRIS) para o subestagiamento da doença renal crônica, baseado na proteinúria.

5.2.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas urinárias

Para a avaliação qualitativa das proteínas urinárias, pelo peso molecular, foi empregado o método de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE), utilizando-se a metodologia pré-estabelecida pelo Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica Médica da FMVZ/ USP (tese de doutorado de Ângela Bacic de Araújo e Silva Rego, dissertação de mestrado de Carolina Zagli Cavalcante – Processos FAPESP nº 03/10426-3, 06/50468-5 e 05/57490-3) (CAVALCANTE, 2007; BACIC et al., 2010).

A técnica foi realizada em um conjunto de placas verticais (Bio Agency Biotecnologia®). O gel de empilhamento foi confeccionado em uma concentração de 4% e o gel de separação a 10% com espessura, largura e altura semelhante ao tamanho da placa.

Para a execução da eletroforese de proteínas urinárias foi necessário o preparo de diferentes soluções, como o gel separador, o gel de empilhamento, o tampão da amostra e tampão do gel separador. Após o preparo destas soluções, as placas de vidro e os espaçadores foram lavados com detergente e o enxágue foi feito em água corrente, e posteriormente com água destilada. Posteriormente, tais materiais foram banhados em álcool a 92%. A seguir, os espaçadores foram encaixados nas placas de vidro, e as mesmas foram colocadas dentro do suporte, tendo os parafusos apertados.

As placas de vidro foram preenchidas com o gel de separação (ou *Separating Gel* 10%), para realizar o processo de polimerização. Por último, foi colocado o gel de empilhamento (*Stacking Gel* 4%). A polimerização do segundo gel ocorreu num período de 30 a 60 minutos.

Com a conclusão da polimerização, as placas e os pentes foram removidos da base e adicionado solução tampão 1x para fixação das placas na cuba. Posteriormente, as amostras eram preparadas, sendo necessária a adição prévia de 2-mercaptoetanol (50µl). Em relação às amostras, o volume de urina a ser colocado nos poços dos géis, para que todos os poços mantivessem a concentração de 1µg de proteína/poço, foi determinado de acordo com a concentração de proteína

mensurada previamente pelo método de Bradford. Após o preparo das amostras, as mesmas eram agitadas em vórtex e a seguir submetidas ao processo de ebulição ou em banho seco por 9 minutos.

A próxima etapa realizada foi o preenchimento da cuba com tampão de corrida 1x. Posteriormente, foi realizado um mapeamento da posição das amostras assim como do padrão de peso molecular no gel (marcador de peso molecular: Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards #161-0375 – Bio-Rad®).

As amostras (1µg proteína urinária/poço) foram colocadas nos poços do gel e iniciou-se a corrida eletroforética, realizada com o uso de uma fonte elétrica (Fonte para eletroforese PS5-0003N Bio Agency Biotecnologia®) com a miliamperagem pré-fixada em 40 mA para o gel de empilhamento e de separação, respectivamente. O tempo de corrida foi de aproximadamente 2 horas e 15 minutos, e para a coloração do gel foi utilizado nitrato de prata, pois se trata de uma técnica de coloração com maior sensibilidade para detecção de proteínas (KSHIRSAGAR; WIGGINS, 1986).

Após a coloração das bandas de proteína, a imagem foi gravada e processada eletronicamente, por meio de um sistema de densitometria (Densitômetro modelo Epson Expression® 1680) e analisada em *software* específico (Vision Works Ultra-Violet Products Ltd.®).

As regiões individuais do gel apresentam “faixas” denominadas no *software* como *lane*, sendo que cada faixa apresenta diferentes bandas de proteínas com pesos moleculares distintos. Por meio do *software* específico, foi padronizada a área sob a curva obtida em cada faixa, a qual é representada pela densidade óptica total, permitindo determinar a porcentagem relativa da densidade óptica de cada banda de proteína em relação a densidade óptica total.

A interpretação dos géis foi realizada de modo que foram consideradas duas regiões de bandas, denominadas como Regiões A e B, de acordo com o peso molecular das proteínas (kDa) (CAVALCANTE, 2007). Na Região A foram localizadas as proteínas com peso molecular maior ou igual a 60kDa, enquanto que na Região B, as proteínas com peso molecular inferior a 60kDa (Figura 1) (ZARAGOZA et al., 2003, 2004; ZARAGOZA et al., 2003; CAVALCANTE, 2007).

A quantidade de proteína encontrada nas Regiões A e B foi determinada após a obtenção do valor da porcentagem da densidade óptica da região analisada em

relação à densidade óptica total de todo o traçado eletroforético, sendo o cálculo final baseado na quantidade total de proteína (1µg).

5.2.10 Determinação urinária das proteínas albumina, ligadas à vitamina D (VDBP) e ao retinol (RBP), e de Tamm-Horsfall (THP), por meio da técnica de *western blotting*

O volume de amostra de urina a ser analisada de cada cão foi calculado com base na concentração de creatinina urinária, e diluído no buffer de amostra (3,55 ml de água destilada, 1,25 ml de 0,5 Tris HCl pH 6,8, 2,5 ml de glicerol, 2,0 ml de SDS 10% e 0,2 ml de 0,5% de bromofenol blue). Após as amostras terem sido submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS – PAGE), realizou-se a transferência das proteínas para a membrana de PVDF por meio de *eletroblotting* e, em seguida, para o “bloqueio” dos *blots*, utilizou-se leite em pó desnatado a 5%, diluído em TBS-T (24,2 g Tris base; 29,2 NaCl; 3,36 EDTA para 1 litro de água destilada), durante 1 hora, com o intuito de evitar ligações inespecíficas.

E então, as membranas foram incubadas com os seguintes anticorpos específicos diluídos em TBS-T: *Anti-albumin antibody* (espécie-específico para o cão), ab112986, Abcam (1:500); *Anti-Vitamin D Binding Protein antibody* (espécie-reativo para humanos, homologia para a espécie canina), ab95469, Abcam (1:500); *Anti-Retinol Binding Protein RBP antibody* (espécie-reativo para humanos, homologia para a espécie canina), ab48624, Abcam (1:250); *Sheep anti-human Tamm-Horsfall* (espécie-reativo para humanos, homologia para a espécie canina), AB733, EMD Millipore Corporation (1:100); *overnight*, a 4°C. Após, adicionou-se os respectivos anticorpos secundários, considerando-se as diluições descritas a seguir: *anti-goat*, 1:10000; *anti-goat*, 1:10000; *anti-rabbit* 1:2000; *anti-sheep*, 1:2000.

A marcação foi realizada por meio da *horseradish* peroxidase (HRP) e utilizou-se o sistema de quimioluminescência para a revelação (ECL, Amersham), o qual é considerado o método imunoenzimático padrão-ouro tratando-se de *Western blotting*.

Para a determinação da ausência ou da intensidade da presença de

albumina, VDBP, RBP ou THP, a análise semi-quantitativa das proteínas foi efetuada com o auxílio do *software* Image J, National Institutes of Health (NIH), que avaliou as bandas por meio de densitometria.

Tendo-se obtido as mensurações da densitometria das referidas bandas de proteínas, a média dos valores do grupo controle (grupo C) foi calculada. E então, os resultados obtidos a partir da densitometria dos cães doentes foram divididos pela média dos valores do grupo controle (grupo C), conforme previamente calculado. Os valores finais foram, então, multiplicados por 100, e expressos em porcentagem. Assim, a interpretação dos resultados da densitometria dos cães doentes foram sempre em comparação ao grupo controle (grupo C).

Desta forma, adotou-se que “-” corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), “+” corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), “++” correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), “+++” correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e “++++” correspondem a ≥ 4 vezes (400%) os valores da média da densitometria do grupo controle, para as proteínas urinárias albumina, VDBP e RBP.

Excepcionalmente no caso da THP, em que a presença urinária desta proteína é esperada em cães clinicamente normais, adotou-se o inverso, de forma que “++++” representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), “+++” representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), “++” representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), “+” representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e “-” representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C) (RAILA; NEUMANN; SCHWEIGERT, 2003).

5.2.11 Exame ultrassonográfico abdominal

Foi realizado o exame ultrassonográfico abdominal a fim de identificar possíveis alterações em órgãos que possam interferir no diagnóstico da proteinúria, bem como para a avaliação morfológica dos rins, segundo método rotineiro empregado no Serviço de Diagnóstico por Imagem do HOVET/FMVZ-USP.

5.3 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram calculados os valores mínimos, máximos, a média, a mediana, o desvio-padrão da média e o erro padrão da média (EPM) das variáveis “creatinina”, “ureia”, “PAS”, “RPC”, “proteína urinária”, “creatinina urinária” e “densitometria” (obtidas no *Western blotting*) das proteínas urinárias albumina, VDBP, RBP e THP”, para os grupos de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4).

No caso da avaliação da eletroforese de proteínas urinárias, foi calculada a porcentagem de proteínas das Regiões A (PM > 60kDa) e B (PM < 60kDa), e o número de bandas de proteínas em cada uma dessas regiões, bem como a identificação dos seus respectivos pesos moleculares, e a RPC, denominadas de RPC A (RPC da Região A) e RPC B (RPC da Região B).

Para a verificação da distribuição dos dados, utilizou-se o teste de Kolgorov-Smirnov. Uma vez evidenciada a distribuição paramétrica dos dados, utilizou-se a análise de variância (one-way ANOVA) para avaliar se houve diferença entre as médias, entre os grupos; ao passo que, quando observada a distribuição não-paramétrica dos dados, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, para avaliar se houve diferença entre as medianas, entre os grupos. Para ambos, considerou-se $\alpha \leq 5\%$.

Para a comparação de duas médias, utilizou-se o teste *t* de Student não pareado, quando verificada a distribuição paramétrica dos dados, e quando não paramétrica, aplicou-se o teste de Mann Whitney. Para ambos, considerou-se como nível de significância $p < 0,05$.

Para os testes de comparação múltipla, utilizou-se os testes de Tukey-Kramer e Dunn, quando das distribuições paramétricas e não-paramétricas dos dados, respectivamente. Para ambos, considerou-se como nível de significância $p < 0,05$.

A forma de apresentação dos dados no texto está expressa em mínima – máxima; média $\pm$ EPM.

A forma de apresentação dos dados gráficos está expressa em média $\pm$ EPM.

Os *softwares* utilizados foram InStat© (GraphPad) e GraphPad Prism© (GraphPad).

6 RESULTADOS

6.1 MARCADORES DE FUNÇÃO RENAL SÉRICOS: CREATININA E UREIA

Os valores individuais e a estatística descritiva das concentrações séricas de creatinina (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) estão representados a seguir, na tabela 1 e no gráfico 1.

Os valores séricos de creatinina observados em toda a população estudada foi de (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) 0,71 – 12,90; $2,99 \pm 0,41$ mg/dl.

À análise dos grupos, obteve-se de 0,71 – 1,1; $0,93 \pm 0,04$ mg/dl para o grupo C, de 0,72 – 1,40; $1,01 \pm 0,06$ mg/dl para o grupo E1, de 1,50 – 2,10; $1,75 \pm 0,05$ mg/dl para o grupo E2, de 2,20 – 4,60; $3,14 \pm 0,25$ mg/dl para o grupo E3, e de 5,0 – 12,49; $7,95 \pm 0,85$ mg/dl para o grupo E4.

Os dados não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Kolgorov-Smirnov e foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis detectando-se diferença entre os grupos ($p < 0,0001$).

O teste de Dunn de comparação múltipla evidenciou diferença entre as médias dos valores de creatinina sérica dentre os seguintes grupos: C *versus* E3 ($p < 0,01$); C *versus* E4 ($p < 0,0001$); E1 *versus* E3 ($p < 0,01$); E1 *versus* E4 ($p < 0,0001$); E2 *versus* E4 ($p \leq 0,05$).

Tabela 1 – Valores individuais e estatística descritiva das concentrações séricas de creatinina (mg/dL) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

nº (#)	Creatinina sérica (mg/dl)				
	C	E1	E2	E3	E4
1	0,89	0,98	2,1	2,31	12,9
2	0,71	0,97	1,8	3,1	5,8
3	0,94	1,3	1,9	2,2	6
4	1	0,93	1,8	3,6	5
5	0,77	0,72	1,5	4,21	6
6	0,98	0,83	1,8	4,6	6,6
7	0,95	0,92	1,7	3,2	12,1
8	1,1	1,17	1,6	3	8,2
9	1,07	0,92	1,7	2,4	8,3
10		1,4	1,6	2,8	8,6
Média	0,93	1,01	1,75	3,14	7,95
DP	0,12	0,21	0,17	0,79	2,68
EPM	0,04	0,06	0,05	0,25	0,85
Mínimo	0,71	0,72	1,50	2,20	5,0
Mediana	0,95	0,95	1,75	3,05	7,40
Máximo	1,1	1,40	2,10	4,60	12,9

Gráfico 1 – Perfis dos valores individuais de creatinina sérica (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

Os valores individuais e a estatística descritiva das concentrações séricas de uréia (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) estão representados a seguir, na tabela 2 e no gráfico 2.

Os valores séricos de ureia observados em toda a população estudada foi de (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) 22,10 – 516,4; $140,8 \pm 18,94$ mg/dl.

À análise dos grupos, obteve-se de 25,20 – 53,40; $41,50 \pm 3,16$ mg/dl para o grupo C, de 22,10 – 27,1; $54,77 \pm 9,86$ mg/dl para o grupo E1, de 34,40 – 125,40; $75,03 \pm 9,83$ mg/dl para o grupo E2, de 92,2 – 315,80; $169 \pm 20,06$ mg/dl para o grupo E3 e de 189,7 – 516,4; $354 \pm 36,66$ mg/dl para o grupo E4.

Os dados apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Kolgorov-Smirnov e a análise de variância indicou diferença entre os grupos que $p < 0,0001$.

Na sequência, o teste de Tukey-Kramer de comparação múltipla evidenciou diferença entre as médias dos valores de ureia sérica dentre os seguintes grupos: C *versus* E3 ($p < 0,001$); C *versus* E4 ($p < 0,0001$); E1 *versus* E3 ($p < 0,01$); E1 *versus* E4 ($p < 0,0001$); E2 *versus* E3 ($p \leq 0,05$); E2 *versus* E4 ($p < 0,0001$); E3 *versus* E4 ($p < 0,0001$).

Tabela 2 – Valores individuais e estatística descritiva das concentrações séricas de ureia (mg/dL) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

nº (#)	Ureia sérica (mg/dl)				
	C	E1	E2	E3	E4
1	39,8	26,3	58,1	128,3	456
2	47,3	33,9	125,4	132,6	257,2
3	35	76,4	79,9	92,2	228
4	39,5	43	54	128,1	189,7
5	32,8	22,1	53,7	138,2	382,9
6	53,4	36,1	57,8	221,5	274,0
7	51,2	127,1	100,1	187,2	496,6
8	25,2	59,8	122,7	315,8	516,4
9	49,3	53	64,2	167,4	325,6
10		70	34,4	178,2	413,5
Média	41,50	54,77	75,03	169,0	354,0
DP	9,49	31,20	31,11	63,44	115,9
EPM	3,16	9,86	9,83	20,06	36,66
Mínimo	25,20	22,10	34,40	92,20	189,7
Mediana	39,80	48,00	61,15	152,80	354,25
Máximo	53,40	127,1	125,4	315,8	516,4

Gráfico 2 – Perfis dos valores individuais de ureia sérica (mg/dl) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

6.2 RAZAO PROTEÍNA:CREATININA URINARIA (RPC)

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) estão representados a seguir, na tabela 4 e no gráfico 4.

Em toda a população estudada, os valores da RPC observados foram (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) de 0,01 – 6,94; $1,37 \pm 0,27$.

Obteve-se de 0,02 – 0,41; $0,14 \pm 0,04$ para os cães do grupo C, de 0,02 – 3,01; $0,39 \pm 0,29$ para os cães do grupo E1, de 0,01 – 1,14; $0,33 \pm 0,12$ para os cães do grupo E2, de 0,07 – 4,57; $1,51 \pm 0,54$ para os cães do grupo E3 e de 1,40 – 6,94; $4,37 \pm 0,47$ para os cães do grupo E4.

Os dados não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste de Kolgorov-Smirnov e, assim, no teste de Kruskal-Wallis foi detectada diferença entre os grupos ($p < 0,0001$). O teste de Dunn de comparação múltipla evidenciou diferença entre as médias dos valores da RPC dentre os seguintes grupos: C *versus* E4 ($p < 0,001$); E1 *versus* E4 ($p < 0,001$) e E2 *versus* E4 ($p < 0,01$).

Foi verificado que 31/49 (64%) dos cães apresentaram $RPC < 0,5$, dos quais 10/10 (100%), 9/10 (90%), 7/10 (70%), 5/10 (50%), correspondem, respectivamente, aos grupos C, E1, E2 e E3.

Valores da RPC de $0,5 \leq RPC < 1$ foram constatados em 2/10 (20%) do grupo E2 (cães E2#5 e E2#8) e 1/10 (10%) do grupo E3 (E3#7), o que representa 3/49 (6,1%) do total de cães com DRC.

Dentre os cães que apresentaram $1 \leq RPC < 2$, destacam-se o de número 2, do grupo E2 (E2#2), o de número 8 do grupo E3 (E3#8) e o de número 1 do grupo E4 (E4#1), o que corresponde a 3/49 (6,1%) do total de cães com DRC.

Foi observada, ainda, a ocorrência de $RPC \geq 2,0$ em 13/49 (26,53%) dos quais 1/10 (10%) do grupo E1 (E1#7), 3/10 (30%) do grupo E3 (E3#6, E3#9 e E3#10) e 9/10 (90%) do grupo E4 (E4#2, E4#3, E4#4, E4#5, E4#6, E4#7, E4#8, E4#9 e E4#10).

Tabela 3 - Valores individuais e estatística descritiva da razão proteína:creatinina (RPC) urinária dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

nº (#)	C	RPC			
		E1	E2	E3	E4
1	0,02	0,02	0,01	0,07	1,40
2	0,03	0,06	1,14	0,09	3,72
3	0,22	0,05	0,10	0,12	3,60
4	0,19	0,04	0,03	0,28	4,93
5	0,03	0,03	0,72	0,28	3,78
6	0,03	0,28	0,41	4,57	3,75
7	0,04	3,01	0,04	0,99	4,91
8	0,32	0,07	0,66	1,83	6,94
9	0,41	0,04	0,15	3,90	5,97
10		0,38	0,13	3,01	4,73
Média	0,14	0,39	0,33	1,51	4,37
DP	0,14	0,92	0,38	1,72	1,50
EPM	0,04	0,29	0,12	0,54	0,47
Mínimo	0,02	0,02	0,01	0,07	1,40
Mediana	0,04	0,05	0,14	0,63	4,25
Máximo	0,41	3,01	1,14	4,57	6,94

Gráfico 3 - Perfis dos valores individuais da razão proteína:creatinina (RPC) urinária dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4) – São Paulo - 2015

6.3 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS – PAGE) DE PROTEÍNAS URINÁRIAS

As descrições referentes à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas urinárias seguem abaixo.

6.3.1 Razão proteína:creatinina urinária das Regiões A (PM >60kDa) e B (PM <60kDa)

O perfil eletroforético das proteínas urinárias dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) está representado a seguir, na figura 1.

Figura 1 - Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães clinicamente normais (**grupo controle – C - C#1 até C#10**), demonstrando bandas de diferentes pesos moleculares - São Paulo - 2015

Legenda: A linha tracejada amarela demarca o peso molecular (PM) da albumina próximo a 67 kDa, e a divisão em Região A (PM > 60 kDa) e Região B (PM < 60 kDa). “P” representa o padrão de pesos moleculares.

O número total de bandas de proteínas urinárias, de acordo com o peso molecular, e os respectivos pesos moleculares, como também as porcentagens correspondentes às Regiões A (PM >60 kDa) e B (PM <60 kDa) dos cães clinicamente normais (grupo controle - C) estão representadas, individualmente, no quadro abaixo (Quadro 1).

Observa-se média de um total de 5 bandas de proteínas, sendo que o número maior de bandas concentra-se na Região B (PM < 60 kDa) que apresenta média de 3 bandas (variação de 1 a 7 bandas), enquanto que na Região A (PM > 60 kDa), a média do número de bandas é 2 com variação de 1 a 2 bandas (Quadro 2).

Somente em um cão do grupo controle (C#3) foi observado discreto predomínio de bandas localizadas na Região A em 1/9 (11,11%), pois no geral na Região B houve a maior concentração do número de bandas, ocorrendo em 8/9 (88,88%) cães (C#1, C#2, C#4, C#5, C#6, C#7, C#8, C#9).

No atinente aos pesos moleculares, na Região A foram observadas proteínas de PM entre 71,36 a 121,2 kDa e na Região B de 22,17 a 59,73 kDa (Quadro 1).

Quadro 1 - Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (Região A, PM > 60 kDa; Região B, PM < 60 kDa), referentes aos cães clinicamente normais (**grupo controle - C**)

Cão nº (#)	Número total de bandas de proteínas	Região A (PM >60 kDa)	Porcentagem (%)	Região B (PM <60 kDa)	Porcentagem (%)
C#1	5	114,9 71,36	29,11	57,64 33,85 27,21	70,89
C#2	6	114,9 73,42	17,43	58,47 34,35 27,45 24,79	82,58
C#3	1	72,9	55,8	33,85	44,2
C#4	9	121,2 72,9	30,52	59,31 51,08 42,23 35,39 33,1 25,79 22,17	69,47
C#5	5	116,1 73,94	28,39	59,73 34,61 27,7	71,61
C#6	6	119,9 72,9	37,19	58,06 33,55 26,85 23,54	62,81
C#7	6	110,08 71,36	32,48	57,24 32,95 26,14 22,75	67,52
C#8	2	72,9	33	58,06	67
C#9	3	121,2 74,47	48,46	26,61	51,53
Média	5	92,15	34,71	37,66	65,29
DP	2	22,70	11,38	13,57	11,38
EPM	1	5,675	3,792	2,564	3,793
Mínimo	1	71,36	17,43	22,17	44,20
Mediana	5	74,21	32,48	33,70	67,52
Máximo	9	121,2	55,80	59,73	82,58

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC correspondentes às Regiões A (PM > 60 kDa; RPC A) e B (PM < 60 kDa; RPC B) dos cães clinicamente normais (grupo controle - C) estão descritos a seguir, no quadro 2 e no gráfico 5.

Para a Região A, verificou-se que os valores da RPC foram (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) de 0,006 – 0,198; $0,059 \pm 0,022$, e para a Região B de 0,018 – 0,214; $0,086 \pm 0,027$. Somente o cão C#3 apresentou RPC A > RPC B, os demais, os valores.

Quadro 2 – Razão proteína:creatinina (RPC) urinária correspondente às proteínas das Regiões A (peso molecular > 60kDa) e B (peso molecular < 60 kDa), e número de bandas de proteínas correspondentes as referidas Regiões, de cães clinicamente normais (**grupo controle - C**)

Cão nº (#)	RPC	Nº de bandas Região A	RPC Região A (RPC A)	Nº de bandas Região B	RPC Região B (RPC B)
C#1	0,028	2	0,0081508	3	0,0198492
C#2	0,039	2	0,0067977	4	0,0322062
C#3	0,22	1	0,12276	1	0,09724
C#4	0,19	2	0,057988	7	0,131993
C#5	0,03	2	0,008517	3	0,021483
C#6	0,03	2	0,011157	4	0,018843
C#7	0,04	2	0,012992	4	0,027008
C#8	0,32	1	0,1056	1	0,2144
C#9	0,41	2	0,198686	1	0,211273
Média	0,14	2	0,059	3	0,086
DP	0,14	0,44	0,06	2	0,082
EPM	0,04	0,14	0,022	0,65	0,027
Mínimo	0,028	1,0	0,0067	1,0	0,018
Mediana	0,04	2,0	0,012	3,0	0,032
Máximo	0,41	2,0	0,1987	7,0	0,2144

Gráfico 4 - Razão proteína:creatinina (RPC) urinária das Regiões A (RPC A) e B (RPC B) dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) - São Paulo – 2015

Legenda: os valores estão expressos em média $\pm$ EPM.

O perfil eletroforético das proteínas urinárias dos cães doentes renais crônicos no Estagio 1 (grupo E1) está representado a seguir, na figura 2.

Figura 2 - Perfil eletroforético de proteínas urinárias dos cães no estagio 1 (grupo E1- E1#1 a E1#10), demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015

Legenda: A linha tracejada amarela demarca o peso molecular (PM) da albumina próximo a 67 kDa, e a divisão em Região A (PM > 60 kDa) e Região B (PM < 60 kDa). "P" representa o padrão de pesos moleculares.

O número total de bandas de proteínas urinárias, e os respectivos pesos moleculares, como também as porcentagens correspondentes às Regiões A (>60 kDa) e B (<60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no estagio 1 (grupo E1) estão representadas, individualmente, no quadro abaixo (Quadro 3).

Foi observado o predomínio de bandas localizadas na Região A em 2/10 (20%) cães (E1#2 e E1#7) e na Região B em 8/10 (80%) cães (E1#1, E1#3, E1#4, E1#5, E1#6, E1#8, E1#9 e E1#10). A média do número de bandas da Região A foi de 2 e com valores mínimo e máximo, respectivamente, de 1 a 2, e quanto a Região B, a média foi de 3 bandas e variação de 1 a 5 bandas.

Quanto aos pesos moleculares das proteínas nas amostras de urina, observou-se valores (mínimo – máximo) de 20,28 – 112,5 kDa, de forma que de 64,17 – 112,5 kDa estavam presentes na Região A e de 20,28 – 58,07 kDa na Região B (Quadro 3).

Quadro 3 - Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (Região A, PM> 60 kDa; Região B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no estagio 1 (grupo E1)

Cão nº (#)	Número total de bandas de proteínas	Região A (PM >60 kDa)	Porcentagem (%)	Região B (PM <60 kDa)	Porcentagem (%)
E1#1	5	100 64,17	43,57	34,69 26,54 22,21	56,43
E1#2	3	102,65 64,98	66,33	25,47	33,67
E1#3	4	98,37 66,2	45,01	53,89 25,47	54,99
E1#4	5	101,32 66,2	41,14	35,33 26,42 22,83	58,86
E1#5	7	112,49 69,16	30,9	58,07 37,14 26,91 25,23 20,28	69,1
E1#6	6	102,65 70,03	41,4	55,25 49,23 32,97 25,58	58,59
E1#7	4	70,46	62,29	41,7 33,9 26,54	37,7
E1#8	7	100 66,62	34,89	53,89 33,43 26,67 25,7 22,83	65,11
E1#9	5	108,16 68,3	39	55,94 34,21 26,67	61
E1#10	7	99,18 67,45	31,11	55,94 49,23 41,54 32,97 25,35	68,89
Média	5	84,55	43,56	35,00	56,46
DP	1,418	19,80	11,99	11,92	11,99
EPM	0,4485	6,261	3,79	2,044	3,79
Mínimo	3,000	64,17	30,90	20,28	33,67
Mediana	5,000	83,77	41,27	32,97	58,73
Máximo	7,000	112,5	66,33	58,07	69,10

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC correspondentes às Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no Estágio 1 (grupo E1) estão descritos a seguir, no quadro 4 e no gráfico 6.

Para a Região A, verificou-se que os valores da RPC foram (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) de 0,008 – 1,86; 0,22 $\pm$ 0,182, e para a Região B de 0,012 – 1,15; 0,175 $\pm$ 0,11. Os cães E1#2 e E1#7 apresentaram RPC A > RPC B.

Quadro 4 – Razão proteína:creatinina (RPC) urinária correspondente às proteínas das Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) e número de bandas de proteínas correspondentes as referidas Regiões, de cães doentes renais crônicos no estágio 1 (grupo E1)

Cão nº (#)	RPC	Nº de bandas Região A	RPC Região A (RPC A)	Nº de bandas Região B	RPC Região B (RPC B)
E1#1	0,02	2	0,008	3	0,012
E1#2	0,06	2	0,04	1	0,02
E1#3	0,05	2	0,0225	2	0,0275
E1#4	0,04	2	0,016	3	0,024
E1#5	0,03	2	0,008	5	0,021
E1#6	0,28	2	0,116	4	0,164
E1#7	3,01	1	1,86	3	1,15
E1#8	0,07	2	0,02	5	0,05
E1#9	0,04	2	0,016	3	0,024
E1#10	0,38	2	0,118	5	0,261
Média	0,39	2	0,22	3	0,175
DP	0,92	0,31	0,576	1,35	0,352
EPM	0,29	0,10	0,182	0,426	0,111
Mínimo	0,02	1,00	0,008	1,00	0,012
Mediana	0,05	2,00	0,021	3,00	0,025
Máximo	3,01	2,00	1,860	5,00	1,150

Gráfico 5 - Valores da razão proteína:creatinina (RPC) urinária das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no **estágio 1 (grupo E1)** – São Paulo - 2015

Legenda: os valores estão expressos em média $\pm$ EPM.

O perfil eletroforético das proteínas urinárias dos cães doentes renais crônicos no Estagio 2 (grupo E2) está representado a seguir, na figura 3.

Figura 3 - Perfil eletroforético de bandas de proteínas urinárias dos cães no **estagio 2 (grupo E2; E2#1 a E2#10)**, demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015

Legenda: A linha tracejada amarela demarca o peso molecular (PM) da albumina próximo a 67 kDa, e a divisão em Região A (PM > 60 kDa) e Região B (PM < 60 kDa). "P" representa o padrão de pesos moleculares.

O número total de bandas de proteínas urinárias, e os respectivos pesos moleculares, como também as porcentagens correspondentes às Regiões A (PM >60 kDa) e B (PM <60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no estagio 2 (grupo E2) estão representadas, individualmente, no quadro abaixo (Quadro 5).

Foi observado o predomínio de bandas localizadas na Região A em 5/10 (50%) cães (E2#2, E2#4, E2#5, E2#8 e E2#9) e na Região B em 5/10 (50%) cães (E2#1, E2#3, E2#6, E2#7 e E2#10). Entretanto na avaliação das médias, a Região A apresentou uma banda, com variação de 1 a 3 bandas (mínimo e máximo), e a Região B com média de 2 bandas e variação de 1 a 6 bandas.

Quanto aos pesos moleculares das proteínas, observou-se variação de mínimo e máximo, respectivamente, de 24,82 –128,1 kDa, de forma que os PM 71,08 –128,1 kDa estavam presentes na Região A e de 24,82 – 59,09 na Região B.

Quadro 5 - Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por Regiões (Região A, PM> 60 kDa; Região B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no **estágio 2 (grupo E2)**

Cão nº (#)	Número total de bandas de proteínas	Região A (>60 kDa)	Porcentagem (%)	Região B (<60 kDa)	Porcentagem (%)
E2#1	3	123,86 73,23	59,55	25,25	40,45
E2#2	8	111,92 73,67	27,25	54,35 45,94 42,81 33,34 27,47 24,82	72,75
E2#3	2	71,51	44,33	25,5	55,67
E2#4	2	71,93	53,01	25,5	46,99
E2#5	8	117,08 82,32 72,8	40,15	59,09 43,21 34,01 27,47 25,25	59,83
E2#6	5	71,93	26,19	54,03 33,34 27,88 25,12	73,8
E2#7	2	72,8	52,94	25,5	47,06
E2#8	2	71,08	71,32	25,63	28,68
E2#9	2	71,08	47,6	25,76	52,4
E2#10	3	128,12 71,93	58,23	25,12	41,77
Média	3,70	85,68	48,06	33,47	51,94
DP	2,45	21,99	14,19	11,16	14,19
EPM	0,77	5,67	4,488	2,380	4,487
Mínimo	2,0	71,08	26,19	24,82	28,68
Mediana	2,50	72,80	50,27	27,47	49,73
Máximo	8,0	128,1	71,32	59,09	73,80

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC correspondentes às Regiões A (PM> 60 kDa) e B (PM <60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no Estágio 2 (grupo E2) estão descritos a seguir, no quadro 6 e no gráfico 7.

Para a Região A, verificou-se que os valores da RPC (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM) foram de 0,007 – 0,60; $0,1753 \pm 0,066$, e para a Região B de 0,0088 – 0,5357; $0,1676 \pm 0,057$.

A RPC da Região A foi maior que a RPC da Região B em 5/10 (50%) cães (E2#1, E2#4, E2#7, E2#8 e E2#10) e RPC da Região B maior que a RPC da Região A em 5/10 (50%) cães (E2#2, E2#3, E2#5, E2#6 e E2#9).

Quadro 6 – Razão proteína:creatinina (RPC) urinária das bandas de proteínas correspondentes das Regiões A (PM >60kDa) e B (PM <60 kDa) e número de bandas de proteínas correspondentes as referidas Regiões, de cães doentes renais crônicos no estágio 2 (grupo E2)

Cão nº (#)	RPC	Nº de bandas Região A	RPC Região A (RPC A)	Nº de bandas Região B	RPC Região B (RPC B)
E2#1	0,016	2	0,00946845	1	0,00643155
E2#2	1,14	2	0,31065	6	0,82935
E2#3	0,101	1	0,0447733	1	0,0562267
E2#4	0,036	1	0,0190836	1	0,0169164
E2#5	0,721	3	0,2894815	5	0,4313743
E2#6	0,417	1	0,1092123	4	0,307746
E2#7	0,048	1	0,0254112	1	0,0225888
E2#8	0,666	1	0,4749912	1	0,1910088
E2#9	0,155	1	0,07378	1	0,08122
E2#10	0,13	2	0,7123	1	0,054301
Média	0,3430	1	0,2069	2	0,1997
DP	0,3823	0,7071	0,2370	1,989	0,2624
EPM	0,1209	0,2236	0,07495	0,6289	0,08298
Mínimo	0,0160	1,0	0,009468	1,0	0,006432
Mediana	0,1425	1,0	0,0915	1,0	0,06872
Máximo	1,140	3,0	0,7123	6,0	0,8294

Gráfico 6 - Valores da razão proteína:creatinina (RPC) urinária das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no estágio 2 (grupo E2) – São Paulo - 2015

Legenda: os valores estão expressos em média $\pm$ EPM.

O perfil eletroforético das proteínas urinárias dos cães doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo E3) está representado a seguir, na figura 4.

Figura 4 - Perfil eletroforético de bandas de proteínas urinárias dos cães no **estágio 3 (grupo E3; E3#1 a E3#10)**, demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015

Legenda: A linha tracejada amarela demarca o peso molecular (PM) da albumina próximo a 67 kDa, e a divisão em Região A (PM > 60 kDa) e Região B (PM < 60 kDa). "P" representa o padrão de pesos moleculares.

O número total de bandas de proteínas urinárias, e os respectivos pesos moleculares, como também as porcentagens correspondentes às Regiões A (PM >60 kDa) e B (PM <60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo E3) estão representadas, individualmente, no quadro abaixo (Quadro 7).

Foi observado o predomínio de bandas localizadas na Região B em 10/10 (100%) dos cães do grupo E3. A média do número de bandas da Região A foi de 2, sendo que o mínimo e máximo, respectivamente, foram de 1 a 3 e para a Região B, a média foi de 5 bandas, variando de 3 a 7 bandas.

Quanto aos pesos moleculares das proteínas, observou-se bandas de PM de 21,0 a 116,4 kDa, de forma que os PM entre 64,89 a 116,4 kDa foram detectados na Região A e de PM 21,0 a 59,49 kDa na Região B.

Quadro 7 - Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (Região A, PM> 60 kDa; Região B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no estagio 3 (grupo E3)

Cão nº (#)	Número total de bandas de proteínas	Região A (PM >60 kDa)	Porcentagem (%)	Região B (PM <60 kDa)	Porcentagem (%)
E3#1	6	116,4 69,96	33,6	34,43 27,85 25 23,15	66,4
E3#2	8	81,83 70,37	34,6	59,15 53,29 43,2 34,85 27,96 26,97	65,4
E3#3	10	109,6 77,66 68,36	29,6	57,46 52,37 34,29 32,42 27,63 25,4 22,36	70,4
E3#4	9	79,03 69,16	25,9	57,13 52,98 42,28 34,71 28,3 26,97 22,83	74,1
E3#5	9	80,42 69,56	16	57,79 52,37 42,46 34,71 28,3 26,97 22,83	84
E3#6	5	78,34 69,56	47,6	52,98 42,83 26,44	52,4
E3#7	5	68,76	32,24	57,46 42,64 33,88 26,23	67,28
E3#8	9	75,0 66,03	29,5	59,49 55,17 50 40,85 32,95 25,51 21	70,5
E3#9	6	75,0 64,89	35,6	49,57 40,15 32,42 24,31	64,4
E3#10	7	79,72 69,96	18,5	52,37 42,1 33,75 27,41 22,67	81,5
Média	7,400	76,98	30,31	37,60	69,64
DP	1,838	13,37	8,974	12,27	8,986
EPM	0,5812	2,990	2,838	1,670	2,842
Mínimo	5,000	64,89	16,00	21,00	52,40
Mediana	7,500	72,69	30,92	34,36	68,84
Máximo	10,00	116,4	47,60	59,49	84,00

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC correspondentes às Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no Estágio 3 (grupo E3) estão descritos a seguir, no quadro 8 e no gráfico 8.

Para a Região A, verificou-se que os valores da RPC foram de 0,02 – 2,17; $0,51 \pm 0,22$, e para a Região B de 0,04 – 2,51; $0,99 \pm 0,33$. Todos os cães (10/10;100%) do grupo E3 apresentaram RPC B > RPC A (Gráfico 14).

Quadro 8 – Razão proteína:creatinina (RPC) urinária correspondente às proteínas das Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) e número de bandas de proteínas correspondentes as referidas Regiões, de cães doentes renais crônicos no estágio 3 (grupo E3)

Cão nº (#)	RPC	Nº de bandas Região A	RPC Região (RPC A)	Nº de bandas Região B	RPC Região (RPC B)
E3#1	0,07	2	0,0234	4	0,0465
E3#2	0,09	2	0,0311	6	0,0588
E3#3	0,12	3	0,037	7	0,088
E3#4	0,28	2	0,073	7	0,210
E3#5	0,28	2	0,045	7	0,239
E3#6	4,57	2	2,173	3	2,396
E3#7	0,99	1	0,321	4	0,676
E3#8	1,83	2	0,539	7	1,290
E3#9	3,90	2	1,388	4	2,511
E3#10	3,01	2	0,556	5	2,453
Média	1,51	2	0,51	5	0,99
DP	1,72	0,47	0,72	0,72	1,07
EPM	0,54	0,14	0,22	0,49	0,33
Mínimo	0,07	1,0	0,02	3,0	0,04
Mediana	0,63	2,0	0,19	5,5	0,45
Máximo	4,57	3,0	2,17	7,0	2,51

Gráfico 7 - Valores da razão proteína:creatinina (RPC) urinária das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no **estágio 3 (grupo E3)** – São Paulo - 2015

Legenda: os valores estão expressos em média $\pm$ EPM.

O perfil eletroforético das proteínas urinárias dos cães doentes renais crônicos no Estagio 4 (grupo E4) está representado a seguir, na figura 5.

Figura 5 - Perfil eletroforético de bandas de proteínas urinárias dos cães no **estagio 4 (grupo E4; E4#1 a E4#10)**, demonstrando bandas de proteínas com diferentes pesos moleculares - São Paulo – 2015

Legenda: A linha tracejada amarela demarca o peso molecular (PM) da albumina próximo a 67 kDa, e a divisão em Região A (PM > 60 kDa) e Região B (PM < 60 kDa). "P" representa o padrão de pesos moleculares.

O número total de bandas de proteínas urinárias, e seus respectivos pesos moleculares, e as porcentagens correspondentes às Regiões A (PM >60 kDa) e B (PM <60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no Estagio 4 (grupo E4) estão representadas, individualmente, no quadro abaixo (Quadro 9).

Todos os cães do grupo E4 apresentaram predomínio de bandas localizadas na Região B (10/10;100%), sendo que a média desta referida Região B foi de 4 bandas (mínimo e máximo de 2 a 6 bandas, respectivamente), e para a Região A, a média foi somente de 2 bandas, com variação de 1 a 2 bandas.

Quanto aos pesos moleculares das proteínas, observou-se variação de PM de mínimo e máximo de 20,28 e 72,02 kDa, respectivamente; para a Região A o PM variou de 61,24 a 72,02 kDa, e para a Região B de 20,28 a 57,49 kDa.

Quadro 9 - Dados individuais das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), segundo o peso molecular (PM), e correspondentes porcentagens de bandas de proteínas por regiões (Região A, PM> 60 kDa; Região B, PM< 60 kDa), referentes aos cães doentes renais crônicos no **estágio 4 (grupo E4)**

Cão nº (#)	Número total de bandas de proteínas	Região A (>60 kDa)	Porcentagem (%)	Região B (<60 kDa)	Porcentagem (%)
E4#1	4	64,06	37,84	49,82 39,93 25	62,6
E4#2	4	62,63	33,61	39,78 32,19 24,48	66,4
E4#3	3	62,35	28,7	39,35 25,56	71,3
E4#4	7	72,02 62,92	25,6	57,49 49,1 40,07 32,3 24,83	74,4
E4#5	7	64,06	20,39	51,6 40,07 32,6 27,93 25,72 20,28	79,6
E4#6	5	63,2	26,64	50,68 40,37 32,71 25,32	73,4
E4#7	6	64,93	24,79	49,46 40,22 32,19 29,65 25,48	75,2
E4#8	6	68,85 61,24	33	48,22 39,35 31,99 25,32	67
E4#9	6	61,79	23,11	49,1 39,5 32,09 27,57 25,64	76,9
E4#10	7	70,42 62,92	34,67	57,49 49,82 39,78 32,4 25	65,32
Média	5,500	64,72	28,84	36,37	71,21
DP	1,434	3,455	5,687	10,21	5,611
EPM	0,4534	0,9582	1,798	1,576	1,774
Mínimo	3,000	61,24	20,39	20,28	62,60
Mediana	6,000	63,20	27,67	32,66	72,35
Máximo	7,000	72,02	37,84	57,49	79,60

Os valores individuais e a estatística descritiva da RPC correspondentes às Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) dos cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) estão descritos a seguir, no quadro 10 e gráfico 9.

Para a Região A, verificou-se que os valores da RPC foram de 0,52 – 2,29; $1,23 \pm 0,15$, e para a Região B de 0,87 – 4,64; $3,13 \pm 0,35$. Todos os 10/10 (100%) cães apresentaram RPC B > RPC A (Gráfico 16), e foi constatada diferença entre as RPC A e RPC B pelo teste *t* de Student ($p < 0,0001$).

Quadro 10 – Razão proteína:creatinina (RPC) urinária correspondente às proteínas presentes nas Regiões A (PM > 60 kDa) e B (PM < 60 kDa) e número de bandas de proteínas correspondentes as referidas Regiões de cães doentes renais crônicos no **estágio 4 (grupo E4)**

Cão nº (#)	RPC	Nº de bandas Região A	RPC Região A (RPC A)	Nº de bandas Região B	RPC Região B (RPC B)
E4#1	1,40	1	0,52	3	0,87
E4#2	3,72	1	1,25	3	2,47
E4#3	3,60	1	1,03	2	2,57
E4#4	4,93	2	1,26	5	3,67
E4#5	3,78	1	0,77	6	3,01
E4#6	3,75	1	1,00	4	2,75
E4#7	4,91	1	1,21	5	3,70
E4#8	6,94	2	2,29	4	4,64
E4#9	5,97	1	1,37	5	4,60
E4#10	4,73	2	1,64	5	3,09
Média	4,37	1	1,23	4	3,13
DP	1,50	0,48	0,48	1,22	1,10
EPM	0,47	0,15	0,15	0,38	0,35
Mínimo	1,40	1,0	0,52	2,0	0,87
Mediana	4,25	1,0	1,23	4,5	3,05
Máximo	6,94	2,0	2,29	6,0	4,64

Gráfico 8 - Valores da razão proteína:creatinina (RPC) urinária das Regiões A e B dos cães doentes renais crônicos no **estágio 4 (grupo E4)** – São Paulo - 2015

Legenda: os valores estão expressos em média $\pm$ EPM
 **** $p < 0,0001$.

6.4 WESTERN BLOTTING PARA A DETERMINAÇÃO URINÁRIA DAS PROTEÍNAS ALBUMINA, LIGADAS À VITAMINA D (VDBP) E AO RETINOL (RBP), E DE TAMM-HORSFALL (THP)

6.4.1 Western blotting para a determinação urinária de albumina

Abaixo, a representação do *Western Blotting* para a determinação urinária de albumina em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), na figura 6.

Figura 6 - *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da **albumina** - São Paulo – 2015

Fonte: (CHACAR, F. C., 2015)

O resultado da estatística descritiva da análise da densitometria das bandas está descrito a seguir (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM %): de 28,17 – 243,4; $100 \pm 24,94\%$ para os cães clinicamente normais (grupo controle – C), de 30,04 – 1279; $285,2 \pm 121,3\%$ para os cães no estágio 1 (grupo E1), de 37,33 – 910,4; $321,8 \pm 87,48\%$, para os cães no estágio 2 (grupo E2); de 33,23 – 1303; $538,1 \pm 147,3\%$, para os cães no estágio 3 (grupo E3), e de 301,9 – 1303; $661,4 \pm 119,1\%$, para os cães no estágio 4 (grupo E4).

Foi constatada diferença significativa entre os valores de densitometria das bandas de albumina urinária pela análise de variância ($p= 0,0087$), e o teste de comparação múltipla de Tukey evidenciou diferença entre as médias dos valores da densitometria da albumina urinária entre o grupo C *versus* E4 ($p \leq 0,01$).

O gráfico 10 representa a análise da densitometria das bandas de albumina urinária em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e nos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4).

Gráfico 9 – Análise da densitometria das bandas de albumina identificadas por meio de *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) - São Paulo - 2015

Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EPM (grupo C: $100 \pm 24,94\%$; grupo E4: $661,4 \pm 119,1\%$; $**p \leq 0,01$).

6.4.2 Western blotting para a determinação urinária da proteína ligada à Vitamina D (VDBP)

Na figura 7 está representada a análise por *Western Blotting* para a determinação urinária da VDBP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e em cães doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4).

Figura 7 - *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4), para a determinação da proteína ligada à vitamina D (VDBP) - São Paulo – 2015

Fonte: (CHACAR, F. C., 2015)

O resultado da estatística descritiva da análise da densitometria das bandas está descrito a seguir (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM %): de 97,04 – 103,0; $100 \pm 0,64\%$ para os cães clinicamente normais (grupo controle – C), de 97,17 – 216; $127,6 \pm 11,30\%$ para os cães no estágio 1 (grupo E1), de 109 – 175,9; $127,7 \pm 7,84\%$ para os cães no estágio 2 (grupo E2); de 98,66 – 198,2; $139,4 \pm 11,58\%$ para os cães no estágio 3 (grupo E3), e de 141,2 – 222,8; $184,5 \pm 10,07\%$ para os cães no estágio 4 (grupo E4).

Foi constatada diferença significativa entre os valores de densitometria das bandas de VDBP urinária pela análise de variância ($p < 0,0001$), e o teste de comparação múltipla de Tukey evidenciou diferença entre as médias dos valores da densitometria da VDBP dentre os seguintes grupos: C *versus* E3 ($p \leq 0,05$); C *versus* E4 ($p \leq 0,0001$); E1 *versus* E4 ($p \leq 0,001$); E2 *versus* E4 ($p \leq 0,001$) e E3 *versus* E4 ($p \leq 0,05$).

O gráfico 11 representa a análise das bandas de VDBP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e também dos cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4).

Gráfico 10 – Análise da densitometria das bandas de proteína ligada à vitamina D (VDBP) identificadas por meio de *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) - São Paulo – 2015

Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EPM (grupo C: $100 \pm 0,64\%$; grupo E1: $127,6 \pm 11,30\%$; grupo E2: $127,7 \pm 7,84\%$; grupo E3: $139,4 \pm 11,58\%$; grupo E4: $184,5 \pm 10,07\%$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

6.4.3 *Western blotting* para a determinação urinária da proteína ligada ao Retinol (RBP)

Na figura 8 está apresentado o *Western Blotting* para a determinação urinária da RBP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e em cães doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4).

Figura 8 - *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupo E1 ao E4), para a determinação da proteína ligada ao retinol (RBP) - São Paulo – 2015

Fonte: (CHACAR, F. C., 2015)

O resultado da estatística descritiva da análise da densitometria das bandas está descrito a seguir (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM%): de 93,74 – 106,3; $100 \pm 1,19\%$ para os cães clinicamente normais (grupo controle – C), de 92,41 – 431; $139,4 \pm 33,01\%$ para os cães no estágio 1 (grupo E1), de 95,71 – 1010; $215,3 \pm 88,48\%$ para os cães no estágio 2 (grupo E2); de 106,9 – 291,2; $177,4 \pm 21,66\%$ para os cães no estágio 3 (grupo E3), e de 185,9 – 1347; $432,4 \pm 108,2\%$ para os cães no estágio 4 (grupo E4).

Houve diferença dos valores da densitometria das bandas de RBP pelo teste de Kruskal Wallis ($p < 0,0001$) e o teste de comparação múltipla de Dunn evidenciou diferença entre as medianas dos valores da densitometria da RBP dentre os seguintes grupos: C versus E3 ($p \leq 0,05$); C versus E4 ($p \leq 0,0001$) e E1 versus E4 ($p \leq 0,001$).

No gráfico 12 está representada a análise da densitometria das bandas de RBP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4).

Gráfico 11 – Análise da densitometria das bandas de proteínas ligadas ao retinol (RBP) identificadas por meio de *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) - São Paulo - 2015

Legenda: Resultados expressos em média $\pm$ EPM (grupo C: $100 \pm 1,19\%$; grupo E1: $139,4 \pm 33,01\%$; grupo E2: $215,3 \pm 88,48\%$; grupo E3: $177,4 \pm 21,66\%$; grupo E4: $432,4 \pm 108,2\%$; * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$).

6.4.4 *Western blotting* para a determinação urinária da proteína de Tamm-Horsfall (THP)

A representação do *Western Blotting* para a determinação urinária da THP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e em cães doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) está configurada na figura 9.

Figura 9 - *Western Blotting* das amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle - C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4), para a determinação da proteína de Tamm Horsfall (THP) - São Paulo – 2015

Fonte: (CHACAR, F. C., 2015)

O resultado da estatística descritiva da análise da densitometria das bandas de THP está descrito a seguir (mínimo – máximo; média $\pm$ EPM%): de 56,27 – 135,3; $100 \pm 7,74\%$ para os cães clinicamente normais (grupo controle – C), de 70,39 – 185,1; $117,2 \pm 10,81\%$ para os cães no estágio 1 (grupo E1), de 43,13 – 136,4; $86,05 \pm 9,03\%$ para os cães no estágio 2 (grupo E2); de 33,76 – 131,4; $65,38 \pm 8,66\%$ para os cães no estágio 3 (grupo E3), e de 12,0 – 100,6; $46,70 \pm 8,96\%$ para os cães no estágio 4 (grupo E4).

Foi detectada diferença entre as densitometrias das bandas de THP pela análise de variância ($p < 0,0001$) e o teste de comparação múltipla de Tukey evidenciou diferença entre as médias dos valores da densitometria de THP dentre os seguintes grupos: C *versus* E4 ($p \leq 0,01$); E1 *versus* E3 ($p \leq 0,01$); E1 *versus* E4 ($p \leq 0,0001$) e E2 *versus* E4 ($p \leq 0,05$).

A representação gráfica da análise de densitometria das bandas de THP em cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) está apresentada no gráfico 13.

Gráfico 12 – Análise da densitometria das bandas de proteína de Tamm Horsfall (THP) identificadas por meio de *Western Blotting* nas amostras de urina de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) - São Paulo – 2015

6.5 ANÁLISE INDIVIDUAL DA RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA, ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE) E *WESTERN BLOTTING* DE PROTEÍNAS URINÁRIAS

A avaliação individual da RPC, da eletroforese (SDS – PAGE) e do *Western blotting* para as proteínas albumina, VDBP, RBP e THP dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) e dos cães doentes renais crônicos, nos estágios 1 ao 4 (grupos E1 ao E4) estão descritas a seguir.

No grupo C, foram observados valores de $RPC < 0,5$ em 10/10 (100%) dos cães. Os animais C#3, C#8 e C#9 apresentaram valores de RPC considerados *borderlines* ($0,2 < RPC < 0,5$). Os cães C#3 e C#8 apresentaram 1 banda de proteína na Região A e 1 banda na Região B. O cão C#9 apresentou 2 bandas na Região A e 1 na Região B. Nos demais, verificou-se maior número de bandas na Região B.

Houve imunodeteção de albumina nos cães C#3, C#4 e C#8, e de THP em todos os animais deste grupo. Não houve imunodeteção de VDBP e RBP em nenhum cão do grupo C.

No quadro 11 está representada a análise individual da razão proteína:creatinina (RPC) urinária, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* das proteínas urinárias, referentes aos cães do grupo C.

Quadro 11 - Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de *Western blotting*, dos cães clinicamente normais (**grupo controle – C**)

Identificação Cão nº (#)	RPC	PM das bandas proteínas pela eletroforese (SDS-PAGE)		Western blotting de proteínas urinarias			
		Região A (>60 kDa)	Região B (<60 kDa)	Albumina*	VDBP*	RBP*	THP**
C#1	0,028	114,9 71,36	57,64 33,85 27,21	-	-	-	++++
C#2	0,039	114,9 73,42	58,47 34,35 27,45 24,79	-	-	-	++
C#3	0,22	72,9	33,85	++	-	-	++++
C#4	0,19	121,2 72,9	59,31 51,08 42,23 35,39 33,1 25,79 22,17	+	-	-	++++
C#5	0,03	116,1 73,94	59,73 34,61 27,7	-	-	-	+++
C#6	0,03	119,9 72,9	58,06 33,55 26,85 23,54	-	-	-	++++
C#7	0,04	110,08 71,36	57,24 32,95 26,14 22,75	-	-	-	+++
C#8	0,32	72,9	58,06	+	-	-	++++
C#9	0,41	121,2 74,47	26,61	-	-	-	++++

Nota: *valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “-” corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), “+” corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), “++” correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), “+++” correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e “++++” correspondem a ≥ 4 vezes (400%)

**valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “++++” representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), “+++” representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), “++” representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), “+” representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e “-” representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C)

No grupo E1, foram observados valores de $RPC < 0,5$ em 9/10 (90%) dos cães. E1#6 e E1#10 apresentaram valores de RPC considerados *borderlines* ($0,2 < RPC < 0,5$) e E1#7 apresentou valores de $RPC \geq 2,0$.

O cão E1#2 apresentou 2 bandas na Região A e 1 banda na Região B. O cão E1#3 apresentou 2 bandas na Região A e 2 na Região B. Nos demais, verificou-se maior número de bandas na Região B.

Houve imunodeteção de albumina nos cães E1#6, E1#7, E1#8, E1#9 e E1#10 (5/10; 50%). A presença de VDBP foi observada em 7/10 (70%) dos cães, com exceção do E1#1, E1#3 e E1#5. RBP foi identificada em 2/10 (20%) cães, estando presente de forma mais intensa em E1#7 e menos intensa em E1#10. THP foi imunodetectada em 10/10 (100%) dos cães do grupo E1.

No quadro 12 está representada a análise individual da razão proteína:creatinina (RPC) urinária, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* de proteínas urinárias, referentes aos cães do grupo E1.

Quadro 12 - Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de *Western blotting*, dos cães doentes renais crônicos no estágio 1 (**grupo E1**)

Identificação Cão nº (#)	RPC	PM das bandas proteínas pela eletroforese (SDS-PAGE)		Western blotting de proteínas urinarias			
		Região A (>60 kDa)	Região B (<60 kDa)	Albumina*	VDBP*	RBP*	THP**
E1#1	0,02	100 64,17	34,69 26,54 22,21	-	-	-	++++
E1#2	0,06	102,65 64,98	25,47	-	+	-	++++
E1#3	0,05	98,37 66,2	53,89 25,47	-	-	-	+++
E1#4	0,04	101,32 66,2	35,33 26,42 22,83	-	+	-	++++
E1#5	0,03	112,49 69,16	58,07 37,14 26,91 25,23 20,28	-	-	-	++++
E1#6	0,28	102,65 70,03	55,25 49,23 32,97 25,58	++++	+	-	++++
E1#7	3,01	70,46	41,7 33,9 26,54	+++	++	++++	++++
E1#8	0,07	100 66,62	53,89 33,43 26,67 25,7 22,83	++	+	-	++++
E1#9	0,04	108,16 68,3	55,94 34,21 26,67	+	+	-	+++
E1#10	0,38	99,18 67,45	55,94 49,23 41,54 32,97 25,35	++++	+	+	++++

Nota:*valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “-” corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), “+” corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), “++” correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), “+++” correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e “++++” correspondem a ≥ 4 vezes (400%)

**valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “++++” representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), “+++” representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), “++” representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), “+” representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e “-” representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C)

No grupo E2, foram observados valores de $RPC < 0,5$ em 7/10 (70%) dos cães. E2#6 apresentou valores de RPC considerados *borderlines* ($0,2 < RPC < 0,5$). E2#5 e E2#8 apresentaram $0,5 \leq RPC < 1$, e E2#2 apresentou $1 \leq RPC < 2$.

Nos cães E2#1 e E2#10, 2 bandas foram identificadas na Região A e 1 na Região B. Nos cães E2#2, E2#5 e E2#6, maior número de bandas foi verificado na Região B.

Houve imunodeteção de albumina em 7/10 (70%) dos cães, e de VDBP em 9/10 (90%) dos casos. A imunodeteção de RBP também foi verificada em 9/10 (90%) dos animais. A presença de THP foi observada em todos os cães deste grupo, de forma variada. E2#6 apresentou menor intensidade da imunodeteção para esta proteína.

No quadro 13 está representada a análise individual da razão proteína:creatinina (RPC) urinária, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* de proteínas urinárias, referentes aos cães do grupo E2.

Quadro 13 - Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de *Western blotting*, dos cães doentes renais crônicos no estágio 2 (**grupo E2**)

Identificação Cão nº (#)	RPC	PM das bandas proteínas pela eletroforese (SDS-PAGE)		Western blotting de proteínas urinárias			
		Região A (>60 kDa)	Região B (<60 kDa)	Albumina*	VDBP*	RBP*	THP**
E2#1	0,016	123,86 73,23	25,25	-	+	-	++
E2#2	1,14	111,92 73,67	54,35 45,94 42,81 33,34 27,47 24,82	++++	+	+	++
E2#3	0,101	71,51	25,5	+	+	+	++++
E2#4	0,036	71,93	25,5	-	+	+	+++
E2#5	0,721	117,08 82,32 72,8	59,09 43,21 34,01 27,47 25,25	++++	+	+	++++
E2#6	0,417	71,93	54,03 33,34 27,88 25,12	++	+	++++	++
E2#7	0,048	72,8	25,5	-	+	+	+++
E2#8	0,666	71,08	25,63	+++	+	+	++++
E2#9	0,155	71,08	25,76	++++	-	+	+++
E2#10	0,130	128,12 71,93	25,12	+++	+	+	++++

Nota: *valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “-” corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), “+” corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), “++” correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), “+++” correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e “++++” correspondem a ≥ 4 vezes (400%)

**valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “++++” representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), “+++” representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), “++” representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), “+” representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e “-” representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C)

No grupo E3, foram observados valores de $RPC < 0,5$ em 5/10 (50%) dos cães. E3#4 e E3#5 apresentaram valores de RPC considerados *borderlines* ($0,2 < RPC < 0,5$). E3#7 e E3#8 apresentaram $1 \leq RPC < 2$. E3#6, E3#9 e E3#10 obtiveram $RPC \geq 2,0$.

Maior numero de bandas na Região B foi verificada em 10/10 (100%) dos cães.

Houve imunodeteção de albumina em 8/10 (80%) dos cães, e de VDBP em 8/10 (80%) dos casos. A imunodeteção de RBP foi verificada em 10/10 (100%) dos animais. A presença de THP foi observada em todos os cães deste grupo, de forma variada. E3#2 apresentou menor intensidade da imunodeteção para esta proteína.

No quadro 14 está representada a análise individual da razão proteína:creatinina (RPC) urinária, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* de proteínas urinárias, referentes aos cães do grupo E3.

Quadro 14 - Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de *Western blotting*, dos cães doentes renais crônicos no estágio 3 (**grupo E3**)

Identificação Cão nº (#)	RPC	PM das bandas proteínas pela eletroforese (SDS-PAGE)		Western blotting de proteínas urinárias			
		Região A (>60 kDa)	Região B (<60 kDa)	Albumina*	VDBP*	RBP*	THP**
E3#1	0,07	116,4 69,96	34,43 27,85 25 23,15	-	-	+	+++
E3#2	0,09	81,83 70,37	59,15 53,29 43,2 34,85 27,96 26,97	+	-	+	+
E3#3	0,12	109,6 77,66 68,36	57,46 52,37 34,29 32,42 27,63 25,4 22,36	-	+	+	++
E3#4	0,28	79,03 69,16	57,13 52,98 42,28 34,71 28,3 26,97 22,83	++++	+	+	++
E3#5	0,28	80,42 69,56	57,79 52,37 42,46 34,71 28,3 26,97 22,83	++++	+	++	++
E3#6	4,57	78,34 69,56	52,98 42,83 26,44	++++	+	+	++++
E3#7	0,99	68,76	57,46 42,64 33,88 26,23	+++	+	+	++
E3#8	1,83	75,0 66,03	59,49 55,17 50 40,85 32,95 25,51 21	+++	+	+	+++
E3#9	3,90	75,0 64,89	49,57 40,15 32,42 24,31	++++	+	++	+++
E3#10	3,01	79,72 69,96	52,37 42,1 33,75 27,41 22,67	++++	+	++	++

Nota: *valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “-” corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), “+” corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), “++” correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), “+++” correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e “++++” correspondem a ≥ 4 vezes (400%)

**valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: “++++” representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), “+++” representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), “++” representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), “+” representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e “-” representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C)

No grupo E4, somente o cão E4#1 apresentou $1 \leq \text{RPC} < 2$. Em 9/10 (90%) dos animais obtiveram $\text{RPC} > 2,0$.

Maior numero de bandas na Região B foi verificada em 10/10 (100%) dos cães.

Houve imunodeteção de albumina, VDBP e RBP em 10/10 (100%) dos cães. A presença de THP foi observada neste grupo, de forma variada. Nos animais E4#1 e E4#3 não houve imunodeteção desta proteína.

No quadro 15 está representada a análise individual da razão proteína:creatinina (RPC) urinária, eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western blotting* de proteínas urinárias, referentes aos cães do grupo E4.

Quadro 15 - Avaliação individual da razão proteína:creatinina urinária (RPC), do peso molecular (PM) das bandas das proteínas urinárias identificadas pela eletroforese em SDS-PAGE e da determinação das proteínas urinárias albumina, proteína ligada a vitamina D (VDBP), proteína ligada ao retinol (RBP) e proteína de Tamm-Horsfall (THP), por meio de *Western blotting*, dos cães doentes renais crônicos no estágio 4 (**grupo E4**)

Identificação Cão nº (#)	RPC	PM das bandas proteínas pela eletroforese (SDS-PAGE)		Western blotting de proteínas urinárias			
		Região A (>60 kDa)	Região B (<60 kDa)	Albumina*	VDBP*	RBP*	THP**
E4#1	1,40	64,06	49,82 39,93 25	++++	+	+	-
E4#2	3,72	62,63	39,78 32,19 24,48	++++	+	++++	+
E4#3	3,60	62,35	39,35 25,56	+++	+	+++	-
E4#4	4,93	72,02 62,92	57,49 49,1 40,07 32,3 24,83	++++	+	++	+++
E4#5	3,78	64,06	51,6 40,07 32,6 27,93 25,72 20,28	++++	++	++++	+
E4#6	3,75	63,2	50,68 40,37 32,71 25,32	++++	+	++	++++
E4#7	4,91	64,93	49,46 40,22 32,19 29,65 25,48	+++	++	++++	++
E4#8	6,94	68,85 61,24	48,22 39,35 31,99 25,32	+++	++	++++	++
E4#9	5,97	61,79	49,1 39,5 32,09 27,57 25,64	++++	+	++	+
E4#10	4,73	70,42 62,92	57,49 49,82 39,78 32,4 25	++++	++	++	++

Nota: *valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: "-" corresponde a $\leq 1,0$ vez ($\leq 100\%$), "+" corresponde de 1,1 a 1,99 vezes (101 – 199%), "++" correspondem de 2,0 a 2,99 vezes (200 – 299%), "+++ correspondem de 3 a 3,99 vezes (300 – 399%) e "++++" correspondem a ≥ 4 vezes (400%)

**valores considerados em relação à média da densitometria do grupo controle: "++++" representa ≥ 1 vez ($\geq 100\%$), "+++ representa 0,70 a 0,99 vezes (70 – 99%), "++" representa 0,40 a 0,69 vezes (40 – 69%), "+" representa 0,10 a 0,39 (10% – 39%) vezes e "-" representa $< 0,10$ ($< 10\%$) vezes os valores da média da densitometria do grupo controle (grupo C)

7 DISCUSSÃO

À análise da RPC, todos os cães clinicamente normais (grupo controle – C), correspondentes ao grupo C, apresentaram valores de RPC menores do que 0,5, e portanto, estes animais são considerados não-proteinúricos (LEES et al., 2005). Conjuntamente à interpretação dos resultados obtidos na eletroforese de proteínas urinárias e do *Western blotting*, respectivamente, verificou-se que apenas o cão C#3 apresentou maior porcentagem de bandas de proteínas na região A (>60 kDa), além da imunodeteção de albumina.

A identificação de albumina na urina de cães saudáveis por meio da técnica de *Western blotting* também foi verificada em estudos prévios (YALÇIN; ÇETIN, 2004). Além disso, proteinúria transitória e reversível, de irrelevância clínica, e com RPC <0,5, pode ocorrer em indivíduos normais, e é frequentemente associada às condições de estresse e/ ou atividade física, o que pode justificar a imunodeteção de albumina verificada no caso do animal C#3 (GARY et al., 2004; LEES et al., 2005).

Os cães C#4 e C#8 também apresentaram albuminúria, conforme resultados do *Western blotting*, no entanto, à eletroforese, apesar de ter sido constatada a banda de proteína equivalente ao peso molecular da albumina (em ambos os cães de 72,9 kDa), detectou-se maior quantidade de proteínas de baixo peso molecular (Região B) e, portanto, possivelmente esta albuminúria pode ter caráter transitório (LEES et al., 2005).

Em geral, o resultado da eletroforese demonstrou que houve maior porcentagem de bandas de proteínas urinárias na Região B, ou seja, de baixo peso molecular (<60 kDa) nos cães do grupo C, o que está de acordo com os resultados obtidos por Zaragoza et al. (2003). Na realização do *Western blotting*, no entanto, não foi possível identificar a presença das proteínas de baixo peso molecular, consideradas marcadores de lesão renal, tais como a VDBP e/ou RBP, sendo que este seria o esperado, uma vez que se tratam de amostras de urina de cães normais.

A ausência da imunodeteção de RBP na urina de cães clinicamente normais, por meio da referida técnica, também foi descrita de modo semelhante por Raila et al. (2000) e Forterre, Raila e Schweigert (2004), confirmando-se que na urina de

cães normais, apesar do predomínio de proteínas de baixo PM, essas seriam compostas predominantemente de outros tipos de proteínas, consideradas fisiologicamente normais.

Por outro lado, para os cães doentes renais crônicos, no presente estudo, a identificação de uma proteína de baixo peso molecular e marcadora de lesão renal, especialmente a VDBP, foi observada em cães já nos estágios iniciais da doença renal crônica, embora sem diferença estatística entre os grupos C, E1 e E2. Atualmente, de acordo com as diretrizes vigentes do consenso do *ACVIM* para a monitoração, diagnóstico e tratamento da proteinúria, os cães não azotêmicos e com $RPC \geq 0,5$ devem ser monitorados de forma prospectiva para a confirmação da presença urinária de proteínas, e a investigação de uma doença de base é apenas recomendada quando o valor da $RPC \geq 1$ (LEES et al., 2005).

No entanto, 7/10 (70%) dos cães no estágio 1 que apresentaram $RPC < 0,5$, e portanto, classificados como não-azotêmicos e não-proteinúricos, para os quais, portanto, ainda não haveria a recomendação de monitoração prospectiva, já apresentaram a imunodeteção urinária de VDBP, o que sinalizou precocemente a presença de lesão tubular nestes animais, frente a um valor de RPC normal.

Estes resultados realçam a importância da investigação e do reconhecimento prévio de injúrias que possam contribuir para a progressão da doença renal crônica, e uma vez que esta enfermidade apresenta caráter irreversível, a identificação de lesões de forma precoce pode ser decisiva para o prognóstico e desfecho do paciente (BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Assim, similarmente ao observado em pacientes humanos com nefropatia diabética, a determinação urinária da VDBP mostrou também ser de grande utilidade para o reconhecimento prematuro de lesões tubulares, o que ressalta o papel desta proteína como marcador para o diagnóstico precoce desta condição (TIAN et al., 2014).

À análise individual dos animais do grupo E1 que apresentaram $RPC < 0,5$ e a presença urinária de VDBP, nos cães E1#2, E1#4 e E1#9 foi observada a imunodeteção concomitante de THP. A perda gradativa da massa renal funcionante pode levar à redução da proteína THP na urina, uma vez que sua síntese ocorre exclusivamente no epitélio das células do ramo fino ascendente da alça de Henle e do túbulo contornado distal (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014). A detecção simultânea de THP nestes três casos denota, portanto, que não houve

comprometimento relevante do número de néfrons, e ainda, que o segmento ascendente da alça de Henle e o túbulo distal possam estar íntegros.

Assim, estas observações corroboram para a possibilidade de que a VDBP urinária possa ser considerada um marcador precoce de lesão renal, pois foi identificada previamente à redução importante da massa renal funcionante, e ainda, antes mesmo que a lesão se estendesse à porção distal dos néfrons, o que poderia causar, por sua vez, diminuição de THP na urina.

Nos cães E1#6 e E1#8, além da imunodeteção de VDBP e THP, também foi identificada a presença de albumina. Conjuntamente à análise da RPC e da eletroforese, destaca-se que o valor da RPC era $<0,5$ (considerado normal, de acordo com o consenso do *ACVIM*), e na Região A foram observadas bandas de proteínas cujos pesos moleculares assemelham-se aos da albumina (70 e 66,62 kDa, respectivamente).

Já foi descrito que pequenas porções de albumina podem eventualmente ultrapassar a barreira de filtração glomerular, sendo reabsorvida pelo complexo de receptores megalina-cubilina, no túbulo proximal. Este complexo também atua na reabsorção de VDBP e por isso, quando esta proteína é identificada na urina, pode sinalizar a presença de lesão no segmento proximal do néfron (BIRN; CHRISTENSEN, 2006; TIAN et al., 2014).

Portanto, a análise da qualidade das proteínas identificadas nos cães E1#6 e E1#8 permite inferir que a origem da proteinúria possa ser primariamente em decorrência do comprometimento da função tubular, e que a presença de albuminúria (em menor magnitude, justificada pela $RPC < 0,5$), corroboraria para a base fisiopatológica deste processo de lesão tubular.

O cão E1#10 apresentou $RPC = 0,38$, considerado valor *borderline* para a presença de proteinúria, de acordo com a IRIS, 2013. A complementação da análise da RPC com a eletroforese e o *Western blotting* pôde trazer informações relevantes, pois verificou-se o predomínio de proteínas de baixo peso molecular (identificação de 5 bandas) e a detecção de VDBP e RBP, além da presença de albuminúria.

Em estudo realizado por Nabity et al. (2011), num modelo de glomerulopatia em cães para a avaliação precoce de injúria tubulointersticial, a detecção urinária de RBP antecedeu o desenvolvimento de azotemia, e a presença urinária da RBP foi cada vez mais evidente conforme o progresso da doença. Assim, com base nos resultados descritos por estes autores e que foram similares ao que foi observado no

cão E1#10, este animal aparenta ter lesão renal mais grave dentre os cães do Estágio 1, apesar do valor *borderline* da RPC.

No cão E1#7, por sua vez, foi observada a $RPC = 3,01$, e à análise conjunta da eletroforese, verificou-se apenas a presença de uma banda de proteína localizada na região A, de 70kDa, compatível com o peso molecular da albumina (próximo de 67 kDa) (QUINLAN; MARTIN; EVANS, 2005), a qual, por sua vez, foi imunodetectada pela técnica de *Western blotting*.

A identificação das bandas de proteínas na Região B foram de PM de 41,7, 33,9 e 26,54 kDa, próximas ao PM da VDBP e RBP, que correspondem aproximadamente a 55 e 21 kDa, respectivamente, segundo dados da literatura (RAILA et al., 2000; GOMME; BERTOLINI, 2004). Tanto VDBP quanto RBP foram imunodetectadas à realização do *Western blotting*, conforme esperado.

No caso do cão E1#7, embora tenham sido imunodetectadas bandas de proteínas tanto de alto, quanto de baixo peso molecular, a RPC da região A ($RPC A = 1,86$) foi maior do que a da região B ($RPC B = 1,15$). Desta forma, especialmente neste caso, talvez seja possível inferir que a lesão tenha sido primariamente glomerular, com posterior sobrecarga tubular, e consequente desenvolvimento de fibrose tubulointersticial, o que pode ser explicado pela marcante presença de RBP.

No atinente à imunodeteccção de THP no estágio 1, a qual foi mais intensa do que aquela observada nos cães clinicamente normais, embora sem diferença estatística dentre estes grupos, pode ser justificada pelo mecanismo compensatório de hipertrofia e hiperfiltração por néfron, os quais ocorrem no curso inicial da doença renal crônica, e que levam ao aumento do *turn over* celular e à maior secreção urinária de THP (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

No que se refere aos animais do grupo E2 que obtiveram $RPC < 0,5$, somente nos cães E2#1 e E2#9 não foi detectada, concomitantemente, RBP e VDBP, e nos demais, a coexistência destes dois marcadores foi observada, o que denota maior gravidade da lesão renal neste grupo, se comparado ao estágio 1.

A imunodeteção de RBP e VDBP foi precocemente verificada nos cães E2#1 (VDBP), E2#4 (VDBP e RBP), E2#7 (VDBP e RBP) e E2#10 (VDBP e RBP), mas que eram classificados como não proteinúricos ($RPC < 0,2$, de acordo com a IRIS, 2013). Estes resultados ressaltam a importância do acompanhamento clínico-laboratorial dos cães no estágio 2 da DRC, e reforçam a recomendação de “monitoração” preconizada pela IRIS, 2013, para os cães subestagiados nesta categoria (IRIS, 2013), pois, apesar do valor da RPC estar normal, a realização de outros exames laboratoriais possa ser recomendada, uma vez que poderão complementar, sinalizar, identificar e monitorar a lesão renal e sua progressão, auxiliando, quiçá, como fator de prognóstico.

O emprego de métodos mais sensíveis, como a imunodeteção de proteínas urinárias por meio da técnica de *Western blotting*, pode ser considerado, pois na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) nem sempre foram detectadas bandas de proteínas correspondentes especificamente a VDBP (PM aproximado de 55 kDa) e a RBP (PM aproximado de 21 kDa). No caso desses cães E2#1 (VDBP), E2#4 (VDBP e RBP), E2#7 (VDBP e RBP) e E2#10 (VDBP e RBP), proteínas de pesos moleculares próximos ao da VDBP não foram detectados em nenhum dos animais, no entanto, próximos aos da RBP foram detectados em todos os cães supracitados.

A justificativa da impossibilidade de identificação de algumas bandas de proteínas por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) pode estar relacionada a quantidade de proteína aplicada no poço, à baixa reprodutibilidade deste método, aos determinados tipos de corantes e fixadores utilizados, ao tempo de revelação do gel, à influência do uso de determinados softwares na obtenção dos resultados e à imprecisão na análise da densitometria. A técnica do *Western blotting* seria mais sensível e específica pelo fato de utilizar anticorpos espécie-específicos, ou mesmo, pelo emprego de anticorpos que apresentam homologia com a espécie investigada (CELIS; GROMOV, 1999; LILLEY; RAZZAQ; DUPREE, 2002; GASSMANN et al., 2009; GUIDANCE; ANALYSIS; MOORE, 2009; LAVOUÉ et al., 2015).

O cão E2#6, por sua vez, apesar de ter apresentado proteinúria na faixa considerada como *borderline* ($RPC = 0,4$), de acordo com a IRIS, 2013, a interpretação conjunta da eletroforese e do *Western blotting*, respectivamente, permitiu verificar o predomínio de proteínas de baixo peso molecular, ou seja, de 4

bandas de proteínas de pesos moleculares 54,03 kDa, 33,34 kDa, 27,88 kDa e 25,18 kDa, e na Região A (PM de alto peso) foi identificada somente uma banda de proteína de 71,93 kDa, sendo esta próxima ao PM da albumina.

Pelo *western blotting* foi identificada a albumina, e dentre as proteínas de baixo PM, foram constatadas a VDBP e a RBP, detectadas em maior intensidade, e que foram correspondentes às massas das bandas de proteínas de baixo peso molecular identificadas. A THP, por sua vez, foi observada em menor intensidade, corroborando com a ausência de banda de proteína de PM próximo a 100 kDa e que poderia estar relacionada com o peso molecular da THP.

De acordo com Raila, Schweigert e Kohn (2014), a excreção reduzida de THP é um indicador já estabelecido de nefropatia grave, e decorre da progressiva lesão tubular, a qual está relacionada ao menor número de células que sintetizam esta proteína. A THP, quando não excretada na urina, pode se depositar no interstício dos túbulos distais, em virtude do extravasamento de urina para o parênquima, o que desencadeia reações inflamatórias, as quais são seguidas de fibrose intersticial. Além disso, a redução de THP indica, ainda, disfunção medular, e portanto, pode estar associada à menor capacidade de concentração urinária, possivelmente relacionada ao segmento da alça de Henle.

Desta forma, para o animal E2#6, os achados deste estudos permitem inferir a compreensão dos possíveis mecanismos fisiopatológicos que possam estar envolvidos, e se associados à baixa densidade urinária e à formação dos cilindros hialino e granuloso, estes achados podem corroborar ainda mais com a identificação de presença ativa de lesão renal. A alta intensidade de imunodeteção de RPB pode estar associada à fibrose intersticial, indicando presença de nefropatia grave, acompanhada da diminuição de THP urinária.

Um outro cão do Estágio 2 (E2#2) apresentou $RPC = 1,14$, e também o predomínio de proteínas de baixo peso molecular, que variaram de 25,12 a 54,03 kDa, sendo a RPC da Região B de 0,82 ($RPC\ B = 0,82$). Na Região A, foram identificadas proteínas de PM 111,92 e 73,67 kDa, e houve a imunodeteção urinária de albumina (PM próximo a 67 kDa) e de THP (PM próximo 100 kDa).

A detecção de bandas de proteínas de baixo peso molecular está de acordo com a identificação das proteínas VDBP e RBP, sendo que esses achados confirmam o comprometimento importante das células tubulares, acarretando na não reabsorção de proteínas presentes no fluido tubular do segmento proximal do

néfron. Ainda, a detecção de albumina urinária pode estar relacionada tanto com a lesão tubular, pelo comprometimento de reabsorção pelo túbulo proximal, quanto pela perda de albumina através da barreira glomerular (BIRN; CHRISTENSEN, 2006).

Na urina de cães é esperado, ao menos, 40 – 60% de albumina (YALÇIN; ÇETIN, 2004) e a imunodetecção urinária das proteínas depende de diversos fatores, dentre eles, da sensibilidade e especificidade do anticorpo utilizado (MOORE, 2009). No presente estudo, o anticorpo para albumina empregado foi espécie-específico para caninos. Nos casos da VDBP e RBP, os anticorpos usados foram primariamente destinados para uso humano, no entanto, há estudos de validação prévia, além de homologia para cães (RAILA et al., 2000; SCHAEFER et al., 2011).

Assim, por se tratarem de metodologias essencialmente qualitativas, tanto a eletroforese de proteínas urinárias, quanto o *Western blotting*, o ideal seria, sempre que possível, a avaliação da proteinúria pela associação destas técnicas com outras de cunho quantitativo (NABITY et al., 2011).

Quanto ao grupo E3, os cães E3#1, E3#2 e E3#3 são classificados como não proteinúricos uma vez que apresentaram $RPC < 0,5$. Entretanto, mesmo diante de valores normais de RPC, todos sinalizaram a imunodetecção de RBP, marcador de lesão tubular, e particularmente nos cães E3#2 e E3#3, à análise da densitometria, verificou-se a redução da imunodetecção de THP, o que sinaliza o comprometimento também do túbulo distal, e que pode denotar, portanto, maior extensão da lesão renal ou de perda do número de néfrons.

Nos cães E3#4 e E3#5, cujos valores da RPC são considerados como *borderliners*, além da presença de RBP e THP, verificou-se, ainda, a imunodetecção de albumina e VDBP. A presença anormal de proteínas urinárias, dentre elas, a de RBP, em cães doentes renais crônicos não proteinúricos também foi descrita por Forterre, Raila e Schweigert (2004), o que corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, indicando e ressaltando que apenas o valor da RPC não é capaz de identificar a presença ou a precocidade de lesão renal e que, portanto, há a necessidade de investigação qualitativa de proteínas específicas.

Nos cães do estágio 3, cujos valores da RPC eram superior a 0,5 (E3#6, $RPC=4,57$; E3#7, $RPC=0,99$; E3#8, $RPC=1,83$; E3#9, $RPC=3,90$; E3#10, $RPC=3,01$), foi observado o predomínio de bandas de proteínas de baixo peso (de

21 kDa a 59,49 kDa) e não de alto peso molecular, o que, de acordo com a literatura vigente, não seria o esperado, principalmente para valores da RPC superiores a 2,0 em que é dito que haveria o predomínio de albumina (alto PM). Houve a imunodeteção das proteínas urinárias VDBP e RBP, além da albumina, a qual foi constatada em todos os cães que apresentaram bandas de proteínas de peso molecular próximo de 64,89 a 69,96 kDa.

A THP foi também imunodetectada em todos esses cães citados do estágio 3, entretanto proteínas de peso molecular próximo a 100 kDa não foram identificadas, mas bandas de peso molecular de 75,0 a 79,72 kDa foram observadas e que poderiam ser correspondentes a outras proteínas não investigadas neste estudo, tal como a transferrina (76 kDa) (HONG; CHIA, 1998). Entretanto pela própria limitação da técnica de eletroforese haverá situações em que poderá não haver concordância entre o achado do PM da banda de proteína e a imunodeteção da proteína em questão.

De acordo com a IRIS, 2013, $RPC > 2,0$ é fortemente sugestivo de albuminúria associada à glomerulopatia, e a recomendação é de que haja intervenção terapêutica imediata com o uso de anti-proteinúricos (GRAUER, 2013). No entanto, face aos resultados obtidos neste estudo, especialmente nos casos dos cães E3#6, E3#9 e E3#10, em que $RPC > 2,0$, suscita-se questões que devam ser consideradas, pois não é possível e adequado estabelecer o diagnóstico de glomerulopatia, dentro do amplo espectro de entidades designadas sob o termo “doença renal crônica”, baseando-se, apenas, em determinado valor de RPC (VADEN, 2011).

Valores da RPC de cães com glomerulopatia e doença tubulointersticial crônica podem se sobrepor (como por exemplo, $RPC > 2,0 - 3,0$), e para o diagnóstico adequado deve-se, então, considerar o conjunto dos achados clínicos e patológicos para, assim, especificar o tipo da nefropatia para o estabelecimento adequado de condutas terapêuticas (LITTMAN et al., 2013).

No que se refere ao estágio 4, 9 dos 10 cães deste grupo (9/10; 90%) apresentaram $RPC > 3,6$, e portanto, foram classificados como proteinúricos. Somente no animal E4#1, que obteve, inclusive, as concentrações séricas de creatinina mais altas do grupo E4, o valor da RPC foi menor, de 1,40, entretanto, ainda considerado proteinúrico. De acordo com Grauer, 2013, sugere-se que as alterações na magnitude da proteinúria devem ser sempre interpretadas à luz das concentrações séricas de creatinina, pois a redução da proteinúria pode ocorrer em

estágios finais da doença renal crônica devido ao menor número de néfrons funcionantes (GRAUER, 2013).

Os demais animais do estágio 4 apresentaram proteinúria intensa ($RPC > 3,6$) e à interpretação dos resultados da eletroforese, observou-se o predomínio de bandas de proteínas de baixo peso molecular, e não de alto PM como poderia ser o esperado, sendo que os valores da RPC correspondentes à Região B ($PM < 60\text{kDa}$) eram maiores do que os da Região A ($PM > 60\text{kDa}$), inclusive com diferença estatística ($p < 0,0001$). A densitometria do *Western blotting* demonstrou maior intensidade das proteínas urinárias albumina e RBP, e inversamente, menor intensidade de THP, além da presença de VDBP em todos os cães do grupo E4.

Estes achados indicam que a marcante imunodeteção de RBP denota a presença de fibrose tubulointersticial, o que caracteriza o estado avançado de lesão renal, esperado no estágio 4. “A via final comum da doença renal crônica é caracterizada pela progressiva fibrose glomerular e/ou túbulo-intersticial”, segundo Vianna et al. (2011).

No que se refere à determinação urinária de THP, em cães com DRC avançada e $RPC > 2,0$, é esperada menor excreção desta proteína devido ao reduzido número de néfrons funcionantes, e portanto, de células que a sintetizam (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014), ou ainda, a excreção reduzida de THP pode estar associada à inabilidade da capacidade de concentração urinária (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014). Os cães com DRC do grupo E4 apresentaram a menor intensidade de detecção de THP em relação aos demais grupos, e especificamente no estágio 4, nos cães E4#1 e E4#3, a THP não foi imunodetectada, como também, não foi identificada nenhuma banda de proteína próximo a 100 kDa, que poderia corresponder a THP.

À análise individual dos demais animais do grupo E4, os cães E4#2, E4#5, E4#7 e E4#8 apresentaram marcante determinação urinária das proteínas albumina e RBP. O primeiro deles (E4#2) era um Rottweiler de apenas 10 meses, e a única banda de proteína de alto peso molecular identificada à eletroforese era de aproximadamente 63 kDa, semelhante ao peso molecular da albumina, imunodetectada no *Western blotting*. Para este caso especificamente, talvez seria possível inferir que o resultado da RPC da Região A seria correspondente à razão albumina:creatinina urinária (RAC), e esta, quando acima de 0,3, é consistente com albuminúria (GRAUER, 2005a; BACIC et al., 2010). Os valores da RPC da Região A

(RPC A=0,35) foram inferiores ao da Região B (RPC B=1,05).

Cães Rottweilers são predispostos à glomerulopatia atrófica, que resulta no desenvolvimento de DRC em cães jovens desta raça, com menos de 1 ano, e é clinicamente caracterizada por azotemia e proteinúria intensa (WAKAMATSU et al., 2007). Entretanto, com a progressão da doença pode ocorrer o comprometimento dos túbulos renais, e especificamente neste cão E4#2 foi também imunodetectada os marcadores de lesão RBP e VDBP, apesar de em menor intensidade.

Nos cães E4#5 e E4#7, de acordo com a mesma interpretação adotada para a RPC A discutida acima, também inferiu-se que $RAC > 0,3$. A observação da imunodeteção mais intensa de albumina, VDBP e RBP, e inversamente, menor de THP, à densitometria do *Western blotting*, denota o comprometimento ao longo de todo os segmentos do néfron: glomerular, tubular proximal, medular e tubular distal, o que por sua vez, é esperado no estágio mais avançado da doença renal crônica.

Para complementação e comentários gerais sobre a perda urinária de VDBP, o cão E4#8, um pequinês de 3 anos que apresentava manifestações clínicas compatíveis com hiperparatireoidismo, também apresentou perda urinária de albumina, RBP e VDBP, e em menor intensidade, de THP. Devido à idade e ao histórico, é possível inferir que se tratava de um quadro de nefropatia juvenil, uma condição que costuma evoluir rapidamente para os estágios finais da doença renal crônica, e a ocorrência de hiperparatireoidismo neste caso evidencia esta progressão.

A deficiência de calcitriol contribui de forma significativa para o desenvolvimento do hiperparatireoidismo secundário renal. Sugere-se que um dos fatores envolvidos na deficiência deste metabólito, seja a perda urinária de VDBP devido à proteinúria. Esta proteína carrega a 25-OH-Vitamina D3, precursor do calcitriol, a forma ativa da vitamina D (THRAILKILL et al., 2011). Em pacientes humanos albuminúricos com diabetes tipo 1, é possível que a perda urinária massiva de VDBP possa contribuir para a deficiência de calcitriol (THRAILKILL et al., 2011).

Por outro lado, segundo Doorenbos et al. (2012), a importante perda urinária desta proteína pode ser controlada instituindo-se a terapia anti-proteinúrica. Estes autores relataram ainda que a perda massiva de VDBP na urina não foi associada às baixas concentrações plasmáticas desta proteína, e também, de 25-OH-Vitamina D3, e calcitriol, em pacientes humanos com doença renal crônica proteinúrica (DOORENBOS et al., 2012).

Portanto, atualmente é ainda controverso que a perda urinária de VDBP possa contribuir efetivamente para a deficiência de calcitriol na doença renal crônica. Até o momento, aceita-se que na síndrome nefrótica, devido à intensa proteinúria, isto possa de fato ocorrer (COISTON; WILLIAMS; CLEEVE, 1985).

Em cães doentes renais crônicos, as informações por ora disponíveis acerca do papel destes componentes, e dos mecanismos envolvidos no metabolismo ósseo-mineral são escassas, havendo a necessidade de mais estudos (DE BRITO GALVAO et al., 2013).

Quanto à análise geral da imunodeteção de albumina, VDBP, RBP e THP, considerando-se os grupos de cães clinicamente normais (grupo controle – C) e de cães doentes renais crônicos (grupos E1 ao E4), foi possível observar a perda urinária progressiva de albumina ao longo dos estágios, porém, diferença estatística foi observada somente entre o grupo C e E4. A marcante imunodeteção urinária de albumina nos cães do estágio 4 reafirma a gravidade da lesão renal (glomerular e/ou tubular) nestes animais, uma vez que a albuminúria está associada à progressão da DRC (GRAUER, 2007).

No que se refere à VDBP, ainda que a imunodeteção desta proteína tenha sido verificada em maior intensidade no grupo E4, o qual apresentou diferença estatística quando comparado aos demais, inclusive ao controle, sua identificação na urina de alguns cães já foi possível nos estágios mais iniciais da DRC, conforme discutido previamente. Estes resultados corroboram para a precocidade da VDBP como marcador de lesão renal (TIAN et al., 2014).

A imunodeteção de RBP, por sua vez, foi mais intensa nos cães dos grupos E3 e E4. Esta proteína é considerada como um marcador de fibrose tubulointersticial, e desta forma, sua identificação urinária pode ser esperada nos casos mais avançados da DRC, conforme observado no presente estudo (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; YALÇIN; ÇETIN, 2004).

Ao contrário do que foi verificado para a albumina, a THP apresentou redução gradativa ao longo dos estágios da DRC, sendo encontrada redução mais importante nos cães do grupo E4, o que também esteve de acordo com a hipótese do presente estudo. A diminuta presença desta proteína na urina indica lesão tubular distal, e portanto, a progressão da extensão da injúria ao longo do néfron, além de sinalizar o comprometimento de massa renal funcional, alterações estas, esperadas neste avançado estágio da DRC (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014).

8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- a) A ausência de VDBP e RBP na urina de cães clinicamente normais indica que a imunodeteção destas proteínas pode ser patológica.
- b) O valor da razão proteína:creatinina urinária (RPC) *per si* não foi capaz de indicar a origem da proteinúria, se glomerular ou tubular.
- c) A análise conjunta da eletroforese de proteínas urinárias e do *Western blotting* (albumina, VDBP, RBP e THP) permitiu identificar o segmento do néfron comprometido que acarretou na perda urinária de proteínas.
- d) A detecção de RBP e VDBP nos estágios iniciais da doença renal crônica (estágios 1 e 2), na ausência de proteinúria avaliada pela RPC, pode ser considerada como marcador precoce de lesão renal.
- e) A imunodeteção de THP foi menos evidente no estágio 4 da doença renal crônica, podendo sugerir lesão dos néfrons (alça de Henle ascendente e/ou túbulo distal) ou perda grave do número de néfrons.

REFERÊNCIAS

ALPERN, R. J.; CAPLAN, M. J.; MOE, O. W. (Ed.). **Seldin and Giebisch's the kidney: physiology and pathophysiology**. 5. ed. [S.l.]: Academic Press, 2012.

BACIC, A.; KOGIKA, M. M.; BARBARO, K. C.; IUAMOTO, C. S.; SIMÕES, D. M. N.; SANTORO, M. L. Evaluation of albuminuria and its relationship with blood pressure in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 2, p. 203–209, 2010.

BARTGES, J. W. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 669–692, 2012.

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Chronic kidney disease: importance of early diagnosis, immediate referral and structured interdisciplinary approach to improve outcomes in patients not yet on dialysis. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 1, p. 93–108, 2011.

BIRN, H.; CHRISTENSEN, E. I. Renal albumin absorption in physiology and pathology. **Kidney International**, v. 69, n. 3, p. 440–449, 2006.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, a; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 542–558, 2007.

CAVALCANTE, C. Z. **Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica**. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

CELIS, J. E.; GROMOV, P. 2D protein electrophoresis: Can it be perfected? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 16–21, 1999.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S.; SCHENK, P. **Canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2011.

CHRISTENSEN, E. I.; BIRN, H.; STORM, T.; WEYER, K.; NIELSEN, R. Endocytic Receptors in the Renal Proximal Tubule. **Physiology**, v. 27, n. 4, p. 223–236, 2012.

COISTON, K.; WILLIAMS, N. J.; CLEEVE, H. J. W. Studies on Vitamin D Binding Protein in the Nephrotic Syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 721, p. 718–721, 1985.

DE BRITO GALVAO, J. F.; 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.

DEFAUW, P.; SCHOEMAN, J. P.; SMETS, P.; GODDARD, A.; MEYER, E.; LIEBENBERG, C.; DAMINET, S. Assessment of renal dysfunction using urinary markers in canine babesiosis caused by *Babesia rossi*. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 326–332, 2012.

DEVUYST, O.; DAHAN, K.; PIRSON, Y. Tamm-Horsfall protein or uromodulin: New ideas about an old molecule. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 20, n. 7, p. 1290–1294, 2005.

DOORENBOS, C. R. C.; DE CUBA, M. M.; VOGT, L.; KEMA, I. P.; VAN DEN BORN, J.; GANS, R. O. B.; NAVIS, G.; DE BORST, M. H. Antiproteinuric treatment reduces urinary loss of vitamin D-binding protein but does not affect vitamin D status in patients with chronic kidney disease. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 128, n. 1-2, p. 56–61, 2012.

FINCO, D. R.; BROWN, S. a; BROWN, C. a; CROWELL, W. a; COOPER, T. a; BARSANTI, J. a. Progression of chronic renal disease in the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 6, p. 516–28, 1999.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 4, p. 271–277, 2004.

GARY, A. T.; COHN, L. a; KERL, M. E.; JENSEN, W. a. The effects of exercise on urinary albumin excretion in dogs. **Journal of veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 1, p. 52–55, 2004.

GASSMANN, M.; GRENACHER, B.; ROHDE, B.; VOGEL, J. Quantifying Western blots: Pitfalls of densitometry. **Electrophoresis**, v. 30, n. 11, p. 1845–1855, 2009.

GOMME, P. T.; BERTOLINI, J. Therapeutic potential of vitamin D-binding protein. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 340–345, 2004.

GRAUER, G. F. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 35, n. 3, p. 581–596, 2005a.

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: New thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, v. 46, n. 10, p. 469–478, 2005b.

GRAUER, G. F. Measurement, Interpretation, and Implications of Proteinuria and Albuminuria. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 37, n. 2, p. 283–295, 2007.

GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011.

GRECO, D. S. Congenital and inherited renal disease of small animals. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 393–399, 2001.

HONG, C. Y.; CHIA, K. S. Markers of diabetic nephropathy. **Journal of Diabetes and its Complications**, v. 12, n. 1, p. 43–60, 1998.

IRIS. **IRIS Staging of CKD (modified 2013)**. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com>>. Acesso em: 5 ago. 2015.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; NEATON, J. D.; KIRK, C. A.; ALLEN, T. a; SWANSON, L. L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 3, p. 393–400, 2005.

JERICÓ, M. M.; ANDRADE NETO, J. P. de; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. [S.l.]: Roca, 2015.

KSHIRSAGAR, B.; WIGGINS, R. C. A map of urine proteins based on one-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western blotting using one microliter of unconcentrated urine. **Clinica Chimica Acta**, v. 158, n. 1, p. 13–22, jul. 1986.

LAVOUÉ, R.; TRUMEL, C.; SMETS, P. M. Y.; BRAUN, J.-P.; ARESU, L.; DAMINET, S.; CONCORDET, D.; PALANCHÉ, F.; PEETERS, D. Characterization of Proteinuria in Dogue de Bordeaux Dogs, a Breed Predisposed to a Familial Glomerulonephropathy: A Retrospective Study. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0133311, 2015.

LEES, G. E. Congenital renal diseases. **The Veterinary clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 6, p. 1379–1399, 1996.

LEES, G. E.; BROWN, S. A.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; VADEN, S. L. ACVIM Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 1, p. 377–385, 2005.

LILLEY, K. S.; RAZZAQ, A.; DUPREE, P. Two-dimensional gel electrophoresis : recent advances in sample preparation , detection and quantitation Kathryn S Lilley , Azam Razzaq and Paul Dupree. **Electrophoresis**, v. 6, n. 1, p. 46–50, 2002.

LITTMAN, M. P. Protein-losing Nephropathy in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 31–62, 2011.

LITTMAN, M. P.; DAMINET, S.; GRAUER, G. F.; LEES, G. E.; VAN DONGEN, a. M. Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. S1, p. 19–26, 2013.

MACDOUGALL, D. F.; COOK, T.; STEWARD, a P.; CATTELL, V. Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. **Kidney International**, v. 29, n. 6, p. 1144–1151, 1986.

MADDENS, B.; HEIENE, R.; SMETS, P.; SVENSSON, M.; ARESU, L.; LUGT, J. Van Der; DAMINET, S. Ã.; MEYER, E. Ã. Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 5, p. 1075–1083, 2011.

MIRKOVIĆ, K.; DOORENBOS, C. R. C.; DAM, W. a.; LAMBERS HEERSPINK, H. J.; SLAGMAN, M. C. J.; NAUTA, F. L.; KRAMER, A. B.; GANSEVOORT, R. T.; VAN DEN BORN, J.; NAVIS, G.; DE BORST, M. H. Urinary Vitamin D Binding Protein: A Potential Novel Marker of Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–9, 2013.

MITANI, S.; YABUKI, A.; TANIGUCHI, K.; YAMATO, O. Association between the Intrarenal Renin-Angiotensin System and Renal Injury in Chronic Kidney Disease of Dogs and Cats. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 75, n. 2, p. 127-133, 2012.

MOORE, C. **Introduction to western blotting**. [S.l.]: MorphoSys UK, 2009. p. 47.

NABITY, M. B.; LEES, G. E.; DANGOTT, L. J.; CIANCIOLO, R.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011.

NELSON, W. RICHARD COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. [S.l.] Elsevier, 2009.

NEWCOMER, M. E.; JONES, T. a; AQVIST, J.; SUNDELIN, J.; ERIKSSON, U.; RASK, L.; PETERSON, P. a. The three-dimensional structure of retinol-binding protein. **The EMBO Journal**, v. 3, n. 7, p. 1451–1454, 1984.

NOTOMI, M. K.; KOGIKA, M. M.; IKESAKI, J. Y. H.; MONTEIRO, P. R. G.; MARQUESI, M. L. Estudo retrospectivo de casos de insuficiência renal crônica em cães no período de 1999 a 2002. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 43, p. 12–22, 2006.

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 / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 4, p. 814–21, 2013.

PALLET, N.; CHAUVET, S.; CHASSÉ, J. F.; VINCENT, M.; AVILLACH, P.; LEVI, C.; MEAS-YEDID, V.; OLIVO-MARIN, J. C.; NGA-MATSOGO, D.; BEAUNE, P.; THERVET, E.; KARRAS, A. Urinary retinol binding protein is a marker of the extent of interstitial kidney fibrosis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

PETERS, T. **All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications.** [s.l.] Academic Press, 1996.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 15–30, 2011.

POWE, C. E.; EVANS, M. K.; WENGER, J.; ZONDERMAN, A. B.; BERG, A. H.; NALLS, M.; TAMEZ, H.; ZHANG, D.; BHAN, I.; KARUMANCHI, S. A.; POWE, N. R.; THADHANI, R. Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 21, p. 1991–2000, 2013.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1211–1219, 2005.

RAILA, J.; BUCHHOLZ, I.; AUPPERLE, H.; RAILA, G.; SCHOON, H. A.; SCHWEIGERT, F. J. The distribution of vitamin A and retinol-binding protein in the blood plasma, urine, liver and kidneys of carnivores. **Veterinary Research**, v. 31, n. 6, p. 541–551, 2000.

RAILA, J.; NEUMANN, U.; SCHWEIGERT, F. J. Immunochemical localization of megalin, retinol-binding protein and Tamm-Horsfall glycoprotein in the kidneys of dogs. **Veterinary Research Communications**, v. 27, n. 2, p. 125–135, 2003.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 261–265, 2014.

SCHAEFER, H.; KOHN, B.; SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J. **Quantitative and qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome.** 2011. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Freie Universitat Berlin, 2011.

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 / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010.

SOSNAR, M.; KOHOUT, P.; RÔÎÂKA, M.; VRBASOVÁ, L. Retrospective Study of Renal Failure in Dogs and Cats Admitted to University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno during 1999-2001. **Acta Veterinaria BRNO**, v. 72, p. 593–598, 2003.

THRAILKILL, K. M.; JO, C.-H.; COCKRELL, G. E.; MOREAU, C. S.; FOWLKES, J. L. Enhanced excretion of vitamin D binding protein in type 1 diabetes: a role in vitamin D deficiency? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 96, n. 1, p. 142–149, 2011.

TIAN, X. Q.; ZHAO, L. M.; GE, J. P.; ZHANG, Y.; XU, Y. C. Elevated urinary level of vitamin D-binding protein as a novel biomarker for diabetic nephropathy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 2, p. 411–416, 2014.

VADEN, S. L. Glomerular Disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 128–134, 2011.

WAKAMATSU, N.; SURDYK, K.; CARMICHAEL, K. P.; BROWN, C. a. Histologic and ultrastructural studies of juvenile onset renal disease in four Rottweiler dogs. **Veterinary pathology**, v. 44, n. 1, p. 96–100, 2007.

YALÇIN, A.; ÇETIN, M. Electrophoretic separation of urine proteins of healthy dogs and dogs with nephropathy and detection of some urine proteins of dogs using immunoblotting. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155, p. 104–112, 2004.

YANG, Y.; MA, H. Western Blotting and ELISA Techniques. **Researcher**, v. 1, n. 2, p. 67–86, 2009.

YOUSEFZADEH, P.; SHAPSES, S. A.; WANG, X. Vitamin D Binding Protein Impact on 25-Hydroxyvitamin D Levels under Different Physiologic and Pathologic Conditions. **international Journal of Endocrinology**, v. 2014, p. 6, 2014.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. a; MAÑÉ, M. C. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1259–72, maio 2004.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. a.; MAÑÉ, M. C. Characterization of Renal Damage in Canine Leptospirosis by Sodium Dodecyl Sulphate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS–PAGE) and Western Blotting of the Urinary Proteins. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, n. 2-3, p. 169–178, ago. 2003.

ZARAGOZA, CONCEPCIÓN BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J.; 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.

ZATZ, R. **Bases fisiológicas da nefrologia**. 2. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2011.

ZHANG, Y. R.; ZHAO, Y. Q.; HUANG, J. F. Retinoid-binding proteins: Similar protein architectures bind similar ligands via completely different ways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2012.

APÊNDICE A – IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES CLINICAMENTE NORMAIS (GRUPO CONTROLE – C)

Dados de identificação dos animais, referentes ao número do prontuário cadastrado no HOVET/FMVZ-USP, idade, definição racial ou não, e sexo dos cães clinicamente normais (grupo controle – C) – São Paulo, 2015.

Nº (#)	Animal	Prontuário*	Idade (meses)	Definição racial	Sexo
C#1	Bombom	233816	26	SRD	F
C#2	Tina Turner	245810	8	SRD	F
C#3	Laika	245837	58	Labrador Retriever	F
C#4	Fred	220094	63	Pinscher	M
C#5	Madona	245811	8	SRD	F
C#6	Yasmin	234756	24	SRD	F
C#7	Lana	220095	41	Pinscher	F
C#8	Julie	245885	111	SRD	F
C#9	Elis Regina	231526	36	Labrador Retriever	F

Nota: Nº (#) = número; * HOVET FMVZ/USP; SRD = sem raça definida.

APÊNDICE B – IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 1 (GRUPO E1)

Dados de identificação dos animais, referentes ao número do prontuário cadastrado no HOVET/FMVZ-USP, idade, definição racial ou não, e sexo dos cães clinicamente doentes renais crônicos no Estágio 1 (grupo E1) – São Paulo, 2015.

Nº (#)	Animal	Prontuário*	Idade (meses)	Definição racial	Sexo
E1#1	Mel	176220	78	Lhasa Apso	F
E1#2	Gummy	213331	76	Pinscher	F
E1#3	Duke	242068	49	SRD	M
E1#4	Cacau	217125	21	Yorkshire Terrier	F
E1#5	Sushi	197869	100	SRD	M
E1#6	Xereta	236346	123	Poodle	F
E1#7	Dóris	166571	140	Yorkshire Terrier	F
E1#8	Nick	240823	155	Lhasa Apso	M
E1#9	Stephany	175253	176	Teckel	F
E1#10	Zeus	239561	166	Whippet	M

Nota: Nº (#) = número; * HOVET FMVZ/USP; SRD = sem raça definida.

APÊNDICE C – IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 2 (GRUPO E2)

Dados de identificação dos animais, referentes ao número do prontuário cadastrado no HOVET/FMVZ-USP, idade, definição racial ou não, e sexo dos cães clinicamente doentes renais crônicos no Estágio 2 (grupo E2) – São Paulo, 2015.

Nº (#)	Animal	Prontuário*	Idade (meses)	Definição racial	Sexo
E2#1	Sandy	154231	84	Boxer	F
E2#2	King	219638	86	Rottweiler	M
E2#3	Teddy	239477	137	Labrador Retriever	M
E2#4	Laila	233197	41	Golden Retriever	F
E2#5	Cocota	231082	19	Bulldog Americano	F
E2#6	Sansão	128489	156	Lhasa Apso	M
E2#7	Ranne	210375	72	Shih Tzu	F
E2#8	Nippy	230168	190	Poodle	M
E2#9	Lion	205274	40	Maltês	M
E2#10	Dudu	160347	99	Pug	M

Nota: N° (#) = número; * HOVET FMVZ/USP; SRD = sem raça definida.

APÊNDICE D – IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 3 (GRUPO E3)

Dados de identificação dos animais, referentes ao número do prontuário cadastrado no HOVET/FMVZ-USP, idade, definição racial ou não, e sexo dos cães clinicamente doentes renais crônicos no Estágio 3 (grupo E3) – São Paulo, 2015.

Nº (#)	Animal	Prontuário*	Idade (meses)	Definição racial	Sexo
E3#1	Bruno	219537	164	SRD	M
E3#2	Luck	241962	177	SRD	M
E3#3	Nina	241878	20	SRD	F
E3#4	Carlota	243222	74	Pastor Alemão	F
E3#5	Luppi	114155	190	SRD	F
E3#6	Whisky	235298	25	Golden Retriever	M
E3#7	Ralph	209003	108	Pinscher	M
E3#8	Pitty	206515	129	Yorkshire Terrier	M
E3#9	Guigui	238658	150	Pointer Inglês	F
E3#10	Rick	244099	120	Shih Tzu	M

Nota: Nº (#) = número; * HOVET FMVZ/USP; SRD = sem raça definida.

APÊNDICE E – IDENTIFICAÇÃO DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 4 (GRUPO E4)

Dados de identificação dos animais, referentes ao número do prontuário cadastrado no HOVET/FMVZ-USP, idade, definição racial ou não, e sexo dos cães clinicamente doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) – São Paulo, 2015.

Nº (#)	Animal	Prontuário*	Idade (meses)	Definição racial	Sexo
E4#1	Lila	231333	33	Golden Retriever	F
E4#2	Titã	235289	20	Rottweiler	M
E4#3	Taylor	241093	147	SRD	M
E4#4	Fauna	130304	161	Labrador Retriever	F
E4#5	Cacau	241150	111	Weimaraner	M
E4#6	Dayana	202668	178	Poodle	F
E4#7	Urso	240589	59	SRD	M
E4#8	Marley	243000	36	Pequinês	M
E4#9	Tobby	231172	140	Schnauzer Miniatura	M
E4#10	Brenda	238861	96	SRD	F

Nota: N° (#) = número; * HOVET FMVZ/USP; SRD = sem raça definida.

APÊNDICE F – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES CLINICAMENTE NORMAIS (GRUPO CONTROLE - C)

Dados individuais do exame de urina referentes à densidade, pH, proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e sangue oculto dos cães clinicamente normais (grupo controle – C), São Paulo - 2015.

Nº (#)	Densidade	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Urobilinogênio	Sangue oculto
C#1	1,040	6,5	(+)	Negativo	+	Negativo	Negativo	Negativo
C#2	>1,040	6,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C#3	>1,040	9,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C#4	>1,040	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	++++
C#5	>1,040	6,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	+++
C#6	1,040	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C#7	1,040	7,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	(+)
C#8	1,024	9,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	++++
C#9	1,022	5,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C#10	1,022	8,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: N° (#) = número; Proteínas: Traços = <30 mg/dL; + = 30 mg/dL, segundo método da fita reagente (Combur)

APÊNDICE G – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES CLINICAMENTE NORMAIS (GRUPO CONTROLE - C)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães clinicamente normais (grupo controle – C), São Paulo - 2015.

Nº (#)	Hemácias (p/cpoX400)	Leucócitos (p/cpoX400)	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Sangue oculto
C#1	-	-	-	FT(+)	D: raras	-	-
C#2	0-2	0-2	H(+)	-	D: raras	Raras	-
C#3	0-2	0-2	H raros:	-	D: raras	Raras	-
C#4	20-25	2-4	-	-	D: ++	Raras	-
C#5	25-30	2-4	-	-	D: +	Raras	-
C#6	-	-	-	OC(+)	D: raras	-	-
C#7	8-10	Raros	-	-	D: raras	-	-
C#8	35-40	2-4	-	-	D: (+)	Raras	-
C#9	0-2	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
C#10	Raras	Raros	-	-	D: raras	Raras	-

Nota: Nº (#) = número; p/cpoX400 = por campo de aumento de 400 vezes; D = células de descamação das vias urinárias ; H= hialino; FT = fosfato tripla; FA = fosfato amorfo; OC= oxalato de cálcio

APÊNDICE H – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 1
(GRUPO E1)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães doentes renais crônicos no Estágio 1 (grupo E1), São Paulo - 2015.

Nº (#)	Densidade	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Urobilinogênio	Sangue oculto
E1#1	1,040	5,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	(+)
E1#2	1,040	8,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#3	1,040	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#4	1,050	5,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#5	1,020	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#6	1,030	8,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	+++
E1#7	1,028	8,0	+++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#8	1,024	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#9	1,016	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E1#10	1,014	6,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: Nº (#) = número; Proteínas: Traços = <30 mg/dL; + = 30 mg/dL, segundo método da fita reagente (Combur)

APÊNDICE I – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIS CRONICOS NO ESTAGIO 1
(GRUPO E1)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães do Estágio 1 (grupo E1), São Paulo – 2015.

Nº (#)	Hemácias (p/cpoX400)	Leucócitos (p/cpoX400)	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Sangue oculto
E1#1	4-6	Raros	-	OC+	D: raras	Raras	-
E1#2	0-2	0-2	-	FT+++	D: raras	++	-
E1#3	-	-	H1-2	-	D: raras	-	-
E1#4	Raras	Raras	-	-	D: raras	Raras	-
E1#5	Raras	-	-	-	D: raras	-	-
E1#6	40-45	0-2	H0-1	-	D: raras	Raras	-
E1#7	2-5	Raros	H0-1	-	D: raras	-	-
E1#8	0-2	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
E1#9	-	-	-	-	D: raras	-	-
E1#10	-	-	-	-	D: raras	-	-

Nota: Nº (#) = número; p/cpoX400 = por campo de aumento de 400 vezes; D = células de descamação das vias urinárias ; H= hialino; FT = fosfato triplo; FA = fosfato amorfo; OC= oxalato de cálcio

APÊNDICE J – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 2
(GRUPO E2)

Dados individuais do exame de urina referentes à densidade, pH, proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e sangue oculto dos cães doentes renais crônicos no Estágio 2 (grupo E2) – São Paulo - 2015.

Nº (#)	Densidade	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Urobilinogênio	Sangue oculto
E2#1	1,040	5,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#2	1,030	7,0	++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	+++
E2#3	1,018	8,0	Negativo	Negativo	Negativo	++	Negativo	Negativo
E2#4	1,016	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	+++
E2#5	1,022	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#6	1,016	6,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#7	1,012	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#8	1,026	8,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#9	1,010	7,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E2#10	1,004	7,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: Nº (#) = número; Proteínas: Traços = <30 mg/dL; + = 30 mg/dL, segundo método da fita reagente (Combur)

APÊNDICE K – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 2 (GRUPO E2)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães do Estágio 2 (grupo E2), São Paulo – 2015.

Nº (#)	Hemácias (p/cpoX400)	Leucócitos (p/cpoX400)	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Sangue oculto
E2#1	Raras	Raros	-	-	D: raras	-	-
E2#2	0-2	0-2	-	H0-1	D: raras	Raras	-
E2#3	0-2	-	-	-	D: raras	-	-
E2#4	4-6	Raros	-	-	-	-	-
E2#5	Raras	Raros	-	-	D: raras	-	-
E2#6	0-2	0-2	H0-1 G0-1	-	D: raras E: + P: +	Raras	-
E2#7	-	-	-	-	-	-	-
E2#8	Raras	Raros	-	-	D: raras	-	-
E2#9	0-2	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
E2#10	0-2	0-2	-	-	D: raras	-	-

Nota: Nº (#) = número; p/cpoX400 = por campo de aumento de 400 vezes; D = células de descamação das vias urinárias; E= células de descamação do epitélio renal; P= células de descamação de pelve renal; G= cilindro granuloso; H= cilindro hialino; FT = fosfato tripla; FA = fosfato amorofo; OC= oxalato de cálcio

APÊNDICE L – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 3
(GRUPO E3)

Dados individuais do exame de urina referentes à densidade, pH, proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e sangue oculto dos cães doentes renais crônicos no Estágio 3 (grupo E3), São Paulo - 2015.

Nº (#)	Densidade	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Urobilinogênio	Sangue oculto
E3#1	1,035	6,5	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#2	1,022	6,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#3	1,018	8,0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#4	1,010	5,5	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#5	1,010	5,5	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#6	1,018	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#7	1,008	5,0	(+)	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#8	1,010	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#9	1,010	7,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E3#10	1,005	7,0	(+)	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: Nº (#) = número; Proteínas: Traços = <30 mg/dL; + = 30 mg/dL, segundo método da fita reagente (Combur)

APÊNDICE M – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 3
(GRUPO E3)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães doentes renais crônicos no Estágio 3 (grupo E3), São Paulo – 2015

Nº (#)	Hemácias (p/cpoX400)	Leucócitos (p/cpoX400)	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Sangue oculto
E3#1	0-2	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
E3#2	-	0-2	H raros	-	D: raras	-	-
E3#3	-	-	-	-	-	-	-
E3#4	-	-	-	-	D: raras	-	-
E3#5	-	-	-	-	-	-	-
E3#6	Raras	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
E3#7	Raras	Raros	-	-	D: raras	Raras	-
E3#8	-	-	-	-	D: raras	-	-
E3#9	0-2	0-2	-	-	D: raras	-	-
E3#10	-	3-4	-	-	D: raras E: +	-	-

Nota: Nº (#) = número; p/cpoX400 = por campo de aumento de 400 vezes; D = células de descamação das vias urinárias; E= células de descamação de epitélio renal; H= cilindro hialino; FT = fosfato triplo; FA = fosfato amorfo; OC= oxalato de cálcio

APÊNDICE N – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 4
(GRUPO E4)

Dados individuais do exame de urina referentes à densidade, pH, proteína, glicose, corpos cetônicos, bilirrubina, urobilinogênio e sangue oculto dos cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4) – São Paulo - 2015.

Nº (#)	Densidade	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Urobilinogênio	Sangue oculto
E4#1	1,012	5,5	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#2	1,020	5,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#3	1,008	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#4	1,012	6,0	+++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#5	1,011	6,5	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#6	1,008	6,0	+	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#7	1,020	7,0	++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#8	1,010	6,0	++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	+++
E4#9	1,016	7,0	Negativo	+++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
E4#10	1,020	6,0	+++	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Nota: Nº (#) = número; Proteínas: Traços = <30 mg/dL; + = 30 mg/dL, segundo método da fita reagente (Combur)

APÊNDICE O – DADOS INDIVIDUAIS DO EXAME DE URINA DOS CÃES DOENTES RENAIIS CRONICOS NO ESTAGIO 4
(GRUPO E4)

Dados individuais das variáveis do exame do sedimento das amostras de urina dos cães doentes renais crônicos no Estágio 4 (grupo E4), São Paulo - 2015

Nº (#)	Hemácias (p/cpoX400)	Leucócitos (p/cpoX400)	Cilindros	Cristais	Células	Bactérias	Sangue oculto
E4#1	-	-	-	OC (+)	D: raras	-	-
E4#2	Raras	3-4	G 0-1	-	D: (+) E: + P: +	-	+
E4#3	-	0-2	G 0-1	-	D: raras P: (+)	-	-
E4#4	Raras	0-2	-	-	D: raras	-	-
E4#5	0-2	0-2	-	-	D: raras	Raras	-
E4#6	Raras	Raras	-	-	D: raras	-	-
E4#7	0-2	6-8	-	-	D: raras	++	-
E4#8	2-4	0-2	-	-	D: raras	-	-
E4#9	-	-	-	-	D: raras	-	-
E4#10	0-2	Raras	-	-	D: raras	Raras	-

Nota: Nº (#) = número; p/cpoX400 = por campo de aumento de 400 vezes; D = células de descamação das vias urinárias ; E= células de descamação de epitélio renal; H= cilindro hialino; FT = fosfato triplo; FA = fosfato amorfo; OC= oxalato de cálcio

APÊNDICE P – DADOS INDIVIDUAIS DO ULTRASSOM ABDOMINAL DOS CÃES CLINICAMENTE NORMAIS
(GRUPO CONTROLE – C)

Exame ultrassonográfico abdominal de cães clinicamente normais (grupo controle - C) - São Paulo, 2015.

Nº (#)	Laudo do exame ultrassonográfico
C#1	Rins direito e esquerdo simétricos, medindo respectivamente em torno de 5,7cm e 5,5cm de comprimento, em topografia habitual, contornos regulares, ambos apresentando arquitetura preservada e ecogenidade das corticais preservadas. Boa definição corticomedular. Não há evidências de lesões císticas.
C#2	Rins com contornos regulares, mediram o RE 5,62 cm e RD 5,88 cm de comprimento, ecogenidade cortical preservada e limite corticomedular definido.
C#3	Rins com contornos regulares, mediram o RE 6,0 cm e RD 5,7 cm de comprimento, ecogenidade cortical preservada e limite corticomedular definido.
C#4	Rins com contornos regulares, mediram o RE 4,019 cm e RD 4,23 cm de comprimento, ecogenidade cortical preservada e limite corticomedular definido.
C#5	Rins com contornos regulares, mediram o RE 5,0 cm e RD 5,15 cm de comprimento, ecogenidade cortical preservada e limite corticomedular definido.
C#6	Rins direito e esquerdo simétricos, em topografia habitual, contornos regulares, ambos apresentando arquitetura preservada e ecogenidade das corticais preservadas. Boa definição corticomedular. Não há evidências de lesões císticas.
C#7	Rins tópicos, simétricos (aproximadamente 4,16 cm RE e 4,15 cm RD, eixo longitudinal), ambos apresentando contornos regulares, arquitetura preservada, limite corticomedular definido e ecogenidade das corticais dentro dos padrões de normalidade.
C#8	...
C#9	...

Nota: ... – dados indisponíveis à avaliação dos prontuários

APÊNDICE Q – DADOS INDIVIDUAIS DO ULTRASSOM ABDOMINAL DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 1 (GRUPO E1)

Exame ultrassonográfico abdominal dos cães com doença renal crônica no Estágio 1 (grupo E1) - São Paulo, 2015.

Nº (#)	Laudo do exame ultrassonográfico
E1#1	RD: dimensões reduzidas, mediu aprox.. 4,1 cm de comprimento, contornos e limites cortico-medulares pouco definidos, presença de halo espesso medular, ao redor da pelve – fibrose/calificação. RE: dimensões reduzidas, mediu aprox. 3,5 cm de comprimento, contornos preservados, limites cortico-medulares pouco definidos, presença de halo formado por pontos hiperecóticos – pontos de fibrose/calificação – em medular, próximo ao limite cortico-medular.
E1#2	Rins de dimensões reduzidas, limites cortico-medulares preservados, ecogenidade mantida, contornos irregulares em RD. Presença de halo hiperecótico espesso longitudinal em medular – sinal da medular. Presença de pontos de fibrose/calificação. Os rins mediram aprox. 3,11 cm (RE) e aprox.. 3,04 cm de comprimento (RD).
E1#3	Dimensões reduzidas, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade mantida. Mediram aprox. 4,34 cm (RE) e aprox. 4,74 cm de comprimento (RD).
E1#4	RE: Dimensões reduzidas, mediu aprox. 3,16 cm de comprimento, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade elevada em limite cortico-medular. RD: Dimensões preservadas, mediu aprox. 3,8 cm de comprimento, contornos irregulares, limites cortico-medulares preservados, ecogenidade elevada em limite cortico-medular.
E1#5	Dimensões discretamente reduzidas, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade discretamente elevada. Presença de linha hiperecótica longitudinal em medular de RE – sinal da medular. Mediram aprox.. 6,89 cm (RE) e aprox.. 6,92 cm de comprimento (RD).
E1#6	Dimensões e contornos preservados, limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenidade elevada em limite cortico-medular. Pelve discretamente dilatada em RE. Mediram aprox. 3,82 cm (RE) e aprox.. 3,73 cm de comprimento (RD).
E1#7	Rins tópicos, dimensões normais (RE 3,54 cm e RD 3,75 cm em maior eixo), contornos regulares, perda da relação e delimitação cortico-medular, ecogenidade ligeiramente elevada, sem evidências de dilatação de pelves. Mineralização diverticular bilateral.
E1#8	RD: dimensões aumentadas, mediu aprox. 5,86 cm de comprimento. Apresenta grande cisto anecótico ocupando polo cranial e região média medindo aprox. 4,45 cm de diâmetro. Observa-se apenas seu polo caudal, que apresenta arquitetura preservada. RE: dimensões reduzidas, mediu aprox. 4,21 cm de comprimento, contornos ligeiramente irregulares e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade elevada. Presença de cisto anecótico em polo caudal medindo aprox. 1,93 cm. de diâmetro.
E1#9	RE: dimensões, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade discretamente elevada. Presença de alguns pequenos cistos anecóticos corticais medindo ate 0,28 cm de diâmetro. Mediu aprox. 5,59 cm de comprimento. RD: animal nefrectomizado.
E1#10	Rins: dimensões, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenidade discretamente elevada. Presença de cisto anecótico cortical em polo cranial de RE medindo aprox.. 0,97 cm de diâmetro. Mediram aprox.. 5,51 cm (RE) e aprox. 5,54 cm. de comprimento (RD).

APÊNDICE R – DADOS INDIVIDUAIS DO ULTRASSOM ABDOMINAL DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 2 (GRUPO E2)

Exame ultrassonográfico abdominal dos cães com doença renal crônica no Estágio 2 (Grupo E2) - São Paulo, 2015.

Nº (#)	Laudo do exame ultrassonográfico
E2#1	Dimensões reduzidas, RE mediu aprox. 5,16 cm e RD mediu aprox. 6,03 cm de comprimento, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade mantida.
E2#2	Contornos pouco definidos, limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade elevada, presença de linha hiperecótica longitudinal em medular – sinal da medular. RE mediu aprox. 6,8 cm e RD mediu aprox. 6,6 cm de comprimento (discretamente reduzidos). Pelve discretamente dilatada em RE. Presença de cisto anecóico em cortical, polco causal de RE medindo aprox. 0,49 cm de diâmetro.
E2#3	Rins: contornos irregulares, medindo cerca de 5,7cm (rim esquerdo) e 5,6cm (rim direito) de comprimento, limite corticomedular definido, ecogenicidade cortical aumentada. Discreta dilatação da pelve do rim esquerdo (cerca de 0,25cm). Calcificação de alguns divertículos renais em ambos os rins.
E2#4	Rins: contornos irregulares, medindo cerca de 6,2cm (rim esquerdo) e 6,0cm (rim direito) de comprimento, cortical com ecogenicidade aumentada, limite corticomedular pouco definido. Ambos apresentam sinal de medular.
E2#5	Rins: simétricos, dimensões normais, contornos regulares, leve espessamento e aumento da ecogenicidade cortical e definição corticomedular preservada.
E2#6	Dimensões, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade elevada. Mediram aprox. 3,33 cm de comprimento (RD).
E2#7	Rins em topografia habitual, de dimensões simétricas e normais, contornos definidos, discreto aumento difuso da ecogenicidade com perda de definição cortico-medular.
E2#8	Dimensões reduzidas, contornos e limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade elevada. Pelve E discretamente dilatada por conteúdo hipo/anecóico (celularidade moderada). RE mediu aprox. 3,86 cm e RD mediu aprox. 3,42 cm de comprimento.
E2#9	Dimensões reduzidas, contornos pouco definidos, perda dos limites cortico-medulares, ecogenicidade elevada. RE apresenta cisto anecóico cortical medindo aprox. 0,59 cm de diâmetro em polo caudal. RE mediu aprox. 3,38 cm e RD mediu aprox. 3,57 de comprimento.
E2#10	RE: dimensões discretamente reduzidas, mediu aprox. 3,9 cm de comprimento, contornos ligeiramente irregulares e limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade discretamente elevada. RD: dimensões discretamente reduzidas, mediu aprox. 3,8 cm de comprimento, contornos e limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade discretamente elevada.

APÊNDICE S – DADOS INDIVIDUAIS DO ULTRASSOM ABDOMINAL DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 3 (GRUPO E3)

Exame ultrassonográfico abdominal dos cães com doença renal crônica no Estágio 3 (Grupo E3) - São Paulo, 2015.

Nº (#)	Laudo do exame ultrassonográfico
E3#1	RE: Dimensões reduzidas, mediu aproximadamente 4,03 cm de comprimento, contornos ligeiramente irregulares e limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade discretamente elevada. RD: Dimensões reduzidas, mediu aprox. 4,1 cm de comprimento, contornos irregulares, limites cortico-medulares preservados, ecogenicidade discretamente elevada, ecotextura grosseira.
E3#2	RD: dimensões reduzidas, mediu aprox. 4,17 cm de comprimento, contornos irregulares, limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade discretamente elevada. Pelve discretamente dilatada por conteúdo anecóico. RE: dimensões reduzidas, mediu aprox. 4,69 cm de comprimento, contornos ligeiramente irregulares, limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade discretamente elevada. Pelve discretamente dilatada por conteúdo anecóico. Presença de cisto anecóico medindo aprox. 0,78 cm de diâmetro em medular.
E3#3	..
E3#4	Rins simétricos (RE= 6,38 cm e RD= 6,19 cm), em topografia habitual, contornos irregulares e definidos, com dimensões reduzidas, ecogenicidade acentuadamente elevada, corticais com parênquima grosseiro e perda da definição cortico-medular. Presença de sinal de medular bilateralmente.
E3#5	RD: dimensões reduzidas, contornos irregulares, limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade acentuadamente elevada. Mediu aprox. 3,96 cm de comprimento. RE: dimensões preservadas, contornos irregulares, limite cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade elevada. Mediu aprox. 6,12 cm de comprimento.
E3#6	RD: contornos irregulares, mediu 5,59 cm, aumento da ecogenicidade, perda moderada dos limites cortico-medulares. Discreta a moderada dilatação de pelve, com conteúdo homogêneo anecóico. RE: contornos irregulares, mediu 7,08 cm, aumento da ecogenicidade, com perda moderada dos limites cortico-medulares. Discreta a moderada dilatação de pelve, com conteúdo anecóico.
E3#7	Dimensões diminuídas (RE= 2,9 cm e RD= 2,6 cm), contornos irregulares e limites cortico-medulares mal definidos, heterogenicidade de cortical, com ecogenicidade maior em áreas centrais.
E3#8	Rins: dimensões reduzida (rim esquerdo 2,7cm e rim direito 2,4cm em eixo longitudinal). Rim esquerdo com leves ondulações de contornos, perda da arquitetura interna, cortical espessada com pelo menos dois cistos (0,3cm) dispersos, aumento difuso da ecogenicidade do parênquima e dilatação de pelve renal. Rim direito com contornos regulares, cortical espessada e aumento de ecogenicidade, com dilatação discreta de pelve (0,3cm).
E3#9	Rins com contornos regulares, medindo aprox. RE 5,3 cm e RD 6,1 cm de comprimento, ambos com ecogenicidade cortical aumentada e espessada, limite cortico-medular preservado. Presença de áreas císticas em cortical de ambos os rins, a maior delas em rim esquerdo, medindo aprox. 0,9 cm de diâmetro. Discreta dilatação da pelve do rim direito.
E3#10	Rins com dimensões reduzidas, perda dos contornos e dos limites cortico-medulares, ecogenicidade acentuadamente elevada. Pelves discretamente dilatadas. Mediram arox 3,47 cm (RE) e aprox. 3,38 cm de comprimento (RD).

Nota: ... – dados indisponíveis à avaliação dos prontuários

APÊNDICE T – DADOS INDIVIDUAIS DO ULTRASSOM ABDOMINAL DOS CÃES DOENTES RENAI CRONICOS NO ESTAGIO 4 (GRUPO E4)

Exame ultrassonográfico abdominal dos cães com doença renal crônica no Estágio 4 (Grupo E4) - São Paulo, 2015.

Nº (#)	Laudo do exame ultrassonográfico
E4#1	Rins: contornos pouco definidos e irregulares com dimensões reduzidas (rim esquerdo 3,4cm e rim direito 6,1cm em eixo longitudinal), limite corticomedular pouco definido, ecogenicidade cortical grosseira. Pelve dilatada (cerca de 0,33cm de diâmetro).
E4#2	Rins com dimensões reduzidas, contornos e limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade cortical elevada em região central. Mediram aprox. 6,21 cm (RE) e aprox. 5,75 cm de comprimento (RD).
E4#3	RE: dimensões preservadas, contornos e limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade elevada. Mediu aprox. 6,33 cm de comprimento. RD: dimensões preservadas, contornos pouco definidos, perda dos limites cortico-medulares, ecogenicidade elevada. Mediu aprox. 6,04 cm de comprimento.
E4#4	Rins em topografia habitual, dimensões normais (RD= 6,52 cm e RE= 6,56 cm, em maior eixo), contornos levemente irregulares, discreta perda de relação cortico-medular e aumento de ecogenicidade de corticais, sem evidências de dilatação de pelves.
E4#5	Rins: dimensões reduzidas, contornos irregulares, perda dos limites cortico-medulares, ecogenicidade cortical elevada.
E4#6	Rins com dimensões reduzidas, contornos irregulares, perda dos limites cortico-medulares, ecogenicidade elevada. Pelves discretamente dilatadas por conteúdo anecóico. Presença de cistos anecóicos em RE medindo aprox. 0,27 cm x 0,24 cm e RD medindo aprox. 0,24 cm x 0,24 cm (RE) e aprox. 2,19 cm de comprimento (RD).
E4#7	Rins com contornos e limites cortico-medulares pouco definidos, ecogenicidade acentuadamente elevada. Presença de cisto anecóico cortical em polo caudal de RD medindo aprox. 0,73 cm de diâmetro. Mediram aprox. 7,21 cm (RE) – dimensões discretamente reduzidas e aprox. 6,89 cm de comprimento (RD) – dimensões reduzidas.
E4#8	...
E4#9	Rins com contornos regulares, limites cortico-medulares e ecogenicidade preservadas, discretas calcificações diverticulares. Mediram RE= 4,0 cm e RD= 4,28 cm de comprimento.
E4#10	Rins com contornos regulares, simétricos, medindo aprox. RE= 4,32 cm e RD= 4,34 cm de comprimento, ambos com ecogenicidade cortical aumentada, limite cortico-medular preservado. Em rim direito apresenta cisto de aprox. 0,2 cm de diâmetro em polo cranial.

Nota: ... – dados indisponíveis à avaliação dos prontuários