CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE

**Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias
de cães com hiperadrenocorticism e a relação com a
pressão arterial sistêmica**

São Paulo

2007

CAROLINA ZAGHI CAVALCANTE

**Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias
de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a
pressão arterial sistêmica**

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 Medicina Veterinária

Departamento:
Clínica Médica

Área de concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Profa. Dra. Márcia Mery Kogika

São Paulo

2007

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.1913
FMVZ

Cavalcante, Carolina Zaghi

Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismismo e a relação com a pressão arterial sistêmica / Carolina Zaghi Cavalcante. – São Paulo: C. Z. Cavalcante, 2007.

105 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, 2007.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Márcia Mery Kogika.

1. Cães. 2. Hiperadrenocorticismismo. 3. Proteinúria. 4. Eletroforese.
5. Albuminúria. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da proteinúria em cães com hiperadrenocorticism hipófise dependente pelo método de eletroforese sódio dodecil sulfato poliacrilamida (sds-page)", protocolo nº708/2005, utilizando 40 cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Márcia Mery Kogika, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Evaluation of proteinuria in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism toward sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (sds-page) electrophoresis", protocol number 708/2005, utilizing 40 dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Márcia Mery Kogika, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 26 de setembro de 2005

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CAVALCANTE, Carolina Zaghi

Título: Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismismo e a relação com a pressão arterial sistêmica

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 Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
Assinatura	_____	Julgamento	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
Assinatura	_____	Julgamento	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição	_____
Assinatura	_____	Julgamento	_____

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a minha família,
em especial aos meus pais *Luiz e Kêmeli* e
ao meu grande amor *Marciano*
*Obrigada, sem vocês nada seria possível***

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Márcia Mery Kogika, que com sua dedicação e paciência, me ensinou a arte da pesquisa e me proporcionou esta conquista.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo pelo suporte financeiro.

A todos os médicos veterinários, residentes e funcionários do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo, pela ajuda na colheita das amostras. Em especial as médicas veterinárias Khadine Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Paula Romy Monteiro, Bruna Maria Pereira Coelho e Vera Fortunato Wirthl.

Às funcionárias do Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, médica veterinária Maria Luíza Franchini e técnicas Maria Helena da Silva Pelissari, Edna Santana dos Santos, Marli Elisabete Ferreira de Castro e Creide Donizete Costa, pela colaboração nos exames laboratoriais.

A todos os professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela contribuição na minha formação profissional.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, em especial ao Doutor Marcelo Larami Santoro, pela disponibilidade, dedicação e por possibilitar a realização de parte da minha pesquisa.

Aos amigos Samantha Myashiro, João Paulo Elsen Sault e Raquel Fraga Raimondo, que com toda certeza foram primordiais na realização, elaboração e análise de toda parte laboratorial do meu estudo.

Às amigas Kelly Ito, Mônica Kanashiro Oyafuso, Aline Santana da Hora, Christiane Prosser, Leila Taranti, Ângela Manetti e Mariana por toda fidelidade, companheirismo e amizade que jamais esquecerei.

A todos os proprietários de cães com hiperadrenocorticismismo que permitiram a colheita de amostras de seus animais.

RESUMO

CAVALCANTE, C. Z. **Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão arterial sistêmica.** [Evaluation of albuminuria and urinary protein electrophoresis in dogs with hyperadrenocorticism and the relationship with systemic blood pressure]. 2007. 105 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

O hiperadrenocorticismo é uma das endocrinopatias mais comuns em cães, sendo caracterizado pela exposição excessiva de glicocorticóides secretados pelas adrenais. A hipercortisolemia crônica pode promover várias complicações, incluindo hipertensão sistêmica e glomerulonefrite. A glomerulonefrite pode desencadear variáveis graus de proteinúria e uma tendência de evolução para doença renal crônica. A perda de proteínas na urina, principalmente da albumina, é uma característica das doenças glomerulares e a determinação de variáveis laboratoriais, como a razão proteína:creatinina urinária (RPC), albuminúria (teste de ELISA) e eletroforese das proteínas urinárias, são recomendadas para a elucidação do diagnóstico. Assim, o objetivo do estudo é avaliar a relação entre proteinúria e hipertensão arterial sistêmica em cães com hiperadrenocorticismo e verificar, pela avaliação da albuminúria e do peso molecular das proteínas urinárias, o segmento do néfron que foi comprometido ou lesado. Foram avaliados 30 cães com diagnóstico de hiperadrenocorticismo, subdivididos em 13 cães com hipertensão arterial sistêmica (grupo I) e 17 cães normotensos (grupo II). Foram determinados a razão proteína:creatinina urinária (RPC); a albuminúria pela avaliação da albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) e a eletroforese de proteínas pela técnica em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE). Os resultados foram comparados com os dados obtidos de 30 cães clinicamente saudáveis e foi constatado que não houve influência da hipertensão arterial sistêmica nos cães com hiperadrenocorticismo em relação à quantificação da albuminúria, determinada pelo método ELISA, e nem na qualidade e quantidade das bandas de proteínas de baixo (< 60 kDa) e de alto peso molecular (> 60 kDa) determinada pela eletroforese. No entanto foi determinado que cães com hiperadrenocorticismo podem desenvolver lesões glomerulares e tubulares, caracterizadas pela presença de albuminúria e de proteínas de alto e

de baixo pesos moleculares, independentemente da presença de hipertensão arterial sistêmica. Concluindo que os métodos laboratoriais, a eletroforese de proteína urinária em gel de poliacrilamida associada à avaliação quantitativa da proteína total, como a determinação quantitativa da albuminúria, são passíveis de serem empregadas para a avaliação dos segmentos dos néfrons comprometidos que causaram as perdas de proteínas na urina.

Palavras-chave: Cães. Hiperadrenocorticismo. Proteinúria. Eletroforese. Albuminúria.

ABSTRACT

CAVALCANTE, C. Z. Evaluation of albuminuria and urinary protein electrophoresis in dogs with hyperadrenocorticism and the relationship with sistemic blood pressure. [Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismismo e a relação com a pressão arterial sistêmica]. 2007. 105.f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Hyperadrenocorticism is a common endocrinopathie in dogs characterized by excessive glucocorticoid expousure secondary to adrenal secretion. Chronic hypercortisolemia may promote several complications, including sistemic hypertension and glomerulonephritis. Glomerulonephritis may lead to different proteinuria degrees and chronic renal disease. Urine protein loss, specially albumin, is characteristic in glomerular diseases. Laboratorial determination by the urinary protein/creatinin ratio (PCR), albuminuria (ELISA test) and urinary protein electrophoresis are recommended for diagnosis. The aim of this study is to evaluate the relationship between proteinuria and sistemic arterial hypertension in dogs with hyperadrenocorticism and to identify the nephron injured segment by evaluating albuminuria and urinary protein molecular weight. Thrithy dogs with hyperadrenocorticism were subdivided in 2 groups as following: 13 dogs with sistemic arterial hypertension (group I) and 17 normal dogs (group II). Urinary protein/creatinin ratio (PCR); albuminuria using the evaluation of normalized albumin and urinary albumin/creatinin ratio (ACR); and protein electrophoresis using polyacrylamide gel with sodium dodecil sulfate (SDS - PAGE) were performed. Results were compared with data of 30 clinically healthy dogs. No influence of sistemic arterial hypertension in dogs with hyperadrenocorticism was noticed in albuminuria magnitude using the ELISA method, nor in the quality and quantity of low (<60 kDa) and high (> 60 kDa) molecular weight bands observed in electrophoresis. However, dogs with hyperadrenocorticism can develop glomerular and tubular lesions, characterized by albuminuria and by the presence of high and low molecular weight proteins in urine independently of sistemic arterial hypertension. Furthermore, urinary protein electrophoresis in polyacrylaminde gel associated to quantitative evaluation of total protein such as the

quantitative determination of the albuminuria, may be used in evaluating committed nephrons segments that caused urine protein loss.

Key words: Dogs. Hyperadrenocorticism. Proteinuria. Electrophoresis. Albuminuria.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Imagem ilustrativa de gel de poliacrilamida delimitando as regiões A e B.....	35
------------	---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Valores individuais da pressão sanguínea e da proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	40
Quadro 2 -	Valores individuais da pressão sanguínea sistólica e da proteína total, creatinina e razão proteína : creatinina das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I).....	41
Quadro 3 -	Valores individuais da pressão arterial sistólica e da proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II)	43
Quadro 4a -	Identificação segundo a idade e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina das cadelas pertencentes ao grupo controle.....	46
Quadro 4b -	Identificação segundo a idade e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo controle.....	47
Quadro 5a -	Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A e B das amostras de urina das cadelas do grupo controle.....	48
Quadro 5b -	Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	49
Quadro 6 -	Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I.....	54

Quadro 7 -	Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo I	56
Quadro 8 -	Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo II	60
Quadro 9 -	Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo II.....	62
Quadro 10 -	Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães do grupo controle	68
Quadro 11 -	Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães do grupo I.....	70
Quadro 12	Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães do grupo II.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das amostras de urina de cães do grupo controle, I e II.....	44
Tabela 2 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo controle e do grupo I....	59
Tabela 3 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo controle e do grupo II...	66
Tabela 4 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B das amostras de urina dos cães do grupo I e II.....	67
Tabela 5 -	Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo controle.....	68
Tabela 6 -	Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo I.....	70
Tabela 7 -	Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo II.....	72
Tabela 8 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da albumina normalizada (mg/mL) das amostras de urina cães dos grupos controle, I e II	75
Tabela 9 -	Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina cães dos grupos controle, I e II.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Representação dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária dos cães do grupo controle e do grupo I	41
Gráfico 2 -	Frequência de cães do grupo I que apresentaram valores da razão proteína:creatinina (RPC) maior ou menor do que 1,0.....	42
Gráfico 3 -	Representação dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária dos cães do grupo controle e do grupo II	43
Gráfico 4 -	Frequência de cães do grupo II que apresentaram valores da razão proteína:creatinina (RPC) maior ou menor do que 1,0.....	44
Gráfico 5 -	Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	50
Gráfico 6 -	Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo I.....	57
Gráfico 7 -	Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo II.....	63
Gráfico 8 -	Representação dos valores da mediana, dos percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) da região A, segundo o traçado eletroforético de proteínas dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II	65
Gráfico 9 -	Representação dos valores da mediana, dos percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) da região B, segundo o traçado eletroforético de proteínas dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II	66
Gráfico 10 -	Representação dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo controle	69

Gráfico 11 -	Representação dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo I.....	70
Gráfico 12 -	Frequência de cães do grupo I, classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e negativos, segundo os valores de albumina normalizada.....	71
Gráfico 13 -	Frequência de cães do grupo I, classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e negativos, segundo os valores da razão albumina:creatinina urinária (RAC).....	71
Gráfico 14 -	Representação dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e máximo e mínimo da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo II.....	73
Gráfico 15 -	Frequência de cães do grupo II, classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e negativos, segundo os valores de albumina normalizada.....	73
Gráfico 16 -	Frequência de cães do grupo II, classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e negativos, segundo os valores da razão albumina:creatinina urinária (RAC).....	74

LISTA DE APÊNDICES

ÂPENDICE A -	Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães do grupo controle.....	91
ÂPENDICE B -	Valores séricos individuais de uréia e creatinina dos cães do grupo controle	92
ÂPENDICE C -	Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	93
ÂPENDICE D -	Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	94
ÂPENDICE E -	Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento das amostras de urina dos cães do grupo controle.....	95
ÂPENDICE F -	Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães do grupo I.....	96
ÂPENDICE G -	Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães do grupo II.....	97
ÂPENDICE H -	Valores individuais de bioquímica sérica dos cães do grupo I.....	98
ÂPENDICE I -	Valores individuais de bioquímica sérica dos cães do grupo II.....	99
ÂPENDICE J -	Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães do grupo I.....	100
ÂPENDICE K -	Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães do grupo II.....	101
ÂPENDICE L -	Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães do grupo I.....	102
ÂPENDICE M -	Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães do grupo II.....	103
ÂPENDICE N -	Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento das amostras de urina dos cães do grupo I.....	104
ÂPENDICE O -	Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento das amostras de urina dos cães do grupo II.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS

RPC	razão proteína:creatinina urinária
PAS	pressão arterial sistêmica
RAC	razão albumina:creatinina urinária

LISTA DE SÍMBOLOS

$>$ maior

$<$ menor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS.....	29
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1	ANIMAIS.....	30
4.2	MÉTODOS.....	32
4.2.1	Determinação da Concentração de Proteína Urinária.....	32
4.2.2	Determinação da Concentração Urinária de Creatinina.....	32
4.2.3	Determinação da Pressão Sanguínea.....	33
4.2.4	Eletroforese de Proteínas Urinária.....	33
4.2.5	Determinação da Concentração Urinária de Albumina.....	35
4.2.6	Análise dos Dados.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC).....	39
5.2	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIAS.....	45
5.3	AVALIAÇÃO DA ALBUMINÚRIA PELO MÉTODO DE ELISA.....	67
6	DISCUSSÃO.....	77
6.1	RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC).....	77
6.2	ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIA.....	78
6.3	ALBUMINÚRIA PELO MÉTODO DE ELISA.....	80
7	CONCLUSÃO.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICES.....	91

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O hiperadrenocorticismismo é considerado uma das endocrinopatias mais comuns em cães, sendo caracterizado pela exposição excessiva de glicocorticóides secretados pelas adrenais (FELDMAN, 2004). As causas mais freqüentes ocorrem secundárias a um excesso de secreção do hormônio adrenocorticotrófico (hipófise dependente), ou um excesso de secreção de cortisol ocasionado por neoplasia na glândula adrenal (adrenal dependente) ou a administração iatrogênica de glicocorticóides (PETERSON, 2007).

Os achados mais comuns do exame clínico dos cães com hiperadrenocorticismismo são a poliúria, polidipsia, polifagia, obesidade central, desordens neuromusculares e sintomas dermatológicos como alopecia, atrofia cutânea, comedos, piodermite crônica e recorrente, calcinose cutânea entre outros (GUPTILL et al., 1997). O diagnóstico presuntivo pode ser estabelecido pela associação dos achados do exame clínico com os exames complementares, no entanto o diagnóstico definitivo é confirmado após a realização de testes que identifiquem a função hipófise-adrenal. Dentre estes testes, o mais utilizado é o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (PETERSON, 2007).

O tratamento médico mais recomendado do hiperadrenocorticismismo consiste na administração de mitotano, e este fármaco causa necrose ou atrofia da camada reticular e glomerular das adrenais (REINE, 2007). Caso se mantenha a hipercortisolemia crônica, decorrente da ação do cortisol, poderá ocorrer uma variedade de sintomas e anormalidades bioquímicas, acarretando em várias complicações como glomerulonefrite, hipertensão sistêmica, urolitíase, infecção do trato urinário, diabetes mellitus, pancreatite aguda, insuficiência cardíaca congestiva e tromboembolismo pulmonar (FELDMAN, 2004; RHETT, 1997).

A glomerulonefrite como complicação do hiperadrenocorticismismo apresenta prevalência de 2,8 %, segundo estudos de Cook e Cowgill (1996). Entretanto Hurley e Vaden (1998) avaliaram a proteinúria dos cães com hiperadrenocorticismismo hipófise-dependente e determinaram que 7 animais (43,75%) apresentaram a razão proteína urinária e creatinina urinária (RPC) > 1,0, ou seja, presença de proteinúria patológica.

A glomerulonefrite associada ao hiperadrenocorticismismo é pouco compreendida, Waters et al. (1997) referem que efeitos imunossupressores e hipertensão glomerular podem estar associados à proteinúria. Rhett (1997) referiu outras causas de proteinúria associadas

com a hipercortisolemia crônica, incluindo glomeruloesclerose, aumento do tamanho dos poros glomerulares, alteração da seletividade e amiloidose.

A apresentação clínica de cães com glomerulonefrite é variável, depende exclusivamente da gravidade e duração da proteinúria, e também da presença ou ausência de insuficiência renal e de suas complicações. Os sintomas clínicos associados à proteinúria de intensidade discreta a moderada geralmente são inespecíficos, tais como perda de peso e letargia. Caso a perda de proteína na urina seja grave ou intensa, ocasionando a hipoalbuminemia (concentração sérica de albumina $< 1,0$ a $1,5$ g/dL), poderá ocorrer edema ou ascite (GRAUER, 1991).

A proteína está presente na urina de cães normais, porém em quantidades altas se torna deletéria. A proteína presente na urina de cães normais é derivada da não reabsorção pelo túbulo proximal, como a proteína de Tamm-Horsfall (FINCO, 1995). Segundo Lees et al. (2005), proteinúria é definida como sendo quantidade anormal de proteína na urina, que pode ser classificada de acordo com o local da perda de proteína ou com os mecanismos que induziram esta perda, tais como as causas pré-renal, renal ou pós-renal. A proteinúria pré-renal é definida como a quantidade anormal de proteína no plasma que ultrapassa a barreira glomerular. As proteínas de origem pré-renal encontradas na urina são hemoglobina, mioglobina e os fragmentos de imunoglobulinas (Proteína de Bence Jones).

A proteinúria de origem renal pode ser classificada em funcional ou patológica. A proteinúria renal funcional é definida como uma alteração renal fisiológica em resposta a um fenômeno transitório, como exercício intenso ou febre. A proteinúria renal patológica é persistente, e é classificada em glomerular, tubular ou intersticial. A proteinúria renal patológica glomerular ocorre devido a lesões na barreira de filtração glomerular que permite a passagem de proteínas de alto peso molecular (incluindo a albumina); a proteinúria renal patológica tubular é caracterizada por proteínas de baixo peso molecular e ocorre devido a não reabsorção das proteínas pelas células tubulares do segmento proximal; já a proteinúria renal patológica intersticial é decorrente de processos inflamatórios (nefrite intersticial aguda) que promovem a liberação de proteínas para o espaço urinário (LEES et al., 2005).

A proteinúria pós-renal é definida como a perda de proteína após a pelve renal, sendo classificada em urinária e extra-urinária. A proteinúria pós-renal urinária é derivada de processos exsudativos ou hemorrágicos da pelve renal, ureter, bexiga ou uretra. A proteinúria pós-renal extra-urinária ocorre devido a processos exsudativos ou hemorrágicos do trato genital ou da genitália externa (LEES et al., 2005).

A mensuração da concentração de proteína na urina pode ser realizada por métodos semiquantitativos e quantitativos. O método semiquantitativo é realizado pelo uso das fitas reagentes, entretanto este método pode apresentar resultados falso-positivo e falso-negativo, não sendo o método indicado para o diagnóstico definitivo de proteinúria (FINCO, 1995). O método quantitativo de avaliação da proteína urinária pode ser realizado por métodos turbidimétricos, de ligação a corantes e químicos. O azul brilhante de Coomassie é um método de ligação a corantes que pode ser indicado e que permite detectar concentrações de proteína de até 0,25 mg/dL, sendo considerado o método mais sensível (HOHNADEL, 1989).

Segundo Finco (1995), a determinação da concentração de proteína urinária pode não refletir a magnitude da proteinúria, devido a flutuações no volume da urina no mesmo paciente e a influência dos ritmos circadianos, indicando-se a colheita das amostras de urina em um período de 24 horas. No entanto Rego (2006) refere que tais colheitas requerem procedimentos como o uso de gaiola metabólica, passagem repetida ou fixação de cateter uretral, que além de serem trabalhosos e onerosos, predispõem o animal a infecções iatrogênicas.

White et al. (1984) relataram uma alta correlação entre o valor de excreção de proteína urinária em 24 horas e a razão proteína e creatinina urinária (RPC) de amostras de urinas aleatórias, fundamentando-se no fato de que a creatinina é produzida em uma taxa constante, é livremente filtrada pelo glomérulo e não é significativamente secretada e nem reabsorvida pelos túbulos renais. Ao se dividir a concentração de proteína urinária (mg/mL) pela concentração de creatinina (mg/mL), o efeito de volume de urina sobre a concentração de proteína em uma amostra de urina é anulado.

A mensuração da concentração de proteína urinária deve ser realizada para determinar a razão proteína e creatinina urinária (RPC). Esta razão pode ser influenciada pelo método de colheita da urina, pela dieta, por hemorragias, por inflamação e por exercícios (HURLEY; VADEN, 1998). Em cães, o valor normal da razão proteína e creatinina urinária (RPC) preconizado, segundo Finco (1995), seria de $< 0,4$; valores da RPC considerados questionáveis encontrariam-se entre 0,4 a 1; e valores da RPC $> 1,0$ seriam anormais ou patológico. Boutilier et al. (2004) avaliaram a RPC em 11 cães com hiperadrenocorticismismo e determinaram o valor acima de 1,0 em 36,4 % dos cães. Ortega et al. (1996) avaliaram a RPC em cães com hiperadrenocorticismismo em diferentes fases do tratamento e observaram valores da RPC acima de 1,0 em 12 (46%) cães sem tratamento, em cinco (31%) cães não controlados com o tratamento e em três (21%) cães bem controlados com o tratamento.

Jacob et al. (2003) demonstraram que o achado da razão proteína e creatinina urinária (RPC) maior que 1,0 observado em 45 cães com insuficiência renal crônica estava associado com um maior desenvolvimento de crise urêmica e morte, concluindo que a determinação desta razão pode ser empregada como valor prognóstico.

Um método qualitativo, como a eletroforese, tem sido empregado para identificar as proteínas na urina de acordo com o peso molecular e, assim, auxiliar na identificação da localização do segmento do néfron envolvido com a perda das referidas proteínas. A eletroforese de proteínas urinárias em gel de poliacrilamida apresenta alta especificidade e sensibilidade na determinação das proteínas, pois fornece informações sobre o peso molecular. A perda de proteínas por comprometimento do segmento tubular, principalmente do túbulo contornado proximal, caracteriza-se pelo achado de proteínas de baixo peso molecular; já em relação à perda de proteínas através do glomérulo, observa-se a presença de proteína de peso molecular que corresponde à albumina, sugerindo-se, portanto, a localização do segmento do néfron comprometido, como possivelmente, também, o prognóstico da afecção (REGO et al., 2001).

A técnica em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) apresenta a melhor separação das proteínas urinárias segundo Waller et al. (1989). Os mesmos autores relataram que as proteínas presentes nas amostras de urina se ligam ao SDS na presença de calor, produzindo um íon negativamente carregado que se move através do gel. Assim, as frações protéicas são separadas de acordo com o peso molecular. Proteínas de peso molecular variando entre 17 e 70 kDa são facilmente detectadas e a proteinúria de origem tubular pode ser demonstrada concomitantemente na presença de proteinúria de origem glomerular.

Toledo (2001) determinou o perfil eletroforético das proteínas séricas e urinárias de cães normais e de portadores de insuficiência renal crônica e concluiu que o SDS-PAGE trata-se técnica exequível, mas bastante trabalhosa, adequada tanto para amostras de soro quanto para as amostras de urina.

Lau e Woo (2002) compararam o exame histopatológico renal com os achados da eletroforese pelo método SDS-PAGE e concluíram que o emprego deste método pode reduzir a necessidade da utilização da biópsia renal no diagnóstico das afecções renais. Schultze e Jensen (1989) diferenciaram a proteinúria de origem glomerular, tubular e a mista de 12 cães pelo método de SDS-PAGE, e concluíram que esta técnica foi eficaz na detecção da lesão renal.

Zaragoza et al. (2003a) avaliaram a proteinúria nos cães com leptospirose pelo método SDS-PAGE e observaram proteínas de baixo peso molecular, indicando lesão tubular característica da leptospirose. Zaragoza et al. (2004) analisaram a proteinúria pelo método SDS-PAGE nos cães com piometra e determinaram que 58% da proteinúria era proveniente de perda decorrente de lesão glomerular (presença de proteínas de alto peso molecular).

Lazaretti et al. (2006) empregaram a eletroforese em SDS-PAGE para traçar o perfil eletroforético das proteínas na urina de cães com nefropatia hereditária e concluíram que a proteinúria tubular demonstra a gravidade do dano tubulointersticial, e está associada com a intensidade da azotemia em cães com doença glomerular progressiva.

Rego (2001) e Toledo (2001) em estudos das proteínas presentes na urina de cães normais constataram diferenças entre machos e fêmeas, concluindo que a urina de cães machos hígidos contém uma quantidade maior de proteína quando comparada com a urina de cadelas sadias.

Outra possibilidade de avaliação da proteinúria seria a determinação de microalbuminúria, que se refere a um tipo e grau de proteinúria representada por uma quantidade anormal de proteína em uma amostra de urina que não é detectada pelos testes convencionais de dosagem de proteína na urina (REGO, 2006). Sendo definida em cães como a concentração de albumina urinária entre 1 e 30 mg/dL. Concentrações maiores de albumina urinária também são anormais e são denominadas de macroalbuminúria (LEES et al., 2005).

Em humanos, a microalbuminúria está geralmente associada aos casos de nefropatia diabética, hipertensão e glomerulopatias que evoluem progressivamente e ocasionam dano na barreira de filtração glomerular, levando a perda de proteína na urina (GARY et al., 2003). Mardell e Sparkes (2006) mencionaram que em humanos o aumento precoce da albuminúria reflete dano glomerular não observado na razão proteína e creatinina urinária (RPC), sendo considerado um marcador de prognóstico negativo que contribui ao dano renal e em alguns casos a insuficiência renal.

A microalbuminúria é importante também na detecção de humanos acometidos pela “síndrome metabólica”, definida pela Organização Mundial de Saúde (WHO), em 1998, como a existência concomitante de hipertensão, dislipidemia, obesidade e microalbuminúria. Pacientes com esta síndrome apresentam maiores riscos de mortalidade decorrente de alterações cardiovasculares (ISOMA et al., 2001). Koh et al. (2000) observaram que os humanos com hiperreatividade do eixo hipotálamo hipófise adrenal apresentam aumento da excreção de albumina na urina e estes pacientes com hiperadrenocorticismo desenvolveram síndrome de resistência à insulina, dislipidemia, hipertensão e obesidade.

A excreção de albumina na urina envolve um ritmo circadiano, em que ocorre a liberação de albumina na urina em 24 horas, sendo considerado o melhor método para a detecção de microalbuminúria a colheita em 24 horas (HEERSPINK et al., 2006). No entanto, similarmente ao que acontece com a proteína urinária, a concentração de albumina urinária deve ser ajustada quanto às diferenças no volume e na concentração das amostras de urina, sendo utilizado como alternativa a razão albumina urinária: creatinina urinária (RAC). A utilização da RAC é considerada uma maneira viável de se determinar a albumina na urina e é considerado adequada para o acompanhamento clínico dos pacientes da espécie canina e humana (HEERSPINK et al., 2006; REGO, 2006).

Na medicina humana, a quantificação da albumina na urina pode ser realizada por técnicas de radioimunoensaio, nefelometria, imunoturbidimetria e ensaios imunoenzimáticos (ELISA). O método para a determinação da albumina na urina de cães mais utilizado é o ELISA de captura (PRESSLER et al., 2002). Em um estudo da concentração de albumina e microalbumina na urina, pelo método de radioimunoensaio, de pacientes humanos com hiperadrenocorticismismo foi detectado, respectivamente, as frequências de 84,6% (11 pacientes) e 61,5% (8 pacientes), sendo que as concentrações diminuíram após o tratamento em 100% dos casos (KOH et al., 2000). Boutilier et al. (2004) observaram a presença de microalbuminúria, pelo método de ELISA, em 63,6 % (n=7) dos cães com hiperadrenocorticismismo.

Atualmente, existem tiras comerciais específicas para a determinação semiquantitativa da microalbuminúria em cães (E.R.D- HealthScreen®). Kogika et al. (2007) avaliaram pelo método semiquantitativo a microalbuminúria em cães com diabetes mellitus e observaram uma frequência de negativo em 52,9% (n = 27) e alto positivo em 17,6% (n = 9) de um total de 51 cães diabéticos. Jensen et al. (2003) determinaram a prevalência da microalbuminúria pela comparação dos métodos semiquantitativo e quantitativo em duas populações distintas de cães e concluíram que o método semiquantitativo fornece resultados falso positivo.

A hipertensão sistêmica também é uma complicação comum das doenças glomerulares que contribui adicionalmente para a progressão da lesão renal. A prevalência da hipertensão sistêmica em cães com doença glomerular e proteinúria persistente atinge cerca de 80% (BROWN, 1995). Os mesmos valores são referidos por Ortega et al. (1996) nos pacientes com hipertensão sistêmica como consequência do hiperadrenocorticismismo não tratado, corroborando com Boutilier et al. (2004) que relataram a presença de hipertensão em grau moderado em 72,7% (n = 8) dos 11 cães avaliados com hiperadrenocorticismismo

A hipertensão arterial associada à doença renal crônica pode ocorrer segundo Rego (2006) em 60% (n=24) dos cães, sendo seus principais fatores o aumento do volume do fluido extracelular, aumento dos níveis e da resposta vascular a norepinefrina, ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, diminuição da ativação do sistema cinina-caliceína, aumento do débito cardíaco e aumento da resistência vascular periférica. A hipertensão arterial sistêmica pode ocasionar hiperfiltração glomerular ocasionando necrose fibrinóide da artéria aferente glomerular, proliferação glomerular e glomeruloesclerose como consequência proteinúria. (ROSS, 1995).

Os mecanismos que promovem a hipertensão sistêmica como complicação do hiperadrenocorticismismo são pouco compreendidos, algumas hipóteses incluem o excesso na secreção de renina, ativação do sistema renina-angiotensina, redução das prostaglandinas, mudanças na excreção de sódio renal e aumento da sensibilidade vascular aos vasoconstrictores endógenos por parte do efeito mineralocorticóide do cortisol (WATERS et al., 1997; GOY-THOLLOT et al., 2002).

Vários estudos realizados em humanos comprovaram a existência da relação entre proteinúria e hipertensão (BROWN et al., 1993; GRAUER et al., 2000; BROWN et al., 2003). Cavalcante et al. (2007) avaliaram pelo método semiquantitativo a microalbuminúria em cães com hiperadrenocorticismismo e a relação com a hipertensão arterial sistêmica e concluíram que a microalbuminúria ocorreu em associação com a hipertensão. Sabe-se que pacientes humanos que apresentam proteinúria devem ser submetidos a tratamento anti-hipertensivo mais intenso do que aqueles que apresentam quantidades normais de proteína na urina, evitando-se, assim, danos importantes ao glomérulo (PETERSON et al., 1995; HEBERT et al., 1997). A coexistência de hipertensão e proteinúria já foram relatadas em cães com hiperadrenocorticismismo (ORTEGA et al., 1996) e em cães com diabetes mellitus (STRUBLE et al., 1998).

2 JUSTIFICATIVA

Face à escassez de estudos que relacionam a microalbuminúria / albuminúria e a pressão arterial sistêmica em cães com hiperadrenocorticismo, o presente estudo poderá contribuir para o melhor entendimento da patogenia da referida afecção, possibilitando a obtenção de informações sobre as principais complicações sistêmicas freqüentemente associadas e, assim, fornecer subsídios para instituição de regimes preventivos e/ou terapêuticos específicos.

3 OBJETIVOS

Avaliar a relação entre proteinúria/albuminúria e hipertensão arterial sistêmica em cães com hiperadrenocorticism, como também identificar a proteína na urina pelo estudo do peso molecular, correlacionando-a com o segmento do néfron comprometido que ocasionou a perda daquela proteína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Estão descritas abaixo as composições dos grupos de cães pertencentes ao grupo controle, clinicamente saudáveis, e os dos grupos de estudo, cães com hiperadrenocorticismos, e posteriormente a metodologia empregada para avaliação de diversos parâmetros.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados um total de 30 cães com diagnóstico clínico de hiperadrenocorticismos, atendidos no 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, machos ou fêmeas, de idades e raças variadas, divididos em 13 cães com hipertensão sistêmica (grupo I) (Apêndice A) e 17 cães com pressão arterial sistólica (PAS) normal (grupo II) (apêndice B), e que não estavam recebendo tratamento para o hiperadrenocorticismos ou medicações que conhecidamente alterasse a PAS ou, ainda, condição mórbida que ocasionasse proteinúria pré-existente.

Os cães com hiperadrenocorticismos foram selecionados de acordo com os dados do exame clínico (anamnese e exame físico), avaliação da bioquímica sérica (fosfatase alcalina; alanina amino transferase; colesterol; triglicerídeos; uréia; creatinina (Apêndice C e D)) e exame de urina (Apêndice F, G, H, I, J, K e L). Após, para a confirmação do hiperadrenocorticismos e seleção dos animais, foi realizado o teste de supressão com baixa dose de dexametasona (Apêndice H e I) (PETERSON, 2007). A aferição do cortisol foi realizada por meio de Kit comercial¹, pela determinação sérica quantitativa de cortisol por radioimunoensaio de fase sólida. Os cães dos grupos I e II foram submetidos à aferição da PAS, a determinação da razão proteína e creatinina urinária (RPC) e à avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias.

O grupo controle consistiu de 30 cães machos ou fêmeas, de raças e idades variadas, clinicamente saudáveis (Apêndice K), domiciliados e apresentando PAS normal e que também

¹ Coat A Count Cortisol®

não tinham recebido nenhum fármaco que alterasse a PAS. Para a seleção deste grupo foram realizadas as determinações séricas de uréia e creatinina (Apêndice L) e o exame de urina (Apêndice M, N e O) e, também, as determinações da RPC e as avaliações da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias

4.2 MÉTODOS

As amostras de urina foram colhidas assepticamente por cistocentese ou sondagem uretral, utilizando-se seringas descartáveis² e sondas uretrais de polietileno descartáveis³, de diâmetros variados, de acordo com o porte do cão. Após as amostras de urina foram analisadas de acordo com as técnicas que serão descritas neste capítulo.

4.2.1 Determinação da Concentração de Proteína Urinária

Para a determinação da proteína urinária foi utilizada a técnica com o corante azul brilhante de Coomassie G – 250⁴, conforme técnica descrita por Bradford (1976). As amostras de urina (sobrenadante), previamente centrifugadas, foram conservadas à temperatura de - 70°C até o momento da realização da prova laboratorial. O método baseia-se na ligação do corante aos resíduos NH_3^+ presentes nas proteínas, sendo essa ligação completada em cerca de dois minutos após o início da reação, desenvolvendo cor estável por uma hora, passível de absorção em comprimento de onda de 595 nm⁵. Como solução padrão foi utilizado o padrão aquoso de proteínas totais⁶.

4.2.2 Determinação da Concentração Urinária de Creatinina

A determinação da concentração de creatinina urinária foi baseada na metodologia descrita por Lustgarten e Wenk (1972) em que ocorre reação da creatinina com o ácido pícrico em meio alcalino, produzindo picrato de creatinina, com leitura posterior em comprimento de onda de 515 nm em analisador bioquímico automático⁷. As amostras de urina

² Seringas descartáveis BD® de 10 ml e agulhas 30 x 7

³ Sondas uretrais 04 e 06

⁴ Serva®

⁵ VIS – 7220 Spectrophotometer – Beying Bsoif Shenzhem Aic Co., Ltd

⁶ Labtest Diagnóstica®

⁷ Liasys®, AMS.

foram diluídas em solução salina, de modo a atingir a linearidade do teste. O valor da creatinina urinária foi utilizado para o cálculo da razão proteína e creatinina urinária (RPC), com a finalidade de corrigir possíveis erros causados pela diluição ou concentração da amostra.

Conforme Lees et al. (2005) o valor da razão proteína e creatinina urinária (RPC) acima de 1,0 indica uma quantidade anormal de proteína na urina, sendo considerado proteinúria patológica no presente estudo em questão.

4.2.3 Determinação da Pressão Sanguínea

A avaliação da pressão sanguínea foi realizada com o cão em decúbito lateral, utilizando a artéria cefálica, pelo método indireto de aferição, com o uso do aparelho Doppler⁸ e manguitos de tamanhos que variam de acordo com a circunferência do membro torácico. O cálculo para a determinação do tamanho do manguito foi baseado na fórmula: $[0,4 \times \text{circunferência do membro torácico}]$; caso o tamanho calculado do manguito fosse intermediário entre os disponíveis, foi utilizado o manguito maior para prevenir a superestimação da pressão sanguínea. Para cada cão de ambos os grupos foram realizadas, no mínimo, três mensurações em ambiente calmo, sendo registrada e considerada a média destas. Foram classificados como hipertensos os cães com pressão sistólica igual ou superior a 180 mmHg conforme descrito por Elliot (2006).

4.2.4 Eletroforese de Proteínas Urinária

Foi empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) para a determinação dos pesos moleculares das proteínas urinárias e esta técnica foi realizada em um conjunto de placas verticais⁹ (LAEMLI, 1970). O gel de empilhamento foi confeccionado sob

⁸ Doppler Ultrasound Parks Medical® Model 811B

⁹ Unidade de eletroforese vertical EV5-2001N Bio Agency Biotecnologia®

concentração de 4% e o gel de separação a 10%, com espessura, largura e altura aproximadas ao tamanho da placa (ZARAGOZA et al., 2003a, 2003b, 2004).

As amostras foram preparadas utilizando-se 60 µL do sobrenadante da urina e 60µL de tampão da amostra para proteínas desnaturadas (lauril sulfato de sódio¹⁰ 20%; EDTA¹⁹ 0,5 M; triz-fosfato¹⁹ 0,617 M, pH 6,8; mercaptoetanol¹⁹; glicerol¹⁹; água deionizada e azul de bromofenol¹⁹) (TOLEDO, 2001). Após as amostras preparadas foram submetidas à ebulição durante 9 minutos e a quantidade de proteína na urina aplicada no gel foi padronizado em 5 µg / poço. Foram aplicadas até 20 amostras por gel e uma amostra do padrão para o peso molecular¹¹ com variação de 200 a 10 kDa.

As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando uma fonte¹² com a miliamperagem pré-fixada em 40 e 65 mA para o gel de empilhamento e separação, respectivamente. O tempo de corrida foi de 7 horas e como coloração do gel foi utilizado o azul brilhante de Coomassie¹³. Após a obtenção da coloração das diferentes bandas de proteínas a imagem foi gravada e processada eletronicamente, utilizando-se um sistema de densitometria¹⁴ e analisada em programa de *software* específico¹⁵

Para a avaliação dos pesos moleculares e da densidade óptica das proteínas urinárias foi utilizado o programa de computador específico já mencionado. As regiões individuais do gel correspondentes à aplicação de cada amostra de urina contendo 5 µg de proteína foi denominada de faixa. Em cada faixa encontram-se diferentes bandas de proteínas com pesos moleculares diversos.

Considerando-se os recursos do programa de computador supracitado, foi padronizada a área sob a curva obtida em cada faixa, representada pela densidade óptica total. Determinando-se assim, pelo programa, a porcentagem relativa da densidade óptica de cada banda de proteína em relação à densidade óptica total.

Para maior facilidade de interpretação, devido a possível sobreposição de picos de bandas, foram consideradas duas regiões, as regiões A e B onde se localizaram as proteínas de peso molecular maior ou igual a 60 kDa e menor que 60 kDa, respectivamente (Figura 1). A divisão das regiões foi baseado no peso molecular das proteínas sendo considerado abaixo de 60 kDa proteínas de baixo peso molecular e acima de 60 kDa proteínas de alto peso molecular conforme Osborne et al. (1995); Zaragoza et al. (2003a, 2004).

¹⁰ Sigma®

¹¹ Fermentas®

¹² Fonte para eletroforese PS5-0003N Bio Agency Biotecnologia®

¹³ Brilliant Blue R Sigma®

¹⁴ Densitômetro modelo Epson Expression ® 1680

¹⁵ Vision Works Ultra- Violet Products Ltd.®

A quantidade de proteína presente em cada região (A e B) foi determinada após obtenção do valor da porcentagem da densidade óptica da região analisada em relação a densidade óptica total de todo o traçado eletroforético, sendo o cálculo final baseado na quantidade total de proteína urinária (5 μ g) aplicada na respectiva faixa do gel. O valor obtido foi corrigido considerando a concentração total de proteína presente (mg/mL) na amostra de urina, utilizando-se a concentração de creatinina urinária (mg/mL) com a finalidade de corrigir possíveis erros causados pela diluição ou pela concentração da amostra. Assim, foi possível obter o índice da RPC para cada região (A e B), com a finalidade de auxiliar na classificação da proteinúria de acordo com os pesos moleculares.

Figura 1- Imagem ilustrativa de gel de poliacrilamida delimitando as regiões A e B. Os algarismos arábicos identificam as amostras de urina analisadas nas diferentes faixas. O padrão de peso molecular está identificado como PM

4.2.5 Determinação da Concentração Urinária de Albumina.

A concentração urinária de albumina foi determinada utilizando o método de ELISA de captura, desenvolvido no laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan (observação - método realizado no Processo FAPESP nº. 03/10426-3). Previamente a descrição da técnica de ELISA usada na determinação da microalbuminúria canina, serão sucintamente abordadas

as técnicas de purificação da albumina canina e inoculação em coelhos para produção de anticorpos específicos, técnicas estas realizadas no processo FAPESP supracitado.

Frações de albumina canina liofilizada¹⁶ foram purificadas em coluna Blue sepharose¹⁷ de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. As amostras purificadas tiveram sua concentração proteica determinada pelo método do ácido bicinonínico, conforme descrito por Smith et al. (1985), para o cálculo do rendimento de purificação (obtido pela divisão da quantidade total de albumina purificada pela quantidade total de albumina inicial) e foram divididas em alíquotas de 1 mL (2,1 mg/mL) em microtubos de 1,5 mL, sendo armazenadas a - 20° C para imunização dos animais.

Dois coelhos albinos Nova Zelândia receberam inicialmente uma injeção intramuscular de uma emulsão com 0,5 mL de adjuvante de Freund completo¹⁸ e 0,5 mL de uma solução de albumina canina purificada (2,1 mg/mL). A intervalos quinzenais, os coelhos receberam quatro reforços de imunização, pela mesma via e nas mesmas concentrações de antígeno, porém utilizando-se o adjuvante incompleto de Freund¹¹. Amostras de sangue foram obtidas antes da primeira imunização e no momento de cada reforço, por punção da veia marginal auricular direita ou esquerda, para determinação do título de anticorpos. Um mês após a última inoculação, foi aplicado o último reforço e após trinta dias deste, os coelhos foram anestesiados e o sangue foi obtido mediante punção da artéria carótida. Após centrifugação o sobrenadante foi retirado e mantido a - 70° C até o momento da purificação dos anticorpos. Os anticorpos IgG do soro dos coelhos foram extraídos seguindo a técnica descrita por Mckinney e Parkinson (1987).

A técnica de ELISA para a quantificação da albumina em amostras de urina foi padronizada no processo FAPESP mencionado acima. Inicialmente as placas de ELISA¹⁹ foram recobertas com 100 µL / poço de anticorpos de coelhos antialbumina canina (IgG anti-albumina canina 1:1600 em tampão carbonato pH 9,6) durante 12 h a 4°C em câmara úmida, sendo utilizada em todas as fases de incubação da técnica. Posteriormente, elas foram lavadas com tampão de lavagem composto por salina-fosfato tamponada (PBS) e 0,05% de monolaurato sorbitan de polioxietileno²⁰, entre cada uma das fases detalhadas da técnica foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada com tampão de lavagem. Após as placas

¹⁶ Fração V, Sigma®

¹⁷ HiTrap Blue HP, Pharmacia®

¹⁸ Sigma®

¹⁹ MaxiSorp Nunc® Immunoplate

²⁰ Tween 20, Merck®

foram bloqueadas com 200 µL / poço de caseína²¹ 1%, durante 2 h a 37°C, sendo então lavadas novamente com tampão de lavagem. Após 100 µL / poço das amostras e do padrão de albumina foram adicionadas às placas. A curva padrão de albumina purificada (2,14 mg/mL) foi obtida nas concentrações de 1,03; 3,08; 27,7; 83,3 e 250 ng/mL e as amostras de urina foram diluídas de modo que as reações ocorram dentro da faixa linear da curva padrão, ambos foram diluídos em tampão de incubação (PBS; gelatina de peixe²² 0,6% e monolaurato sorbitan de polioxietileno¹³), seguindo-se por uma incubação por 1 hora a 37°C. Depois da lavagem com tampão de lavagem, foram adicionados 100 µL de IgG de coelho anti-albumina canina biotinizada (1: 6400 em tampão de incubação) conforme a técnica descrita por Harlow e Lane (1988), seguindo-se por nova incubação a 37°C durante 1 h. Depois da lavagem com tampão de lavagem foram adicionados 100 µL do conjugado avidina peroxidase¹⁵ (1: 20000 em tampão de incubação) incubados a 37°C durante 1 h. Após uma última lavagem com tampão de lavagem, foram adicionados 100 µL de uma solução recém-preparada de substrato (o-fenilenodiamino²³ 1mg/mL e H₂O₂¹⁴ 0,03%, dissolvidos em tampão citrato 0,1M, pH 5,0). A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 30% (50 µL/poço). A absorbância dos poços das placas foi lida em um leitor de ELISA²⁴, com comprimento de onda ajustado para leitura em 492 nm.

Para a comparação entre os valores de albumina urinária dos cães foram obtidos os valores da razão albumina:creatinina (RAC) e da albumina normalizada para uma densidade de 1,010 utilizando-se a fórmula abaixo, proposta por Pressler et al. (2002): Albumina normalizada = concentração mensurada de albumina urinária x (0,01/ [densidade urinária – 1,0]). O valor de 1,040 foi usado para as amostras com densidades acima de 1,040.

Conforme Pressler et al. (2002) e Rego et al. (2006) foram considerados com microalbuminúria, através dos resultados da albumina normalizada, os cães que apresentaram valores de 0,01 a 0,3 mg/mL; com macroalbuminúria os cães com valores maiores que 0,3 mg/mL; e negativos com valores inferiores a 0,01 mg/mL de albumina normalizada. De acordo com os resultados da RAC foram considerados negativos os cães que apresentaram valores inferiores a 0,03, com microalbuminúria de 0,03 a 0,3 e macroalbuminúricos os valores maiores que 0,3.

²¹ Merck®

²² Sigma®

²³ OPD – Sigma®

²⁴ Multiskan EX

4.2.6 Análise dos Dados

Os valores urinários de proteína total, creatinina, razão proteína:creatinina, concentração de albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina dos cães dos grupos controle e dos cães dos grupos I e II, estão apresentados individualmente, sob a forma de quadros.

Dos grupos controle, I e II foram calculados a média, a mediana, o desvio-padrão da média, o erro padrão da média, os valores máximo e mínimo da razão proteína:creatinina, albumina normalizada, razão albumina:creatinina para as regiões A (> 60 kDa) e B (< 60 kDa) das amostras de urina, estando todos estes valores representados na forma de tabelas.

Após a verificação da forma de distribuição dos parâmetros anteriores, foram feitas transformações para logaritmo e raiz quadrada com a finalidade de atingir homocedasticidade e distribuição Gaussiana a fim de se aplicar testes estatísticos paramétricos. As variáveis tiveram uma distribuição não paramétrica ou não Gaussiana, sendo comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, a um nível de significância de 5%, exceto os valores da razão proteína:creatinina, que após transformação para logaritmo, se tornou paramétrico sendo então utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de um critério. A análise foi realizada com o auxílio de um programa estatístico²⁵.

O coeficiente de correlação de Pearson foi calculado, com o auxílio do programa Minitab¹⁴, para as variáveis albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II.

²⁵ Minitab 14

5 RESULTADOS

Apresentam-se, a seguir, os resultados referentes a razão proteína:creatinina urinária (RPC), eletroforese de proteínas urinárias e avaliação da albuminúria pelo método de ELISA.

5.1 RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC)

Os resultados dos valores individuais da pressão sanguínea, proteína urinária, creatinina urinária e da razão proteína:creatinina urinária (RPC) dos cães do grupo controle apresentam-se dispostos no quadro 1; todos os cães pertencentes a este grupo apresentaram pressão sanguínea sistólica inferiores a 180 mmHg e a RPC inferior a 1,0.

No quadro 2 encontram-se os valores individuais da pressão sanguínea, proteína urinária, creatinina urinária e da razão proteína:creatinina (RPC) dos cães do grupo I (hiperadrenocorticismo com hipertensão arterial sistêmica), sendo que todos os cães apresentaram pressão sanguínea acima de 180 mmHg. O gráfico 1 representa os valores das medianas, os valores dos percentis de 25 e 75% e os valores máximo e mínimo dos parâmetros RPC dos cães do grupo I e do grupo controle, observando-se que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$). O gráfico 2 representa a frequência de cães segundo o valor da razão proteína:creatinina urinária (RPC), detectando-se que valores acima de 1,0 foram representados por 69,2% dos cães do grupo I.

Animal número	Média da pressão sanguínea sistólica (mmHg)	Proteína (mg/mL)	Creatinina (mg/mL)	RPC
1	134	0,004	0,63	0,006
2	150	0,13	0,26	0,48
3	170	0,04	1,16	0,03
4	160	0,08	0,12	0,66
5	144	0,12	0,83	0,14
6	150	0,01	1,02	0,01
7	130	0,04	0,56	0,06
8	150	0,15	1,36	0,11
9	150	0,08	1,60	0,05
10	130	0,50	3,80	0,13
11	130	0,25	3,48	0,07
12	150	0,09	0,68	0,13
13	130	0,04	0,52	0,07
14	120	0,14	2,64	0,05
15	130	0,11	1,12	0,10
16	130	0,42	1,72	0,24
17	170	0,06	0,76	0,07
18	160	0,20	1,30	0,16
19	150	0,88	3,00	0,29
20	130	0,27	1,80	0,15
21	150	0,04	0,68	0,06
22	140	0,23	1,92	0,12
23	140	0,45	2,40	0,19
24	140	0,10	1,00	0,10
25	140	0,23	1,56	0,15
26	150	0,30	2,36	0,13
27	128	0,02	0,94	0,02
28	150	0,10	0,64	0,15
29	154	0,05	0,51	0,10
30	150	0,14	0,97	0,15

Nota: RPC = razão proteína:creatinina urinária

Quadro 1 - Valores individuais da pressão sanguínea e da proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo – 2007

Animal número	Média da pressão sanguínea sistólica (mmHg)	Proteína (mg/mL)	Creatinina (mg/mL)	RPC
1	194	0,13	0,10	1,21
2	210	2,01	0,18	10,69
3	205	2,05	0,64	3,20
4	196	0,06	0,05	1,10
5	186	0,60	0,07	7,74
6	186	0,60	0,29	2,05
7	210	0,36	0,25	1,42
8	184	0,12	0,55	0,22
9	200	0,17	0,49	0,35
10	200	2,12	0,16	12,84
11	190	0,03	0,24	0,14
12	204	0,35	0,25	0,01
13	184	4,29	0,62	6,89

Nota: RPC = razão proteína:creatinina urinária

Quadro 2 - Valores individuais da pressão sanguínea sistólica e da proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) - São Paulo – 2007

Gráfico 1 - Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária dos cães do grupo controle e do grupo I – São Paulo - 2007

Gráfico 2 - Frequência (em porcentagem) de cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) que apresentaram valores da razão proteína:creatinina (RPC) maior ou menor do que 1,0 - São Paulo – 2007

Os valores individuais da pressão sanguínea, proteína urinária, creatinina urinária e da razão proteína:creatinina (RPC) dos cães do grupo II estão distribuídos no quadro 3. No gráfico 3 estão dispostos os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos da razão proteína:creatinina (RPC) dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial normal (grupo II) e do grupo controle; constatou-se que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) entre os grupos. O gráfico 4 representa a frequência de cães com valores de RPC acima e abaixo de 1,0 nos animais pertencentes ao grupo II, sendo que os valores acima de 1,0 totalizaram 47,1% dos cães pertencentes ao grupo II.

Animal número	Média da pressão sanguínea sistólica (mmHg)	Proteína (mg/mL)	Creatinina (mg/mL)	RPC
1	176	0,60	0,20	2,92
2	174	1,22	0,43	2,78
3	176	0,49	0,54	0,90
4	146	0,39	0,03	11,34
5	150	0,09	0,06	1,39
6	140	0,08	0,19	0,44
7	160	0,06	0,23	0,28
8	166	0,02	0,10	0,22
9	164	0,19	0,37	0,50
10	134	0,13	0,13	0,95
11	130	0,91	0,39	2,28
12	156	0,12	0,39	0,30
13	170	0,38	0,08	4,78
14	115	0,03	0,18	0,16
15	126	0,17	0,76	0,22
16	160	2,11	0,26	7,96
17	140	0,69	0,63	1,08

Nota: RPC = razão proteína:creatinina urinária

Quadro 3 - Valores individuais da pressão arterial sistólica e da proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismos e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo - 2007

Gráfico 3 - Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária dos cães do grupo controle e do grupo II - São Paulo - 2007

Gráfico 4 – Frequência (em porcentagem) de cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial normal (grupo II) que apresentaram valores da razão proteína:creatinina urinária (RPC) maior ou menor do que 1,0 - São Paulo – 2007

Na análise estatística referente aos valores da razão proteína:creatinina urinária entre os grupos controle e os grupos I e II, foi observada diferença significativa ($P < 0,001$), no entanto, não foi evidenciada diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos I e II (Tabela 1).

Tabela 1 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das amostras de urina de cães do grupo controle, do grupo I (hiperadrenocorticismo com hipertensão arterial sistêmica) e do grupo II (hiperadrenocorticismo sem hipertensão arterial sistêmica) – São Paulo - 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo I (n=13)	Significância*
RPC	Média	0,139	3,684	$P < 0,001$
	Mediana	0,115	1,426	
	Desvio padrão	0,135	4,375	
	Mínimo	0,006	0,010	
	Máximo	0,66	12,848	
Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo II (n=17)	Significância*
RPC	Média	0,139	2,216	$P < 0,001$
	Mediana	0,115	0,956	
	Desvio padrão	0,135	3,140	
	Mínimo	0,006	0,010	
	Máximo	12,848	11,343	
Parâmetro	Estatística	Grupo I (n=13)	Grupo II (n=17)	Significância*
RPC	Média	3,684	2,216	$P > 0,05$
	Mediana	1,426	0,956	
	Desvio padrão	4,375	3,140	
	Mínimo	0,010	0,010	

* Análise de variância (ANOVA) de um critério

5.2 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIAS

Os traçados eletroforéticos das amostras de urina dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II apresentaram extrema variabilidade no número de bandas de proteínas e na intensidade da densidade óptica de cada banda de proteína identificada em cada amostra de urina. Assim, analisou-se as bandas de proteínas pertencentes às regiões A e B, conforme classificação descrita na metodologia, e de acordo com os valores da razão proteína:creatinina urinária (RPC) de cada região.

Os quadros 4(a) e 4(b) apresentam os valores individuais do peso molecular das bandas de proteínas presentes nas amostras de urina dos cães do grupo controle, segundo as regiões A e B, além dos dados quanto ao sexo e a idade dos animais pertencentes a este grupo. Nos valores individuais das bandas de proteínas dos cães pertencentes ao grupo controle, observa-se bandas de proteínas localizadas próximos a 110 kDa ($n = 29$) na região A e bandas de proteína com peso molecular localizados próximos a 30 kDa ($n = 19$) na região B. Observou-se também a diferença entre os padrões eletroforéticos de machos e fêmeas. Os resultados dos valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) dividida por regiões A e B, conforme mencionado no capítulo anterior, dos cães do grupo controle para fêmeas e machos, respectivamente, apresentam-se dispostos nos quadros 5(a) e 5(b); observa-se que as fêmeas apresentam menor quantidade de proteínas (RPC) na região B quando comparado aos machos. As curvas eletroforéticas das amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo controle estão dispostas no gráficos 5a, 5b, 5c e 5 d (curvas 1 a 31).

Animal número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
1	24	Fêmea	112,3 69,6	-
2	78	Fêmea	111,2	36,7
3	24	Fêmea	111,2 74,2 70 61,4	37,5 28,7
4	24	Fêmea	112,3 70	-
5	48	Fêmea	110,1 70,2 61,4	37,8 28,8
6	84	Fêmea	111,2	-
7	24	Fêmea	113,5 69,7	-
8	24	Fêmea	108,4 70,7 61,1	45,2 37,1 29,5 18,2
9	54	Fêmea	109,5	-
10	12	Fêmea	110,1 70,5 61,4	37,3 29,3 17,3
11	12	Fêmea	107,8 71,5 61,9	37,4 28,7
12	18	Fêmea	110,1 80,6 72,1 63,1	38,6 29,1
13	24	Fêmea	111,2 70,2	-
14	42	Fêmea	108,4 93,2 80 71,5 62,5	38,6 29,8
15	30	Fêmea	111,2 80,7 69,6 61,13	27,9 17

Quadro 4 a – Identificação segundo a idade e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina das cadelas pertencentes ao grupo controle, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
16	24	Macho	110,1 71,03 61,4	37,1 29,7 25,6
17	24	Macho	113,5 68,7	37,3 29,4 15,8
18	60	Macho	110,6 70,5	45,5 36,2 29,9 15,7
19	24	Macho	109,5 79,1 70,5 61,4	29,4 15,7
20	60	Macho	108,4 79,7 71	28,8 16
21	36	Macho	111,2 79,5 72	-
22	60	Macho	108,4 68,7	36,2 28,7 16
23	60	Macho	107,8 69,3	59 29,7 15,7
24	12	Macho	110,1 71,03 61,7	45,8 37,1 30 17
25	36	Macho	107,3 80,9 71,5 62,5	38,6 28,9 16
26	24	Macho	110,1 71	16,2
27	24	Macho	112,3 69,6	16

(Continua)

Quadro 4 b - Identificação segundo a idade e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo controle, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
28	60	Macho	111,2 71	47,5 37,7 29,9 16,2
29	78	Macho	79,1 70,5 62,5	55 29,9 16
30	30	Macho	108,9 69,3 62,5	55 37,7 29,4

(Conclusão)

Quadro 4 b - Identificação segundo a idade e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo controle, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Número	RPC - Região A ≥ 60 kDa	RPC - Região B < 60 kDa
1	0,006	-
2	0,406	0,074
3	0,023	0,007
4	0,660	-
5	0,134	0,006
6	0,010	-
7	0,060	-
8	0,060	0,050
9	0,050	-
10	0,068	0,062
11	0,064	0,006
12	0,114	0,016
13	0,070	-
14	0,037	0,013
15	0,040	0,060

Nota: RPC = razão proteína:creatinina urinária

Quadro 5a - Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), classificados de acordo com o peso molecular das proteínas determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, das amostras de urina das **cadela**s do grupo controle - São Paulo – 2007

Número	RPC - Região A ≥ 60 kDa	RPC – Região B < 60 kDa
16	0,087	0,153
17	0,009	0,061
18	0,034	0,126
19	0,099	0,191
20	0,139	0,011
21	0,060	-
22	0,097	0,023
23	0,074	0,116
24	0,076	0,024
25	0,106	0,044
26	0,065	0,065
27	0,017	0,003
28	0,101	0,049
29	0,031	0,069
30	0,134	0,016

Nota: RPC = razão proteína creatinina:urinária

Quadro 5b - Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), classificados de acordo com o peso molecular das proteínas determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, das amostras de urina dos **cães** do grupo controle - São Paulo – 2007

Curva 1 – Grupo Controle: cão 01

Curva 2 – Grupo Controle: cão 02

Curva 3 – Grupo Controle: cão 03

Curva 4 – Grupo Controle: cão 04

Curva 5 – Grupo Controle: cão 05

Curva 6 – Grupo Controle: cão 06

Curva 7 – Grupo Controle: cão 07

Curva 8 – Grupo Controle: cão 08

Gráfico 5a (curva 1 a 8) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo controle, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Curva 9 – Grupo Controle: cão 09

Curva 10 – Grupo Controle: cão 10

Curva 11 – Grupo Controle: cão 11

Curva 12 – Grupo Controle: cão 12

Curva 13 – Grupo Controle: cão 13

Curva 14 – Grupo Controle: cão 14

Curva 15 – Grupo Controle: cão 15

Curva 16 – Grupo Controle: cão 16

Gráfico 5b (curva 9 a 16) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo controle, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Curva 17 – Grupo Controle: cão 17

Curva 18 – Grupo Controle: cão 18

Curva 19 – Grupo Controle: cão 19

Curva 20 – Grupo Controle: cão 20

Curva 21 – Grupo Controle: cão 21

Curva 22 – Grupo Controle: cão 22

Curva 23 – Grupo Controle: cão 23

Curva 24 – Grupo Controle: cão 24

Gráfico 5c (curva 17 a 24) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo controle, individualmente identificados – São Paulo – 2007

Curva 25 – Grupo Controle: cão 25

Curva 26 – Grupo Controle: cão 26

Curva 27 – Grupo Controle: cão 27

Curva 28 – Grupo Controle: cão 28

Curva 29 – Grupo Controle: cão 29

Curva 30 – Grupo Controle: cão 30

Curva 31 – Grupo Controle: padrão

Gráfico 5d (curva 25 a 31) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo controle, individualmente identificados – São Paulo - 2007

No quadro 6 encontram-se dispostos os valores individuais dos pesos moleculares das bandas de proteínas presentes nas amostras de urina dos cães do grupo I, conforme as regiões A e B. Verifica-se a presença de várias bandas de proteínas distribuídas nas regiões A e B. No quadro 7 estão apresentados os valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) por regiões A e B, conforme metodologia mencionada no capítulo anterior, dos cães do grupo I; observa-se que os valores da RPC, tanto na região A quanto na região B, foram superiores ao grupo controle. As curvas eletroforéticas das amostras de urina dos animais do grupo I encontram-se dispostas nos gráficos 6a e 6b (curvas 32 a 45). Observa-se a extrema variabilidade no número de bandas de proteínas nas curvas eletroforéticas das amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I quando comparado ao grupo controle.

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
1	96	Fêmea	112,7 79,8 69,2 62	55,3 45,3 35,4 29,1
2	120	Fêmea	78,1 71,1 62,9	56,1 49 42,8 35,3 27,9 26,6 21,8 17,1
3	132	Macho	80,1 71,4 62,5	54,4 49 42,8 35,3 28 19,9 17,4 15,6
4	120	Fêmea	114,35 69,1	53,4 44,9 35,1 28,2 17,5

(Continua)

Quadro 6 - Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
5	144	Fêmea	78,3 66,6	53,8 35,3 25 17,4
6	96	Fêmea	114,5 66,2	54 35,4 27,8 25,4 20,1 17,5
7	108	Fêmea	112,7 79,5 68,1	53,8 35,4
8	132	Macho	77,6 65,5	52,7 42,8 35,1 27,1 24,4 21,7 17,2 15,6
9	108	Macho	80,73 67,9	54,4 44,3 34,2 32,2 27,2 24,1 17,2 15,5
10	144	Fêmea	79,1 65,5	54,5 44,4 35,5 27,8 25 21,1 17,9

(Continuação)

Quadro 6 - Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
11	60	Fêmea	113,9 80,5 67,3 62,3	54,7 45,4 36,1 28,9 25,9 18,4
12	96	Fêmea	109,5 82,1 71,4 62,5	56,8 45,7 35,4 28,3 21,8 17,7
13	108	Fêmea	76,8 66,2	52,9 34,7 27,8 24,3 17,1

(Conclusão)

Quadro 6 - Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo I, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Número	RPC - Região A ≥ 60 kDa	RPC - Região B < 60 kDa
1	0,995	0,220
2	4,360	6,332
3	1,848	1,354
4	0,846	0,254
5	7,473	0,268
6	1,573	0,478
7	1,281	0,144
8	0,189	0,035
9	0,214	0,135
10	9,409	3,441
11	0,117	0,030
12	0,006	0,003
13	5,300	1,590

Nota: RPC= razão proteína:creatinina urinária

Quadro 7 - Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), classificados de acordo com o peso molecular das proteínas determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, das amostras de urina dos cães do grupo I - São Paulo – 2007

Curva 32 – Grupo I: cão 1

Curva 33 – Grupo I: cão 2

Curva 34 – Grupo I: cão 3

Curva 35 – Grupo I: cão 4

Curva 36 – Grupo I: cão 5

Curva 37 – Grupo I: cão 6

Curva 38 – Grupo I: cão 7

Curva 39 – Grupo I: cão 8

Gráfico 6a (curva 32 a 39) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo I, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Curva 40 – Grupo I: cão 9

Curva 41 – Grupo I: cão 10

Curva 42 – Grupo I: cão 11

Curva 43 – Grupo I: cão 12

Curva 44 – Grupo I: cão 13

Curva 45 – Grupo I: Padrão

Gráfico 6b (curva 40 a 45) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo I, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Na análise estatística comparando os valores da RPC da região A do grupo controle com a região A do grupo I e na comparação das regiões B dos respectivos grupos, foram observadas diferenças significantes ($P < 0,001$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B, obtidas na eletroforese em gel de poliacrilamida, das amostras de urina dos cães do grupo controle e do grupo I – São Paulo - 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo I (n=13)	Significância*
Região A	Média	0,097	2,585	P< 0,001
	Mediana	0,066	1,281	
	Desvio padrão	0,128	3,081	
	Mínimo	0,006	0,006	
	Máximo	0,660	9,409	
Região B	Média	0,041	1,099	P< 0,001
	Mediana	0,0196	0,254	
	Desvio padrão	0,049	1,849	
	Mínimo	0	0,003	
	Máximo	0,190	6,332	

* ANOVA não paramétrico – Teste de Kruskal Wallis

O quadro 8 apresenta os dados referentes ao sexo, idade e os valores individuais dos pesos moleculares das bandas de proteínas presentes nas amostras de urina dos cães do grupo II, segundo as regiões A e B. Observa-se a presença de várias bandas de proteínas distribuídas nas regiões A e B e um maior número de bandas quando comparado com o grupo controle.

Os valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B dos cães do grupo II estão apresentados no quadro 9; constatou-se que valores da RPC observados, tanto na região A quanto na região B, foram superiores ao grupo controle. Nos gráficos 7a, 7b e 7c (curvas 46 a 63) encontra-se configurado os achados dos perfis eletroforéticos de proteínas das amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo II. Observa-se a extrema variabilidade no número de bandas de proteínas nas curvas eletroforéticas das amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo II quando comparado ao grupo controle, no entanto quando comparado o grupo I não se observa esta variabilidade.

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
1	72	Fêmea	111,5 67,3	49 35,5 33,8 28,4 22,1 18,1
2	84	Fêmea	110,9 78,9 66,6	53,8 45,3 35,3 31,4 28 17,4
3	84	Fêmea	113,9 68,8	54,2 51 46,3 35,9 29,1 22,1 18,1
4	60	Fêmea	78,9 66,2	54,7 45,9 35,9 25,2 17,9
5	108	Fêmea	115,1 80,1 71,1 64,8	55,8 52,2 46,3 36,4
6	96	Fêmea	113,8 80,8 72,4 62,5	57 35,7 28,9 17,7
7	108	Fêmea	118,7 72,2 64	56,2 36,2 29
8	156	Fêmea	72,2	-
9	60	Macho	119,3 72,2	36,1 28,7 22,4 16,2

(Continua)

Quadro 8 - Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo II, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Animal Número	Idade (meses)	Sexo	Região A ≥ 60 kDa	Região B < 60 kDa
10	120	Macho	66,36	54,5 34,9 27,6 24,1 17
11	120	Fêmea	66,2	54 35,4 25
12	144	Fêmea	113,9 71,3	62 35,5 29,1
13	156	Fêmea	81,4 69,2	55,7 36,4 28,7 18,2
14	144	Fêmea	113,8 82,8 72,4	51,1 36,7 28,9
15	108	Macho	114,9 82,1 72,4 62,9	55,5 35,8 28,75 16,39 13,8
16	132	Fêmea	70,3 62,9	55,3 44,8 35,8 28 24,4 17,1
17	96	Fêmea	69,1	-

(Conclusão)

Quadro 8 - Identificação segundo a idade, o sexo e os valores individuais dos pesos moleculares em Kilodaltons (kDa) das bandas de proteínas identificadas nas amostras de urina dos cães pertencentes ao grupo II, segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), determinada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida – São Paulo - 2007

Número	RPC - Região A ≥ 60 kDa	RPC - Região B < 60 kDa
1	1,682	1,244
2	1,907	0,882
3	0,007	0,003
4	9,716	1,627
5	1,228	0,171
6	0,350	0,091
7	0,238	0,043
8	0,222	-
9	0,266	0,243
10	0,770	0,186
11	2,083	0,206
12	0,254	0,048
13	3,291	1,490
14	0,090	0,072
15	0,114	0,108
16	6,315	1,647
17	1,082	-

Nota: RPC = razão proteína:creatinina urinária

Quadro 9- Valores individuais da razão proteína:creatinina urinária (RPC) segundo as regiões A (proteínas de peso molecular ≥ 60 kDa) e B (proteínas de peso molecular < 60 kDa), classificados de acordo com o peso molecular das proteínas determinado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, das amostras de urina dos cães do grupo II - São Paulo – 2007

Curva 46 – Grupo II: cão 1

Curva 47 – Grupo II: cão 2

Curva 48 – Grupo II: cão 3

Curva 49 – Grupo II: cão 4

Curva 50 – Grupo II: cão 5

Curva 51 – Grupo II: cão 6

Curva 52 – Grupo II: cão 7

Curva 53 – Grupo II: cão 8

Gráfico 7a (curvas 46 a 53) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo II, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Curva 54 – Grupo II: cão 9

Curva 55 – Grupo II: cão 10

Curva 56 – Grupo II: cão 11

Curva 57 – Grupo II: cão 12

Curva 58 – Grupo II: cão 13

Curva 59 – Grupo II: cão 14

Curva 60 – Grupo II: cão 15

Curva 61 – Grupo II: cão 16

Gráfico 7b (curvas 54 a 61) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo II, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Curva 62 – Grupo II: cão 17

Curva 63 – Grupo II: padrão

Gráfico 7c (curvas 62 a 63) - Perfil eletroforético de proteínas das amostras de urina dos cães do grupo II, individualmente identificados – São Paulo - 2007

Os gráficos 8 e 9 representam os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximo e mínimo da RPC, referentes as regiões A e B, respectivamente, dos cães pertencentes ao grupo controle, grupo I e grupo II.

Gráfico 8- Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária (RPC) da região A, segundo o traçado eletroforético de proteínas obtido em gel de poliácridamida dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II – São Paulo - 2007

Gráfico 9- Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária (RPC) da região B, segundo o traçado eletroforético de proteínas obtido em gel de poliacrilamida dos cães pertencentes aos grupos controle, I e II – São Paulo - 2007

Na tabela 3 encontram-se dispostos os dados da análise estatística da razão proteína: creatinina (RPC) dos animais pertencentes ao grupo controle e ao grupo II. Na comparação das regiões A e B de ambos os grupos foi observada uma diferença significativa ($P < 0,001$ e $P < 0,01$ respectivamente); entretanto, em relação aos grupos I e II não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$), conforme os dados dispostos na tabela 4.

Tabela 3 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B, obtidas na eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida das amostras de urina dos cães do grupo controle e do grupo II – São Paulo - 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo II (n=17)	Significância*
Região A	Média	0,097	1,742	$P < 0,001$
	Mediana	0,066	0,7698	
	Desvio padrão	0,128	2,598	
	Mínimo	0,006	0,0067	
	Máximo	0,660	9,716	
Região B	Média	0,041	0,474	$P < 0,001$
	Mediana	0,0196	0,1708	
	Desvio padrão	0,049	0,6262	
	Mínimo	0	0	
	Máximo	0,190	1,647	

* ANOVA não paramétrico – Teste de Kruskal Wallis

Tabela 4 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão proteína:creatinina urinária (RPC) das regiões A e B, obtidas na eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida das amostras de urina dos cães do grupo I e do grupo II – São Paulo – 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo I (n=13)	Grupo II (n=17)	Significância*
Região A	Média	2,585	1,742	P > 0,05
	Mediana	1,281	0,7698	
	Desvio padrão	3,081	2,598	
	Mínimo	0,006	0,0067	
	Máximo	9,409	9,716	
Região B	Média	1,099	0,474	P > 0,05
	Mediana	0,254	0,1708	
	Desvio padrão	1,849	0,6262	
	Mínimo	0,003	0	
	Máximo	6,332	1,647	

* ANOVA não paramétrico – Teste de Kruskal Wallis

5.3 AVALIAÇÃO DA ALBUMINÚRIA PELO MÉTODO DE ELISA

No quadro 10 encontram-se dispostos os valores urinários individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo controle. A correlação entre as variáveis albumina normalizada e RAC dos cães pertencentes ao grupo controle foi considerada adequada ($r = 0,647$; $P = 0,0001$) (Tabela 5). O gráfico 10 representa os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos das variáveis albumina normalizada e RAC dos cães do grupo controle.

Segundo a classificação proposta no capítulo material e métodos, a microalbuminúria, considerada por meio dos valores da albumina normalizada, seriam aqueles cães que apresentaram valores de 0,01 a 0,3 mg/mL; a macroalbuminúria seria para valores superiores a 0,3 mg/mL; e negativos com valores inferiores a 0,01 mg/mL. Considerando-se os valores da razão albumina:creatinina urinária (RAC) foram considerados negativos os cães que apresentaram valores inferiores a 0,03; com microalbuminúria valores entre 0,03 a 0,3 e macroalbuminúricos os valores maiores que 0,3. Os dados obtidos nos cães do grupo controle foram considerados negativos tanto para a avaliação da albumina normalizada como para a razão albumina:creatinina urinária (RAC).

Animal Número	Albumina (mg/mL)	Albumina normalizada (mg/mL)	RAC
1	0,0012	0,0003	0,002
2	0,0072	0,0036	0,026
3	0,0321	0,010	0,027
4	0,004	0,0009	0,029
5	0,0059	0,0010	0,007
6	0,0019	0,0005	0,001
7	0,002	0,0007	0,003
8	0,001	0,0004	0,01
9	0,001	0,0004	0,0008
10	0,002	0,0008	0,0005
11	0,005	0,0012	0,001
12	0,002	0,0008	0,003
13	0,001	0,0007	0,002
14	0,003	0,0008	0,001
15	0,006	0,0022	0,006
16	0,003	0,0008	0,002
17	0,0038	0,0008	0,004
18	0,002	0,0006	0,001
19	0,010	0,0025	0,003
20	0,002	0,0005	0,001
21	0,002	0,0008	0,002
22	0,002	0,0006	0,001
23	0,004	0,001	0,002
24	0,0006	0,0002	0,0006
25	0,004	0,0011	0,003
26	0,005	0,0012	0,002
27	0,001	0,0004	0,001
28	0,003	0,0016	0,005
29	0,0006	0,0002	0,001
30	0,0056	0,0011	0,005

Nota: RAC = razão albumina:creatinina urinária

Quadro 10 - Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo – 2007

Tabela 5 - Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo controle – São Paulo – 2007

Parâmetro	Correlação de Pearson (r) *	Significância
Albumina Normalizada RAC	0,647	P = 0,0001

* Coeficiente de correlação

Gráfico 10 – Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo controle – São Paulo - 2007

Os resultados dos valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo I apresentam-se dispostos no quadro 11. A correlação entre as variáveis albumina normalizada e RAC dos cães pertencentes ao grupo I foi considerada adequada ($r = 0,966$; $P = 0,0000$) (Tabela 6). O gráfico 11 representa os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos dos parâmetros albumina normalizada e RAC dos cães com hiperadrenocorticism e hipertensão arterial sistêmica (grupo I).

No grupo I foram constatados, considerando os valores da albumina normalizada, 84,6% dos cães com microalbuminúria, 7,7% com macroalbuminúria e 7,7% de cães negativos ou com albuminúria insignificante (Gráfico 12). Ao classificar a albuminúria com base nos valores da razão albumina: creatinina urinária (RAC), 30,8% apresentaram microalbuminúria e 69,2% macroalbuminúria (Gráfico 13).

Animal Número	Albumina (mg/mL)	Albumina normalizada (mg/mL)	RAC
1	0,018528	0,030	0,173
2	0,229431	0,114	1,220
3	0,308788	0,077	0,482
4	0,038319	0,127	0,703
5	0,33711	0,481	4,349
6	0,05559	0,039	0,190
7	0,013133	0,007	0,052
8	0,527344	0,138	0,958
9	0,598324	0,230	1,214
10	0,09368	0,066	0,567
11	0,361504	0,200	1,481
12	0,022653	0,015	0,089
13	0,2878	0,130	0,462

Nota: RAC = razão albumina:creatinina urinária

Quadro 11 - Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (Grupo I) - São Paulo – 2007

Tabela 6 - Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo I – São Paulo – 2007

Parâmetro	Correlação de Pearson (r) *	Significância
Albumina Normalizada RAC	0,966	P = 0,0000

* Coeficiente de correlação

Gráfico 11 – Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada (mg/dL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo I – São Paulo - 2007

Gráfico 12 – Frequência (porcentagem) de cães do grupo I (hiperadrenocorticismo com hipertensão arterial sistêmica), classificados como microalbuminúricos (0,01 a 0,3 mg/mL), macroalbuminúricos (> 0,3 mg/mL) e negativos (< 0,01 mg/mL), segundo os valores de albumina normalizada – São Paulo – 2007

Gráfico 13 – Frequência (porcentagem) de cães do grupo I (hiperadrenocorticismo com hipertensão arterial sistêmica), classificados como microalbuminúricos (0,03 a 0,3) e macroalbuminúricos (> 0,3), segundo os valores da razão albumina:creatinina urinária (RAC) – São Paulo – 2007

Os valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo II estão apresentados no quadro 12. A correlação entre as variáveis albumina normalizada e RAC dos cães pertencentes ao grupo II foi considerada adequada ($r = 0,939$; $P = 0,0000$) (Tabela 7). No gráfico 14 estão dispostos os valores das medianas, dos percentis de 25 e 75% e os valores máximos e mínimos das variáveis albumina normalizada e RAC dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II).

Considerando os valores de albumina normalizada, 47% dos cães apresentaram microalbuminúria, 11,8% macroalbuminúria e 41,2% dos cães eram negativos ou com albuminúria insignificante (Gráfico 15). Ao classificar a presença de albuminúria com base nos valores da razão albumina:creatinina (RAC) da urina, 52,9% apresentaram microalbuminúria e 41,2% macroalbuminúria e 5,9% foram classificados com negativos (Gráfico 16).

Animal número	Albumina (mg/mL)	Albumina normalizada (mg/mL)	RAC
1	0,082858	0,069	0,404
2	0,306552	0,080	0,700
3	0,017963	0,005	0,032
4	0,266567	0,533	7,616
5	0,023819	0,039	0,358
6	0,035757	0,044	0,181
7	0,011079	0,006	0,047
8	0,005443	0,003	0,050
9	0,4178	0,130	1,114
10	0,06168	0,034	0,450
11	0,199757	0,083	0,502
12	0,027456	0,010	0,069
13	0,027063	0,024	0,336
14	0,003344	0,002	0,018
15	0,024691	0,006	0,032
16	1,459528	0,729	5,507
17	0,028923	0,009	0,045

Nota: RAC = razão albumina:creatinina urinária

Quadro 12 - Valores individuais da albumina, albumina normalizada e razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (Grupo II) - São Paulo - 2007

Tabela 7 - Valores da correlação de Pearson (r) para albumina normalizada e razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães pertencentes ao grupo I – São Paulo – 2007

Parâmetro	Correlação de Pearson (r)*	Significância
Albumina Normalizada RAC	0,939	P = 0,0000

* Coeficiente de correlação

Gráfico 14 – Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), dos percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e da razão albumina:creatinina urinária (RAC) dos cães do grupo II (hiperadrenocorticism com pressão arterial sistêmica normal) – São Paulo - 2007

Gráfico 15 – Frequência (porcentagem) de cães do grupo II (hiperadrenocorticism com pressão arterial sistêmica normal), classificados como microalbuminúricos (0,01 a 0,3 mg/mL), macroalbuminúricos (> 0,3 mg/mL) e negativos (< 0,01 mg/mL), segundo os valores de albumina normalizada – São Paulo - 2007

Gráfico 16 – Frequência (porcentagem) de cães do grupo II (hiperadrenocorticismo com pressão arterial sistêmica normal), classificados como microalbuminúricos (0,03 a 0,3), macroalbuminúricos (> 0,3) e negativos (< 0,03), segundo os valores da razão albumina:creatinina urinária (RAC) – São Paulo - 2007

Na análise estatística da variável albumina normalizada entre os cães do grupo controle e os cães com hiperadrenocorticismo, incluindo os grupos I e II, foi observada diferença significativa entre estes grupos ($P < 0,001$). No entanto, não foi constatada diferença significativa entre os dois grupos doentes, grupos I e II, ($P > 0,05$) (Tabela 8). Achados semelhantes foram também observados quando a análise dos dados referentes a variável razão albumina:creatinina urinária (RAC), conforme apresentado na tabela 9.

Tabela 8 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da albumina normalizada (mg/mL) das amostras de urina cães dos grupos controle, I e II – São Paulo - 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo I (n=13)	Significância*
Albumina Normalizada	Média	0,003	0,127	P< 0,001
	Mediana	0,0008	0,114	
	Desvio padrão	0,007	0,126	
	Mínimo	0,0002	0,0072	
	Máximo	0,010	0,481	
Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo II (n=17)	Significância*
Albumina Normalizada	Média	0,003	0,106	P< 0,001
	Mediana	0,0008	0,034	
	Desvio padrão	0,007	0,203	
	Mínimo	0,0002	0,002	
	Máximo	0,010	0,729	
Parâmetro	Estatística	Grupo I (n=13)	Grupo II (n=17)	Significância*
Albumina Normalizada	Média	0,127	0,106	P> 0,05
	Mediana	0,114	0,034	
	Desvio padrão	0,126	0,203	
	Mínimo	0,0072	0,002	
	Máximo	0,481	0,729	

* ANOVA não paramétrico – Teste de Kruskal Wallis

Tabela 9 - Valores da média, mediana, desvio padrão, máximo e mínimo da razão albumina:creatinina (RAC) das amostras de urina cães dos grupos controle, I e II – São Paulo - 2007

Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo I (n=13)	Significância*
RAC	Média	0,016	0,918	P< 0,001
	Mediana	0,002	0,567	
	Desvio padrão	0,050	1,131	
	Mínimo	0,0005	0,052	
	Máximo	0,027	4,350	
Parâmetro	Estatística	Grupo controle (n=30)	Grupo II (n=17)	Significância*
RAC	Média	0,016	1,027	P< 0,001
	Mediana	0,002	0,3362	
	Desvio padrão	0,050	2,136	
	Mínimo	0,0005	0,018	
	Máximo	0,027	7,616	
Parâmetro	Estatística	Grupo I (n=13)	Grupo II (n=17)	Significância*
RAC	Média	0,918	1,027	P> 0,05
	Mediana	0,567	0,3362	
	Desvio padrão	1,131	2,136	
	Mínimo	0,052	0,018	
	Máximo	4,350	7,616	

* ANOVA não paramétrico – Teste de Kruskal Wallis

6 DISCUSSÃO

Apresentam-se, a seguir, as discussões referentes a razão proteína:creatinina urinária (RPC), eletroforese de proteínas urinárias e avaliação da albuminúria pelo método de ELISA.

6.1 RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC)

Os valores da RPC de todos os cães pertencentes ao grupo controle (cães clinicamente saudáveis) foi inferior a 1,0, demonstrando que todos os cães apresentaram-se dentro da normalidade, conforme relatos de Lees et al. (2005) que referem o valor da RPC acima de 1,0 representaria quantidade anormal de proteína na urina, sendo, portanto, considerada proteinúria patológica.

A comparação dos valores da RPC do grupo controle com os grupos I e II demonstrou existir nítida diferença ($P < 0,001$) entre os grupos de cães com hiperadrenocorticismismo e os cães clinicamente normais. Os cães pertencentes ao grupo I apresentaram proteinúria patológica ($RPC > 1,0$) em 69,2% (9 cães) e os cães do grupo II em 47,1% (8 cães). Assim, a proteinúria constatada pelos valores da RPC nos cães com hiperadrenocorticismismo dos grupos I e II pode ser sugestiva de proteinúria patológica decorrente de lesão renal, pois de acordo com os estudos realizados por Ortega et al. (1996) e por Hurley e Vaden (1998), estes autores relataram que a hipercortisolemia crônica pode induzir o aumento da taxa de filtração glomerular e a hipertensão glomerular, causando glomeruloesclerose e, em consequência, perda de proteínas através do glomérulo ocasionando a proteinúria patológica.

Assim, considerando-se que a hipertensão glomerular possa apresentar papel importante no desenvolvimento da lesão glomerular, os cães com hiperadrenocorticismismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) do presente estudo não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) na RPC quando comparado com os cães com hiperadrenocorticismismo e normotensos (grupo II). Segundo Ortega et al. (1996) e Goy-Thollot et al. (2002), estes referem que o tempo de duração da hipercortisolemia possa aumentar a sensibilidade vascular a vasoconstritores endógenos, desenvolvendo-se a hipertensão arterial sistêmica e glomerular e, assim, perpetuar a proteinúria. No presente estudo, entretanto, não foi possível determinar

precisamente o período de evolução da doença em ambos os grupos (I e II), mas somente o tempo em que o diagnóstico de hiperadrenocorticismo foi definido. Apesar de não ter sido considerado o tempo de evolução da doença, nota-se que a hipertensão arterial sistêmica presente nos cães do grupo I não foi fator preponderante para determinar a perda maior de proteína na urina nestes animais.

6.2 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIA

Na avaliação individual das bandas de acordo com o peso molecular das proteínas da urina dos cães pertencentes ao grupo controle, foram observadas bandas de proteínas localizadas na região A com peso molecular próximo a 110 kDa ($n = 29$) e próximo a 70 kDa ($n = 27$), além das bandas de proteínas localizadas na região B com peso molecular próximo a 30 kDa ($n = 19$), concordando com Shultze e Jensen (1989) e Zaragoza et al. (2004) que observaram as mesmas bandas em cães clinicamente normais. O predomínio de proteínas na região correspondente ao peso molecular da albumina foi descrito nos primeiros estudos de eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas urinárias em cães hígidos (MULLER; TRAUTWEIN, 1977). Ainda, Finco (1995) confirma que a presença de proteínas de diferentes pesos moleculares na urina dos cães sadios é normal, mas em pequenas quantidades; a proteína de Tamm-Horsfall, oriunda dos rins, é uma das proteínas usualmente presente, além da possibilidade da presença de albumina em quantidade mínima. A albumina, com um peso molecular aproximado de 66 KDa, normalmente não está presente na urina (DIBARTOLA et al., 1980; WALLER et al., 1989). Entretanto, alguns autores relatam que 25 a 70% da proteína total presente na urina é representada pela albumina (HARVEY; HOE, 1966; BARSANTI; FINCO, 1979).

Rego (2001) e Toledo (2001), em estudos relacionados aos tipos de proteínas presentes na urina de cães normais, constataram diferenças entre machos e fêmeas, corroborando com os dados observados no presente estudo em que foram detectadas diferenças nos perfis das bandas de proteínas na região B dos cães machos, e que não foram observadas na mesma região das amostras de urina das fêmeas pertencentes ao grupo controle. A presença de proteínas de baixo peso molecular (< 60 kDa) da região B pode estar relacionada a presença de proteínas oriundas do trato genital masculino.

Quando ocorre a perda de proteínas através do glomérulo, estas corresponderiam a proteínas de alto peso molecular em que a albumina estaria também incluída e, no presente estudo, estas encontrariam-se presentes na região A do traçado eletroforético. Detectou-se que todos os cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentaram várias bandas de proteínas na referida região A, sugerindo que a albumina poderia estar representada. A presença de proteínas na urina dos cães com hiperadrenocorticismo pode estar relacionada com a passagem através da membrana glomerular devido ao um aumento da permeabilidade do glomérulo, sendo esta hipótese possivelmente confirmada quando da comparação dos valores da RPC da região A dos cães doentes (grupos I e II) com a RPC da região A do grupo controle, em que os cães com hiperadrenocorticismo apresentaram concentrações significativamente superiores. Segundo Waters et al. (1997) e Rhett (1997), o aumento da permeabilidade glomerular ocorre nos cães com hiperadrenocorticismo devido aos efeitos imunossupressores do cortisol além da hipertensão glomerular, glomeruloesclerose e alteração da seletividade da membrana glomerular.

No que se refere à perda de proteína urinária por comprometimento do segmento tubular, principalmente do túbulo contornado proximal, esta se caracteriza pelo achado de proteínas de baixo peso molecular (< 60 kDa) (SHULTZE; JENSEN, 1989; REGO, 2001). No presente estudo, a avaliação qualitativa das proteínas pertencentes à região B permitiu observar que a maioria dos cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentava um grande número de bandas de proteínas na referida região; no entanto, a presença de proteínas de baixo peso molecular também pôde ser observada na urina de cães pertencentes ao grupo controle. Entretanto, quando considerada quantitativamente as referidas bandas de proteínas, a avaliação da RPC da região B confirmou maior concentração de proteína nos cães com hiperadrenocorticismo comparada com a mesma região dos cães do grupo controle. Estes achados sugerem que os cães com hiperadrenocorticismo (grupos I e II) apresentaram perda urinária de proteína, também em parte decorrente de comprometimento / lesão tubular. De acordo com o estudo de Zaragoza et al. (2003), que avaliaram a proteinúria de cães com leptospirose, o aumento das concentrações de proteínas de baixo peso molecular confirma a origem da proteína decorrente de comprometimento do segmento tubular. Segundo Newman et al. (2000), pode ocorrer em consequência da lesão prévia do glomérulo, a extensão da lesão também para o segmento tubular do néfron.

No hiperadrenocorticismo, segundo Rhett (1997), a prevalência de glomerulonefrite, confirmada com o exame histopatológico, varia em 15% e a presença da fração albumina das proteínas urinárias é sempre mencionada por diversos autores possivelmente decorrente da

alteração da permeabilidade glomerular (LULICH et al., 1996; REGO, 2001; TOLEDO, 2001; LEES et al., 2005).

Assim, no presente estudo, os animais com hiperadrenocorticismismo avaliados apresentaram não somente o comprometimento do segmento glomerular, mas também do segmento tubular, pois foram constatados aumentos das concentrações das bandas de proteínas em ambas as regiões, A e B, sugerindo que os cães com hiperadrenocorticismismo possam também evoluir ou desenvolver doença túbulo-intersticial, conforme justificado por Newman et al. (2000), que relataram que a cronicidade da proteinúria e/ou o excesso de proteína presente no filtrado glomerular poderiam ocasionar a fibrose intersticial.

6.3 ALBUMINÚRIA PELO MÉTODO DE ELISA

Na análise individual dos valores de RAC e albumina normalizada dos cães pertencentes ao grupo controle, foram constatados valores dentro da faixa de normalidade corroborando com os dados obtidos por Rego (2006), que ainda relatou que nos cães sadios não existe diferença significativa entre os valores da RAC e da albumina normalizada entre machos e fêmeas, e entre os métodos de colheita de urina (cistocentese e cateterismo vesical).

Na avaliação da correlação entre os valores individuais de albumina normalizada e da RAC dos cães pertencentes ao grupo controle, foi observada correlação positiva (forte) entre as duas variáveis, no entanto Rego (2006) avaliou a mesma correlação e observou uma correlação fraca para os cães clinicamente normais e sugeriu a utilização apenas da RAC para animais que apresentassem densidade urinária superior a 1,040, fato este não observado no estudo em questão.

Os cães com hiperadrenocorticismismo (grupos I e II) quando comparados com os cães do grupo controle, foi constatada diferença significativa ($P < 0,001$) (Tabelas 8 e 9) entre os valores de RAC e albumina normalizada; entretanto esta diferença não foi observada quando a comparação das mesmas variáveis foi realizada entre os cães com hiperadrenocorticismismo dos grupos I e II ($P > 0,05$) (Tabelas 8 e 9), discordando com os achados de Cavalcante et al. (2007) que avaliaram a microalbuminúria, por método semiquantitativo, em cães com hiperadrenocorticismismo e observaram que a microalbuminúria ocorria em associação com a hipertensão nos cães com esta afecção. Cabe ressaltar que a metodologia empregada para a

mensuração da microalbuminúria no referido estudo difere do método empregado no presente estudo (quantitativo-ELISA), pois segundo relatos de Grauer et al. (2004), o teste semiquantitativo apresenta sensibilidade de 54% e especificidade de 69% quando comparado ao método quantitativo- ELISA, concluindo que o teste semiquantitativo possui uma alta porcentagem de resultados falso positivo e falso negativo para a detecção de albumina na urina de cães, quando comparado ao método utilizado no presente estudo.

A presença concomitante de hipertensão arterial sistêmica e proteinúria nos cães com hiperadrenocorticismo já foram anteriormente relatadas (ORTEGA et al., 1996; GOY-THOLLOT et al., 2002; BOUTILIER et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2007), no entanto, a intensidade de albuminúria relacionado com a hipertensão arterial sistêmica foi avaliada até o presente momento somente por testes semiquantitativos (BOUTILIER et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2007). No presente estudo, a albuminúria dos cães com hiperadrenocorticismo, referentes aos grupos I (com hipertensão arterial sistêmica) e II (com pressão arterial sistólica normal), não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos. Possivelmente pelo, fato do presente estudo ter sido realizado em casos clínicos em diferentes tempos de evolução da doença, como também pela ausência de mensurações seriadas da pressão arterial sistêmica e da proteinúria, não foi possível avaliar a possibilidade da influência da hipercortisolemia crônica no aumento da sensibilidade vascular a vasoconstritores endógenos ocasionando a hipertensão arterial sistêmica e glomerular, como também no efeito imunossupressor do cortisol causando alterações da membrana glomerular e perpetuando, assim, a proteinúria (RHETT, 1997; WATERS et al., 1997; GOY-THOLLOT et al., 2002).

Na avaliação da correlação entre os valores individuais de albumina normalizada e RAC dos cães pertencentes aos grupos I e II, foi observada correlação positiva entre as duas variáveis, corroborando com Rego (2006) que obteve uma correlação fortemente positiva na avaliação dos cães com insuficiência renal crônica. Provavelmente esta correlação ocorreu devido ao fato dos cães pertencentes aos grupos I e II apresentarem baixa densidade urinária, impedindo assim a superestimação do valor de albumina normalizada.

Nos cães pertencentes ao grupo I, com exceção do cão número 7, todos os cães com $RPC > 1,0$ apresentaram microalbuminúria ou macroalbuminúria quando analisados em relação à RAC e albumina normalizada; o mesmo foi observado nos cães pertencentes ao grupo II, com exceção dos cães número 13 e 17, corroborando com os relatos de Lees (1996) que refere que em cães que apresentam $RPC > 1,0$, a albuminúria estará presente devido a intensidade da proteinúria.

Nos cães com hiperadrenocorticismo que apresentaram valores da $RPC < 1,0$, pertencentes ao grupo I (com hipertensão arterial sistêmica), todos apresentaram microalbuminúria ou macroalbuminúria, em relação aos valores de albumina normalizada e RAC. Este achado foi também mencionado por Mardell e Sparkes (2006) em humanos, destacando que a detecção precoce do aumento da intensidade da albuminúria reflete presença de dano glomerular, ainda não observado pela determinação da RPC, sendo, portanto, considerado um marcador de prognóstico negativo e que contribui ao dano renal e, em alguns casos, para a evolução da insuficiência renal.

Por outro lado, os cães pertencentes ao grupo II (normotensos) e com $RPC < 1,0$, vários cães apresentaram valores negativos de albumina normalizada e apenas o cão de número 14 apresentou o valor negativo para albuminúria quando avaliado pela RAC, mesmo sendo observada uma correlação positiva entre albumina normalizada e RAC. Rego (2006) refere que em cães com densidade urinária acima de 1,040, a RAC demonstra resultados mais fidedignos, fato este não observado na avaliação individual desses cães do presente estudo.

7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições apresentadas no presente estudo pode-se concluir:

1. Não houve influência da hipertensão arterial sistêmica nos cães com hiperadrenocorticismo em relação à quantificação da albuminúria avaliada pela albumina normalizada e pela razão albumina:creatinina urinária, determinada pelo método ELISA.
2. Não houve influência da hipertensão arterial sistêmica nos cães com hiperadrenocorticismo em relação à qualidade e quantidade das bandas de proteínas de baixo (< 60 kDa) e de alto peso molecular (> 60 kDa).
3. Sugere-se que cães com hiperadrenocorticismo possam desenvolver, durante a evolução da doença, lesões glomerulares e tubulares, caracterizadas pela presença de albuminúria e de proteínas de alto e de baixo pesos moleculares, independentemente da presença de hipertensão arterial sistêmica e que a hipercortisolemia crônica possa ser o principal fator de indução da lesão renal.
4. Os métodos laboratoriais, a eletroforese de proteína urinária em gel de poliacrilamida associada à avaliação quantitativa da proteína total, como a determinação quantitativa da albuminúria, são passíveis de serem empregadas para a avaliação dos segmentos dos néfrons comprometidos que causaram as perdas de proteínas na urina.

REFERÊNCIAS

BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Protein concentration in urine of normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 40, n. 11, p. 1583-1587, 1979.

BOUTILIER, P.; CARR, A.; WALDNER, C. Blood pressure, proteinuria, and microalbuminuria in dogs with hyperadrenocorticism and response to therapy with an angiotensin converting enzyme inhibitor. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 400, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BROWN, S. A. Primary Diseases of Glomerular. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Willians and Wilkins, 1995. p. 368-385.

BROWN, S. A.; FINCO, D. R.; BROWN, C. A.; CROWELL, W. A.; ALVA, R.; ERICSSON, G. E.; COOPER, T. Evaluation of the effects of inhibition of angiotensin converting enzyme with enalapril in dogs with induced chronic renal insufficiency. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 3, p. 321-327, 2003.

BROWN, S. A.; WALTON, C. L.; CRAWFORD, P.; BAKRIS, G. L. Long-term effects of antihypertensive regimens on renal hemodynamics and proteinuria. **Kidney International**, v. 43, n.3, p. 1210-1218, 1993.

CAVALCANTE, C. Z.; KOGIKA, M. M.; SIMÕES, D. M. N.; KANASHIRO, M. O.; PROSSER, C. S.; MIYASHIRO, S. I.; DUARTE, R. Microalbuminuria in dogs with hyperadrenocorticism and relationship to blood pressure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 647, 2007.

COOK, A. K.; COWGILL, L. D. Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 32, p. 313-322, 1996.

DIBARTOLA, S. P.; CHEW, D. J.; JACOBS, G. Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 16, p. 537-546, 1980.

ELLIOT, J. Hypertension consensus report an update. In: ANNUAL AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 24., Louisville. **Proceedings...**, 2006.p. 654-655.

FELDMAN, E. C. Hyperadrenocorticism (Cushing's Syndrome). In: FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2004. p. 252-357.

FINCO, D. R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995. p. 211-215.

GARY, A. T.; COHN, L. A.; KERL, M. E.; JENSEN, W. A. The effects of exercise on microalbuminuria in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 3, p. 435, 2003.

GOY-THOLLOT, I.; PÉCHEREAU, D.; KÉROACK, S.; DEZEMPTE, J. C.; BONNET, J. M. Investigation of the role of aldosterone in hypertension associated with spontaneous pituitary-dependent hyperadrenocorticism in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 43, p. 489-492, 2002.

GRAUER, G. F. Glomerular disease and proteinúria. In: ALLEN, D. G. **Small animal medicine**. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1991. p. 615-623.

GRAUER, G. F.; GRECO, D. S.; GETZY, D. M.; COWGILL, L. D.; VADEN, S. L.; CHEW, D. J.; POLZIN, D. J.; BARSANTI, J. A. Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 526-533, 2000.

GRAUER, G. F.; MOORE, L. E.; SMITH, A. R.; JENSEN, W. A. Comparison of conventional urine protein test strip method and a quantitative Elisa for the detection of canine and feline albuminuria. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 425, 2004.

GUPTILL, L.; SCOTT-MONCRIEFF, J. C.; WIDMER, W. Diagnosis of canine hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 215-235, 1997.

HARVEY, D. G.; HOE, C. M. The use of paper electrophoresis for the routine identification of urinary proteins in the dog. **Journal of Small Animal Practice**. v. 7, p. 431-440, 1966.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies**: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. 726 p.

HEBERT, L. A.; KUSEK, J. W.; GREENE, T.; AGODOA, L. Y.; JONES, C. A.; LEVEY, A. S.; BREYER, J. A.; FAUBERT, P.; ROLIN, H. A.; WANG, S.H. Effects of blood pressure control on progressive renal disease in blacks and whites. **Hypertension**, v. 30, p. 428-435, 1997.

HEERSPINK, H. L. J.; BRINKMAN, J. W.; BAKKER, S. J. L.; GANSEVOORT, R. T.; ZEEUW, D. Update on microalbuminuria as a biomaker in renal and cardiovascular disease. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, p. 631-636, 2006.

HOHNADDEL, D. C. Urine protein total. In: KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical Chemistry- Theory analysis and correlation**. 2. ed. Ohio: Mosby, 1989. p. 1060-1065.

HURLEY, K. J.; VADEN, S. L. Evaluation of urine protein content in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 212, n. 3, p.369-373, 1998.

ISOMA, B.; ALMGREN, P.; TIINAMAIJA, T.; BJÖRN, F.; LAHTI, K.; NISSÉN, M.; MARJA-RIITA, T.; LEIF, G. Cardiovascular Morbidity and Mortality Associated with the Metabolic Syndrome. **Diabetes Care**, v. 24, p. 683-689, 2001.

JACOB, F.; POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; NEATON, J. D.; LEKCHAROENSUK, C.; ALLEN, T. A.; KIRK, C. A.; SWANSON, L. L. Association between initial systolic blood pressure and risk of developing a uremic crisis or of dying in dogs with chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 3, p. 322-329, 2003.

KOGIKA, M. M.; CAVALCANTE, C. Z.; SIMÕES, D. M. N.; KANASHIRO, M. O.; PROSSER, C. S.; MIYASHIRO, S. I.; KANAYAMA, K. K.; DUARTE, R. Microalbuminuria in dogs with diabetes mellitus. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 647, 2007.

KOH, J. M.; KIM, J. Y.; CHUNG, Y. E.; PARK, J. Y.; SHONG, Y. K.; HONG, S. K.; KIM, G. S.; LEE, K. U. Increased urinary albumin excretion in Cushing's syndrome: remission after correction of hipercortisolemia. **Clinical Endocrinology**, v. 52, p. 349-353, 2000.

LAEMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 15, p. 680-685, 1970.

LAU, Y. K.; WOO, K. T. SDS-PAGE is underutilised as a tool for investigation renal patients. **Nephron**, v. 90, p. 227-229, 2002.

LAZARETTI, P.; BAHR, A.; STEINER, J. M.; KASHTAN, C. E.; LESS, G. E. Qualitative changes in proteinuria correlate with changes in kidney structure and function as x-linked hereditary nephropathy (XLHN) progresses in affected male dogs. In: ANNUAL AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 24., 2006, Louisville. **Proceedings...**p. 764.

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.; ELLIOT, J.; GRAUER, G. E.; VADEN, S. L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 377-385, 2005.

LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A.; POLZIN, D. J. Diagnosis and long-term management of protein-losing glomerulonephropathy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 6, p. 1401-1416, 1996.

LUSTGARTEN, J. A.; WENK, R. E. Simple rapid kinetic method for serum creatinina measurement. **Clinical Chemistry**, v. 8, p. 1419-1422, 1972.

MARDELL, E. J.; SPARKES, A. H. Evaluation of a comercial in-house test kit for the semi-quantitative assessment of microalbuminúria in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 8, p. 269-278, 2006.

MCKINNEY, M. M.; PARKINSON, A. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluid. **Journal of Immunological Methods**, v. 96, p. 271-278, 1987.

MULLER, P. R.; TRAUTWEIN, G. Harnalyse mittels SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese beim **Hund**. **Zentralblatt fur Veterinarmedizin**, v. 24, p. 731-755, 1977.

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

ORTEGA, T. M.; FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; WILLITS, N.; COWGILL, L. D. Systemic arterial blood pressure and urine protein/ creatinina ratio in dogs with

hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 209, n. 10, p. 1724-1729, 1996.

OSBORNE, C.A.; STEVENS, J.B.; LULICH, J.P.; ULRICH, L.K.; BIRD, K.A.; KOEHLER, L.A.; SWANSON, L.L. A clinician's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995. p. 136-205.

PETERSON, J. C.; ADLER, S.; BURKART, J. M.; GREENE, T.; HEBERT, L. A.; HUNSICKER, L. G.; KING, A. J.; KLAHR, S.; MASSRY, S. G.; SEIFER, J. L. Blood pressure control, proteinuria, and the progression of renal disease. The Modification of Diet in Renal Disease study. **Annals of Internal Medicine**, v. 123, p. 754-762, 1995.

PETERSON, M. E. Diagnosis of hyperadrenocorticism in dogs. **Clinical Techniques Small Animal Practice**, v. 22, p. 02-11, 2007.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; JENSEN, W. A.; SIMPSON, D. Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative tests strips designed for use with human urine. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 2, p. 55-60, 2002.

REGO, A. B.; KOGIKA, M. M.; SANTORO, M. L.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. Eletroforese das proteínas urinárias de cães normais e de cães com doença renal em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE). **Veterinária Notícias**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2001.

REGO, A. B. A. S. **Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sanguínea sistêmica**. 2006. 108 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

REINE, N. J. Medical management of pituitary-dependent hyperadrenocorticism: mitotane versus trilostane. **Clinical Techniques Small Animal Practice**, v. 22, p. 18-25, 2007.

RHETT, N. Complications and concurrent disease associated with canine hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 2, p. 309-320, 1997.

ROSS, L. A. Pathophysiology and management of systemic hypertension associated with renal dysfunction. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1995. p. 392-399.

SCHULTZE, A. E.; JENSEN, R. K. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Canine Urinary Proteins for the Analysis and Differentiation of Tubular and Glomerular Diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, n. 4, p. 93-97, 1989.

STRUBLE, A. L.; FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; KASS, P. H. Systemic hypertension and proteinuria in dogs with diabetes mellitus. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 6, p. 822-825, 1998.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurent of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 150, p. 76-85, 1985.

TOLEDO, E. G. H. **Perfil eletroforético de proteínas séricas e urinárias de cães normais e de portadores de insuficiência renal crônica**. 2001.102 f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2001.

WALLER, K. V.; WARD, K. M.; MAHAN, J. D.; WISMATT, D. K. Currents concepts in proteinuria. **Clinical Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 755-765, 1989.

WATERS, C. B.; ADAMS, L. G.; SCOTT-MONCRIEFF, C. J.; DENICOLA, D. B.; SNYDER, P. W.; WHITE, M. R.; GASPARINI, M. Effects of glucocorticoid therapy on urine protein-to-creatinine ratios and renal morphology in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 11, p. 172-177, 1997.

WHITE, V.; OLIVIER, N. B.; REIMANN, K.; JOHSON, C. Use of protein to creatinina in a single urine specimen for quantification of canine proteinuria. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 185, n. 8, p. 882-885, 1984.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; GONZÁLEZ, M.; MAÑÉ, M. C. SDS-PAGE and western blotting of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Reserch**, v. 34, p. 137-151, 2003b.

ZARAGOZA, C.; BARRERA, R.; CENTENO, F.; TAPIA, J. A.; MAÑÉ, M. C. Canine pyometra: a study of the proteins by SDS-PAGE and western blot. **Theriogenology**, v. 61, p. 1259-1272, 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, p. 169-178, 2003a.

APÊNDICE A - Dados referentes à idade, sexo, definição racial, método de colheita de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I)
- São Paulo - 2007

N.	Idade (meses)	Definição racial	Sexo	Método de colheita de urina
1	96	SRD	F	Cateterização uretral
2	120	Dachshund	F	Cistocentese
3	132	Dachshund	M	Cateterização uretral
4	120	Poodle	F	Cistocentese
5	144	SRD	F	Cateterização uretral
6	96	SRD	F	Cistocentese
7	108	Cocker	F	Cistocentese
8	132	Dachshund	M	Cateterização uretral
9	108	Boxer	M	Cateterização uretral
10	144	SRD	F	Cateterização uretral
11	60	Dachshund	F	Cistocentese
12	96	SRD	F	Cistocentese
13	108	Poodle	F	Cistocentese

Nota: N. = número; SRD = sem raça definida

APÊNDICE B - Dados referentes à idade, sexo, definição racial, método de colheita de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo - 2007

N.	Idade (meses)	Definição racial	Sexo	Método de colheita de urina
1	72	Dachshund	F	Cistocentese
2	84	SRD	F	Cistocentese
3	84	Poodle	F	Cateterização uretral
4	60	Poodle	F	Cistocentese
5	108	Poodle	F	Cateterização uretral
6	96	SRD	F	Cateterização uretral
7	108	Rottweiler	F	Cateterização uretral
8	156	SRD	F	Cateterização uretral
9	60	Dachshund	M	Cateterização uretral
10	120	Terrier Brasileiro	M	Cateterização uretral
11	120	Dachshund	F	Cistocentese
12	144	SRD	F	Cistocentese
13	156	Poodle	F	Cateterização uretral
14	144	SRD	F	Cateterização uretral
15	108	Dachshund	M	Cateterização uretral
16	132	Dachshund	F	Cistocentese
17	96	Poodle	F	Cistocentese

Nota: N. = número; SRD = sem raça definida

APÊNDICE C - Valores individuais de bioquímica sérica dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) - São Paulo – 2007

N.	ALT (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dL)	TRG. (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Cortisol I (µg /dL)	Cortisol II (µg /dL)
1	35	3442	243	307	49	1,2	6,5	3,91
2	97	1135	437	284	58	1,2	5,38	3,37
3	118	542	375	177,4	58	1,4	6,39	3,77
4	77,93	839	271,71	185	10,65	0,85	17,42	8,91
5	887	1870	401	238	124	1,4	9,56	11,63
6	61,8	3483	159	83,6	14	1,4	5,63	6,91
7	28,48	161,34	341,19	407,6	16,3	0,87	2,5	5,26
8	116,2	352	393	202	70	1,1	5,46	2,79
9	121,7	207,8	588,9	322	61,4	1,5	3,66	3,18
10	58,72	242	404,7	178	85,8	1,7	11,87	5,49
11	29,7	426	365	249	84	1,5	6,73	3,29
12	141	646	278	78	20	1	3,24	4,27
13	121	123,8	464	388,9	30,8	1	3,62	1,57

Nota: N. = número; ALT = alanina amino transferase; FA = fosfatase alcalina; TRG = triglicerídeos; Cortisol I = cortisol basal; Cortisol II.= cortisol após supressão com baixa dose de dexametasona.

APÊNDICE D - Valores individuais de bioquímica sérica dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo - 2007

N.	ALT (U/L)	FA (U/L)	Colesterol (mg/dL)	TRG. (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Cortisol I (µg /dL)	Cortisol II (µg /dL)
1	48,37	3737	563	233	46	1,1	3,99	4,27
2	642	3454	404	274	43	1,2	4,56	4,89
3	62,9	617	671,4	620,8	17,4	1	12,28	8,77
4	907,6	1127,6	433	155	46	1	5,76	4,72
5	110,7	315,7	238	329	34,8	1	2,44	1,96
6	100,8	1388	729	168	30,6	1	10,97	2,77
7	58,9	1089	150	190	38	1,7	3,43	1,52
8	75,92	225,5	352	169,8	25,2	1	5,42	2,81
9	59	8582	272	213,9	151	2	5,8	5,54
10	36,8	306,8	316	157	18	0,92	7,79	8,18
11	100,8	292,8	241	221	22	1,1	4,56	2,04
12	293	1614	224	198	37	0,8	12,85	14,67
13	109,6	2327,8	320	177	40,65	1,15	10,34	10,3
14	43,9	307	666,9	258,7	52,9	1,5	3,12	1,84
15	98,7	914	534,9	574,6	37,5	1,2	5,5	2,04
16	87	308	503,9	249	32,7	1	5,24	4,15
17	109	798	405	298,7	19,6	1,3	2,47	2,8

Nota: N. = número; ALT = alanina amino transferase; FA = fosfatase alcalina; TRG = triglicerídeos; Cortisol I = cortisol basal; Cortisol II.= cortisol após supressão com baixa dose de dexametasona.

APÊNDICE E - Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) - São Paulo - 2007

N.	Cor	Odor	Aspecto	Densidade
	Amarelo palha	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,006
2	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,020
3	Amarelo citrino	Aliaceo	Ligeiramente turvo	1,040
4	Amarelo palha	Sui generis	Límpido	1,003
5	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,007
6	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,014
7	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,018
8	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,038
9	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,026
10	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,014
11	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,018
12	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,015
13	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,022

Nota: N. = número

APÊNDICE F - Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo - 2007

N.	Cor	Odor	Aspecto	Densidade
1	Amarelo palha	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,012
2	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,038
3	Amarelo ouro	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,036
4	Amarelo palha	Sui generis	Límpido	1,005
5	Amarelo palha	Sui generis	Límpido	1,006
6	Amarelo citrino	Sui generis	Límpido	1,008
7	Amarelo citrino	Sui generis	Límpido	1,018
8	Amarelo palha	Sui generis	Límpido	1,014
9	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,032
10	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,018
11	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,024
12	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,025
13	Amarelo citrino	Sui generis	Límpido	1,011
14	Amarelo palha	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,016
15	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,038
16	Amarelo palha	Sui generis	Límpido	1,020
17	Amarelo citrino	Sui generis	Ligeiramente turvo	1,030

Nota: N. = número

APÊNDICE G - Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I)
- São Paulo – 2007

N.	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Sangue oculto	Urobilino- gênio
1	6,5	-	-	-	-	-	-
2	6,0	+	-	-	-	-	-
3	5,5	++	-	-	-	-	-
4	7,0	-	-	-	-	-	-
5	7,0	+	-	-	-	++	-
6	7,0	++	-	-	-	++	-
7	7,0	+	-	-	-	+	-
8	6,0	++	-	-	-	+	-
9	8,0	+	-	-	-	-	-
10	7,5	+	-	-	-	+++	-
11	7,5	+	-	-	-	+++	-
12	6,5	+	-	-	-	+	-
13	8,0	++	-	-	-	++	-

Nota: N. = número; Proteína: Traços = < 30 mg/dl; + = 30 ,g/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 500 mg/dl; Glicose = + = 50 mg/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 300 mg/dl; ++++ = 1000 mg/dl; Limites práticos de sensibilidade da bilirrubina = 0,5 a 5 mg/dl.

APÊNDICE H - Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticism e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo – 2007

N.	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Sangue oculto	Urobilino-gênio
1	5,0	+	-	-	-	++	-
2	6,0	+	-	-	-	++	-
3	8,0	+	-	-	-	++	-
4	7,5	+	-	-	-	+	-
5	8,0	-	-	-	-	-	-
6	8,0	-	-	-	-	-	-
7	6,0	-	-	-	-	-	-
8	6,0	-	-	-	-	-	-
9	5,0	+	-	-	-	-	-
10	8,0	+	-	-	-	-	-
11	6,5	+	-	-	-	+++	-
12	5,5	+	-	-	-	-	-
13	7,0	-	-	-	-	-	-
14	5,0	+	-	-	-	-	-
15	6,5	+	-	-	-	+	-
16	7,0	+	-	-	-	+	-
17	8,0	++	-	-	-	+	-

Nota: N. = número; Proteína: Traços = < 30 mg/dl; + = 30 ,g/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 500 mg/dl; Glicose = + = 50 mg/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 300 mg/dl; ++++ = 1000 mg/dl; Limites práticos de sensibilidade da bilirrubina = 0,5 a 5 mg/dl.

APÊNDICE I - Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e hipertensão arterial sistêmica (grupo I) - São Paulo - 2007

N.	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bact.	Outros
1	0-2	0-2	-	-	-	Raras	-
2	0-2	0-2	G +	-	D +	+	-
3	2-4	3-4	-	-	D (+)	(+)	S
4	0-2	0-2	-	-	D (+)	(+)	-
5	8-10	0-2	-	-	-	+	-
6	8-10	0-2	-	-	-	+	-
7	4-6	0-2	-	-	D +	+	-
8	2-4	0-2	H + G+	-	-	+	-
9	0-2	4-6	-	-	-	(+)	-
10	20-25	0-2	-	-	D (+)	(+)	-
11	20-25	0-2	-	-	D +	(+)	-
12	2-4	0-2	-	-	-	Raras	-
13	13-17	0-2	H +	-	D (+)	(+)	-

Nota: N. = número; G = cilindro granuloso; H = cilindro hialino; D = células de descamação de vias urinárias; S = espermatozóides; Bact. = bactérias

APÊNDICE J - Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães com hiperadrenocorticismo e pressão arterial sistêmica normal (grupo II) - São Paulo – 2007

N.	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bact.	Outros
1	13-17	0-2	-	-	D +	+	-
2	18-20	0-2	-	-	-	+	-
3	6- 8	4-6	-	-	D +	+	-
4	2-4	0-2	-	-	D (+)	(+)	-
5	0-2	0-2	-	-	-	-	-
6	0-2	0-2	-	-	-	-	-
7	0-2	0-2	-	-	D (+)	(+)	-
8	0-2	0-2	-	-	-	-	GG +
9	0-2	0-2	-	B +	D + P +	+	-
10	0-2	4-6	-	-	D (+)	(+)	-
11	13-17	0-2	-	-	-	+	-
12	0-2	2-4	G +	-	D +	(+)	GG ++
13	0-2	0-2	-	-	D (+)	(+)	-
14	0-2	2-4	H + G +	-	-	Raras	-
15	2-4	0-2	-	-	D (+)	Raras	-
16	2-4	0-2	H +	-	D (+)	(+)	GG +
17	2-4	4-6	H +	FT (+)	D (+)	(+)	-

Nota: N. = número; G = cilindro granuloso; H = cilindro hialino; FT = fosfato triplo; B: bilirrubina; D = células de descamação de vias urinárias; P = pelve renal; GG = gotículas de gordura; Bact. = bactérias

APÊNDICE K - Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo - 2007

N.	Idade (meses)	Definição racial	Sexo	Método de colheita de urina
1	24	Border Collie	Fêmea	Cistocentese
2	78	SRD	Fêmea	Cistocentese
3	24	São Bernardo	Fêmea	Cistocentese
4	24	SRD	Fêmea	Cistocentese
5	48	São Bernardo	Fêmea	Cistocentese
6	84	SRD	Fêmea	Cistocentese
7	24	SRD	Fêmea	Cistocentese
8	24	SRD	Fêmea	Cistocentese
9	54	SRD	Fêmea	Cistocentese
10	12	Dog Alemão	Fêmea	Cateterização uretral
11	12	SRD	Fêmea	Cistocentese
12	18	SRD	Fêmea	Cistocentese
13	24	SRD	Fêmea	Cistocentese
14	42	SRD	Fêmea	Cistocentese
15	30	SRD	Fêmea	Cistocentese
16	24	SRD	Macho	Cateterização uretral
17	24	Border Collie	Macho	Cateterização uretral
18	60	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral
19	24	Pit Bull	Macho	Cateterização uretral
20	60	Cocker	Macho	Cateterização uretral
21	36	Chow-Chow	Macho	Cateterização uretral
22	60	SRD	Macho	Cistocentese
23	60	SRD	Macho	Cistocentese
24	12	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral
25	36	Dachshund	Macho	Cistocentese
26	24	Labrador	Macho	Cateterização uretral
27	24	São Bernardo	Macho	Cateterização uretral
28	60	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral
29	78	Setter Irlandês	Macho	Cateterização uretral
30	30	Dog Alemão	Macho	Cateterização uretral

Nota: N. = número; SRD = sem raça definida

APÊNDICE L - Valores séricos individuais de uréia e creatinina dos cães do grupo controle -
São Paulo - 2007

Número	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	47,2	1,11
2	65,2	1,3
3	36,1	1,27
4	37,1	1,15
5	41,4	1,36
6	26,1	1,33
7	37,1	0,90
8	31,0	0,90
9	34,2	1,35
10	30,9	1,35
11	36,0	1,20
12	49,0	0,90
13	20,2	1,10
14	45,8	1,10
15	49,7	1,36
16	46,9	1,37
17	42,0	1,15
18	48,1	1,36
19	41,9	1,38
20	33,0	1,08
21	32,0	1,40
22	43,07	1,33
23	40,1	1,20
24	46,2	1,38
25	25,4	1,00
26	41,0	0,80
27	41,5	1,22
28	38,0	1,08
29	39,5	1,34
30	40,7	1,33

APÊNDICE M - Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo – 2007

Número	Cor	Odor	Aspecto	Densidade
1	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,034
2	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,019
3	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,031
4	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
5	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,034
6	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,034
7	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,024
8	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,032
9	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,035
10	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,030
11	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
12	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,022
13	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,018
14	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,040
15	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,028
16	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,038
17	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,045
18	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,032
19	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
20	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,045
21	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,020
22	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
23	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
24	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,035
25	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,040
26	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,045
27	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,027
28	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,020
29	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,021
30	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,048

APÊNDICE N - Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo – 2007

N.	pH	Proteína	Glicose	Corpos Cetônicos	Bilirrubina	Sangue oculto	Urobilino-gênio
1	7,0	-	-	-	-	-	-
2	5,5	-	-	-	-	-	-
3	6,0	-	-	-	-	-	-
4	6,0	-	-	-	-	-	-
5	7,5	-	-	-	-	-	-
6	5,5	-	-	-	-	-	-
7	6,5	-	-	-	-	-	-
8	8,0	-	-	-	-	-	-
9	5,0	-	-	-	-	-	-
10	7,0	+	-	-	-	-	-
11	6,0	Traços	-	-	-	-	-
12	8,0	-	-	-	-	-	-
13	8,0	-	-	-	-	-	-
14	5,0	-	-	-	-	-	-
15	5,0	Traços	-	-	-	+	-
16	8,0	Traços	-	-	-	-	-
17	7,0	-	-	-	-	-	-
18	9,0	-	-	-	-	-	-
19	6,0	+	-	-	+	+	-
20	6,5	Traços	-	-	-	-	-
21	6,0	-	-	-	-	-	-
22	7,5	-	-	-	-	-	-
23	8,0	+	-	-	-	-	-
24	9,0	-	-	-	-	-	-
25	6,0	Traços	-	-	+	-	-
26	6,0	Traços	-	-	-	-	-
27	6,0	-	-	-	-	-	-
28	8,0	+	-	-	-	-	-
29	7,5	-	-	-	-	-	-
30	6,5	-	-	-	-	-	-

Nota: N. = número; Proteína: Traços = < 30 mg/dl; + = 30 ,g/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 500 mg/dl; Glicose = + = 50 mg/dl; ++ = 100 mg/dl; +++ = 300 mg/dl; ++++ = 1000 mg/dl; Limites práticos de sensibilidade da bilirrubina = 0,5 a 5 mg/dl.

APÊNDICE O - Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães do grupo controle - São Paulo - 2007

N.	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bact.	Outros
1	Raras	-	-	-	D +	-	-
2	-	-	-	OC +	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	GG +
4	0-1	0-1	-	OC (+)	D (+)	-	-
5	-	-	-	-	-	Raras	-
6	-	-	-	-	D: raras	Raras	GG +
7	Raras	Raros	-	-	-	-	-
8	0-1	0-1	-	OC (+)	D (+)	-	-
9	Raras	Raros	-	-	-	-	GG ++
10	4-8	4-8	G (+)	FT ++ B +	D +	(+)	-
11	Raras	Raros	-	-	D (+)	-	-
12	1-3	Raros	-	-	D +	-	-
13	5-10	Raros	-	-	D (+)	-	-
14	5-10	Raros	-	-	D +	-	-
15	Raras	Raros	-	-	D (+)	-	GG +
16	Raras	Raros	-	FT ++	D +	-	-
17	Raras	Raros	G: raros	-	D: raras	Raras	S +
18	4-6	0-2	-	-	D +	-	-
19	0-1	0-1	G (+)	FT (+)	D +	(+)	-
20	Raras	Raros	G (+)	-	D (+)	(+)	S +
21	0-2	0-4	-	-	D (+)	-	-
22	0-2	0-2	-	-	D +	-	-
23	0-1	0-1	-	-	D (+)	-	S +
24	Raras	Raros	-	FT +	D +	-	-
25	0-1	0-1	-	-	T(+)	-	S +
26	Raras	Raros	-	-	D (+)	(+)	S +
27	Raras	-	-	-	-	Raras	-
28	Raras	Raros	-	-	D (+)	-	-
29	2-4	Raros	-	-	D (+)	-	S + GG +
30	-	-	-	-	-	-	-

Nota: N. = número; G = cilindro granuloso; OC = oxalato de cálcio; FT = fosfato triplo; D = células de descamação de vias urinárias; S = espermatozoides, GG = gotículas de gordura; Bact. = bactérias