

ANGÉLICA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular  
Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de  
lesão renal precoce?**

*São Paulo*

2009

ANGÉLICA OLIVEIRA DE ALMEIDA

**Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de lesão renal precoce?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**  
Cirurgia

**Área de Concentração:**  
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

**Orientador:**  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo  
2009

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2213  
FMVZ

Almeida, Angélica Oliveira de  
Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indicio de lesão renal precoce? / Angélica Oliveira de Almeida. --2009.  
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Golden Retriever. 2. Lesão renal. 3. Proteinúria. 4. Eletroforese. 5. Duchenne I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Eletroforese da proteína urinária em cães Golden Retriever afetados pela distrofia muscular: indício de lesão renal precoce?", protocolado sob o nº 1575/2008, utilizando 12 (doze) cães, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, 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" da referida Comissão.

We certify that the Research "Urinary protein electrophoresis in Golden Retriever muscular dystrophy: An early kidney damage?", protocol number 1575/2008, utilizing 12 (twelve) dogs, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum" of the meeting.

São Paulo, 05 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ALMEIDA, Angélica Oliveira de

Título: Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de lesão renal precoce?

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe Maria Aparecida, meu pai Walter e meu irmão Arthur, por estarem do meu lado e acreditarem que esse dia chegaria.

Aos meus cães Taffarel, Meg e Apolo, que me mostram a cada dia o que é o amor verdadeiro e sem interesse.

E também à todos os cães do canil GRMD, mas principalmente ao Winner, Bis, Choquito, Peter, Gaspar e Totó que me ensinaram a ser feliz apesar de todas dificuldades. Que vocês continuem com as carinhas felizes sempre que alguém chega!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro à Deus que me colocou nesse caminho e me deu saúde e força para chegar até aqui.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, por me receber e prontamente me aceitar como orientada, aceitar minhas idéias e me dar liberdade de fazer uma pesquisa da qual hoje me orgulho.

Ao Prof. Dr. Francisco Duque de Mesquita Neto que me ensinou a ser uma veterinária incomum, e me mostrou o que é fazer pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari da UNESP/Jaboticabal por ceder tão gentilmente o laboratório para a realização dessa pesquisa.

Ao Paulo que também abriu as portas do laboratório, mas que acima de tudo teve muita paciência para me ensinar absolutamente tudo sobre eletroforese.

Ao meu namorado Mike que sempre esteve comigo nessa batalha e soube entender tantos momentos de ausência.

À Marina que sempre esteve do meu lado desde o primeiro dia da pós-graduação, e tornou-se uma amiga mais que especial, uma pessoa para toda vida.

Ao meu grande amigo Leandro que está do meu lado desde o começo da graduação sempre dando conselhos e ajudando.

À Ju Passos pelas conversas, baladinhas e passeios com os cachorros, que fazem bem à alma.

Aos amigos de mestrado Matheus, Sarmento, Marininha, Karlinha, Thaís, Dilayla, Cris, Renata, Ana, Carol e toda a equipe do canil.

Ao Augusto por cuidar dos cães e de todos que estão por perto.

Ao Diogo que está sempre ajudando todos em casa, e resolvendo os problemas de todo mundo.

À Inês que cuida de mim e do meu irmão há tantos anos e que já faz parte da família.

À todos que não tiveram seus nomes citados, mas que estiveram do meu lado nesses anos de mestrado.

## RESUMO

ALMEIDA, A. O. **Estudo da Proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de lesão renal precoce?** [Electrophoresis of urinary protein evaluation in GRMD dogs, an early renal lesion?]. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença genética recessiva e hereditária, ligada ao cromossomo X, caracterizada pela ausência ou insuficiência da proteína distrofina no sarcolema das fibras musculares. É uma doença muscular progressiva, que afeta um em cada 3.500 meninos.

Atualmente, os cães da raça Golden Retriever, portadores da distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD), que exibem mudanças musculares, patogenia, bem como o fenótipo, comparáveis aos vistos nos casos de DMD, vêm sendo considerados o melhor modelo animal para o estudo da DMD. Nos GRMDs a fraqueza muscular inicia-se a partir do segundo mês de vida e é progressiva, portanto, a expectativa de vida destes cães é muito reduzida. Histologicamente, os músculos mostram necrose, fibrose e regeneração. As manifestações patológicas da GRMD já se iniciam na vida intra-uterina com o desenvolvimento de lesões nos músculos da língua. A hipertrofia da língua está associada com disfunção da faringe e do esôfago, o que resulta em disfagia, regurgitação e sialorréia.

O objetivo desse estudo foi avaliar no modelo animal, utilizando cães golden retrievers normais e afetados pela distrofia muscular de duchenne, a proteína na urina e o peso molecular das proteínas urinárias, além de acompanhar a bioquímica sérica.

Durante quatro meses seis cães machos com distrofia muscular e idade entre dois e seis anos tiveram amostras de urina coletadas a cada duas semanas e amostras de sangue coletadas uma vez por mês, e três cães normais foram avaliados para estabelecer uma comparação. Nas amostras sanguíneas foram realizados exames para avaliar a função renal e a urina foi usada para a mensuração de proteína, creatinina e a realização da eletroforese.

Não foi encontrado indício de lesão renal nos exames realizados nas amostras de sangue e também na relação proteína:creatinina nas amostras de urina.



Na análise das eletroforeses, foi encontrado diferenças na quantidade de bandas protéicas apresentadas entre os animais normais e os cães com distrofia muscular. Os cães com distrofia apresentam uma maior distribuição de bandas de alto peso molecular que não são encontradas nos cães normais, além de terem ainda uma maior quantidade de proteínas de baixo peso molecular.

Apesar de se manterem dentro dos parâmetros estabelecidos para lesão renal, os cães com distrofia, tem bandas protéicas que não são vistas em animais normais e que mantém a integridade do parênquima renal.

**Palavras-chave:** GRMD, lesão renal, eletroforese proteínas urinárias

## ABSTRACT

ALMEIDA, A. O. **Electrophoresis of urinary protein evaluation in GRMD dogs, an early renal lesion?** [Estudo da proteína urinária em cães Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), através da eletroforese em gel de poliacrilamida, indício de lesão renal precoce?]. 2009. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Duchenne's Muscular Dystrophy (DMD) is a lethal childhood disease, a X-linked recessive disorder, caused by mutations of the dystrophin gene, a protein that has a vital role in maintaining muscle structure and function. DMD is a progressive muscular disease, which affects 1:3500 born boys. At this moment, the dogs with Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), are the best animal model to study DMD. GRMD dog exhibits muscle changes, pathogenesis and phenotype comparable with the DMD boys. In GRMDs, the muscular weakness beginning with 60 days of life and this is progressive. Histologically, the muscles show necrosis, fibrosis, degeneration and regeneration. The pathogenesis manifests in utero with the development of lingual muscle lesions. The tongue hypertrophy is associated with pharyngeal and esophageal dysfunction, and results in dysphagia, regurgitation and drooling.

The aim of this research was investigate in normal dogs and in dogs affected by the Duchene muscular dystrophy the protein in the total urinary proteins and their separation with SDS-PAGE.

During four months, six male dogs between two and six years were evaluated. The blood was examined once a month and the urine twice a month, three normal dogs were examined to establish a comparison between both. In blood samples were carried out tests to evaluate renal function and urine was used for the measurement of protein, creatinine and for electrophoresis.

We found no evidence of kidney damage in tests performed on blood samples and also in the protein: creatinine ratio in urine samples.

In the analysis of electrophoresis, we found differences in the amount of protein bands presented between normal dogs and dogs with muscular dystrophy. GRMD dogs have a wider distribution of bands with high molecular weight, which are not found in normal dogs. In addition they have a greater amount of protein with low molecular weight.

While staying within the parameters established for renal injury, the dogs with dystrophy, has protein bands not seen in normal animals that maintains the integrity of the renal parenchyma.

**Keywords:** GRMD, renal injury, urinary protein electrophoresis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	13
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	16
2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)	16
2.2 GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY (GRMD)	17
2.3 FUNÇÃO RENAL	19
2.4 PROTEINÚRIA	21
2.4.1 Análise quantitativa da proteína urinária	24
2.4.2 Análise qualitativa da proteína urinária	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
3.1 ANIMAIS	30
3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA	31
3.3 EXAME DE URINA	32
3.3.1 Concentração da proteína urinária	33
3.3.2 Concentração urinária de creatinina	33
3.4 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIAS	34
3.5 BIOQUÍMICA SÉRICA	35
3.6 ANÁLISE DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS	35
<b>4 ESTATÍSTICA</b>	36
<b>5 RESULTADOS</b>	36
5.1 BIOQUÍMICA SÉRICA	36
5.2 RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA	37
5.3 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS URINÁRIAS	40
<b>6 DISCUSSÃO</b>	49
6.1 URÉIA E CREATININA SÉRICA	49
6.2 RAZÃO PROTEÍNA CREATININA URINÁRIA (RPC)	51
6.3 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS URINÁRIAS	53
<b>7 CONCLUSÕES</b>	57
<b>REFERÊNCIAS</b>	58

## 1 INTRODUÇÃO

A doença neuromuscular mais comum, de evolução mais rápida e grave, a Distrofia Muscular de Duchenne, tem origem genética e se manifesta por um defeito no gene da distrofina, proteína responsável pela integridade da membrana basal da fibra muscular. O resultado deste defeito é a lesão progressiva das células musculares à medida que são solicitadas durante as contrações musculares para gerar movimento

A Distrofia Muscular de Duchenne é um distúrbio genético de caráter recessivo, com uma grande taxa de mutação em um gene do cromossomo X, em simples palavras. Essa doença é observada geralmente em meninos na proporção de 1 para cada 3500 nascidos vivos, sendo a menina é geralmente portadora do defeito genético, com 25% de chance de gerar filhos do sexo masculino com a mesma patologia.

Essa patologia foi descrita em 1868 por Duchenne, e ainda hoje as famílias portadoras e com filhos afetados continuam sem possibilidade de cura. Os primeiros sinais costumam se manifestar aos dois anos de idade, mas são geralmente percebidos perto dos cinco quando a criança começa a ter dificuldade para correr, subir ou descer escadas e apresentar quedas freqüentes. Esta dificuldade ocorre devido à fraqueza muscular que acomete primeiro a cintura pélvica, e posteriormente a cintura escapular. A progressão leva a criança à cadeira de rodas, por volta dos dez anos, e ao óbito, próximo aos vinte anos, devido ao comprometimento da musculatura respiratória (GAIAD, 2006).

A distrofina é o maior componente do complexo distrofina - glicoproteínas (DGC), que liga o citoesqueleto da miofibrila com a matrix extracelular. A ruptura desse complexo causa um aumento da susceptibilidade de lesão induzida pela contração, e lesão do sarcolema, ocasionando necrose da miofibrila, levando à perda progressiva da massa e função muscular (CHARGÉ; RUDNICKI, 2003).

Segundo Dickinson e Lecouter (2002) durante a evolução das distrofias musculares, as fibras que atingem o estágio de degeneração são gradualmente substituídas por tecido conjuntivo fibroso e adiposo.

Sabe-se que as alterações musculares já ocorrem desde o período fetal, e que durante a infância e adolescência, a necrose está presente em um alto grau em certos grupos musculares pélvicos e escapulares.

Pacientes tendem a perder a capacidade de locomoção entre os 12 e 14 anos de idade e se tornam dependentes da cadeira de rodas, fato que agrava o quadro clínico e permite a rápida progressão da doença, e diminuição da qualidade de vida.

Embora o camundongo *mdx* seja o modelo animal largamente utilizado nos estudos da doença e também para os efeitos das terapias gênicas e transplante celular. O desenvolvimento da distrofia nos camundongos é mais lenta e torna difícil a comparação à DMD humana. O quadro clínico do *mdx* é mantido relativamente normal, já que apresenta uma menor degeneração das fibras musculares, maior regeneração e menos fibrose do que encontrado nos pacientes com DMD (PASTORET; SEBILLE, 1995; SHELTON, 2005).

Cães da raça Golden Retriever, apresentam também uma distrofia muscular que é homóloga à DMD humana, o modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD), o qual é a espécie animal que apresenta um desenvolvimento da distrofia mais similar a DMD humana.

O modelo GRMD apresenta as alterações musculares mais próximas daquela encontrada nos humanos, entre elas encontramos a atividade aumentada de CPK, atrofia muscular associadas a contraturas, necrose muscular, degeneração e mineralização concomitante, fibrose do endomísio e perimísio e cardiomiopatias. Assim, como em pacientes portadores da DMD, cães jovens freqüentemente morrem devido à parada cardíaca ou respiratória, ainda que muitos sobrevivam e alcancem alguns anos de vida (NGUYEN et al., 2002).

Considerando-se as intensas alterações musculares e o alto valor de CPK, é normal pensar em uma possível lesão renal decorrente da intensa lesão muscular sofrida por esses animais.

A capacidade de reserva renal e a ocorrência de processos compensatórios resultam na ausência de sinais clínicos, os quais só aparecem quando resta pouquíssimo tecido renal viável (FINCO, 1989). Ainda hoje o diagnóstico de rotina das afecções renais em cães e gatos é feito tardiamente e a extensão da lesão renal já está avançada.

Os dois parâmetros mais freqüentemente usados para avaliar a função renal são as concentrações de uréia e creatinina plasmáticas, (BIEWENGA; VAN DEN

BRON, 1981), porém esses parâmetros mostram-se insatisfatórios uma vez que só se acumulam significativamente no sangue quando já existem 50% ou mais de néfrons não funcionais (GRANERUS, 2000).

O filtro glomerular normal é extremamente delicado e permite a passagem de apenas peptídeos e proteínas de baixo peso molecular (geralmente inferior a 10 mil dáltons) que são prontamente reabsorvidas nas primeiras porções do túbulo contornado proximal. A proteína está presente na urina de cães normais, porém em quantidades aumentadas pode se tornar deletéria. A proteína presente na urina de cães normais é derivada da não reabsorção pelo túbulo proximal (FINCO, 1995).

Diversos métodos quantitativos para detecção de proteínas na urina são utilizados; cada qual com suas vantagens e limitações. No entanto a quantificação das proteínas permite apenas evidenciar a intensidade das proteinúrias, portanto o estudo de outras características requer análises qualitativas.

A eletroforese tem sido empregada 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 (REGO et al., 2001).

Os estudos aqui descritos têm por objetivos (1) estabelecer primeiramente se os animais acometidos pela Distrofia Muscular de Duchenne apresentam proteinúria patológica, ou seja, valores da Relação Proteína:Creatinina superiores a 1,0, e (2) avaliar a perda urinária de proteínas em cães normais e comparar os perfis eletroforéticos de proteínas urinárias de cães normais com os cães Golden Retriever com Distrofia Muscular, aliado à avaliação bioquímica da função renal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As revisões de literatura foram feitas separadas pelos diferentes temas, que são relevantes para essa pesquisa e por esse motivo devem ser bem elucidados. A revisão em itens torna mais fácil o entendimento e aprofundamento no tema.

### 2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE (DMD)

Distrofia Muscular é um termo usado para designar qualquer doença de ordem primária da musculatura esquelética, que resulta em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose de miofibrilas (BERGMAN et al., 2002).

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum, grave e de evolução mais rápida entre as miopatias hereditárias. É uma doença genética, de caráter recessivo ligado ao cromossomo X, associada a um defeito no gene da distrofina, levando à deficiência ou ausência desta proteína na membrana da célula muscular. Isto gera degeneração progressiva da musculatura esquelética (KORNEGAY et al., 1999), podendo acometer a musculatura cardíaca e o sistema nervoso (HARRINSON; BRAUNWALD, 1987).

Mutações no gene da distrofia levam à deficiência da distrofina, que é uma proteína associada ao sarcolema que auxilia na manutenção da integridade da membrana no processo de contração muscular. Segundo Valentine et al. (1989), o músculo sem a distrofina, fica mais susceptível a lesões induzidas pelo exercício, evidenciada pelo rápido influxo de enzimas musculares.

Na fisiopatologia da distrofia de Duchenne, sabe-se que ocorrem deleções, duplicações ou mutações de ponto da banda Xp21 do gene responsável pela síntese da proteína distrofina, localizado no braço curto do cromossomo X (BERRY et al., 1992; BIBLIOMED, 2004).

A distrofina participa do arranjo citoesquelético do miócito, ligando este ao sarcolema da matriz extracelular. Portanto é uma proteína indispensável para o bom funcionamento do músculo esquelético em geral, uma vez que sua ausência



possibilita o influxo de cálcio e outras moléculas provenientes do líquido extracelular para o interior das fibras musculares, culminando com a necrose dessas fibras (BIBLIOMED, 2004)

O complexo processo relacionado à necrose da fibra muscular não tem sido claramente descrito, portanto não existe ainda nenhum marco de melhora no tratamento dos pacientes (TKATCHENKO et al., 2001). Eventualmente, a regeneração pode não prosseguir com a necrose, resultando em progressiva perda muscular (NICHOLS et al., 1994).

Vainzof e Zatz (2003) relataram que estudos moleculares em indivíduos com distrofias musculares, têm apresentado variabilidade clínica inter e intra-familiar em diferentes desordens genéticas, levantando a importância de outros fatores, que não os genéticos, na determinação da expressão fenotípica.

Geralmente o diagnóstico de DMD é quase sempre estabelecido, através da história familiar, achados clínicos, laboratoriais e genéticos (análise de DNA), podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos. Os níveis enzimáticos, principalmente de CPK, biopsia muscular e análise de DNA são amplamente explorados na caracterização da doença (CAROMANO, 1999). Já Erazo-Torricelli (2004) relatam que os níveis de CPK estão aumentados de 100 a 300 vezes na fase pré-clínica.

As crianças afetadas apresentam fraquezas progressivas devido à perda da massa muscular e as contraturas. A lesão da miofibrila sem uma total recuperação tanto nas crianças quanto no modelo canino GRMD, resultam em fibroses, contraturas e fraqueza (CHILDERS et al., 2002).

Embora o defeito na DMD seja conhecido, as funções exatas da distrofina não são totalmente entendidas, e a seqüência de eventos moleculares que lidam para a lesão celular ainda não foi elucidada (MARQUES, 2004).

## 2.2 GOLDEN RETRIEVER MUSCULAR DYSTROPHY (GRMD)

Nos estudos da Distrofia Muscular de Duchenne o animal mais usado é o camundongo mdx (X-linked murine dystrophy), nesses animais ocorre uma mutação homóloga que também é caracterizada pela deficiência de distrofina. Os

camundongos mdx têm necroses recorrentes das fibras musculares como acontece nos humanos, mas neles ocorre uma regeneração muito eficiente e eles não sofrem perda generalizada de fibras musculares e fraqueza. O modelo canino da distrofia muscular de Duchenne denominado cxmd (canine X-linked muscular dystrophy), com similar mutação pode ser superior ao camundongo, uma vez que o tamanho e os sintomas dos cães são muito próximos ao dos humanos (NICHOLS et al., 1994).

A distrofia muscular ligada ao sexo e associada à deficiência de distrofina, tem sido registrada em várias raças de cães, mas é mais bem descrita no Golden Retriever (BERGMAN, 2002). Os cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular são denominados GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), eles são excelentes modelos para o estudo da eficácia da geneterapia em miopatias por deficiência de distrofina, pois há muitas similaridades fenotípicas e genotípicas entre cães afetados e meninos com DMD (SHELTON, 2001; NGUYEN et al., 2002).

Até bem pouco tempo as miopatias espontâneas nos animais, especialmente nos cães, eram consideradas raras (MCKERRELL, 2004). Atualmente já são reconhecidas mais de vinte miopatias caninas, fato este atribuído ao avanço nos métodos de investigação (MCKERRELL, 2004). A hereditariedade está presente em muitas dessas miopatias. Várias delas apresentam manifestações clínicas como: disfagia, regurgitação, megaesôfago (podendo levar à pneumonia aspirativa), anormalidades da marcha e redução na tolerância a exercícios (MCKERRELL, 2004)

A Distrofia Muscular nos cães da raça Golden Retriever (GRMD) é uma miopatia degenerativa causada pela ausência da distrofina. As lesões musculares nos cães são caracterizadas por necrose maciça, que afeta principalmente músculos da cabeça, pescoço, e membros. As lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda na vida intra-uterina (VALENTINE et al., 1990). Os músculos respiratórios não suportam a necrose terminal difusa, o que resulta em insuficiência respiratória aguda e morte. Embora muitos filhotes possam morrer durante o período neonatal, dentre os sobreviventes, ao redor dos dois meses de idade, podem ser constatados sinais de regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular através de imunohistoquímica (NGUYEN et al., 2002).

A GRMD é geneticamente homóloga à distrofia muscular de Duchenne (DMD) que acomete seres humanos. Sinais clínicos resultantes da ausência da distrofina ocorrem em diversas espécies (HOFFMAN; GOROSPE, 1991), porém em cães, ao contrário do que ocorre em gatos e ratos afetados, observa-se maior semelhança de

evolução da doença com a DMD (CHILDERS et al., 2002; COLLINS, MORGAN, 2003; KORNEGAY, 2003; BOGDONOVICHI et al., 2004). Portanto, os cães GRMD têm sido considerados modelos experimentais para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para meninos afetados pela doença (KHURANA; DAVIES, 2003).

Os cães afetados são diagnosticados ao primeiro dia de vida, através da análise de creatina quinase, que se encontra dramaticamente elevada na maioria dos casos, e juntamente por teste genético utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) (VALENTINE et al., 1990; CHILDERS et al., 2001, 2002).

A patogênese do GRMD se manifesta intra-útero e pode ser identificado a partir do nascimento, com importantes sinais de necrose dos músculos dos membros, pescoço e tronco que progridem conforme o animal alcança a maturidade (COLLINS; MORGAN, 2003). Os sinais clínicos progridem rapidamente entre os três e seis meses de idade (KORNEGAY et al., 1994).

Os cães machos afetados cansam-se com facilidade, desenvolvem andadura alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas, podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos; a maior parte da musculatura esquelética torna-se atrófica, porém, certos grupos musculares e a língua apresentam-se com hipertrofia (NGUYEN et al., 2002). Assim como a DMD, cães com GRMD freqüentemente morrem de falência cardio-respiratória, embora possam sobreviver e alcançar muitos anos de vida (BIGGAR et al., 2002).

### 2.3 FUNÇÃO RENAL

Os rins dos carnívoros são “retroperitoneais”, curtos, grossos e em forma de feijão. O rim direito não está sujeito à grandes variações de posição, diferente do rim esquerdo, que está frouxamente inserido pelo peritônio e cuja posição pode ser alterada pelo grau de distensão do estômago (DYCE et al., 1990).

A superfície renal é levemente convexa, exceto por uma depressão na borda medial, chamado seio renal. Nesse local abre-se o hilo renal por onde passam o ureter, os vasos sanguíneos e os nervos renais. Seu parênquima é dividido em

medula e córtex. A medula tem segmentos em forma de pirâmides, o rim canino é unipiramidal, não há cálices, e os ápices das pirâmides unem-se formando a crista renal (ELLEMPORT, 1986; DYCE et al., 1997; KONIG et al., 2004).

A unidade morfofuncional do rim do rim é o néfron, que é composto de corpúsculo renal, túbulo proximal, alça de Henle e túbulo contorcido distal, o néfron drena para o interior de um ducto coletor. Nos carnívoros, todos os glomérulos estão na região cortical. Na medula encontram-se porções dos túbulos proximais, túbulos distais, alça de Henle e ductos coletores (ELLEMPORT, 1986; DYCE et al., 1990; OSBORNE; FINCO, 1995; KONIG et al., 2004).

A função fisiológica dos rins é regular a composição e o volume do fluido extracelular glomerular de modo a manter a homeostase, essa função é acompanhada pela filtração glomerular, seguida pela reabsorção e secreção tubular. Os rins têm ainda um importante papel no sistema endócrino, por vezes funcionam como glândulas endócrinas produzindo hormônios, como exemplo temos a renina, eritropoetina e 1,25-diidroxicolecalciferol (LESS, 2004).

Na avaliação da função renal, diversos exames laboratoriais podem ser feitos, entre eles os que indicam glicosúria, proteinúria, cilindúria e também avaliação das células do epitélio renal no sedimento urinário, podendo indicar lesão renal. O nível de uréia sanguínea é um indicativo de lesão renal, pois ela é excretada pelos rins e 40% é reabsorvida pelos túbulos renais. A mensuração da uréia sanguínea é feita para acompanhamento do paciente já acometido por lesão renal, pois eles se tornam aumentados quando 70 a 75% dos néfrons estão afuncionais (KIRK, 1987).

A creatinina é derivada da creatina e da fosfocreatina do metabolismo muscular, uma pequena quantidade é excretada pelos túbulos proximais. O nível de creatinina plasmática não é influenciada pela proteína alimentar, catabolismo protéico, sexo, idade ou exercício. A creatinina é usada como um índice da velocidade de filtração glomerular, pois se sabe que existe relação entre a velocidade de filtração glomerular e a concentração de creatinina, a cada redução de 50% da filtração glomerular a creatinina dobra seu valor (KIRK, 1987).

A atividade glomerular é comumente avaliada na rotina pela concentração de creatinina e uréia sérica, porém estes testes apresentam limitações, pois quando se mostram aumentados cerca de 50% da função renal está comprometida (GRANERUS, 2000).

O aumento da fosfatase alcalina também deve ser levado em conta, é considerado um indicador precoce de lesão renal e pode ser detectado em lesões menos severas (HEIENE et al., 1991).

## 2.4 PROTEINÚRIA

O glomérulo normal funciona como um filtro seletivo, tanto para dimensões, quanto para cargas (BRENNER et al., 1978).

A urina é formada pela ultrafiltração do plasma através da barreira glomerular, composta por três camadas: (1) endotélio fenestrado do capilar glomerular, (2) membrana basal glomerular e (3) células epiteliais viscerais (podócitos) (DIBARTOLA et al., 1980; CHEW; DIBARTOLA, 1989; WALLER et al., 1989;; LULICH; OSBORNE, 1990;). A filtração ocorre por pressão hidrostática gerada pelo débito cardíaco. Água e moléculas pequenas, como a glicose e uréia, passam livremente por esta barreira, ao mesmo tempo em que ocorre retenção de proteínas plasmáticas de tamanho maior. A inibição à passagem de moléculas é maior conforme aumenta o peso molecular. Esta seletividade pelo tamanho é atribuída à membrana basal, sendo de tal ordem que macromoléculas circulantes com raios superiores a 3,4 nm, são excluídas da filtração. Geralmente proteínas com peso maior ou igual a 70 kDa não passam pela barreira glomerular (LULICH; OSBORNE, 1990; FINCO, 1995;).

A albumina, com um peso molecular aproximado de 66 kda, normalmente não está presente na urina (DIBARTOLA et al., 1980; WALLER et al., 1989). Alguns autores relatam que 25 a 70% da proteína total presente na urina é representada pela albumina (HARVEY; HOE, 1966; BARSANTI; FINCO, 1979). Proteínas de alto peso molecular normalmente não aparecem no ultra filtrado glomerular em quantidades detectáveis.

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

filtração glomerular de substâncias aniônicas, como por exemplo a albumina. Essas proteínas com carga elétrica negativa são repelidas pela barreira glomerular, enquanto que polycations, como a proteína lisozima são livremente filtrados.

A presença ou não de moléculas no ultrafiltrado com base no seu tamanho, levou-se a acreditar na existência de “poros” na barreira glomerular. No entanto, tais estruturas não foram identificadas em estudos utilizando microscopia eletrônica (DIBARTOLA et al., 1980). Portanto o tamanho não é o único fator determinante da filtração glomerular. Relata-se que macromoléculas protéicas poderiam passar pela barreira glomerular se tivessem uma forma alongada (exemplo: albumina), ao invés de esférica (exemplo: hemoglobina), e se apresentarem numa orientação adequada em relação aos “poros” da barreira glomerular (DIBARTOLA et al., 1980; FINCO, 1995a). Em contraste proteínas menores podem ter sua passagem impedida pelo fato de se ligarem a proteínas carreadoras, formando complexos maiores, com a hemoglobina. Apesar de a hemoglobina possuir um baixo peso molecular, dificilmente ela passa pela barreira glomerular pelo fato de ela estar ligada quase sempre ligada à haptoglobina, uma proteína plasmática maior (DIBARTOLA et al., 1980; LULICH; OSBORNE, 1990; OSBORNE et al., 1995).

Muitas das proteínas provenientes do filtrado glomerular são reabsorvidas pelas células tubulares proximais, primariamente por endocitose. Essas proteínas são digeridas nos vacúolos e aos aminoácidos resultantes retornam para a circulação (WALLER et al., 1989).

O termo proteinúria é definido como a presença de proteína na urina. Porém, esse termo usualmente é utilizado para indicar uma quantidade anormal de proteína na urina (LULICH, OSBORNE, 1990; LESS et. al., 2005).

A proteína está presente na urina de cães normais, porém em quantidades aumentadas pode se tornar 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).

A proteinúria pode ser classificada de acordo com o local da perda de proteína ou com os mecanismos que induziram essa perda, tais como as causas pré-renal, renal e 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

fragmentos de imunoglobulinas (Proteína de Bence Jones), descrita por Lees et al. (2005). Esse quadro é marcado principalmente pelo aparecimento de proteínas de baixo peso molecular, e pode ser observado em pacientes com hemólise intravascular, anemias hemolíticas imunomediadas, polimiosites e mieloma múltiplo (SQUIRES, 1994).

Waller et al. (1989), classificaram a proteinúria, em função do tempo, em intermitente (benigna, funcional, postural) e persistente. Segundo os autores, a proteinúria persistente, é classificada em pré-renal ou renal. A proteinúria renal intermitente é definida como uma alteração renal fisiológica em resposta a um fenômeno transitório, como exercício intenso ou febre. A proteinúria renal persistente 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 que promovem a liberação de proteínas para o espaço urinário (LESS 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 (LESS et al., 2005).

Existe outro método de se classificar a proteinúria segundo Lapin et al., (1989), que é dividido em cinco mecanismos básicos de acordo com o local da injúria: (1) Proteinúria glomerular seletiva – alterações brandas nos poros da parede dos capilares glomerulares, bem como alterações nas cargas negativas da membrana basal glomerular, causam filtração aumentada de albumina e sua excreção na urina; (2) Proteinúria glomerular não seletiva – alterações mais severas da parede glomerular causam transtorno do mecanismo de ultrafiltração, resultando em perda da seletividade glomerular. Proteínas de alto peso molecular ocorrem na urina final; (3) Proteinúria tubular – insuficiência no mecanismo de reabsorção tubular causa proteinúria de baixo peso molecular; (4) Proteinúria de “super fluxo” –

proteínas de baixo peso molecular (Proteína de Bence Jones, mioglobina, hemoglobina), quando ocorrem em concentrações anormalmente altas no plasma sanguíneo, são filtradas pelo glomérulo, saturando a capacidade de reabsorção do sistema tubular. Elas passam para a urina devido ao “super fluxo”; (5) Proteínuria pós renal – injúria no sistema urogenital eferente causa contaminação da urina por debris teciduais, exsudato ou sangue.

A quantidade e as proteínas encontradas na urina variam amplamente em estados normais e em doenças renais. É possível que a composição das proteínas urinárias reflita alterações específicas na estrutura ou função renal. Três fatores básicos dificultam a análise de proteínas urinárias: (1) há uma larga variação na quantidade e composição das proteínas presentes na urina de amostra para amostra. A excreção da albumina pode variar de 20 mg/dia ou menos em condições normais, até 20g/dia em pacientes com síndrome nefrótica; (2) a maioria das proteínas presente na urina está presente também no soro, e pode ter chegado à urina por mecanismos que não incluem alterações renais; (3) os produtos da degradação de proteínas são concentrados pelos rins, e podem ser mensurados na urina junto com proteínas intactas. Exemplos de proteínas com produtos de degradação conhecidos incluem a fibrina e as  $\gamma$ -globulinas (PESCE, 1974). Podem ainda ser encontradas na urina, proteínas originárias da secreção de células epiteliais dos túbulos contornados distais. Dentre elas a mucoproteína de Tamm-Horsfall, que está implicada na formação de cilindros (WALLER et al., 1989).

#### 2.4.1 Análise quantitativa da proteína urinária

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



ocorrer em urinas nas quais a proteína predominante não é a albumina (SQUIRES, 1994).

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

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

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

Segundo Finco (1995), a mensuração da concentração da proteína urinária pode não refletir adequadamente a magnitude da perda de proteína na urina de cães, devido a flutuações no volume de urina no mesmo paciente e influência de ritmos circadianos, advogando, portanto, a colheita de amostras de urina num período de 24 horas. Infelizmente, tais colheitas requerem procedimentos como o uso de gaiolas metabólicas, passagem repetida ou fixação de cateter uretral, que além de serem trabalhosos e onerosos, predispõem o animal a infecções iatrogênicas.

White et al. (1984) demonstraram, em cães, uma alta correlação entre o valor de excreção de proteína urinária em 24h e a relação proteína/creatinina (RPC) de amostras de urinas aleatórias, fundamentando-se no fato de que a creatinina é produzida numa taxa constante, é livremente filtrada pelo glomérulo e não é significativamente secretada nem reabsorvida pelos túbulos renais. Ao se dividir a concentração de proteína urinária (mg/mL) pela concentração de creatinina (mg/mL), o efeito do volume de urina é anulado. Os autores constataram que uma perda diária de proteína urinária de 30 mg/kg/24horas, considerada como o limite superior de proteína urinária diária por cães, seria correspondente a uma RPC de

aproximadamente 1,0, valor este que passou a ser utilizado como o máximo para esta relação em cães normais.

A mensuração da concentração de proteína urinária deve ser realizada para determinar a razão da proteína e creatinina urinária (RPC). Esta razão pode ser influenciada pelo método de colheita da urina, dieta, hemorragias, inflamação e exercícios (HURLEY; VADEN, 1998). Em cães o valor normal da razão proteína creatinina urinária (RPC) preconizado, segundo Finco (1995), seria de  $< 0,4$ ; valores questionáveis 0,4 a 1; e valores anormais ou patológicos  $> 1,0$ .

Lulich e Osborne (1990), relataram boa correlação entre a RPC de amostras de urina isoladas, tomadas ao acaso, com a quantidade de proteína excreta na urina em 24 horas.

Squires (1994), relacionou o valor de RPC encontrado para amostras de cães com doença renal, ao local da lesão presente no rim. Segundo o autor, valores menores que 1,0 são considerados normais. Valores entre 1,0 e 5,0 são encontrados em lesões pré-glomerulares, pós-glomerulares e glomerulares brandas. Valores entre 5,0 e 13,0 freqüentemente indicam proteinúria severa decorrente de transtorno pós-glomerular ou de glomerulopatia, enquanto valores acima de 13 são indicativos de glomerulopatias severas.

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 um valor prognóstico.

#### 2.4.2 Análise qualitativa da proteína urinária

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

A eletroforese se destaca entre as técnicas para análise qualitativa de proteínas presentes na urina. Harvey e Hoe (1966), ao analisarem urina de cães pelo método de eletroforese em celulose, observaram concentrações de albumina na ordem de 60%. Os autores relataram que uma das desvantagens do método foi a baixa sensibilidade, o que dificultou a avaliação da urina dos cães normais. Outras técnicas foram sendo desenvolvidas para a eletroforese, inclusive em gel de agarose, mas houve superioridade nos resultados alcançados pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Diversos estudos, tanto com urina de humanos como com urina de cães, revelam a qualidade da técnica com SDS-PAGE (PESCE, 1974; WEBER, 1988; SCHULTZE; JENSEN, 1989; WALLER et al., 1989; KAWAKAMI & KAJII, 1990).

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

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

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

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

Um método qualitativo, como a eletroforese, tem sido empregado para 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 de através do glomérulo, observa-se a presença de proteínas de peso molecular correspondente à albumina, sugerindo-se, portanto, a localização do segmento do néfron comprometido, como possivelmente, também, o prognóstico da afecção (REGO et al., 2001).

A proteinúria pode mostrar uma lesão renal (primitiva ou secundária). Os critérios que permitem classificar uma proteinúria são: sua característica transitória ou permanente, a quantidade, composição e sua seletividade, isso quer dizer a presença de proteínas menores que a albumina, a função renal, a associação de alterações no sedimento urinário (hematúria, piúria) (FAUVELL; LAVILLE, 2006).

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 de 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 de eletroforese de 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 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 uma lesão tubular característica da leptospirose. Zaragoza et al. (2004) analisaram a proteinúria em cadelas com piometra e determinaram que 58% da proteinúria era proveniente da perda decorrente da lesão glomerular (presença de proteínas de alto peso molecular).

Lazaretti et al. (2006) empregaram a eletroforese 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 túbulo intersticial 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 hípidos contém uma quantidade maior de proteína quando comparada com a urina de cadelas saudáveis.

Para o diagnóstico de proteinúria é imperativo a pesquisa da etiologia. O conhecimento da etiologia permite determinar o tratamento e o prognóstico da lesão renal. A albumina é somente um dos componentes das proteínas urinárias, a sua presença mesmo que em pequenas quantidades é chamada microalbuminúria que tem um importante valor prognóstico. Ela é bem estabelecida nas lesões glomerulares, o valor da proteinúria durante a descoberta e depois na evolução da lesão renal tem um grande valor prognóstico. Enfim cada vez mais os resultados experimentais e clínicos sugerem que reduzir a proteinúria deve ser um objetivo terapêutico (FAUVELL; LAVILLE, 2006).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto proposto foi conduzido após aprovação pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados seis cães machos da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD), com idades entre um e quatro anos, pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD - Brasil localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP. Foram ainda avaliados três cães machos normais da raça Golden Retriever clinicamente sadios para estabelecer uma comparação com os animais afetados pela distrofia.

Os animais foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação, higiene e recreação. Os diagnósticos de Distrofia Muscular e de estado normal de saúde necessário para a seleção dos animais foram realizados pelas equipes do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (IB-USP) e do Canil GRMD Brasil do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, através de genotipagem de acordo com Bartlett et al. (1996). Para purificação do DNA genômico de células do cordão umbilical, já coletada no nascimento, uma alíquota de até 1 microlitro, utilizou-se o kit comercial GFX™ Genomic (GE Healthcare). A região contendo a mutação de ponto foi amplificada por meio da Reação da Cadeia em Polimerase (PCR) utilizando o termociclador PTC-200 (MJ Research). Os pares de primers utilizados foram: GF2 (5' – CTT AAG GAA TGA TGG GCA TGG G – 3') e GR2 (5' – ATG CAT AGT TTC TCT ATC ATG C – 3') localizados, respectivamente, no intron 6 e exon 7 do gene da distrofina canino. Os amplicons gerados foram submetidos à digestão com a enzima *Sau96 I* (GE Healthcare), capaz de reconhecer o sítio mutado. Os produtos da

digestão enzimática foram analisados em gel de poliacrilamida 8% e visualizados após coloração com nitrato de prata.

### 3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Semanalmente foi realizada uma avaliação clínica nos animais para garantir que estes estivessem dentro dos parâmetros de saúde preconizados, bem como assegurar para que não houvesse nenhum distúrbio que pudesse interferir no estudo (figura1).



**Canil GRMD - USP**  
**Ficha de Avaliação Clínica**

<b>Nome do animal:</b> _____		<b>Data:</b> ___/___/___	
<b>Data de nasc.:</b> _____		<b>Idade:</b> _____	<b>Peso:</b> _____ Kg

<b>FC:</b> ___ bpm	<b>FR:</b> ___ rpm	<b>T:</b> ___ °C	<b>TPC:</b> ___ s
<b>Pulso femoral:</b> Normal ( ) Filiforme ( )			

<b>Estado geral:</b> normal ( ) regular ( ) mal ( )
<b>Consciência:</b> alerta ( ) apático ( ) letárgico ( )

<b>Mucosas:</b>	<b>Hidratação:</b>	<b>Linfonodos:</b>	<b>Apetite:</b>
( ) Normais	( ) Normal	Sub-mand.: _____	( ) Normorexia
( ) Palidas	( ) 4%	Supra-escap.: _____	( ) Hiporexia
( ) Congestas	( ) 6%	Axilares: _____	( ) Polifagia
( ) Cianóticas	( ) 8%	Poplíteos: _____	( ) Anorexia
( ) Ictérica	( ) 10%	Inguinais: _____	

<input type="checkbox"/> 1. Digestivo <input type="checkbox"/> 2. Respiratório <input type="checkbox"/> 3. cardiovascular <input type="checkbox"/> 4. Nervoso <input type="checkbox"/> 5. Urinário <input type="checkbox"/> 6. Reprodutivo <input type="checkbox"/> 7. Oftálmico <input type="checkbox"/> 8. Auricular <input type="checkbox"/> 9. Músculo-esquelético <input type="checkbox"/> 10. Pele e anexos <input type="checkbox"/> 11. Abdômen <input type="checkbox"/> 12. Odontológico	<b>Avaliação por sistemas – Observações</b> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
---	--

<b>Diagnósticos diferenciais:</b> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	<b>Exames complementares:</b> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>
<b>Diagnóstico definitivo:</b> <hr/>	
<b>Tratamento:</b> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/> <hr/>	

Figura 1 – Ficha clínica utilizada para avaliação semanal dos animais

### 3.3 EXAME DE URINA

As amostras de urina foram colhidas por sondagem uretral, utilizando-se sondas e seringas descartáveis. As coletas seguiram o padrão quinzenal totalizando oito amostras por animal para os animais afetados, e uma amostra para os animais normais.



As amostras de foram avaliadas fisicamente quanto à cor, aspecto, odor, e densidade (mesurada no refratômetro). O exame químico foi feito pela imersão de fita reagente específica para urinálise (Combur - 10® - Roche) e leitura contra padrão de cores estabelecido pelo fabricante, depois de decorrido um minuto. As amostras foram centrifugadas a 2000g por 10 minutos, e o sobrenadante armazenado em microtubos a – 70°C até o momento da realização da eletroforese, onde foi determinada também a proteína e creatinina nas amostras conforme as técnicas a seguir descritas.

### 3.3.1 Concentração da proteína urinária

Para a determinação da proteína urinária foi utilizado o método colorimétrico do Vermelho de Pirogalol (Kit Sensiprot - Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil). As amostras de urina (sobrenadante), previamente centrifugadas, foram conservadas à temperatura -70°C até o momento da realização da prova laboratorial.

Estas dosagens fornecem informação direta sobre as concentrações de proteínas excretadas na urina.

### 3.3.2 Concentração Urinária de Creatinina

A determinação da concentração de creatinina urinária foi baseada na metodologia descrita por Lustgarten e Wenk (1972), onde ocorre a reação da creatinina com o ácido pícrico em meio alcalino, produzindo picrato de creatinina, com leitura em comprimento de onda de 515 nm em analisador bioquímico automático (Kit Creatinina - Labtest Diagnóstica S. A.; MG, Brasil). As amostras de urina foram diluídas em solução salina, de modo a atingir a linearidade do teste.

A creatinina urinária foi mensurada para o cálculo da razão proteína creatinina urinária (RPC), essa razão é usada para corrigir possíveis erros provenientes da concentração ou diluição da amostra.

Segundo Less et al. (2005) o valor da razão proteína creatinina urinária (RPC) acima de 1,0 indica uma quantidade anormal de proteína, sendo considerado proteinúria patológica.

### 3.4 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS URINÁRIAS

Os estudos eletroforéticos das proteínas foram realizados em sistema vertical de eletroforese com gel homogêneo de poliacrilamida (PROTEAN II xi Vertical Electrophoresis Cells – Bio-Rad Laboratories; CA, EUA), para a determinação dos pesos moleculares das proteínas urinárias realizada em um conjunto de placas verticais de acordo com o método de preparo de gel descrito por Laemmli (1970).

O gel de empilhamento foi confeccionado com concentração de 4% e o de separação 10%, (Apêndice A) com espessura 1,0 mm, largura e altura aproximadamente 16,0 cm.

As amostras foram preparadas utilizando 30 µL do sobrenadante da urina e 20 µL do tampão da amostra para proteínas desnaturadas (descrição ver Apêndice A), após esse procedimento as amostras foram submetidas à ebulição por 10 minutos para que houvesse a completa desnaturação. Em cada poço foi colocado 10 µL da solução previamente preparada, totalizando 17 amostras por gel, sendo uma amostra do padrão para o peso molecular MW-SDS-70 Kit (Sigma Chemical CO; MO, EUA) com variação de 14.000 a 70.000 e o MW-SDS-200 Kit (Sigma Chemical CO; MO, EUA), com variação de 6,5 a 200 kDa.

As corridas eletroforéticas foram realizadas com a miliamperagem pré-fixada em 20 e 25 mA para o gel de empilhamento e separação respectivamente. O tempo de corrida foi de 5 horas. A coloração dos géis foi feita com Azul brilhante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical CO; MO, EUA) (Apêndice B). A leitura do gel foi realizada num sistema de densitometria (SHIMADZU CS-9301PC; Japão), junto ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP-Câmpus de Jaboticabal, SP, sob responsabilidade do Professor Dr. José Jurandir Fagliari e do técnico Paulo César da Silva.

### 3.5 BIOQUÍMICA SÉRICA

Foram utilizadas amostras de soro obtidas após sinérise de sangue coletado por punção da veia cefálica do antebraço. Os exames de uréia e creatinina, proteína e albumina séricas foram realizados no laboratório de patologia clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET-FMVZ – USP) no aparelho de análises Labtest®.

### 3.6 ANÁLISE DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS

Para realizar o agrupamento das frações protéicas semelhantes foi utilizada a técnica de sobreposição dos traçados obtidos pela densitometria e da análise visual, conjunta e individual, dos géis. Assim, as bandas protéicas alinhadas horizontalmente nos géis e com picos localizados na mesma posição nos gráficos de densitometria, foram agrupadas. A cada uma destas bandas semelhantes foi atribuído um valor de peso molecular representado pela média aritmética dos pesos obtidos na densitometria

## 4 ESTATÍSTICA

Para os valores urinários de proteína total, creatinina e razão proteína:creatinina, e os valores séricos de uréia, creatinina, proteína e albumina, entre os cães afetados pela distrofia foi feita a Análise de Variância, e para a comparação dos dois grupos foi usado o teste de Wilcoxon com um nível de significância de 5% .

Na análise da eletroforese dos grupos estudados as variáveis tiveram uma distribuição não paramétrica ou não Gaussiana, sendo comparadas pelo teste de Mann-Whitney, a um nível de significância de 5%.

As médias das bandas protéicas apresentadas pelos animais Afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne serão apresentadas em forma de gráficos e tabelas para efeito comparativo.

Todas as análises foram feitas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism.

## 5 RESULTADOS

Os cães afetados pela distrofia muscular foram submetidos a avaliações clínicas semanais, e laboratoriais mensais para caracterização do seu estado de saúde. Durante os períodos de avaliações e coleta de materiais os cães permaneceram sob as mesmas condições ambientais e não foram submetidos a qualquer exercício físico intenso. Também não foram observados episódios de febre ou qualquer outra manifestação de alteração clínica.

### 5.1 BIOQUÍMICA SÉRICA

Os resultados da creatinina, uréia, proteína e albumina sérica dos animais afetados pela distrofia apresentaram-se dentro dos padrões (Tabela 1) e não houve diferença significativa quando comparado com os valores apresentados pelos animais normais.

Tabela 1- Valores das médias de uréia, creatinina, proteína total e albumina sérica dos cães afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne e a média dos cães normais juntos

<b>Animal</b>	<b>Idade</b>	<b>Uréia</b> <b>Média ± s</b>	<b>Creatinina</b> <b>Média ± s</b>	<b>Proteína</b> <b>Total</b> <b>Média ± s</b>	<b>Albumina</b> <b>Média ± s</b>
<b>GRMD-2B7</b>	2 anos	32,3 ± 3,68	0,71 ± 0,06	6,27 ± 0,72	3,2 ± 0,46
<b>GRMD-I3</b>	5 anos	35,05 ± 11,02	0,76 ± 0,03	6,5 ± 0,39	3,05 ± 0,33
<b>GRMD-1K6</b>	2 anos	31,35 ± 4,78	0,66 ± 0,02	6,5 ± 0,55	3,25 ± 0,37
<b>GRMD-2L3</b>	3 anos	36,1 ± 5,75	0,7 ± 0,02	7,27 ± 0,37	3,25 ± 0,47
<b>GRMD-M5</b>	6 anos	41,25 ± 8,09	0,75 ± 0,04	6,82 ± 0,33	3,12 ± 0,35
<b>GRMD-2L2</b>	3 anos	44,42 ± 11,41	0,79 ± 0,03	6,8 ± 0,53	3,3 ± 0,31
<b>Normais</b>	2 a 7 anos	36,76 ± 2,79	0,59 ± 0,08	7,53 ± 0,45	3,1

## 5.2 RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC)

Os resultados dos valores individuais da proteína urinária, creatinina urinária e da razão proteína:creatinina urinária (RPC) dos cães normais apresentam-se dispostos na tabela 2.

As médias dos valores de proteína e creatinina urinária e o cálculo da razão proteína:creatinina (RPC) dos animais afetados pela distrofia estão no tabela 3.

Todos os animais nesse estudo tiveram valores de RPC menores que 1,0 exceto o animal 2L2 que apresentou valor de RPC 1,15 em uma das 8 amostras coletadas.

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

normais e afetados pela distrofia, observando-se que houve diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ). O gráfico 2 representa os valores das medianas, os valores dos percentis de 25 e 75% e os valores máximo e mínimo dos parâmetros RPC dos cães normais e dos seis cães afetados individualmente.

Tabela 2 - Valores individuais de proteína, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães do grupo controle

<b>Animal</b>	<b>Proteína (mg/mL)</b>	<b>Creatinina (mg/mL)</b>	<b>RPC</b>
<b>Animal 1</b>	69	460,7	0,149772
<b>Animal 2</b>	18,1	201,7	0,089737
<b>Animal 3</b>	30,8	309,6	0,099483

Tabela 3 – Valores das médias de proteína, creatinina e razão proteína:creatinina das amostras de urina dos cães afetados pela Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD)

<b>Animal</b>	<b>Proteína (mg/mL) Média ± s</b>	<b>Creatinina (mg/mL) Média ± s</b>	<b>RPC Média ± s</b>
<b>2B7</b>	84,38 ± 17,49	359,23 ± 112,90	0,26 ± 0,10
<b>I3</b>	47,5 ± 14,10	260,21 ± 85,38	0,18 ± 0,04
<b>1K6</b>	67,26 ± 24,56	238,95 ± 53,14	0,29 ± 0,11
<b>2L3</b>	49,87 ± 5,28	228,16 ± 60,13	0,22 ± 0,04
<b>M5</b>	57,07 ± 51,39	214,51 ± 77,51	0,24 ± 0,12
<b>2L2</b>	97,26 ± 76,52	265,33 ± 67,03	0,38 ± 0,31

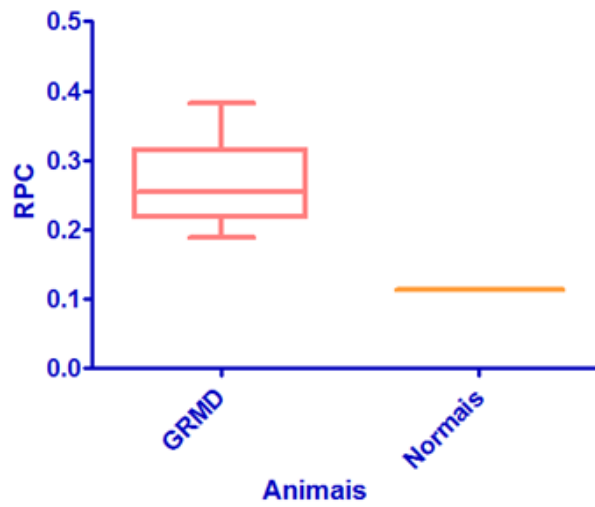


Gráfico 1 - Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária dos cães afetados pela distrofia (GRMD) e dos cães normais

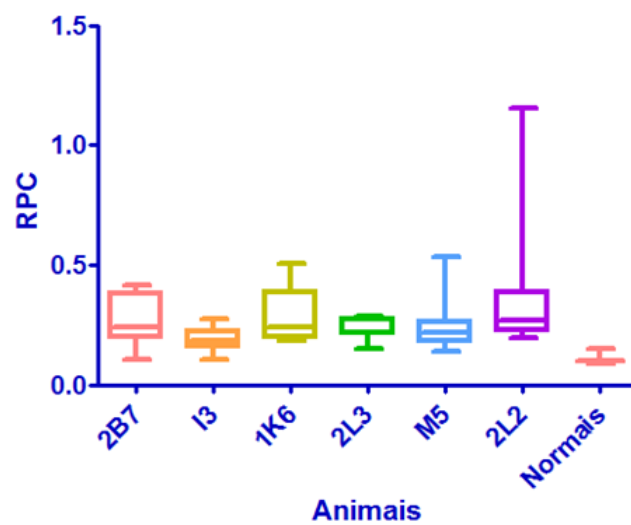


Gráfico 2 - Representação dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da razão proteína:creatinina urinária de cada animal afetado pela distrofia e os cães normais

Na análise estatística referente aos valores da razão proteína:creatinina urinária foi observada diferença significativa ( $P < 0,05$ ), tanto entre os cães normais e os afetados (gráfico1), bem como entre cada animal afetado quando comparado ao valor apresentado pelos cães normais (gráfico 2).

### 5.3 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS URINÁRIAS

Os traçados eletroforéticos das amostras de urina dos cães pertencente ao grupo dos normais e dos afetados apresentaram extrema variabilidade no número de bandas de proteínas e na intensidade óptica de cada banda de proteína identificada em cada amostra de urina.

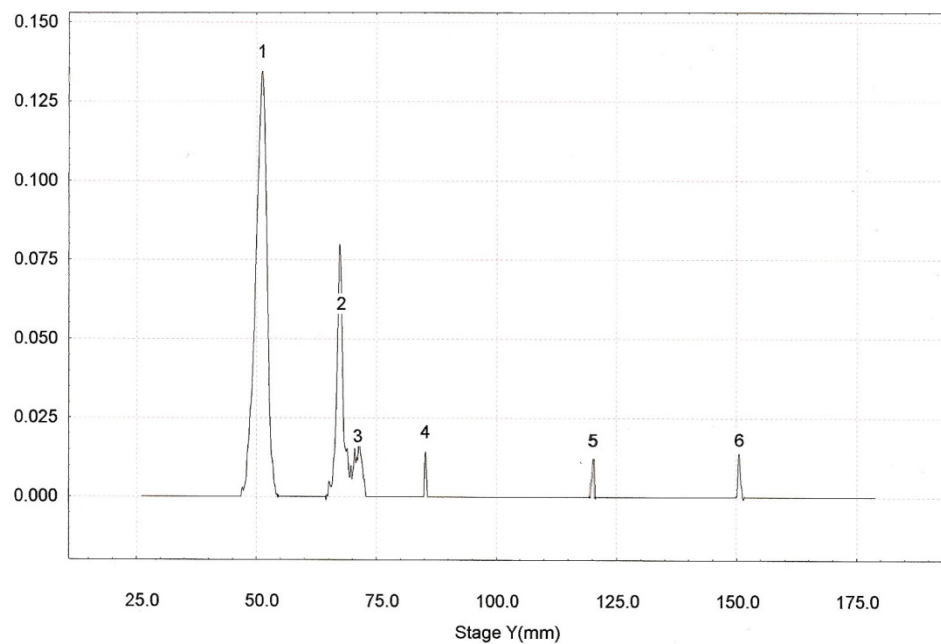


Gráfico 3 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de urina de cão normal



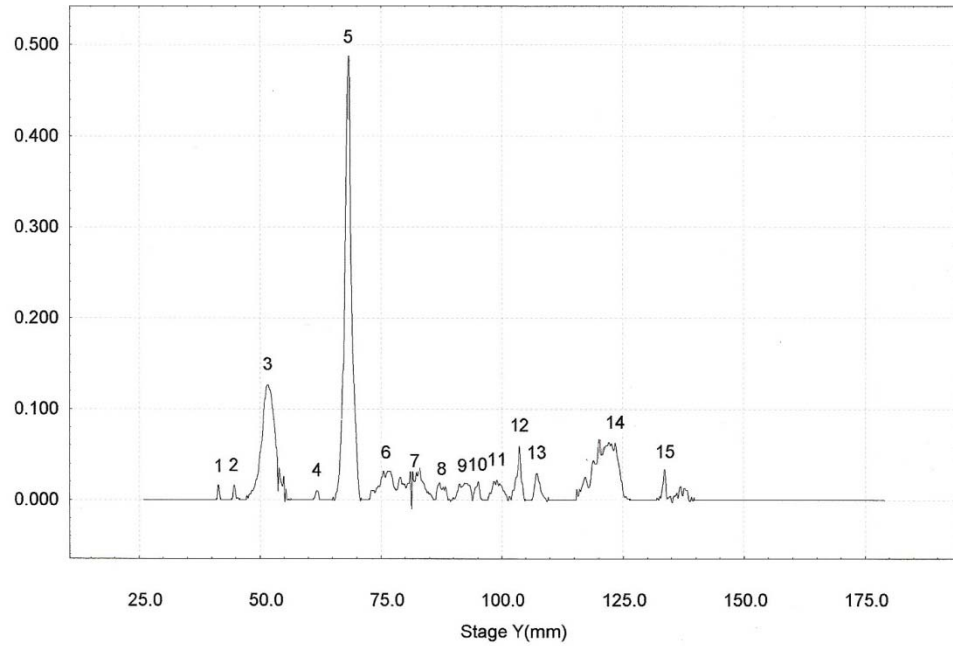


Gráfico 4 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de urina do cão I3 afetado pela distrofia muscular

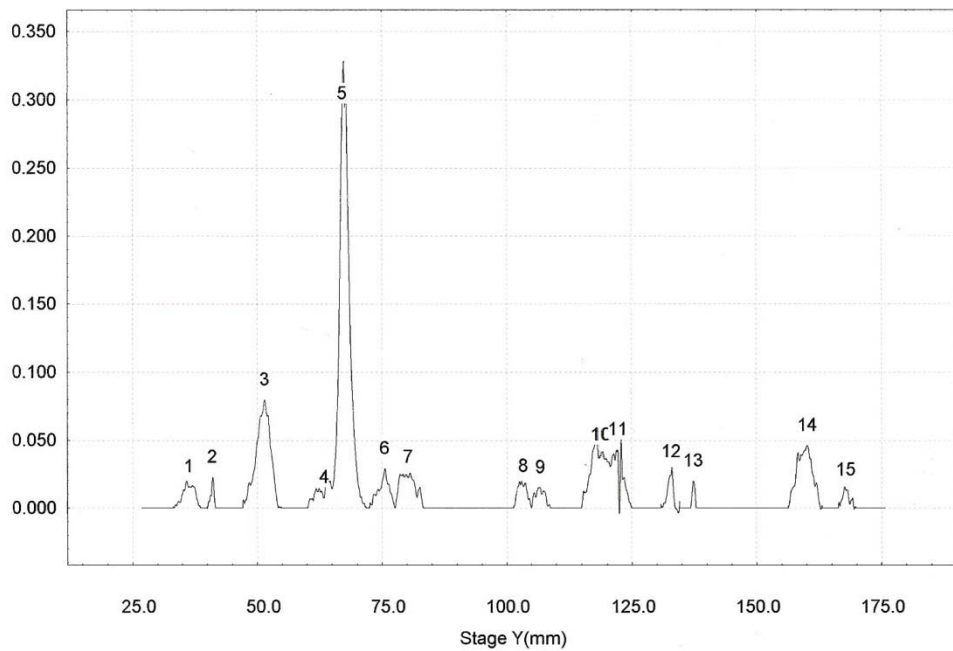


Gráfico 5 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de urina do cão 2L3 afetado pela distrofia muscular

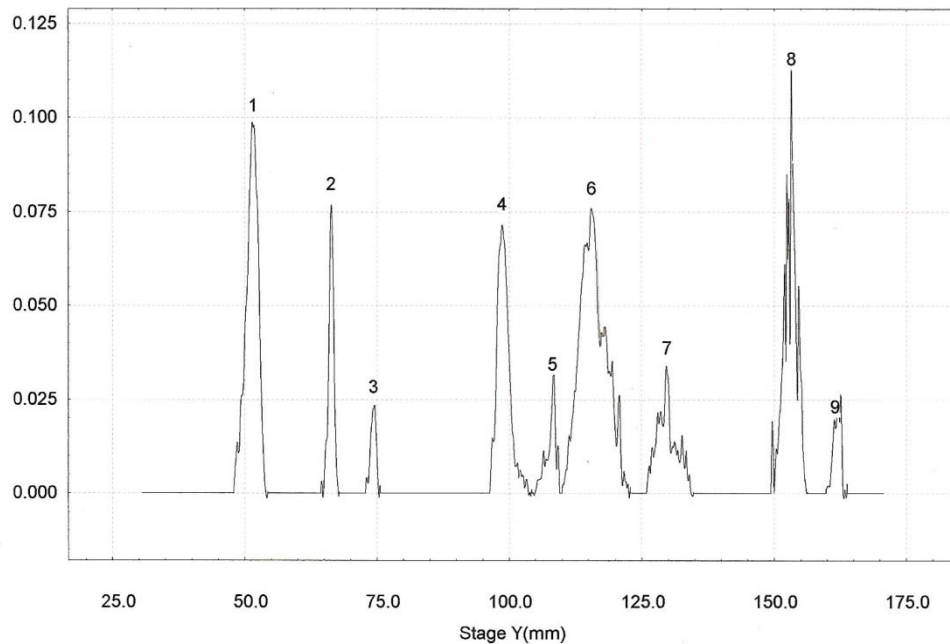


Gráfico 6 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de uma amostra de urina do cão 2L2 afetado pela distrofia muscular

Para a avaliação qualitativa das proteínas excretadas na urina foram feitas leituras densitométricas das eletroforeses (SDS-PAGE). Nas urinas de cães normais foram detectadas além da albumina bandas com pesos moleculares aproximados de 114.000, 80.000, 62.000, 57.000, 51.000, 44.000, 36.000, 30.000, 22.000 e 18.000 dáltons. Nos cães com distrofia muscular foram detectadas além das bandas já citadas para os cães normais, sete bandas com pesos moleculares maiores do que o da albumina, e uma banda de peso molecular menor, e os pesos aproximados dessas bandas são de 233.000, 200.000, 189.000, 166.000, 137.000, 91.000, 74.000 e 16.000 dáltons (Tabela 4).

Nos cães com distrofia, o percentual de albumina foi superior ao apresentado pelos cães normais, mais essa diferença não foi significativa ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 7).

Tabela 4 – Médias aritméticas e resultado da estatística, da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de urina de cães Golden Retrievers com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD) e Normais

<b>Peso Molecular</b>	<b>Grupo GRMD</b>	<b>Grupo Normais</b>	<b>Estatística</b>
<b>233</b>	0,21	Ausente	-
<b>200</b>	1,75	Ausente	-
<b>189</b>	1,15	Ausente	-
<b>166</b>	0,53	Ausente	-
<b>137</b>	1	Ausente	-
<b>114</b>	15,71	33,9	P= 0,5476 Não Significativo
<b>91</b>	0,16	Ausente	-
<b>80</b>	1,66	0,93	P= 0,6041 Não Significativo
<b>74</b>	1,23	Ausente	-
<b>Albumina</b>	26,5	16,93	P= 0,5476 Não Significativo
<b>62</b>	3,03	4,16	P= 0,7143 Não Significativo
<b>57</b>	6,08	1,5	P= 0,0952 Não Significativo
<b>51</b>	0,7	0,36	P= 0,8781 Não Significativo
<b>44</b>	2,71	0,03	P= 0,0238 Significativo
<b>36</b>	7,51	0,16	P= 0,0238 Significativo
<b>30</b>	8,8	5,1	P= 0,2619 Não Significativo
<b>22</b>	10,21	1,5	P= 0,0381 Significativo
<b>18</b>	24,11	35,4	P= 1,00 Não Significativo
<b>16</b>	2,63	Ausente	-

Das proteínas presentes em ambos os grupos, as bandas que tiveram diferença percentual estatisticamente significativa foram as de peso molecular aproximado 44000, 36000 e 22000 dáltons, que foram significativamente superiores nos cães distróficos, e as bandas de peso molecular 80000, 57000, 51000 e 30000 dáltons também tiveram o percentual maior nos cães distróficos, porém não foi significativa ( $p < 0,05$ ); entretanto as proteínas de pesos moleculares 114000, 62000 e 18000 dáltons tiveram o percentual diminuído nos cães com distrofia quando

comparado ao grupo de cães normais, no entanto não foi uma diminuição estatisticamente significativa ao nível de 5%.

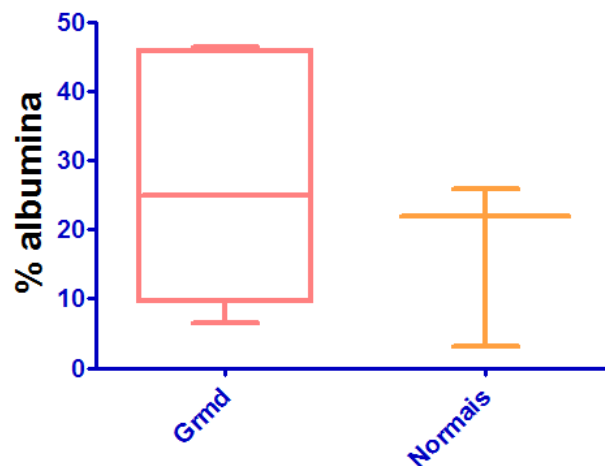


Gráfico 7 – Representação (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da percentagem de albumina na urina dos cães afetados pela distrofia (GRMD) e dos cães normais

As bandas protéicas encontradas na eletroforese da urina dos cães normais e dos afetados pela distrofia muscular foram representados em gráficos (Gráficos 8 e 9), para facilitar a visualização da diferença apresentada entre os dois grupos estudados

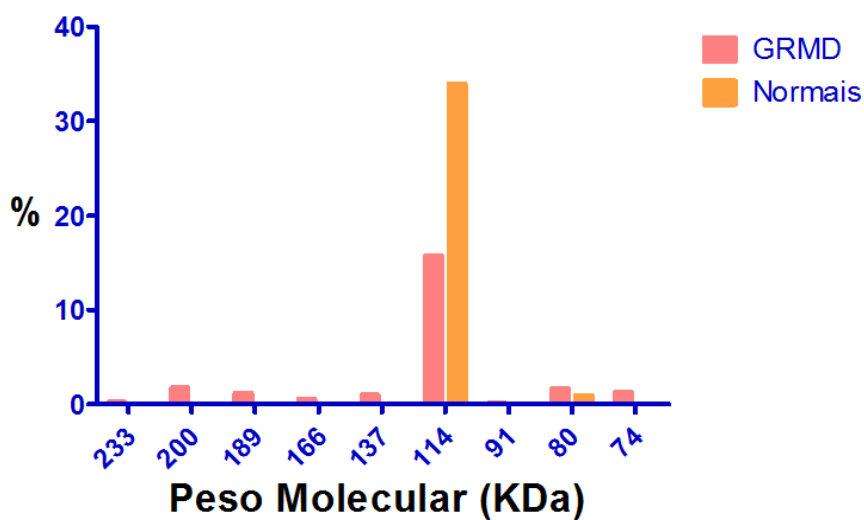


Gráfico 8 – Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas de peso molecular maior que o da albumina, detectadas por SDS-PAGE

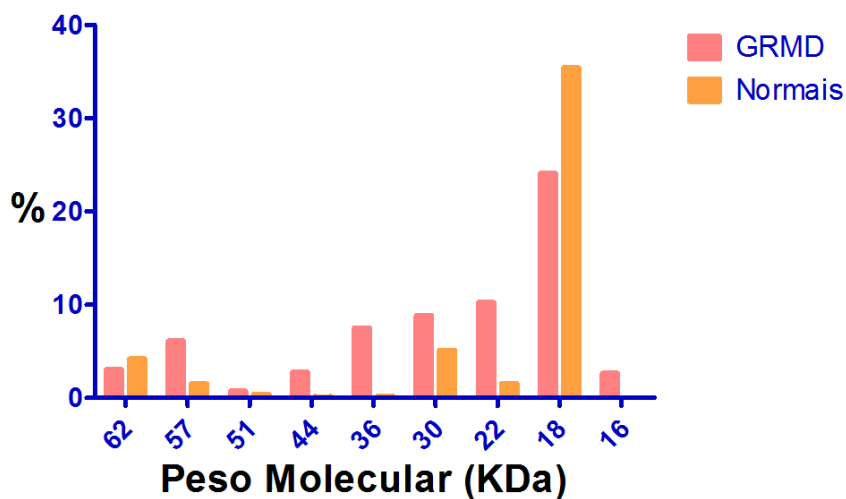


Gráfico 9 – Representação gráfica das distribuições percentuais das bandas protéicas de peso molecular menor que o da albumina, detectadas por SDS-PAGE

No gráfico 8 estão representadas as médias percentuais das bandas protéicas consideradas de alto peso molecular, e no gráfico 9 as bandas protéicas representadas são as de baixo peso molecular. No gráfico 8 vê-se que nos cães GRMD foram detectadas bandas com alto peso molecular, que se mostraram

ausentes nos cães normais, e no gráfico 5, as proteínas de baixo peso molecular estão em maior concentração nos cães GRMD, com exceção das bandas protéicas de peso molecular 62000 e 18000 dáltons.

Com a finalidade estabelecer uma comparação dentro do grupo dos animais acometidos pela distrofia muscular, a tabela 5 mostra as médias apresentadas por eles nas bandas protéicas encontradas no estudo, visto que mesmo pertencendo a um mesmo grupo, estes apresentaram valores muito diferentes quando comparados uns aos outros (Tabela 5).

Tabela 5 - Médias aritméticas da distribuição, dada em percentual, das bandas protéicas detectadas em eletroforetogramas de urina de cães Goldens Retrievers com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD)

<b>Peso Molecular</b>	<b>2B7</b>	<b>1K6</b>	<b>I3</b>	<b>2L2</b>	<b>2L3</b>	<b>M5</b>
<b>233</b>	ausente	1,3	ausente	ausente	ausente	ausente
<b>200</b>	3,2	Ausente	ausente	4,5	2,7	0,1
<b>189</b>	3,0	3,9	ausente	ausente	ausente	ausente
<b>166</b>	ausente	0,6	1,3	0,5	0,8	ausente
<b>137</b>	0,6	Ausente	0,9	0,5	2,9	1,1
<b>114</b>	16,1	19,8	15,8	14,5	15,4	12,7
<b>91</b>	1,0	Ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
<b>80</b>	2,8	1,8	2,2	ausente	1,7	1,5
<b>74</b>	ausente	Ausente	ausente	2,2	ausente	5,2
<b>Albumina</b>	38	6,6	46,4	10,4	45,6	12
<b>62</b>	2,1	4,8	ausente	1,2	6,6	3,5
<b>57</b>	8,4	3,3	10,7	5,7	5,8	2,6
<b>51</b>	ausente	3,5	ausente	0,7	Ausente	ausente
<b>44</b>	3,5	4,0	2,5	1,9	2	2,4
<b>36</b>	9,0	6,5	8,0	10,9	5,7	5,0
<b>30</b>	5,8	7,8	11,4	15,2	7,4	5,2
<b>22</b>	4,0	25,9	3,7	6,4	2,2	19,1
<b>18</b>	8,8	35,3	5,4	38,8	9,9	46,5
<b>16</b>	6,5	0,7	ausente	3,8	4,8	ausente

As bandas de proteínas de alto peso molecular que não aparecem nos animais normais, porém as detectamos em animais distróficos, mas não são todos os animais deste grupo que elas podem ser vistas.

A banda protéica de peso molecular 233000 dáltons aparece em uma pequena porcentagem e apenas em um animal, o 1K6; a banda de proteína de peso molecular aproximado de 200000 dáltons apareceu nos animais 2B7, 2L2, 2L3 e M5; a banda protéica de 189000 dáltons foi evidenciada na amostra da urina dos cães 2B7 e 1K6; a proteína de 166000 dáltons nas amostras dos cães 1K6, I3, 2L2 e 2L3 e a banda protéica de peso 137000 dáltons apareceu em cinco dos seis cães do grupo, com exceção do 1K6. Essas bandas protéicas que foram encontradas na urina dos cães afetados pela distrofia muscular não tiveram grandes percentuais em relação ao total das bandas protéicas das amostras, mas essas bandas não são normalmente encontradas em animais normais.

Outras duas bandas protéicas foram vistas somente nos cães com distrofia muscular, a banda de peso molecular 91000 dáltons foi encontrada somente em um cão, o 2B7, e com apenas 1% da média do total das bandas protéicas encontradas. A proteína de peso 74000 dáltons apareceu na amostra dos cães 2L2 e M5, também com uma porcentagem baixa.

A albumina que é uma proteína importante e muito estudada, corresponde em média a 16,93% das proteínas urinárias de cães normais. Quando observada nos cães com distrofia muscular, vemos que os cães 2B7, I3 e 2L3 tem percentuais acima de 30, já os cães 1K6, 2L2 e M5 tem percentuais bem menores de 6 a 12%. O gráfico 10 mostra essa diferença.

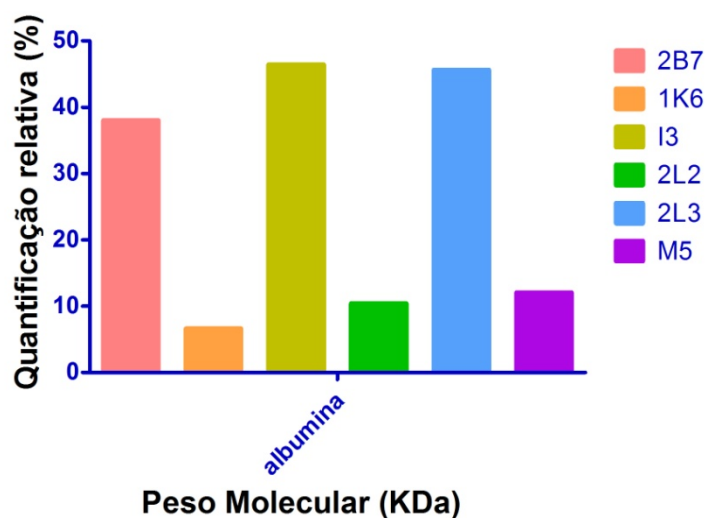


Gráfico 10 - Representação gráfica das distribuições percentuais da banda protéica referente a albumina, detectadas por SDS-PAGE nas amostras da urina de cães com distrofia muscular

A banda protéica de peso molecular aproximado de 18000 dáltons também apresentou valores diferentes entre os animais do grupo GRMD, os animais que tiveram maior quantidade de albumina mostraram pequena quantidade dessa banda protéica (2B7, I3 e 2L3), e aqueles que com pequena quantidade de albumina apresentaram valores superiores da banda protéica de peso 18000 dáltons (1K6, 2L2 e M5), (gráfico 11).

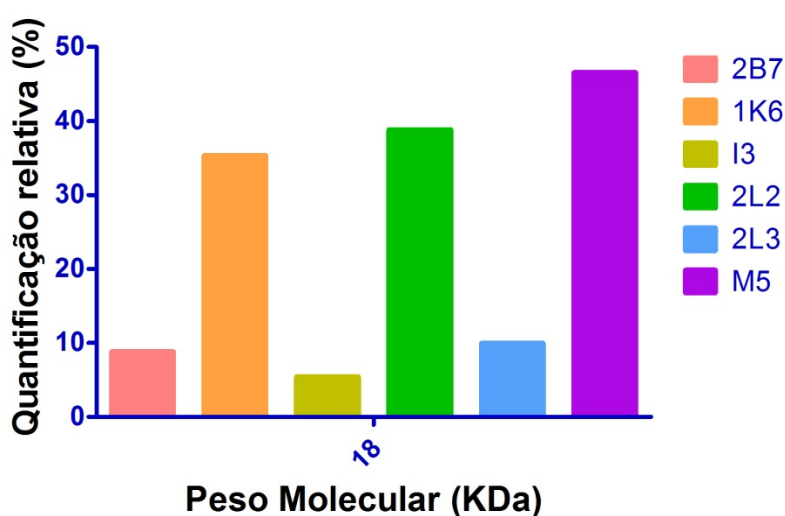


Gráfico 11 – Representação gráfica das distribuições percentuais da banda protéica de peso molecular aproximado de 18000 dáltons, detectadas por SDS-PAGE nas amostras da urina de cães com distrofia muscular



## 6 DISCUSSÃO

A insuficiência renal primária é caracterizada pelo não funcionamento de pelo menos três quartos dos nefros de ambos os rins, quando não ocorre compensação através da hipertrofia de um dos rins (OSBORNE; FINCO, 1995).

Atualmente na Clínica Veterinária de Pequenos Animais o diagnóstico da insuficiência renal é feito através da mensuração de uréia e creatinina sérica, mas estes apresentam limitações, pois a alteração desses parâmetros só será evidenciada quando 50% dos néfrons estiverem afuncionais (BIEWENGA; VAN DEN BRON, 1981; GRANERUS, 2000).

### 6.1 URÉIA E CREATININA SÉRICA

Os valores de uréia sérica ficaram dentro da normalidade para os cães do grupo dos Normais. Nos animais do grupo GRMD, os valores de uréia sérica nem sempre se mantiveram dentro do valor de referência de 40 mg/dL (Valor de referência do Laboratório Clínico do HOVET-USP). Uma amostra do animal I3 apresentou valor aumentado, e duas amostras dos animais M5 e 2L2 também estavam acima do limite estabelecido.

A uréia é um produto metabólico nitrogenado sintetizado no fígado, através do ciclo da ornitina, a partir da amônia derivada do catabolismo dos aminoácidos originados de proteínas endógenas e exógenas (DIBARTOLA, 1997; KERR, 2003). Depois de formada, a uréia é transportada pelo plasma até os rins, onde é excretada na urina (KERR, 2003).

Se houver desidratação e depleção de volume, ocorre uma diminuição da velocidade do fluxo tubular e a uréia sofre reabsorção tubular passiva, e a sua eliminação é diminuída sem que haja decréscimo na Taxa de Filtração Glomerular. Assim, a eliminação de uréia não é estimativa confiável da Taxa de Filtração Glomerular, e sua concentração pode ser afetada por vários fatores diferentes, e o

mais importante é o fator renal, causado pela insuficiência renal (DIBARTOLA, 1997; KERR, 2003; BARSANTI et al., 2004).

Os valores da uréia podem estar aumentados ou diminuídos dependendo do estado do animal. Além do fator renal, há também os fatores pré-renais e pós-renais para o aumento da uréia (KERR, 2003). Os fatores pré-renais são alimentação rica em proteína, deficiência de carboidratos, sangramento gastrointestinal onde o sangue é uma fonte de proteína endógena, estados catabólicos como nos casos de neoplasias, insuficiência cardíaca congestiva, hipovolemia que pode ser causada por desidratação ou hipoadrenocorticismo. Os fatores pós-renais têm como causas mais comuns a obstrução uretral e a ruptura de bexiga onde nesses casos a uréia é reabsorvida pela corrente sanguínea. A diminuição da uréia ocorre devido a deficiência protéica, septicemia grave, problemas hormonais com efeitos anabólicos esteróides, ou falha no ciclo da uréia devido a alteração congênita no metabolismo, desvio portocaval congênito ou doença hepática em estágio terminal (DIBARTOLA, 1997; KERR, 2003; BARSANTI et al., 2004). Os cães GRMD se encaixariam principalmente nas alterações de origem pré-renais, eles recebem uma alimentação de alta qualidade que tem um alto nível de proteína; a insuficiência cardíaca é um achado de rotina nesses cães devido à degradação da musculatura esquelética em decorrência da progressão da doença; e o último fator pré-renal que observamos nos cães é a dificuldade de apreensão de água e alimentos e sialorréia evidente, que pode ocasionar uma desidratação em relação aos cães normais, pois nos exames clínicos de rotina não foi observado desidratação.

A insuficiência renal é uma de várias condições que afetam as concentrações plasmáticas de uréia (KERR, 2003); portanto o valor de uréia aumentado não é definitivo para o diagnóstico de insuficiência renal, outros exames mais específicos devem ser realizados.

O aumento da uréia não foi significativo, principalmente pelo fato dos cães GRMD receberem uma alimentação com alto valor de proteína, mas o fator principal para esse aumento é provavelmente devido a dificuldade que eles apresentam na apreensão e deglutição de água e alimentos e a intensa sialorréia que faz com que eles tenham uma depleção de volume hídrico.

A creatinina ficou na faixa esperada que é de 1,3 mg/dL (Valores de referência do Laboratório Clínico do HOVET-USP).

A creatinina é o produto da degradação não enzimática da fosfocreatina no músculo, que está envolvida no metabolismo energético, particularmente na estabilização de ligações de fosfato de alta energia não necessárias para uso imediato. A produção diária de creatinina no corpo é determinada em grande parte pela massa muscular do indivíduo e não é afetada pela dieta (DIBARTOLA, 1997; KERR, 2003)

A creatinina não é metabolizada e é excretada pelos rins quase que inteiramente por filtração glomerular. Em estado de equilíbrio, sua velocidade de excreção é relativamente constante e a concentração sérica de creatinina varia inversamente com a Taxa de Filtração Glomerular, sendo assim, a determinação da eliminação da creatinina é uma boa forma para estimar a filtração (DIBARTOLA, 1997).

Segundo DiBartola (1997) os valores normais de creatinina sérica geralmente varia de 0,8 mg/dL a 1,8 mg/dL, enquanto que para Barsanti et al. (2004) os valores são menores que 1,7 mg/dL. O aumento da creatinina no sangue ocorre em todas as patologias renais em que há diminuição da taxa de filtração glomerular, enquanto a sua diminuição não tem significado clínico (SILVEIRA, 1988).

Num teste pré-clínico, valores de uréia e creatinina sérica sozinhos não são validos para assegurar a integridade renal, principalmente quando estudos com injeções de células-tronco ou até mesmo novos agentes terapêuticos são desenvolvidos, como ocorre no caso dos cães GRMD e na intensa busca de novas terapias.

## 6.2 RAZÃO PROTEÍNA:CREATININA URINÁRIA (RPC)

Os valores obtidos de proteína e creatinina urinária foram submetidos à seguinte fórmula (BARSANTI et al., 2004):

$$\text{RPC} = \frac{\text{Proteína Total (mg/dL)}}{\text{Creatinina (mg/dL)}}$$

Todos os cães nesse estudo apresentaram RPC inferior a 1,0, isso demonstra que todos os animais, tanto os cães normais como os cães GRMD

apresentaram-se dentro da normalidade. Lees et al. (2005) referem que valores de RPC acima de 1,0 representam quantidade anormal de proteína na urina, sendo considerada proteinúria patológica. Alguns valores considerados parâmetros para RPC estão demonstrados na tabela 6.

A comparação das médias de RPC de cada animal GRMD com a média dos animais normais teve diferença significativa ( $P < 0,05$ ). Apesar de os dois grupos apresentarem valores abaixo do preconizado, os animais afetados pela distrofia muscular tiveram médias superiores que os animais normais.

A média da RPC dos animais normais foi aproximadamente 0,11 e os cães GRMD tiveram uma RPC média de 0,22.

Tabela 6 – Valores recomendados para a Relação Proteína:Creatinina Urinária (RPC) em cães

<b><i>Autores</i></b>	<b><i>Valores Recomendados</i></b>
Center et al., 1985	<b>0,01 – 0,38</b>
Jergens et al., 1987	<b>0,08 – 1,62</b>
McCaw et al., 1985	<b>0,0 – 0,31</b>
Grauer et al., 1985	<b>0,02 – 0,14</b>
White et al., 1984	<b>0,08 – 0,54</b>

Para White et al. (1984) e Grauer et al. (1985), valores maiores que 1,0 certamente são indicativos de excreção protéica anormal.

Uma relação RPC menor que 0,4 é absolutamente normal e que maior que 2,0 é certamente anormal e que animais com valores intermediários deverão ser submetidos a uma avaliação pela determinação da excreção protéica em 24 horas (CENTER et al., 1985). Nos estudos de Fettman e Rebar (2004), valores abaixo de 1,0 são normais.

De acordo com White et al. (1984) nenhum cão com relação P/C U menor que 1,0 apresentou excreção protéica urinária em 24 horas maior que 30 mg/Kg e também nenhum cão com relação P/C U maior que 1,0 teve perda protéica urinária menor que 30 mg/Kg.

Cães com relação P/C U menores que 1,0 não apresentaram excreção protéica urinária em 24 horas maior que 20 mg/Kg e também cães com relação P/C U maiores que 1,0 não apresentaram excreção protéica urinária em 24 horas menor que 20 mg/Kg (CENTER et al., 1985; GRAUER et al., 1985).

### 6.3 ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS URINÁRIAS

Na avaliação individual das bandas de acordo com o peso molecular aproximado das proteínas dos cães pertencentes ao grupo dos cães normais, foram localizadas apenas duas bandas de proteínas de alto peso molecular. A com peso molecular aproximado de 114000 e 80000 dáltons, Zaragoza et al. (2003), observou essas mesmas 2 bandas de alto peso molecular em cães saudáveis.

Zaragoza (2003) classificou as bandas protéicas encontradas em faixas que variam de 10 em 10, considerando a albumina entre 60 e 70 kDa. De acordo com essa classificação o grupo dos animais desse estudo apresentaram 8 bandas distintas, sendo duas bandas de alto peso molecular, a albumina e outras cinco bandas de peso molecular menor que a albumina.

Nos estudos de Zaragoza (2002, 2003) foi encontrado nos animais normais apenas cinco bandas protéicas. No presente estudo evidenciou-se 3 bandas a mais e são elas: (1) 50-60 kDa; (2) 40-50 kDa e (3) 30-40 kDa. A banda de 50-60 apareceu em 2% da média das amostras de urina, a banda de 40-50 kDa teve a porcentagem de 0,03%, e a última banda de 30-40 kDa teve a média percentual aproximada de 5%.

No outro grupo avaliado, o de cães com distrofia muscular quando reorganizamos as bandas anteriormente descritas e reclassificamos de acordo com Zaragoza (2003), quinze bandas foram encontradas. O número de bandas de alto peso molecular é evidente, e apesar de algumas bandas com peso molecular muito mais alto que o esperado estejam presentes, sabe-se que elas não aparecem em todos os animais do estudo ao mesmo tempo, mas são importantes e serão descritas por não serem encontradas em cães normais, e mesmo em pesquisas de eletroforese urinária de diversas patologias, não existe literatura que relate o aparecimento de proteínas com peso molecular tão alto na urina.

As proteínas que diferem do grupo dos normais são: (1) 230-240 kDa; (2) 200-210 kDa; (3) 180-190 kDa; (4) 160-170 kDa; (5) 130-140 kDa; (6) 90-100 kA e 70-80 kDa. Tanto a albumina como as bandas de peso molecular menor que ela apareceram nos dois grupos estudados.

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). A presença de proteínas de diferentes pesos moleculares na urina de cães saudáveis é normal, mas em pequenas quantidades (FINCO, 1995).

A proteína de Tamm-Horsfall é um constituinte normal da urina de cães (SCHWEIGERT et al., 2002; FORTERRE et al., 2004). Na sua forma nativa a proteína de Tamm-Horsfall é um polímero de peso > 5000 kDa, que sofre dissociação em monômeros de peso em torno de 100 kDa durante a desnaturação por SDS-PAGE (SCHWEIGERT et al., 2002). Portanto a banda protéica que aparece na faixa de proteínas de alto peso molecular após a separação das proteínas por SDS-PAGE, não precisa ser necessariamente interpretada como um componente patológico de origem glomerular, mas deve ser visto como um constituinte normal da urina (RAILA et al., 2007).

A proteína de peso molecular aproximado de 114 kDa que aparece em ambos os grupos pode ser classificada como a proteína de Tamm-Horsfall, que não demonstra nenhuma alteração no presente estudo.

A albumina com um peso molecular 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).

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). 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.

Assim, no presente estudo, os animais estudados não apresentaram proteinúria considerada patológica. Porém apresentaram bandas protéicas de alto peso molecular, um maior percentual de albumina em comparação com os cães

normais e um percentual também aumentado de proteínas de baixo peso molecular (Apêndice C).

Apesar das alterações encontradas para alguns fatores, todos os animais apresentaram-se dentro dos limites de normalidade dos parâmetros pesquisados, não tendo sido detectados sinais clínicos ou laboratoriais que possam confirmar existência de alterações renais nos cães GRMD. No entanto também não ficou descartada a possibilidade da existência de alterações subclínicas na função renal. Os achado de proteínas de alto peso molecular, são um forte indício que não haja integridade glomerular, e a não reabsorção dessas proteínas e sua conseqüente passagem pelo glomérulo e posteriormente túbulo renal, além de indicar um possível dano glomerular pode causar também dano tubular. A proteína de alto peso pode causar dano no túbulo renal, por ser uma molécula grande, e o aumento de proteínas de baixo peso molecular, mesmo que não seja estatisticamente significativo também contribui para reforçar a idéia de que existam alterações renais, mesmo que subclínicas.

Gatti (2007) e Souza (2007), avaliaram a taxa de filtração glomerular dos cães GRMD e concluíram que eles apresentam uma taxa de filtração glomerular maior quando comparado com Golden Retriever normais. Esse aumento na filtração pode ser uma possível explicação para o fato desses animais não apresentarem proteinúria patológica, e nem a creatinina sérica aumentada.

Em condições renais fisiológicas, a produção de urina deve diminuir se houver desidratação (FINCO, 1995c) e não ocorreu nos cães GRMD (SOUZA, 2007), apesar de eles apresentarem uma desidratação leve (6 a 7%), da dificuldade de deglutição de alimento e água e a perda de líquido pela saliva.

Ainda segundo Souza (2007), relata o aumento da taxa de filtração glomerular e um aumento na excreção urinária de proteína, sem a existência de sinais típicos de doença renal. Estes dados permitiu que a hipótese dos cães afetados tenham um aumento da pressão capilar glomerular. Neste caso, haveria hiperfiltração desencadeada por glomerulopatia por lesão mínima (BROWN, 1995) ou pela redução do número de glómerulos funcionantes em decorrência da doença assemelhada à displasia renal, ou à doença glomerular hereditária do cão samoieda (FINCO, 1995d).

Exames histológicos de fragmentos renais podem dar mais informações à respeito da integridade tubular e glomerular renal, e provavelmente elucidar a

origem do aparecimento de bandas protéicas de alto peso molecular. Além de também poder correlacionar o fato de esses cães terem uma taxa de filtração glomerular, explicar não encontrarmos proteinúria.



## 7 CONCLUSÕES

1. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio é eficaz para a avaliação qualitativa das proteínas urinárias.

2. A Distrofia Muscular de Duchenne em cães da raça Golden Retriever, não cursa com proteinúria patológica.

3. Os valores da razão proteína:creatinina dos cães GRMD, apesar da normalidade, apresentam valor superior aos cães normais.

4. Não se pode afirmar que haja nos cães GRMD lesão renal, tanto pelos exames de rotina, quanto pelos valores de razão proteína:creatinina. Padrões estes que são os mais usados.

5. Os cães GRMD apresentaram um valor da proteína albumina maior que os cães normais. Sugere-se que sejam feitos mais testes para confirmar se há microalbuminúria nesses animais e aí sim um forte indício de lesão renal precoce, mesmo que não haja proteinúria.

6. As proteínas de baixo peso molecular estão aumentadas nos cães GRMD quando comparadas com os animais normais, podendo indicar alteração tubular.

7. Proteínas de alto peso molecular foram encontradas nas amostras de urina dos cães GRMD, proteínas de tamanho muito maior que o esperado, mesmo quando observado em outras patologias. O total da quantidade de proteínas de alto peso molecular nos cães GRMD é menor quando comparada com os cães normais, mas o fato de observar proteínas de pesos muito altos torna necessária a identificação dessas proteínas, para avaliar se há algum comprometimento da permeabilidade glomerular.

## REFERÊNCIAS

- BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Protein concentration in urine of normal dogs. **American journal of veterinary research**, v. 40, n. 1, p. 1583-8, 1979.
- BARSANTI, J. A.; LEES, G. E.; WILLARD, M. D.; GREEN, R.A. Urinary Disorders. In: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. **Small animal clinical diagnosis by laboratory methods**, 4. ed., Philadelphia: W.B. Saunders, 2004. cap. 7, p. 135–164.
- BARTLETT, R. J.; WINAND, N. J.; SECORE, S. L.; SINGER, J. T.; FLETCHER, S.; WILTON, S.; BOGAN, D. J.; METCALF-BOGAN. J. R.; BARTLETT, W. T.; HOWELL, J. M.; COOPER, B. J.; KORNEGAY, J. N. Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 650-654, 1996.
- BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. **Journal of the american animal hospital association**, v. 38, p. 255-261, 2002.
- BERRY, C. R.; GASCHEN, F. P.; ACKERMAN, N. Radiographic and ultrasonographic features of hypertrophic feline muscular dystrophy in two cats. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 33, n. 6, p. 357-364, 1992.
- BIBLIOMED INC. **Distrofia muscular de Duchenne**. 2004. Disponível em: <http://www.espacorealmedico.com.br> Acesso em: 15 set. 2008.
- BIEWENGA, W. J.; VAN DEN BRON, W. E. Assessment of glomerular filtration rate in dogs with renal insufficiency: analyses of the 51 Cr-EDTA clearance and its relation to the plasma concentrations of urea and creatinine. **Research in Veterinary Science**, v. 30, p. 158-160, 1981.
- BIGGAR, W. D. ; DOUGLAS, M. D. ; KLAMUT, H. J. ; DEMACIO, P. C. ; STEVENS, D. J. ; RAY, P. N. Duchenne Muscular Dystrophy: Current knowledge, Treatment, and Future Prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 401, p. 88-106, 2002
- BOGDONOVICH, S.; PERKINS, K. J.; KRAG, T. O.; KHURANA, T. S. Therapeutics of Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal of Molecular Medicine**, v. 82, p. 102-115, 2004.
- BRENNER, B.M.; HOSTETTER, T. H.; HUMES, H. D. Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. **New england journal of medicine**, v. 298, p. 826, 1978.

BROWN, S. A. Primary diseases of glomeruli. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**, Baltimore: Willims & Wilkins, p. 368-80, 1995.

CAROMANO, F. A. Características do Portador de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)-**Revisão arquivos de ciências da saúde da Unipar**, v.3, p. 211-218, 1999.

CENTER, S. A.; WILKINSON, E.; SMITH, C.A.; ERB, H.; LEWIS, R.M. 24-hour urine protein/creatinina ratio in dogs with protein-losing nephropathies. **Journal of american veterinary medical association**, v. 187, n. 8, p. 820 – 824, 1985.

CHARGÉ, S. B; RUDNICK, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiology review**, v. 84, p. 209- 238, 2004.

CHEW, D.; DIBARTOLA, S. Diagnosis and pathophysiology of renal disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. p. 1893-1961.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. L.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contractin injury in dystrophic canine muscle. **Archives of physical medicine and rehabilitation**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, M. J. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. **American journal of physical medicine & rehabilitation**, v. 80, p. 175-181, 2001.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, n, 84, p. 165-172, 2003.

DIBARTOLA, S. P. Abordagem Clínica e Avaliação Laboratorial da Afecção Renal. In: ETTINGER, S. J., FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Moléstias do cão e do gato**. 4ed. São Paulo: Manole, 1997, cap. 132, p. 2355-2373.

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.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. O aparelho urogenital. In: **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 110-139. 1997.

ELLEMPORT, C. R. Aparelho urogenital In: GETTY, R. **Sisson/Grossman – anatomia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. p. 1445-1465.

ERAZO-TORRICELLI, R. Actualización en distrofias musculares. **Revista de Neurologia**, v. 39, p. 860-871, 2004.

FAUVEL, J. P.; LAVILLE, M. Protéinurie. **Néphrologie & Thérapeutique**, v. 2, p. 32-40, 2006.

FETTMAN, M. J.; REBAR, A.. Laboratory evaluation of renal function. In: THRALL, M. A. **Veterinary hematology and clinical chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. cap.21, p. 301-328.

FINCO, D. R. Applied physiology of the kidney. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology**. 2. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, p. 26-46, 1995a.

FINCO, D.R. Congenital, inherited, and familial renal diseases. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 471 – 480, 1995d.

FINCO, D.R. Evaluation of renal function. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 215-30, 1995c.

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

FINCO, D.R. Urinary protein loss. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, D.R. **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: Willims & Wilkins, p. 211-15, 1995b.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine dogs with renal disease using ProteinChip analysis. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 16, p. 271-277, 2004.

GAIAD, T. P. **Influência da fisioterapia na função motora e histopatologia da fibra muscular esquelética no modelo Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD)**. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GATTI, A. **Estudo da função glomerular em Golden Retrievers normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GRANERUS, G. **Njurarna och ovre urinvagarna**. Sweden: Studentlitteratur, lund, 2000.

GRAUER, G. F.; THOMAS, C. B.; EICKER, S. W. Estimation of quantitative proteinúria in the dog, using the protein-to-creatinine ration from a random, voided sample. **American Journal of veterinary research**, v. 46, n. 10, p. 2116–2119, 1985.

GÖRG, A.; POSTEL, W.; WESER, J.; SCHIVARAGIN, H. W. Horizontal SDS eletrophoresis in ultrathin pore-gradient gels for the analysis of urinary proteins. **Science tools**, v. 32, n. 1, p. 5-9, 1985.

HARDWICKE, J. Laboratory aspects of proteinuria in human disease. **Clinical nephrology**, v. 3, p. 37-41, 1975.

HARRINSON, T. R.; BRAUNWALD, E. **Principles of internal medicine**. 1987. v. 1, p. 1000; 2013-2074.

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.

HEIENE, R.; BIEWENGA, W. J.; KOEMAN, J. P. Urinary alkaline phosphatase and  $\gamma$ -glutamyl transferase as indicators of acute renal damage in dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v. 32, p. 521-524, 1991.

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: Windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topical Membrane**, v. 38, pag. 113-154, 1991.

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. 12, n. 3, p. 369-373, 1998.

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 dogs with chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 222, n. 3, p. 322-329, 2003.

JERGENS, A. E.; MCCAWE, D. L.; HEWETT, J. E. Effects of collection time and food consumption on the urine protein/creatinine ratio in the dog. **American journal of veterinary research**, v. 48, n. 7, p. 1106–1109, 1987.

KAWAKAMI, H.; MURAKAMI, T.; KAJII, T. Normal values for 24-h urinary protein excretion: total and low molecular weight proteins with a sex-related difference. **Clinical Nephrology**, v. 33, n. 5, p. 232-236, 1990.

KERR, M. G. Substâncias Nitrogenadas. In: **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica clínica e Hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003, p. 119 – 130.

KHURANA, T. S.; DAVIES, K. E. Pharmacological Strategies for Muscular Dystrophy. **Nature Reviews**; v. 2, p. 379-390, 2003.

KÖNIG, H. E.; RUBERTE, J.; LIEBICH, H. G. Aparelho Urogenital. In: KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. **Anatomia dos Animais Domésticos – Órgãos e Sistemas**. Porto Alegre: Artmed, p. 15 – 79, 2004.

- KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Contraction force generated by tarsal joint flexion and extension in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Journal of the neurological sciences**, v. 166, p. 115-121, 1999.
- KORNEGAY, J. N.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; CHILDERS, M. K.; CUNDIFF, D. D.; PETROSKI, G. F.; SCHUELER, R. O. Tarsal joint contracture in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Laboratory animal science**, v. 44, p. 331-333, 1994.
- KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C. S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 493-500, 2003.
- 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.
- LAPIN, A.; GABL, F.; KOPSA, H. Diagnostic use of an analysis of urinary proteins by practicable sodium dodecyl sulfate electrophoresis method and rapid two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 10, p. 589-95, 1989.
- LAU, Y. K.; WOO, K. T. SDS-PAGE is underutilized 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 functional 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.
- LESS, G. E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 34, p. 867-885, 2004.
- LESS, 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 (small animal). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 337-385, 2005.
- LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A. Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, p. 59-72, 1990.
- LUSTGARTEN, J. A.; WEN, R. E. Simple, rapid, kinetic method for serum creatinine measurement. **Clinical Chemistry**, v. 8, p. 1419-1422, 1972.
- MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphology and Science**; v. 21, p. 145-152, 2004.
- MARSHALL, T.; WILLIAMS, K.M. Electrophoretic analysis of Bence Jones proteinuria. **Electrophoresis**, n. 20, p. 1307-1324, 1999.

MCCAWE, D. L.; KNAPP, D. W.; HEWETT, J. E. Effect of collection time and exercise restriction on the prediction of urine protein excretion, using urine protein/creatinina ratio in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 46, n. 8, p. 1665–1669, 1985.

MECKERRELL, R. E. Miopatias caninas e felinas. In DUNN, J. K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 255-271.

MULLER, P. R.; TRAUTWEIN, G. Harnalyse mittels SDS-Polyacrilamidgelelektrophorese beim Hund. **Zentralblatt für Veterinärmedizin**, 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 quantity. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, p. 43-54, 2000.

NGUYEN, F.; CHEREL, L.; GUIGAND, I.; GOUBAULT-LEROUX, I., WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 100–108, 2002.

NICHOLS, P. L.; LYMN, R. W.; DRISCOLL, P. P.; CLEARFIELD, C. Gene therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Nih Guide**. v. 23, 1994.

OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. Media: Williams & Wilkins, 1995. p. 960.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. A mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of neurological sciences**, v. 129, p. 97-105, 1995.

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

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

PETERSON, A.; EVRIN, E.; BERGGARD, I. Differentiation of glomerular, tubular, and normal proteinuria: determinations of urinary excretion of  $\beta_2$ -microglobulin, albumin and total protein. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 48, p. 1189-1198, 1969.

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

RAILA, J.; AUPPERLE, H.; RAILA, G.; SCHOON, H. A.; SCHWEIGBERT, F. J. Renal pathology and urinary protein excretion in a 14-month-old Bernese Mountain Dog with chronic renal failure. **Journal of veterinary medicine series A**, n. 54, p. 131-135, 2007.

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.

SCHATZBERG, S. J.; ANDERSON, L. V. B.; WILTON, S. D.; KORNEGAY, J. N.; MANN, C. J.; SOLOMON, G. G.; SHARP, N. J. H. Alternative dystrophin gene transcripts in Golden Retriever muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 21, p. 991-998, 1998.

SCHULTZE, A. E.; JENSEN, R. K. Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 18, p. 93-97, 1989.

SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J.; HAEBEL, S. Vitamin A excreted in the urine of canines is associated with a Tamm-Horsfall like protein. **Veterinary research**, v. 33, p. 299-311, 2002.

SHARP, N.; KORNEGAY, J. N.; VAN CAMP, S. D.; HERBSTREITH, M. H.; SECORE, S. L.; KETTLE, S.; HUNG, W. Y.; CONSTANTINOU, C. D.; ROSES, A. D. An error in dystrophin mRNA processing in Golden Retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. **Genomics**, v. 13, p. 115-121, 1992.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, n. 3, p. 240-244, 2001.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 127-138, 2005.

SILVEIRA, J. M; Urinálise clínica. In: **Patologia Clínica Veterinária – Teoria e Interpretação**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. p. 67–85.

SOUZA, A. P. **Função renal e homeostase de água, sódio e potássio em cães da raça Golden Retriever normais, portadores e afetados pela distrofia muscular**. 2007. 118 f. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista – UNESP – SP, 2007.

SQUIRES, R. Tackling the problem of proteinuria. **In Practice**, v. 16, n. 1, p. 30-36, 1994.

TKATCHENKO, A. V.; PIÉTU, G.; CROS, N.; GANNOUN-ZAKI, L.; AUFRAY, C.; LÉGER, J. J.; DECHESNE, C. A. Identification of altered gene expression in skeletal muscle from Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorder**, v.11, p. 269- 277, 2001.



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-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal, 2001.

UMBREIT, A.; WIEDEMANN, G. Determination of protein fractions. A comparison with different electrophoretic methods and quantitatively determined protein concentrations. **Clinica Chimica Acta**, v. 297, p. 163-172, 2000.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 36, p. 543-555, 2003.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increase Serum Alanine Aminotransferase Activity Associated with Muscle Necrosis in the Dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990.

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

WEBER, M. H. Urinary protein analysis. **J. Chromatogr.**, v. 429, p. 315-344, 1988.

WHITE, V.; OLIVIER, N. B.; REIMANN, K.; JOHSON, C. Use of protein-to-creatinine 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 Research**, 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-polyacrilamde gel electrophoresis (SDS-PAGE) an western blotting of the urinary proteins. **Journal of Comparative Pathology**, v. 129, p. 169-178, 2003a.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - RECEITAS DE SOLUÇÕES EMPREGADAS PARA SDS PAGE

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

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

Acrilamida	146,0 g
N' N' Metholene – bis Acrilamida	4,0 g
Água destilada para 500 ml. Filtrar e estocar a 4°C em recipiente escuro. Máximo 30 dias.	

##### **1,5M Tris – HCl, PH 8,8**

Trizima Base	54,45 g
Água destilada	150,0 ml
Ajustar o pH para 8,8 com HCl. Completar com água destilada para 300 ml. Estocar a 4°C.	

##### **0,5M Tris – HCl, pH 6,8**

Trizima Base	6,0 g
Água destilada	60,0 ml
Ajustar o pH para 6,8 com HCl. Completar com água destilada para 100 ml. Estocar a 4°C.	

**10% (w/v) SDS**

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

**10% (w/v) Persulfato de Amônio**

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

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

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

**5X Tampão do Eletrodo (Tampão de corrida)**

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

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

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

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

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

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

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

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

Coomasie Brilliant Blue R-250 2,5 g

Dd H<sub>2</sub>O Qs to 250,0 ml

Homogenizar com um homogenizador magnético e filtrar.

**Solução corante**

Coomasie Stock Solution 125,0 ml

Metanol 500,0 ml

Ácido acético 100,0 ml

Dd H<sub>2</sub>O 1000,0 ml

Homogenizar magnéticamente

**Solução descorante**

Metanol 250,0 ml

Ácido acético 100,0 ml

Dd H<sub>2</sub>O 1000,0 ml

Homogenizar magnéticamente

**Solução fixadora**

Metano 40%

Glicerol 3%

**APÊNDICE C – REPRESENTAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE PROTEÍNAS DE ALTO E BAIXO PESO MOLECULAR.**

<b>PROTEÍNAS</b>	<b>GRMD</b>	<b>NORMAIS</b>
<b>Alto Peso Molecular</b>	<b>23,4%</b>	<b>34,83%</b>
<b>Albumina</b>	<b>26,5%</b>	<b>16,93%</b>
<b>Baixo Peso Molecular</b>	<b>65,78%</b>	<b>48,21%</b>