RICARDO DUARTE LOPES

Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida, contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page)

São Paulo

2020

RICARDO DUARTE LOPES

Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida, contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page)

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

Departamento:

Clínica Veterinária

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Marcia Mery Kogika

São Paulo

2020

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3923
FMVZ

Lopes, Ricardo Duarte
Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida, contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page) / Ricardo Duarte Lopes. – 2020.
130 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Mery Kogika.

1. Proteinúria. 2. Canino. 3. Stain Free®. 4. Prata. 5. Coomassie. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida ,contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page).-1", protocolada sob o CEUA nº 7026010218 (ID 004701), sob a responsabilidade de **Márcia Mery Kogika** *e equipe; Ricardo Duarte Lopes* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/03/2018.

We certify that the proposal "Electrophoresis of urinary protein validation in dogs with gel polyacrylamide staining of sodium dodecyl sulfate (SDS-Page)", utilizing 100 Dogs (males and females), protocol number CEUA 7026010218 (ID 004701), under the responsibility of **Márcia Mery Kogika** *and team; Ricardo Duarte Lopes* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/14/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 02/2018 a 02/2020 Área: Clínica Médica Veterinária

Origem:	Amostras biológicas estocadas						
Espécie:	Cães	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	05 a 240 meses	N:	100
Linhagem:	Todas as raças			Peso:	500 a 80000 g		

Local do experimento: Laboratorio Clinico do Departamento de Clinica Medica da FMVZ-USP

São Paulo, 01 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LOPES, Ricardo Duarte

Título: Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida, contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page)

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

Data: _____/_____/_____

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr._____

Instituição:_____ Julgamento:_____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais Carlos e Cristina, a minha esposa Lilia, ao meu filho Enzo e as minhas irmãs Juliana, Luciana e Mariana que sempre me derem muito apoio e força em todas as minhas escolhas, contribuindo muito para a minha formação profissional e pessoal.

Não posso esquecer também da minha orientadora Marcia Mery que sempre me incentivou e orientou neste novo caminho da pesquisa.

A toda equipe do laboratório clínico Provet, onde me incentivam e me ajudam na evolução da minha jornada profissional e pessoal.

A minha cachorra Maggie, sempre presente ao meu lado e que nos deixou próximo ao término desta dissertação, deixando muita saudade. Não podendo esquecer do Tico, Teco e Lilica, meus pets que sempre tiveram ao meu lado e me ajudaram a ser um melhor médico veterinário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Provet por acreditar neste trabalho e na minha capacidade profissional ao longo destes anos, em especial ao Rubem Montoni Junior e a Tatiana Moura Montoni por acreditar no meu potencial, crescimento pessoal e profissional, assim como, auxiliando no financiamento deste projeto, assim como o Rogerio Soila que sempre me acolheu e com toda a sua paciência proporcionou grandes ensinamentos pessoais e profissionais para a minha vida.

Imensa gratidão a FMVZ USP de São Paulo por proporcionar este aprendizado e oportunidade, como também e diretoria e todos os membros do programa de pós graduação desta conceituada Universidade, me acolheram com bastante carinho, paciência e proporcionaram muito conhecimento para a realização deste trabalho. Todos os simpósios, alunados e conversas de corredor com certeza me ajudaram muito e vou levar estes ensinamentos para o restante da minha vida. Sei da imensa dedicação e esforço que todos os professores, alunos e funcionários têm com a Universidade e fazem de tudo para ajudar aos alunos e principalmente aos animais. Parabéns a todos.

Agradeço ao meu filho e a esposa Lilia por suportarem esta fase da minha vida, assim como, toda ausência que tive que fazer para a conclusão deste estudo, como também o companheirismo, cumplicidade, e incentivo que dão no dia a dia.

Agradeço imensamente e sem palavras para descrever a minha querida orientadora Marcia Mery, com toda a sua carisma, paciência, inteligência e muito obrigado por passar todo o seu conhecimento, além de toda a sua vontade de nos tornar melhores pesquisadores e uma melhor pessoa, assim como, me aceitar como seu orientado, mesmo com toda a minha ausência por ter uma vida muito atarefada. Não poderia de deixar de agradecer também todos os seus orientados, Cinthia Martorelli, Douglas Caragelasco, Fernanda Chacar, Natalia Garla e Bruna Ruberti, onde, mesmo em locais diferentes, sempre estávamos juntos para um bem maior, e me ajudaram muito para conseguir entrar no programa. Não me esquecerei de todas as conversas, auxílios e conselhos que

me deram em toda esta jornada do mestrado, passando muito de seus conhecimentos e experiência.

Agradeço a querida professora Mitika que sempre me incentivou a estudar e demonstrou com muito carinho sua paixão pela pesquisa científica, sendo uma ótima coordenadora do curso de especialização de patologia clínica veterinária na qual eu fiz, e sempre aconselhando na especialidade clínica que escolhi.

Aos meus pais que sempre me apoiaram nas minhas escolhas e me proporcionaram a melhor educação que um filho realmente precisa, com muito amor, cumplicidade, alegria e carinho. Sempre com aquelas palavras acolhedoras e incentivadoras que todos precisam ter para continuar nesta jornada chamada “vida”.

A todos os técnicos e veterinários do laboratório clínico Provet onde entenderam a minha ausência por alguns momentos, assim como no auxílio técnico deste trabalho. Em especial a veterinária Fernanda Faria, Regina Ruiz e Carolina Falleiros e as técnicas Luciana e Larissa que me ajudaram na triagem e análises das amostras.

As orientandas e veterinárias Fernanda e Bruna que me auxiliaram muito na estatística deste trabalho, ajudando a entender melhor e conseguir fazer as análises. Assim como o Douglas que me ensinou com toda a sua paciência a técnica utilizada em seus trabalhos anteriores.

RESUMO

LOPES, R.D. Validação Laboratorial da Eletroforese de Proteína Urinária de cães em Gel de Poliacrilamida,contendo Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-Page). 2020. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Introdução: o estudo de validação para verificar a repetitividade e reprodutibilidade com o uso de diferentes colorações ou sistema de marcação de bandas de proteínas da urina de cães, na eletroforese em gel de poliacrilamida, seria de grande importância pois alicerçariam informações fidedignas acerca da investigação da proteinúria de forma qualitativa e quantitativa, pela confiabilidade nos métodos e interpretação clínica adequada. Ainda, a possibilidade de comparação entre as colorações e sistema de marcação de bandas de proteínas poderá indicar o melhor procedimento laboratorial. **Métodos**: amostras de urina com diferentes concentrações de proteínas, denominadas como *pools* 1, 2 e 3, com valores da razão proteína creatinina urinária (RPC) de 0,04, 1,48 e 14,41, respectivamente, foram submetidas a avaliação do intra (repetição de 10 determinações no mesmo dia) e inter (repetição de 10 determinações no mesmo dia e repetidos consecutivamente em 3 dias seguidos) ensaios na eletroforese em gel de poliacrilamida no atinente aos pesos moleculares e porcentagem de densidade óptica das bandas. Foram empregadas as colorações pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, como também pelo sistema Stain-Free®. **Resultados:** os coeficientes de variação para os pesos moleculares, no intra e inter ensaios, foram praticamente inferiores a 5% (variação de 0,41% a 6,55%) em todas as colorações e o Stain-Free®. Para a porcentagem de densidade óptica, o coeficiente de variação foi superior a 5% no intra (valor máximo de 28,95% na coloração do azul brilhante de Coomassie) e inter (valor máximo de 28,03%, também na coloração azul brilhante de Coomassie) ensaios e ambos na amostra de *pool* 3. Os coeficientes de variação foram maiores nas bandas de proteínas com maior porcentagem de densidade óptica, como também maiores na coloração Prata e coeficientes de variação menores para o sistema Stain-Free®. O sistema Stain-Free® foi o que apresentou com maior frequência diferença significante com as colorações azul brilhante de Coomassie e Prata. **Conclusão:**

a repetitibilidade e a reprodutibilidade foram adequadas para a detecção das bandas dos pesos moleculares em todas as colorações e o Stain-Free®, não ocorrendo o mesmo para a porcentagem de densidade óptica, entretanto o sistema Stain-Free® foi o que apresentou os menores coeficientes de variação quando comparado as outras colorações.

Palavras-chave: Proteinúria. Canino. Stain-Free®. Coloração Prata. Coloração Coomassie

ABSTRACT

LOPES, R.D., Laboratory validation of the polyacrylamide gel electrophoresis of dogs containing sodium dodecyl sulfate (SDS-Page). 2020. 130 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Introduction: the validation study in order to verify the repeatability and reproducibility by the use of different stains or protein bands marker of urinary protein in dogs by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis is the great importance as those information could support reliable information by means of qualitative and quantitative investigation of proteinuria as well as to achieve adequate clinical interpretation due to the reliability of the methods. In addition, the possibility of the comparison among stains and protein bands marker could guide for better laboratorial procedures. **Methods**: urine samples of different concentrations of proteins called as *pools* 1, 2 and 3 showing urinary protein creatinine ratio (UPC) of 0.04, 1.48 and 14.41, respectively, were submitted to intra (repetition of 10 measurements on the same day) and inter (repetition of 10 measurements on the same day and that procedure repeated consecutively along 3 consecutive days) assays by the use of SDS polyacrylamide gel electrophoresis for the evaluation of molecular weights and percentage of densitometric analysis. Coomassie brilliant blue and silver stains were used as well as the Stain-Free® system. **Results**: the coefficients of variation for the molecular weights detected in the intra and inter assays were in its majority less than 5% (range of 0.41% to 6.55%) and were observed in all stains and Stain-Free® system. In relation to the percentage densitometric analysis of the protein bands, the coefficient of variation was greater than 5% in the intra assay (maximum value of 28.95% at the Coomassie blue stain) and inter assay (maximum value of 28.03% at Coomassie blue stain), and both observed in the *pool* 3 sample. The coefficients of variation were higher at protein bands with a higher percentage of densitometric analysis, and higher values were detected by the use silver stain and lower in the Stain-Free® system. The Stain-Free® system was one of the most that showed significant difference with the Coomassie brilliant blue and silver stains. **Conclusion**: repeatability and reproducibility were adequate for the detection of the protein molecular weight bands by the use of stains and Stain-Free® system, however not observed for

the percentage of densitometric analysis of bands, and the Stain-Free® system showed the lowest coefficients of variation when compared to the others stains.

Keywords: Proteinuria. Canine. Stain-Free®. Silver stain. Coomassie blue stain

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Capilar glomerular - desenho esquemático de uma parte de um glomérulo com os componentes relacionados a barreira de filtração de proteínas: glicocálix endotelial, frenestras endoteliais, membrana basal e podócitos. 29
Figura 2 - Figura esquemática de algumas funções dos podócitos e substâncias responsáveis pela manutenção do citoesqueleto e o seu formato 30
Figura 3 - Modelo esquemático da teoria da membrana basal glomerular em relação a seletividade das proteínas por aumento da pressão. Em condições efêmeras, há mudança física dos podócitos, alterando a permeabilidade da membrana basal e a passagem de macromoléculas.. 31
Figura 4 - Figura esquemática da captação das proteínas por endocitose nas células tubulares proximais em bordadura em escova. Receptores como a Megalina, Cubilina e os Amnionless são responsáveis pelo processo de endocitose. 32
Figura 5 - Cuba vertical e fonte utilizado para a realização da eletroforese de proteínas da urina, ambas do fabricante Bio-Rad® 43
Figura 6 - Sistema utilizado para revelação das bandas de eletroforese pelo método Stain-Free®, utilizando bandeja específica de análise. 43
Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha azul encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”. 47
Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha preta encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”. 50
Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo sistema Stain-Free® da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha roxa encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”. 54
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *pool* 2, nas delimitações das linhas azuis

encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P” 57
Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata, amostra do *pool* 2, nas delimitações das linhas pretas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”..... 60
Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo Stain-Free® da amostra do *pool* 2, nas delimitações das linhas roxas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P” 64
Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *pool* 3, nas delimitações das linhas azuis encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P. 67
Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata da amostra do *pool* 3, nas delimitações das linhas pretas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P**”.**..... 71
Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo sistema Stain-Free® da amostra do *pool* 3 nas delimitações das linhas roxa encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P” 74
Figura 16 - Gráficos dos valores da densidade óptica do *pool* 1 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works. 80
Figura 17 – Gráficos dos valores da densidade óptica do *pool* 2 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works. 89
Figura 18 - Gráficos de resultados do *Pool* 3 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works. 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizados no **dia 1**..... 44
Tabela 2 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie, realizados no **dia 2**..... 45
Tabela 3 -Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do pool 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie, realizados no **dia 3.**..... 45
Tabela 4 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie. 46
Tabela 5 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 48
Tabela 6 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 48
Tabela 7 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 49
Tabela 8 - Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata..... 49
Tabela 9 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**. 51

Tabela 10 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 52
Tabela 11 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**. 52
Tabela 12 - Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®. 53
Tabela 13 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**. 54
Tabela 14 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**. 55
Tabela 15 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**. 55
Tabela 16 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie. 56
Tabela 17 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 58
Tabela 18 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela

eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 58
Tabela 19 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 59
Tabela 20 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata. 59
Tabela 21 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**. 61
Tabela 22 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 62
Tabela 23 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**. 62
Tabela 24 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free®. 63
Tabela 25 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizados no **dia 1.** 64
Tabela 26 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizados no **dia 2**. 65
Tabela 27 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas

urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 3**. 66
Tabela 28 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO). 66
Tabela 29 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 68
Tabela 30 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 69
Tabela 31 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 69
Tabela 32 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata (PR). 70
Tabela 33 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**. 71
Tabela 34 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 72
Tabela 35 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**. 72

Tabela 36 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free®. 73
Tabela 37 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**. 75
Tabela 38 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**. 75
Tabela 39 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**. 76
Tabela 40 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie..... 76
Tabela 41 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 77
Tabela 42 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 78
Tabela 43 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 79

Tabela 44 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata. 79
Tabela 45 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**. 81
Tabela 46 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 81
Tabela 47 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**. 82
Tabela 48 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®. 82
Tabela 49 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**. 84
Tabela 50 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**. 84
Tabela 51 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**. 85
Tabela 52 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas

urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie..... 85
Tabela 53 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 87
Tabela 54 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 87
Tabela 55 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 88
Tabela 56 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata. 88
Tabela 57 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1** 90
Tabela 58 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 90
Tabela 59 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3.** 91
Tabela 60 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®. 91

Tabela 61 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 1**..... 93
Tabela 62 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 2**..... 93
Tabela 63 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 3**..... 94
Tabela 64 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie. 94
Tabela 65 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**. 95
Tabela 66 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**. 96
Tabela 67 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**. 96
Tabela 68 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata (PR). 97
Tabela 69 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das

proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**. 99
Tabela 70 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**. 99
Tabela 71 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**. 100
Tabela 72 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®. 100
Tabela 73 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares,** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações e método de marcação de bandas. 101
Tabela 74 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 1, 2 e 3 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações. 102
Tabela 75 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações. 102
Tabela 76 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações. 103
Tabela 77 - Coeficientes de variação das porcentagens de **densidades óptica** das bandas 1, 2 e 3 do intra e inter ensaios do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações. 103
Tabela 78 - - Coeficientes de variação das porcentagens de **densidades óptica** das bandas 4 e 5 do intra e inter ensaios nos dias 1, 2 e 3 do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações. 104

Tabela 79 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações. 105
Tabela 80 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 6, 7, 8, 9 e 10 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações. 105
Tabela 81 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 1, 2, 3 e 4 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações. 106
Tabela 82 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 5, 6 e 7 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações. 106
Tabela 83 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 8, 9 e 10 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações. 106
Tabela 84 - Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 108
Tabela 85 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 108
Tabela 86 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 1 (RPC = 0,04) , segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 108
Tabela 87 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 108
Tabela 88 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 1 (RPC = 0,04) , segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 108
Tabela 89 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 109

Tabela 90 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 109
Tabela 91 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 3**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas. 109
Tabela 92 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas. 109
Tabela 93 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 109
Tabela 94 - Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 110
Tabela 95 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 110
Tabela 96 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 110
Tabela 97 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 110
Tabela 98 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 110
Tabela 99 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 111
Tabela 100 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas. 111

Tabela 101 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 3**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 111
Tabela 102 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 111
Tabela 103 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 111
Tabela 104 – Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 105 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 106 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 107 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 108 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 109 - Estatística do **peso molecular da banda 6**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 112
Tabela 110 - Estatística do **peso molecular da banda 7**, do p*ool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 113
Tabela 111 - Estatística do **peso molecular da banda 8**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 113

Tabela 112 - Estatística do **peso molecular da banda 9**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 113
Tabela 113 - Estatística do **peso molecular da banda 10**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias..... 113
Tabela 114- Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 113
Tabela 115 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 116 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 3**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 117 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 118 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 119 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 6**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 120 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 7**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 114
Tabela 121 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 8**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 115
Tabela 122 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 9**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 115

Tabela 123 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 10**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias. 115

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA 29

2. HIPÓTESE 39

3. OBJETIVOS 39

4. MATERIAL E MÉTODOS 40

4.1 Amostras de Urina 40

4.2 Exame de Urina 40

4.3 Razão proteína/creatinina urinária (RPC) 40

4.4 Conservação 41

4.5 Procedimento das amostras de urina para a determinação do intra e inter ensaios 41

4.6 Técnica para a determinação de eletroforese de proteínas urinárias 42

4.7 Análise dos resultados 44

5. RESULTADOS 44

5.1 Pesos moleculares dos *pools* 44

5.2 Porcentagens da densidade óptica das bandas de proteínas dos *pools* 74

5.3 Coeficiente de variação das amostras de urina dos *pools* 1, 2 e 3 101

5.4 Análise estatística dos *pools* 107

6. DISCUSSÃO 115

7. CONCLUSÃO 122

REFERÊNCIAS 124

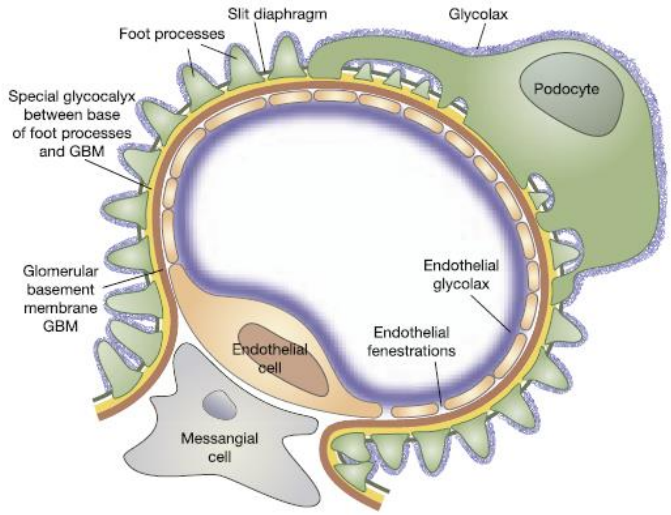
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Os néfrons são as unidades funcionais dos rins e neles estão presentes a cápsula glomerular, os glomérulos, os túbulos proximal, distal e coletor e a alça de Henle, que são responsáveis pela filtração de elementos do plasma sanguíneo e eliminação através da urina de substâncias indesejadas (MARIA; CAVALHEIRO; BREGMAN, 2001).

Uma das possibilidades de perda de proteínas para o filtrado glomerular seria através da barreira glomerular pelo comprometimento da membrana basal e podócitos que apresentam seletividade de carga elétrica e tamanho das moléculas, como também apresentam poros que permitem ou não a passagem de proteínas. Apesar de ainda não existir um consenso sobre o tamanho destes poros, usualmente é descrito que a albumina e as outras proteínas de peso moleculares maiores, como exemplo as imunoglobulinas, não ultrapassam essa barreira (BRAY; ROBINSON, 1984; MARIA; CAVALHEIRO; BREGMAN, 2001).

Ainda estudos estão sendo conduzidos e diversas teorias têm surgido para o entendimento da fisiopatologia da barreira da filtração glomerular e as possibilidades de lesões nas células endoteliais fenestradas, membrana basal ou podócito que resultam em proteinúria (SCHLÖNDORFF; WYATT; CAMPBELL, 2017). Na figura 1 estão representados os elementos dos capilares glomerulares.

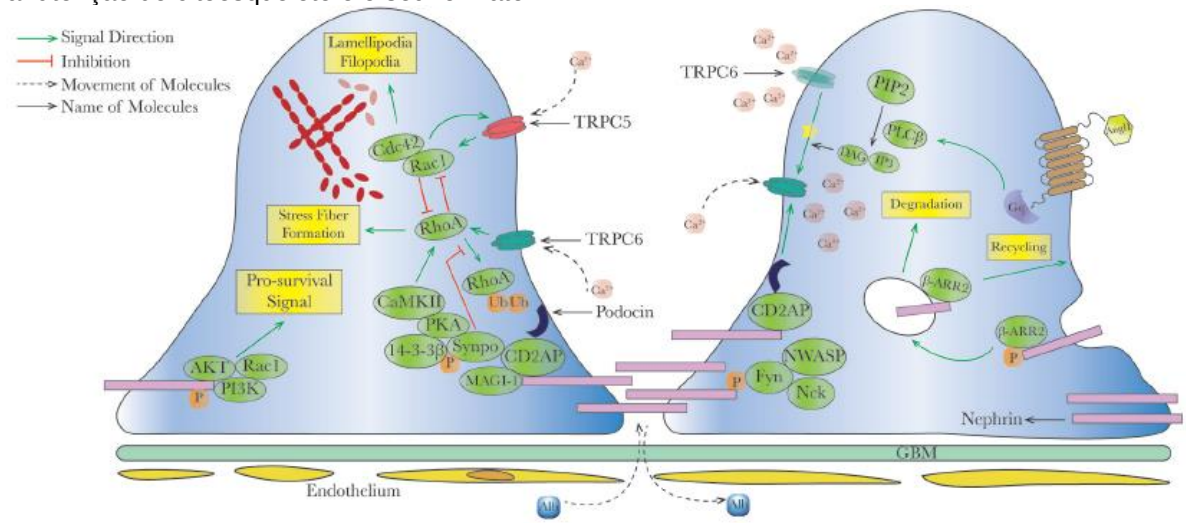
Figura 1 - Capilar glomerular - desenho esquemático de uma parte de um glomérulo com os componentes relacionados a barreira de filtração de proteínas: glicocálix endotelial, frenestras endoteliais, membrana basal e podócitos.



Fonte: (SCHLÖNDORFF; WYATT; CAMPBELL, 2017)

O diafragma da fenda existente entre os podócitos exerce importante função na permeabilidade da membrana basal e as células se interligam de uma forma peculiar, além de executarem diversas funções altamente especializadas. Ainda, nos últimos anos, foram descobertas diversas substâncias responsáveis na preservação ou na falta do citoesqueleto (Figura 2), entretanto muitos estudos e teorias ainda necessitam de discussões verticalizadas para o entendimento adequado de como ocorre permeabilidade das substâncias, (MARIA; CAVALHEIRO; BREGMAN, 2001; GRAHAMMER; SCHELL; HUBER, 2013; SISKA et al., 2017; YU et al., 2018).

Figura 2 - Figura esquemática de algumas funções dos podócitos e substâncias responsáveis pela manutenção do citoesqueleto e o seu formato



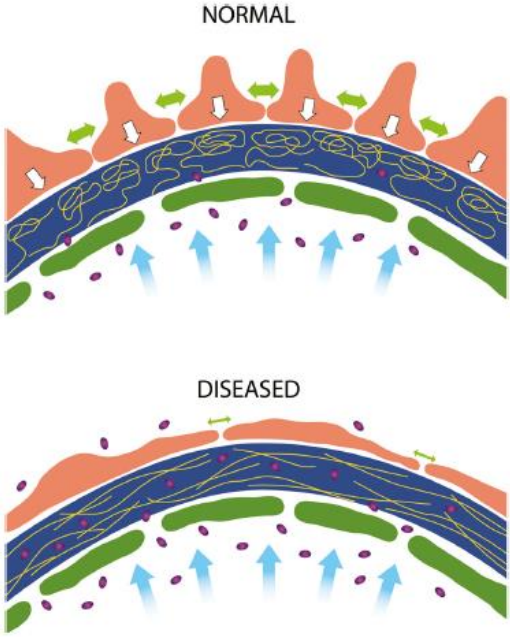
Fonte: (YU et al., 2018)

O aumento da pressão sanguínea nos glomérulos seria umas das principais causas de proteinúria, sugerindo que a pressão exercida nos podócitos ocasione a perda do seu formato (“foot”), comprimindo a membrana basal e, assim, permitindo maior permeabilidade de macromoléculas e aumentando a permeabilidade para a passagem das proteínas de peso molecular maior, como encontra-se configurado na figura 3 (FISSELL; MINER, 2018).

No filtrado glomerular, as proteínas de peso molecular abaixo a da albumina e que ultrapassaram a membrana basal glomerular são posteriormente reabsorvidas pelas células dos túbulos proximais, processo este que ocorre por endocitose, sendo que os principais receptores envolvidos nesse processo são a Megalina e a Cubilina (Figura 4), responsáveis pela reabsorção de diversas proteínas tais como as proteínas carreadoras de vitaminas como a Vitamina D, folato, retinol, vitamina B12. Também

ocorre a reabsorção de outras proteínas e substâncias, como a própria albumina (normalmente presente em pequena quantidade no filtrado glomerular), mioglobina, hemoglobina, transferrina, lactoferrina, assim como lipoproteínas, hormônios, enzimas ou inibidores de enzimas, proteínas do sistema imune, alguns fármacos (aminoglicosídeos, polimixina B, entre outros), cálcio iônico, fatores de coagulação e entre outros (VERROUST, 2002; BIRN; CHRISTENSEN, 2006; TOJO; KINUGASA, 2012; NIELSEN; CHRISTENSEN; BIRN, 2016).

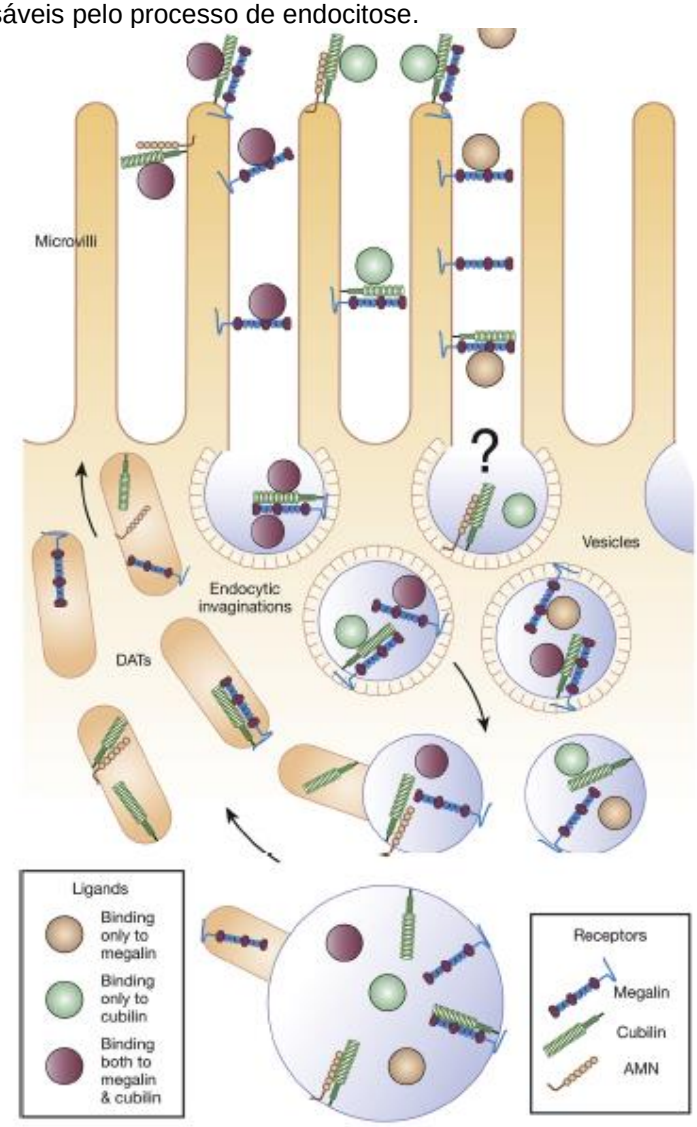
Figura 3 - Modelo esquemático da teoria da membrana basal glomerular em relação a seletividade das proteínas por aumento da pressão. Em condições efêmeras, há mudança física dos podócitos, alterando a permeabilidade da membrana basal e a passagem de macromoléculas



Fonte: (FISSELL; MINER, 2018)

Uma proteína que pode estar presente na urina em condições fisiológica é a proteína de Tamm-Horsfall, conhecida também como Uromodulina, proteína esta sintetizada exclusivamente nas células epiteliais do ramo ascendente na alça de Henle e no túbulo contorcido distal e que apresenta alto peso molecular, próximo de 100 kDa. A diminuição da concentração urinaria desta proteína tem sido utilizada como marcador de perda de nefrons, a exemplo na doença renal crônica (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017).

Figura 4 - Figura esquemática da captação das proteínas por endocitose nas células tubulares proximais em bordadura em escova. Receptores como a Megalina, Cubilina e os Amnionless são responsáveis pelo processo de endocitose.



Fonte: (NIELSEN; CHRISTENSEN; BIRN, 2016)

A proteinúria em cães e gatos é relativamente frequente na rotina clínica e usualmente está associada a inúmeras causas, além da origem diversa, ou seja, de quais segmentos do nefron que poderiam estar comprometidos e, portanto, relacionados com a perda daquelas proteínas. Estudos em cães e gatos, assim como em humanos, sugerem que a proteinúria renal persistente está relacionada com a morbidade e mortalidade, sendo de pior prognóstico quando relacionada com a maior intensidade da proteinúria (LEES et al., 2005; GRAUER, 2011; BROWN et al., 2013). Em um estudo multicêntrico em 1156 pacientes caninos de uma região na Itália, foi observada prevalência de proteinúria em 43,3% de pacientes que eram suspeitos para detecção de proteinúria pelos exames rotineiros do exame químico de urina e confirmada pela determinação da razão proteína/creatinina urinária (RPC)

(GIZZARELLI et al., 2019). Em um estudo prospectivo cohort de cães com doença renal crônica e proteinúricos, animais que apresentavam RPC ≥ 1,0 apresentaram maior frequência para desenvolver crises urêmica e óbito quando comparados aos animais com RPC < 1,0 (JACOB et al., 2005). O aumento da mortalidade também foi citado em outro estudo em que além da proteinúria, o comprometimento da taxa de filtração glomerular e a hipertensão sistêmica seriam fatores importantes para o desfecho clínico (WEHNER; HARTMANN; HIRSCHBERGER, 2008).

A proteinúria pode ser classificada de acordo com sua origem em pré-renal, renal e pós-renal. A proteinúria pré-renal ocorre devido à presença de proteínas livres no plasma, tais como a mioglobinemia e hemoglobinemia, como de outras proteínas de baixo peso molecular que não estão presentes normalmente no filtrado glomerular, como a de Bence-Jones (LEES et al., 2005)

A proteinúria de origem renal pode ser decorrente de fatores funcionais ou transitórios em que geralmente está relacionada com a condição sistêmica, como exemplo, a febre ou exercícios extenuantes. Já a proteinúria renal patológica, seria decorrentes de lesão renal (comprometimento de glomérulos, túbulos e interstício) (LEES et al., 2005).

A proteinúria de origem glomerular é oriunda pelo aumento da filtração glomerular de proteínas plasmáticas, ou seja, do extravasamento de proteínas que normalmente não ultrapassariam a barreira glomerular, como também em decorrência da perda da permeabilidade seletiva da barreira glomerular, ocorrendo a passagem, principalmente de proteínas de alto peso molecular, tal como a albumina, de peso molecular aproximado de 69 kDa (ZARAGOZA et al., 2003; LEES et al., 2005; CARAGELASCO et al., 2017). Ainda, a proteinúria de origem glomerular pode estar associada à hipertensão intraglomerular, intrínseca ou decorrente de hipertensão arterial sistêmica, formação de imunocomplexos, inflamação vascular nos capilares glomerulares, glomerulopatia de origem hereditária, alterações estruturais na membrana basal glomerular (por exemplo, a nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X – defeito no colágeno tipo IV) (VINGE et al., 2010; GRAUER, 2011; LAVOUÉ et al., 2015; SUGAHARA et al., 2015; REBECCA et al., 2018). A proteinúria de origem tubular ocorre devido à diminuição da reabsorção tubular no segmento proximal das proteínas plasmáticas presente normalmente no filtrado glomerular, ou seja, a barreira glomerular está adequada e ainda preserva as características de permeabilidade seletiva sendo, portanto, a proteína de origem tubular caracterizada

pela presença na urina de proteínas de baixo peso molecular ou < 60 kDa. No que se refere à proteinúria de origem intersticial, esta ocorre devido a processos inflamatórios no interstício em que as proteínas alcançam o espaço urinário, por exemplo, na nefrite aguda intersticial (SCHULTZE; JENSEN, 1989; LEES et al., 2005; VINGE et al., 2010; CARAGELASCO et al., 2017).

A proteinúria de origem pós-renal ocorre devido à adição de proteínas na urina após o segmento da entrada da pelve renal e ao longo do trato urinário inferior. A origem pode ser urinária (processos hemorrágicos ou exsudativos em pelve renal, ureter, bexiga urinária e uretra, incluindo a uretra prostática em machos) ou extra urinária (proteínas derivadas de secreções ou de processos hemorrágicos e exsudativos em trato genital ou genitália externa (LEES et al., 2005; GRAUER, 2011).

Na rotina da clínica veterinária, um dos primeiros testes de “triagem” realizado para a avaliação da proteína urinária é pelo uso da fita reagente/bioquímica empregada na realização do exame de urina, sendo este um método semiquantitativo colorimétrico e que qualitativamente, apesar da baixa especificidade e sensibilidade, detecta a presença de albumina, entretanto pode estar associado principalmente a resultados falso positivo (GRAUER, 2011; PIECH; WYCISLO, 2019). A avaliação semiquantitativa da proteína urinária do exame de urina, juntamente com a densidade urinaria, não apresentou correlação adequada quando comparada com a razão proteína/creatinina urinária (RPC) (MEINDL et al., 2019). Ainda, a determinação da albumina na urina requer métodos espécie-específico, como de kits comerciais semiquantitativos ou por método ELISA quantitativo, usualmente não disponíveis na rotina clínica (GRAUER, 2011; SMETS et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2013; MARTORELLI et al., 2016).

Quando há suspeita de proteinúria de origem renal, é recomendada a quantificação das proteínas totais presentes na urina juntamente com a determinação da concentração de creatinina urinária, para assim calcular a razão proteína/creatinina urinária (RPC), sendo condição *sine qua non* a análise conjunta dos achados do exame de urina (sedimento urinário) daquela mesma amostra de urina para excluir a proteinúria de origem pré-renal ou pós-renal. Para o cálculo da RPC, é importante determinar a concentração da creatinina urinária, pois esta permite anular a variação da diluição e do volume urinário em um período de 24 horas sobre a quantificação de proteinúria, já que a coleta de todo o volume de urina produzido em um período de 24 horas seria inviável na maioria dos casos e que se assemelha ao procedimento

adotado na pediatria humana (LEES et al., 2005; GRAUER, 2011), mas alguns estudos demonstram que a presença de bacteriúria presente na amostra possa aumentar falsamente os valores de RPC e, assim, recomenda-se a repetição do teste após a resolução da infecção (MEINDL et al., 2019). Ainda, para evitar qualquer dúvida, recomenda-se a confirmação da urocultura negativa nas amostras de urina para o cálculo da RPC.

Atualmente suscitam-se discussões acerca da necessidade de orientação adequada quanto a forma de obtenção da amostra de urina, como também da avaliação físico-química e da sedimentoscopia para a mensuração da RPC e sua adequada interpretação, como também da possibilidade de ocorrer variação dos resultados oriundos de diferentes laboratórios clínicos veterinários que pode acarretar em interpretações e condutas clinicas diferentes ou até mesmo inadequadas (BEATRICE et al., 2010; DUFFY; SPECHT; HILL, 2015; ROSSI et al., 2015; SHROPSHIRE; QUIMBY; CERDA, 2018). No relativo a forma de obtenção das amostras de urina para a determinação da RPC, aquelas obtidas por cistocentese ou por micção espontânea não apresentaram alterações relevantes (BEATRICE et al., 2010), entretanto as amostras de urina obtidas principalmente no domicílio pelo tutor/ proprietário devem ser questionadas devido a possibilidade de “contaminação”, mas também pode apresentar resultados mais fidedignos pela ausência do fator de estresse (DUFFY; SPECHT; HILL, 2015; SHROPSHIRE; QUIMBY; CERDA, 2018).

Segundo a IRIS, (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2019) o valor normal de RPC para cães não azotêmicos a ser considerado é inferior a 0,2, entre 0,2 e 0,5 são valores questionáveis ou suspeitos ou com proteinúria *borderline* e quando a RPC for superior a 0,5, seria considerado como proteinúrico. Sugere-se que os valores de RPC entre 0,5 a 1,0 poderiam corresponder à proteinúria de origem tubular, e RPC > 1,0 e inferior a 2,0 relacionado à proteinúria de origem tubular ou glomerular, e RPC > 2,0 seria fortemente indicativo de proteinúria de origem glomerular, portanto, nessa última sendo a proteinúria de origem glomerular caracterizada pelo predomínio de proteínas de alto peso molecular ou da albumina.

Na atualidade existe um consenso em relação à indicação de terapia para doenças glomerulares em cães em que a conduta deve ser baseada no acompanhamento da mensuração seriada da RPC, confirmando-se os valores aumentados persistentes da RPC, como também na avaliação da RPC durante o monitoramento da terapia (BROWN et al., 2013; LITTMAN et al., 2013). Assim, para

a definição adequada do diagnóstico da glomerulopatia nos casos de persistência da proteinúria, para a confirmação da presença de proteínas de alto peso molecular – albumina, recomenda-se a realização de exames mais específicos tais como a eletroforese de proteína urinária e biopsia renal (LITTMAN et al., 2013).

A elucidação dos pesos moleculares das proteínas presentes na urina pela eletroforese pode trazer informações importantes, pois a perda de proteínas de alto peso molecular, incluindo a albumina, estaria relacionada com lesões glomerulares e as de baixo peso molecular com o comprometimento do segmento tubular proximal na reabsorção dessas proteínas. Estudos na medicina veterinária evidenciaram o predomínio de proteínas de baixo peso molecular em amostras de urina com valores de RPC > 2,0, e sem a presença de macroalbuminúria, demonstrando a possibilidade da proteinúria de RPC > 2,0 ser também decorrente do acometimento tubular, ou seja, das proteínas de baixo peso molecular, que normalmente estão presentes no filtrado glomerular, não terem sido reabsorvidas pelos segmentos tubulares proximais (CAVALCANTE et al., 2013; WAKI, 2013; CARAGELASCO et al., 2017). Ainda, nos casos de RPC > 2,0, deve-se considerar a possibilidade de ser observada, concomitantemente a presença de proteínas de baixo e de alto peso molecular, ou seja, decorrente do comprometimento de ambos os segmentos do néfron, glomérulo e túbulo, pois suscita-se que na evolução da doença renal, o comprometimento do segmento tubular possa ter ocorrido devido a lesão glomerular prévia (VINGE et al., 2010; NABITY et al., 2011).

Assim, diante das possibilidades, ou seja, da proteinúria estar associada à lesão de glomérulos, túbulos, ou de ambas, atualmente, observa-se a necessidade de verticalizar a análise e reconhecimento dos tipos de proteínas presentes na urina, para assim ter subsídios na avaliação da origem da proteinúria, pois a definição do local do segmento do néfron que gerou a perda daquelas proteínas pode auxiliar o diagnóstico adequado, como também a terapia a ser recomendada. Assim, a análise somente pela determinação quantitativa pela RPC parece não ser fidedigna na clínica de cães e gatos para assegurar a origem ou o(s) segmento(s) do(s) néfron(s) comprometido(s), diferentemente ao observado na medicina humana em que a proteinúria está relacionada principalmente as afecções glomerulares secundárias a hipertensão primária sistêmica, nefropatia diabética e doenças imunomediadas (CHRISTENSEN; GBUREK, 2004; VINGE et al., 2010; BASTOS; KIRSZTAJN, 2011).

Na eletroforese em gel de poliacrilamida pela análise das proteínas urinária, ocorre a separação das proteínas conforme o seu peso molecular, e esta tem sido investigada em diversas afecções renais em cães; as proteínas de baixo peso molecular estão relacionadas à lesão ao nível do segmento tubular, enquanto proteínas de alto peso molecular pelo comprometimento e lesão glomerular (SCHULTZE; JENSEN, 1989; SMETS et al., 2012; CAVALCANTE et al., 2013; WAKI, 2013).

Como as proteínas podem ser carregadas positivamente ou negativamente, é empregado o método do gel de poliacrilamida contendo sódio dodecil sulfato (SDS-PAGE). Neste, as proteínas presentes na urina se ligam ao SDS em presença de calor, formando um íon negativo, que migra então em direção ao polo positivo do gel, permitindo assim a separação das proteínas de acordo apenas com seu peso molecular (SCHULTZE; JENSEN, 1989).

O teste de SDS-PAGE é uma técnica com boa sensibilidade, mas pouca especificidade comparada com a biopsia renal, apresentando sensibilidade de 100% para detecção de lesões glomerulares e de 92,6% para lesões túbulo intersticiais, e especificidade de 40% para lesões glomerulares e 62,5% para lesões túbulos intersticiais. Uma vantagem da eletroforese em relação a biopsia renal seria de que o fragmento da amostra de tecido renal poderia não representar a região renal afetada, além de ser um procedimento invasivo (ZINI; BONFANTI; ZATELLI, 2004). Em outro estudo utilizando-se uma outra técnica de eletroforese de proteínas urinária em comparação com a biopsia renal que foi avaliado por escore, foi evidenciado sensibilidade de 97% e especificidade de 100% para detecção de lesão glomerular, e de 90% de sensibilidade e 100% de especificidade para a detecção de lesão túbulo intersticial (HOKAMP et al., 2018).

Para a avaliação das proteínas urinaria, há diversas metodologias que estão sendo empregadas na pesquisa tais como o SDS-PAGE e Western Blot, a quimioluminescência, o SDS-AGE (Sodium dodecyl sulfate–agarose gel electrophoresis - Hydragel 5 Proteinúria; Sebia®) e o sistema STAIN-FREE® (Bio Rad®) (GIORI et al., 2011; TAYLOR et al., 2013; GHOSH et al., 2014; GIRALDI; PALTRINIERI; SCARPA, 2019),

Observa-se que há limitações na técnica de eletroforese de proteínas e do western blot, pois há possibilidade de ocorrer variações, seja pelo executor / pesquisador, como também pela variação nas concentrações de reagentes primários,

ou ainda pela degradação das proteínas por proteases endógenas e as dificuldades de padronização devido ao uso de diversos equipamentos e metodologias de análise dos géis, do volume da amostra de urina, entre outros (GHOSH et al., 2014). Assim, recentemente, algumas tecnologias têm sido empregadas para facilitar e melhorar o processamento das amostras e, entre elas, descreve-se a tecnologia de SDS-PAGE com o método Stain-Free®, técnica no qual os géis contêm compostos trihalo patenteados que produzem uma luz fluorescente frente a exposição de uma luz ultravioleta quando reagem com resíduos de triptofano (COLELLA et al., 2012). A referida, metodologia já foi comparada com outras colorações e foram observados bons resultados (COLELLA et al., 2012; GÜRTLER et al., 2013).

As colorações mais comumente utilizadas para a identificação das proteínas são o azul brilhante de Comassie, Prata, Sypro Ruby e Amido Black, sendo que a coloração pela Prata é a que apresenta maior sensibilidade (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1988; CANDIANO et al., 2004; COLELLA et al., 2012; GÜRTLER et al., 2013; SUSNEA et al., 2013). Em uma pesquisa utilizando a espectrofotometria de massa foi observada que a metodologia de Stain-Free® foi capaz de detectar pequenas quantidades de proteínas (em nanogramas) em comparação com a coloração pela Prata (SUSNEA et al., 2013).

O processo para a validação dos métodos eletroforéticos pode ser conduzido de diversas formas e está na dependência da finalidade do uso daquela técnica (RIBANI et al., 2004).

Diversos aspectos devem ser levados em consideração, tais como a metodologia e o equipamento, o número de operadores, o uso de calibradores comerciais ou não etc. Assim, os estudos de intra e inter ensaios são importantes para verificar a variabilidade que o método laboratorial poderia apresentar e estabelecer as possibilidades de variações e, consequente, auxiliar na interpretação adequada dos resultados a serem obtidos (SMITH, 2012).

A importância da validação de um método assegura que o processo analítico forneça evidências objetivas e documentadas e que expressem confiabilidade e qualidade nos resultados (RIBANI et al., 2004). A condução para o processo de validação pode ser realizada de duas formas, (1) a validação no laboratório (“in house validation”) e (2) a validação completa (“full validation”). A validação realizada no laboratório é um processo preliminar em que é avaliado o desempenho da metodologia descrito em artigos e revistas científicas, mas sem a avaliação da

reprodutibilidade. Por outro lado, a validação completa já envolve o desempenho da metodologia executada em diferentes laboratórios e matrizes, verificando a reprodutibilidade da análise e também envolvendo diferentes operadores e, ainda, a avaliação pode ser aprimorada investigando-se a seletividade, acurácia, limite mínimo de detecção e estabilidade da amostra e do analito (RIBANI et al., 2004; SMITH, 2012).

Os principais métodos utilizados na validação de matrizes biológicas são a seletividade, linearidade, limite de detecção, robustez, precisão e acurácia. No relativo à análise da eletroforese de proteínas urinaria em gel de poliacrilamida, a investigação quanto a precisão poderia trazer confiabilidade no seu emprego tanto para fins de pesquisa como para aplicação clínica. Teoricamente a precisão é representada na avaliação da dispersão dos resultados obtidos de uma mesma amostra, envolvendo a calibração, o controle de qualidade e a capacidade do método fornecer resultados semelhantes e até precisos, e envolve a repetitividade e a reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004; SMITH, 2012).

2. HIPÓTESE

A hipótese do presente estudo seria de que não haveria o comprometimento da repetitividade e da reprodutibilidade nas bandas dos pesos moleculares, e respectivas porcentagens de densidade óptica, na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida com o uso de uma mesma coloração ou de um sistema de marcação de bandas. Ainda, de que os resultados obtidos nas diferentes colorações ou no sistema de detecção de bandas seriam semelhantes.

3. OBJETIVOS

Avaliar de forma qualitativa (identificação dos pesos moleculares das bandas de proteínas) e quantitativa (percentagem da densidade óptica das bandas) as proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida de cães, pelo intra e inter ensaios, utilizando-se o método SDS-PAGE, comparando os traçados eletroforéticos obtidos em uma mesma ou em diferentes colorações ou método de detecção de bandas, ou seja, pelo azul brilhante de Coomassie, Prata e Stain-Free®.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de Urina

Foram utilizadas amostras de urina de cães coletadas por cistocentese ou cateterismo oriundas dos Laboratórios Clínico do Departamento de Clínica Médica / HOVET da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e do PROVET – Instituto Brasileiro de Diagnóstico e Especialidades Veterinárias – LTDA.

4.2 Exame de Urina

Foi realizado a urinálise em todas as amostras, em que foram avaliadas as características físicas e químicas, além da análise microscópica do sedimento urinário, segundo os métodos rotineiros (FRY, 2011). Foram excluídas as amostras que apresentaram hematúria (com mais de 5 hemácias por campo em aumento de 400X), hemoglobinúria (presença de 1+, no escore total de 3+ de sangue oculto na reação química da fita reagente) , piúria (com mais de 5 leucócitos por campo em aumento de 400X) e/ou bacteriúria, sendo este último item confirmado pela urocultura e/ou a presença de bactérias no sedimento urinário. Assim somente foram avaliadas, para a eletroforese de proteínas urinárias, as amostras que não apresentaram crescimento bacteriano na cultura.

4.3 Razão proteína/creatinina urinária (RPC)

Para o cálculo da razão proteína/creatinina urinária (RPC), a concentração de proteínas urinária, na amostra do sobrenadante de urina obtida após centrifugação, foi mensurada pelo método colorimétrico do azul brilhante de Coomassie G-25 e avaliado em espectofotometria a 595 nm, sendo que o padrão utilizado foi a diluição de BSA (EBRAM®). A concentração de creatinina urinária foi determinada por meio da diluição de 1:21 da amostra de urina em água destilada para atingir linearidade, utilizando-se a solução de creatinina amidohidrolase, creatinina amidinohidrolase, oxidase de sacorsina e peroxidase (creatinina enzimática) em meio alcalino, reação colorimétrica com leitura em comprimento de onda de 670 nm, em analisador automático (Vitros 250 – Orthoclinical®). Assim, a RPC foi calculada pela divisão do valor da concentração urinária da proteína pelo valor da concentração urinária da creatinina.

4.4 Conservação

As amostras de urina, ou seja, do sobrenadante obtido após centrifugação, foram mantidas sob congelamento (- 20º C) por um período máximo de 3 meses até o processamento da eletroforese.

4.5 Procedimento das amostras de urina para a determinação do intra e inter ensaios

Para o estudo do intra e inter ensaios no referente para as variáveis peso molecular (PM) e porcentagem da densidade óptica (%DO) no atinente para cada banda de proteína dos traçados eletroforéticos de proteínas urinária, realizados em gel de poliacrilamida, e submetidas a diferentes colorações, ou seja, pela Prata, azul brilhante de Coomassie e Stain-Free®, conduzidos os procedimentos a seguir descritos.

Três diferentes amostras de urina, com concentrações variadas de proteínas, foram utilizadas com o intuito de avaliar a repetitividade ou precisão das mensurações, como também de sua reprodutibilidade, ou seja, os intra e inter ensaios, respectivamente. As três amostras de urina com concentrações diferentes de proteínas foram denominadas como *pools* 1, 2 e 3. Os referidos *pools* foram constituídos pelos volumes de sobrenadantes de cinco amostras de urina oriundas de diferentes cães, respeitando-se os limites de RPC para cada *pool*. O *pool* 1, foi constituído de amostras de urina com RPC <0,49, o *pool* 2 com amostras de RPC entre 0,50 a 1,99, e o *pool* 3 com amostras de urina com RPC > 5,0. Para a obtenção do *pool*, foi realizada a homogeneização das cinco amostras (sobrenadante de urina) em agitador Vortex por 1 minuto e, na sequência, aliquotadas em frascos tipo eppendorf e conservados a temperatura de -20º C até o momento da análise.

Para o **intra** ensaio, o traçado eletroforético de cada *pool* foi processado por 10 vezes, ou seja, 10 corridas eletroforéticas consecutivas de uma mesma amostra do *pool* em um mesmo dia, e para o **inter** ensaio, 10 traçados eletroforéticos também foram realizados consecutivamente, como no intra ensaio, entretanto, esse mesmo procedimento foi também repetido em três momentos, ou seja, durante 3 dias subsequentes.

Para todas as corridas da eletroforese, foi empregado o padrão comercial de peso molecular entre 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards

– Bio-Rad®). As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando-se o gel comercial TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions e foram analisadas, inicialmente, com a metodologia de marcação de bandas de proteína denominada de Stain-Free® que foi desenvolvida pela Bio-Rad®. Posteriormente esses mesmos géis eram transportados manualmente para um outro sistema e corados com o azul brilhante de Coomassie ou a Prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1988; CARAGELASCO et al., 2017).

4.6 Técnica para a determinação de eletroforese de proteínas urinárias

As amostras de urina que estavam congeladas foram submetidas ao processo de descongelamento em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.000 RCF por 5 minutos. Obtido o sobrenadante, logo este era diluído em uma solução de adição prévia de 2β-mercaptoetanol + tampão de amostra (2x Laemmli Sample Buffer - Bio-Rad®). Após o preparo dessas amostras, as mesmas foram agitadas em Vortex® e, a seguir, submetidas ao processo de ebulição em banho seco a 100ºC por 10 minutos e, na sequência, agitadas novamente em Vortex®.

Para a realização das corridas eletroforéticas, foi empregado o uso de uma fonte (PowerPac™ Basic Power Suply – Bio-Rad®) e de uma cuba vertical (Mini- PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell - Bio-Rad®) (Figura 5), com um gel de espessura de 1,0 mm, sendo que a corrida ou o deslocamento das proteínas do gel ocorreu em meio de tampão de corrida 1X, preparado a partir solução tampão 10X (10x Tris/Glycine/SDS Buffer - Bio-Rad®), e que foram submetidas a voltagem de 300V por 23 minutos. Foi realizado, em cada corrida, o mapeamento das amostras/*pool*, assim como de um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope Standards # 1610375 – Bio-Rad®).

O gel de poliacrilamida a 10% + Stain-Free® (TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions - Bio-Rad®) foi preparado conforme as instruções do fabricante. O processo de coloração pelo método Stain-Free® foi realizado logo após a realização da corrida eletroforética, sendo utilizado a ativação da coloração por 5 minutos, no equipamento Gel Doc EZ imager (Bio-Rad®), e os traçados foram analisados pelo *software* ImageLab versão 6.0.1 (Bio-Rad®) (Figura 6). Logo após a análise os géis pelo método Stain-Free®, estes foram transferidos para um sistema manual de fixação das bandas de proteínas e os géis preparados para as colorações com o azul brilhante

de Coomassie G-250 (Bio-Safe™ Coomassie Stain # 1610786 - Bio-Rad®) e a Prata (HEUKESHOVEN; DERNICK, 1988; CARAGELASCO et al., 2017)

Figura 5 - Cuba vertical e fonte utilizado para a realização da eletroforese de proteínas da urina, ambas do fabricante Bio-Rad®

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020.

Após as colorações das bandas de proteína com o azul brilhante de Coomassie e a Prata, as imagens foram gravadas e processadas eletronicamente, por meio de um sistema de densitometria (Densitômetro modelo Epson Expression® 1680) e analisada em programa de *software* específico (Vision Works Ultra-Violet Products Ltda.®).

Figura 6 - Sistema utilizado para revelação das bandas de eletroforese pelo método Stain-Free®, utilizando bandeja específica de análise.

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020.

4.7 Análise dos resultados

Foi realizado para cada banda de proteína de cada um dos 3 *pools*, a avaliação dos intra e inter ensaios, e também foram calculados a média, coeficiente de variação e erro padrão da média. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer foram empregados para a comparação dos pesos moleculares e das porcentagens de densidade óptica obtidas nas diferentes colorações (azul brilhante de Coomassie e Prata) ou no método de marcação de bandas - Stain-Free® (DRISCOLL, 1996).

5. RESULTADOS

5.1 Pesos moleculares dos *pools*

As tabelas 1, 2, 3 e 4 apresentam os resultados obtidos referente aos pesos moleculares do *pool* 1 pela eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida, corados pelo azul brilhante de Coomassie, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 7 apresenta um gel corado pelo azul brilhante de Coomassie.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio em todos os três dias (dias 1, 2 e 3) foram menores que 5% com exceção apenas no dia 3, na banda 4, que foi de 6,15%. No relativo ao inter ensaio, todos os coeficientes de variação de todas as bandas foram inferiores a 5%.

Tabela 1 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizados no **dia 1**.

Dia 1 Azul Brilhante de Coomassie pool 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	99	65	51	36	27
2	99	64	53	35	27
3	94	64	53	35	26
4	98	64	53	35	26
5	93	65	52	34	26
6	96	64	52	34	26
7	94	63	52	34	26
8	93	65	53	34	26
9	93	65	53	34	26

10	94	64	51	34	26
Média	95	64	52	35	26
CV	2,73%	0,98%	1,50%	1,42%	1,23%
EPM	0,822	0,200	0,249	0,155	0,102
Máximo	99	65	53	36	27
Mínimo	93	63	51	34	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 2 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie, realizados no **dia 2**.

Dia 2 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	96	66	56	36	28
2	96	66	57	35	29
3	97	66	55	36	29
4	95	66	56	36	28
5	93	66	55	36	29
6	94	66	57	36	28
7	95	66	57	35	29
8	93	67	57	36	30
9	94	67	56	36	29
10	94	67	58	37	28
Média	95	66	56	36	29
CV	1,55%	0,63%	1,40%	1,39%	1,83%
EPM	0,465	0,133	0,249	0,158	0,165
Máximo	97	67	58	37	30
Mínimo	93	66	55	35	28

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 3 -Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie, realizados no **dia 3**.

Dia 3 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	96	67	57	36	27
2	94	65	55	35	27
3	95	65	54	34	28
4	94	65	57	41	27
5	94	65	55	36	27
6	94	64	56	35	27
7	94	65	55	34	27
8	96	61	54	35	26

9	93	63	53	32	26
10	95	64	54	34	26
Média	95	64	55	35	27
CV	1,15%	2,48%	2,22%	6,15%	2,24%
EPM	0,343	0,506	0,386	0,684	0,190
Máximo	96	67	57	41	28
Mínimo	93	61	53	32	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

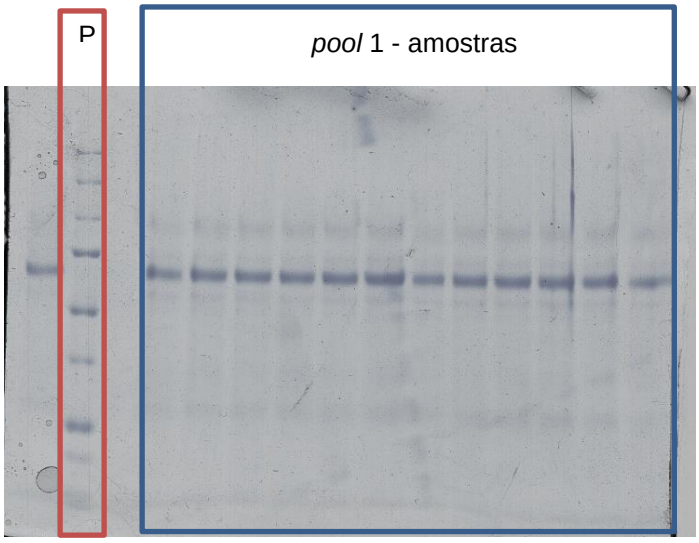
Tabela 4 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie.

Dia	*pool* 1 Azul Brilhante de Coomassie	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	99	65	51	36	27
	2	99	64	53	35	27
	3	94	64	53	35	26
	4	98	64	53	35	26
	5	93	65	52	34	26
	6	96	64	52	34	26
	7	94	63	52	34	26
	8	93	65	53	34	26
	9	93	65	53	34	26
	10	94	64	51	34	26
2	1	96	66	56	36	28
	2	96	66	57	35	29
	3	97	66	55	36	29
	4	95	66	56	36	28
	5	93	66	55	36	29
	6	94	66	57	36	28
	7	95	66	57	35	29
	8	93	67	57	36	30
	9	94	67	56	36	29
	10	94	67	58	37	28
3	1	96	67	57	36	27
	2	94	65	55	35	27
	3	95	65	54	34	28
	4	94	65	57	41	27
	5	94	65	55	36	27
	6	94	64	56	35	27
	7	94	65	55	34	27
	8	96	61	54	35	26

	9	93	63	53	32	26
	10	95	64	54	34	26
	Média	95	65	55	35	27
	CV	1,90%	2,06%	3,50%	3,95%	4,08%
	EPM	0,330	0,244	0,349	0,254	0,202
	Máximo	99	67	58	41	30
	Mínimo	93	61	51	32	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha azul encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 apresentam os pesos moleculares das bandas de proteínas urinária do *pool* 1 obtidas na eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 8 apresenta um gel corado pela referida coloração.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio em todos os três dias (dias 1, 2 e 3) foram menores que 5%, e no relativo ao inter ensaio, somente nas bandas 4 e 5, os coeficientes de variação foram de 5,85% e 5,29%, respectivamente.

Tabela 5 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 Prata *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	94	64	55	34	25
2	90	63	55	31	26
3	88	62	53	32	26
4	86	63	54	31	25
5	88	63	54	31	26
6	86	63	54	31	26
7	87	64	54	31	26
8	89	63	53	31	25
9	91	63	54	31	25
10	88	63	53	32	26
Média	89	63	54	32	26
CV	2,63%	0,66%	1,29%	2,94%	1,21%
EPM	0,739	0,131	0,219	0,294	0,098
Máximo	94	64	55	34	26
Mínimo	86	62	53	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 6 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 Prata *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	97	66	56	35	28
2	97	67	56	35	28
3	97	66	57	35	29
4	97	66	57	35	29
5	98	66	57	35	29
6	97	67	57	36	29
7	98	67	57	37	29
8	99	65	57	35	29
9	98	67	58	37	29
10	99	68	57	36	29
Média	98	67	57	36	29
CV	0,89%	1,41%	1,09%	1,79%	1,38%
EPM	0,273	0,296	0,197	0,202	0,125
Máximo	99	68	58	37	29
Mínimo	97	65	56	35	28

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 7 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 Prata *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	95	64	55	35	28
2	94	65	56	35	28
3	93	65	56	36	29
4	94	65	56	35	28
5	94	64	55	36	28
6	95	65	56	36	28
7	95	65	56	36	28
8	94	65	56	35	29
9	94	64	57	36	29
10	93	64	55	35	29
Média	94	65	56	35	28
CV	0,84%	0,58%	0,92%	1,39%	1,24%
EPM	0,249	0,119	0,161	0,155	0,111
Máximo	95	65	57	36	29
Mínimo	93	64	55	35	28

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

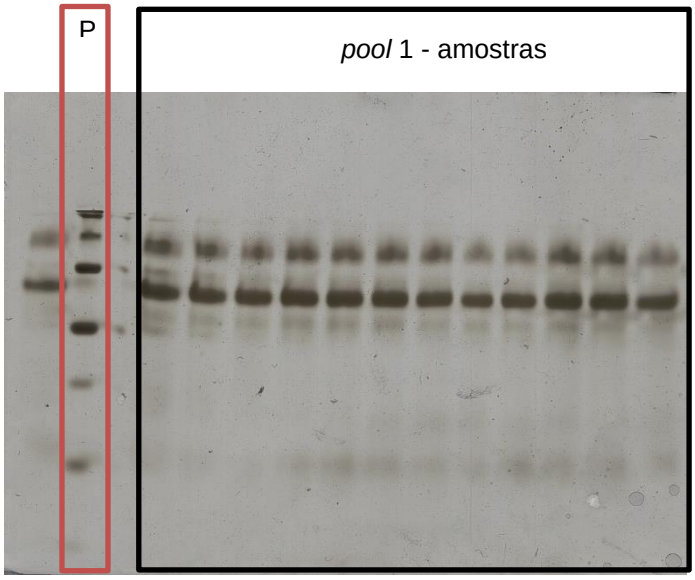
Tabela 8 - Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata.

Dia	*pool* 1 Prata	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	94	64	55	34	25
	2	90	63	55	31	26
	3	88	62	53	32	26
	4	86	63	54	31	25
	5	88	63	54	31	26
	6	86	63	54	31	26
	7	87	64	54	31	26
	8	89	63	53	31	25
	9	91	63	54	31	25
	10	88	63	53	32	26
2	1	97	66	56	35	28
	2	97	67	56	35	28
	3	97	66	57	35	29
	4	97	66	57	35	29
	5	98	66	57	35	29
	6	97	67	57	36	29

	7	98	67	57	37	29
	8	99	65	57	35	29
	9	98	67	58	37	29
	10	99	68	57	36	29
3	1	95	64	55	35	28
	2	94	65	56	35	28
	3	93	65	56	36	29
	4	94	65	56	35	28
	5	94	64	55	36	28
	6	95	65	56	36	28
	7	95	65	56	36	28
	8	94	65	56	35	29
	9	94	64	57	36	29
	10	93	64	55	35	29
	Média	93	65	55	34	28
	CV	4,23%	2,43%	2,43%	5,85%	5,29%
	EPM	0,721	0,288	0,245	0,365	0,265
	Máximo	99	68	58	37	29
	Mínimo	86	62	53	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 8 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha preta encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 9,10, 11 e 12 encontram-se dispostos os resultados referentes aos pesos moleculares do *pool* 1 do traçado eletroforético das proteínas urinária em gel de poliacrilamida corados pelo Stain-Free®, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também o mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 9 apresenta um gel corado pelo método Stain-Free®.

Os coeficientes de variação observados tanto no intra como no inter ensaios, para o método de detecção das bandas de proteínas pelo Stain Free®, foram menores que 5%.

Tabela 9 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**.

Dia 1 Stain-Free® *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	94	63	52	32	27
2	93	63	52	32	26
3	92	62	53	32	26
4	90	62	52	32	25
5	92	62	51	31	26
6	90	61	51	32	27
7	88	61	51	32	26
8	87	62	53	32	26
9	87	62	53	32	26
10	90	65	51	33	26
Média	90	62	52	32	26
CV	2,60%	1,60%	1,88%	1,67%	1,41%
EPM	0,741	0,317	0,308	0,169	0,116
Máximo	94	65	53	33	27
Mínimo	87	61	51	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 10 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	95	67	54	35	29
2	95	66	55	35	28
3	95	66	55	35	29
4	95	66	55	35	28
5	95	65	55	35	28
6	96	65	55	35	28
7	97	66	55	35	28
8	96	66	52	35	29
9	96	66	55	35	28
10	97	66	55	34	28
Média	96	66	55	35	28
CV	0,93%	0,79%	1,86%	0,80%	1,71%
EPM	0,280	0,164	0,321	0,088	0,153
Máximo	97	67	55	35	29
Mínimo	95	65	52	34	28

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 11 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**.

Dia 3 Stain-Free® *pool* 1	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	98	66	51	35	28
2	98	66	52	34	27
3	97	66	52	34	28
4	96	65	51	34	27
5	95	65	51	34	27
6	95	64	51	34	27
7	95	64	51	34	27
8	95	64	51	34	27
9	95	64	53	34	27
10	97	65	51	34	27
Média	96	65	51	34	27
CV	1,15%	0,99%	1,41%	1,00%	1,09%
EPM	0,350	0,203	0,228	0,107	0,094
Máximo	98	66	53	35	28
Mínimo	95	64	51	34	27

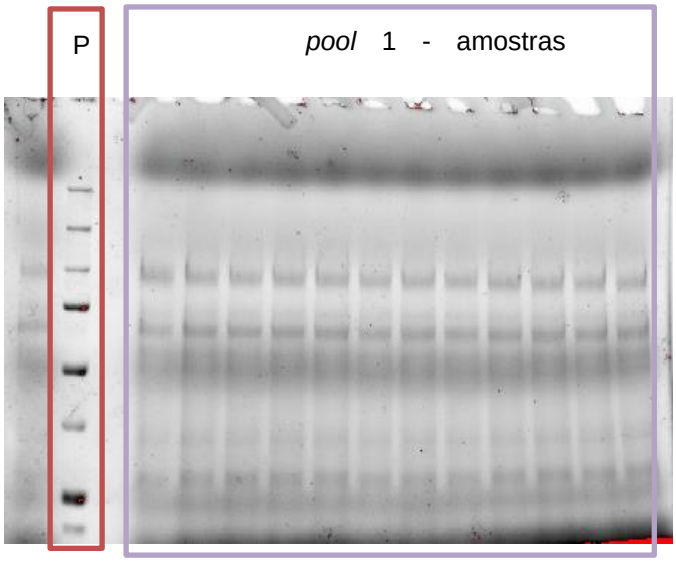
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 12 - Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®.

Dia	*pool* 1 Stain-Free®	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	94	63	52	32	27
	2	93	63	52	32	26
	3	92	62	53	32	26
	4	90	62	52	32	25
	5	92	62	51	31	26
	6	90	61	51	32	27
	7	88	61	51	32	26
	8	87	62	53	32	26
	9	87	62	53	32	26
	10	90	65	51	33	26
2	1	95	67	54	35	29
	2	95	66	55	35	28
	3	95	66	55	35	29
	4	95	66	55	35	28
	5	95	65	55	35	28
	6	96	65	55	35	28
	7	97	66	55	35	28
	8	96	66	52	35	29
	9	96	66	55	35	28
	10	97	66	55	34	28
3	1	98	66	51	35	28
	2	98	66	52	34	27
	3	97	66	52	34	28
	4	96	65	51	34	27
	5	95	65	51	34	27
	6	95	64	51	34	27
	7	95	64	51	34	27
	8	95	64	51	34	27
	9	95	64	53	34	27
	10	97	65	51	34	27
	Média	94	64	53	34	27
	CV	3,32%	2,55%	3,25%	3,69%	3,73%
	EPM	0,570	0,299	0,311	0,227	0,185
	Máximo	98	67	55	35	29
	Mínimo	87	61	51	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo sistema Stain-Free® da amostra do *pool* 1, na delimitação da linha roxa encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra "P".



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

As tabelas 13, 14, 15 e 16 apresentam os resultados obtidos dos pesos moleculares do *pool* 2 pela eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida, corados pelo azul brilhante de Coomassie, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 10 apresenta um gel corado pelo azul brilhante de Coomassie.

Os coeficientes de variação observados nos intra e inter ensaios foram todos menores que 5%, sendo que o valor máximo observado foi de 4,64%, detectado no intra ensaio na banda 4 do dia 1.

Tabela 13 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**.

Dia 1 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	77	68	57	38	26
2	75	67	52	33	26
3	76	68	51	34	27
4	76	66	54	35	27
5	75	66	54	35	28
6	73	66	53	34	28
7	76	64	50	33	28

8	74	65	51	33	28
9	74	65	52	37	29
10	73	64	53	35	29
Média	75	66	53	35	28
CV	1,48%	1,89%	3,72%	4,64%	3,66%
EPM	0,351	0,392	0,620	0,509	0,320
Máximo	77	68	57	38	29
Mínimo	73	64	50	33	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 14 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**.

Dia 2 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM – kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	76	65	56	34	26
2	76	65	56	34	27
3	74	64	56	33	26
4	76	65	56	35	27
5	76	65	56	34	27
6	74	64	55	33	26
7	74	63	56	33	26
8	74	63	55	33	26
9	74	63	56	33	28
10	73	62	55	33	26
Média	75	64	56	33	26
CV	1,74%	1,34%	1,01%	2,15%	2,38%
EPM	0,410	0,272	0,179	0,227	0,200
Máximo	76	65	56	35	28
Mínimo	73	62	55	33	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 15 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**.

Dia 3 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	73	64	56	34	26
2	74	64	56	34	26
3	74	63	55	33	26
4	73	63	55	34	26
5	74	64	56	34	26
6	74	64	54	33	26

7	73	64	55	34	27
8	74	63	55	34	27
9	75	64	56	34	26
10	75	64	56	34	27
Média	74	64	55	34	26
CV	0,98%	0,99%	0,83%	0,72%	1,48%
EPM	0,229	0,199	0,145	0,077	0,124
Máximo	75	64	56	34	27
Mínimo	73	63	54	33	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

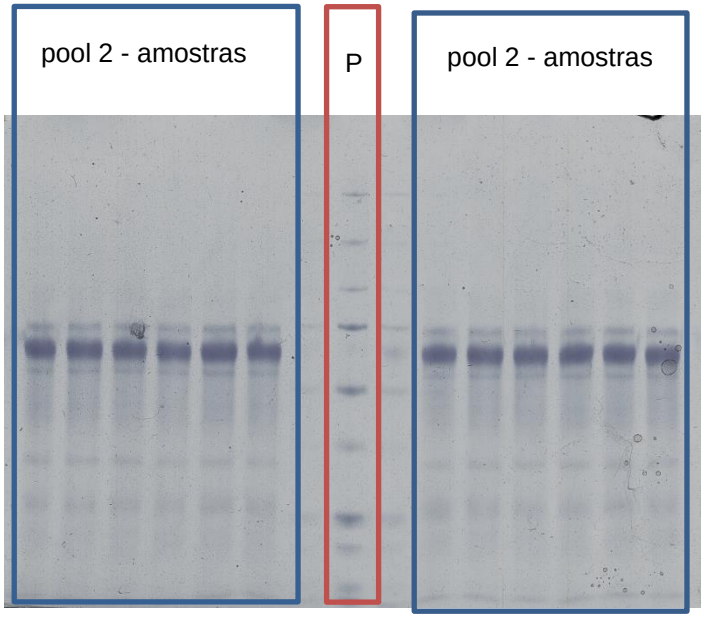
Tabela 16 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie.

Dia	*pool* 2 Azul Brilhante de Coomassie	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	77	68	57	38	26
	2	75	67	52	33	26
	3	76	68	51	34	27
	4	76	66	54	35	27
	5	75	66	54	35	28
	6	73	66	53	34	28
	7	76	64	50	33	28
	8	74	65	51	33	28
	9	74	65	52	37	29
	10	73	64	53	35	29
2	1	76	65	56	34	26
	2	76	65	56	34	27
	3	74	64	56	33	26
	4	76	65	56	35	27
	5	76	65	56	34	27
	6	74	64	55	33	26
	7	74	63	56	33	26
	8	74	63	55	33	26
	9	74	63	56	33	28
	10	73	62	55	33	26
3	1	73	64	56	34	26
	2	74	64	56	34	26
	3	74	63	55	33	26
	4	73	63	55	34	26
	5	74	64	56	34	26
	6	74	64	54	33	26

	7	73	64	55	34	27
	8	74	63	55	34	27
	9	75	64	56	34	26
	10	75	64	56	34	27
	Média	74	64	55	34	27
	CV	1,51%	1,98%	3,29%	3,32%	3,41%
	EPM	0,206	0,233	0,327	0,206	0,167
	Máximo	77	68	57	38	29
	Mínimo	73	62	50	33	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *Pool* 2, nas delimitações das linhas azuis encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 17, 18, 19 e 20 apresentam os pesos moleculares das bandas de proteínas urinária do *pool* 2 obtidos na eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 11 apresenta um gel corado pela referida coloração.

Os coeficientes de variação dos intra ensaios, na sua maioria foram menores que 5%, com exceção do dia 1 na banda 5, com valor de 5,28%, e no referente ao inter ensaio todos foram inferiores a 5%.

Tabela 17 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 Prata *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	75	67	54	33	27
2	73	66	54	34	27
3	75	66	54	33	26
4	75	66	54	34	26
5	74	66	53	33	27
6	74	66	54	33	29
7	75	65	53	32	25
8	73	66	52	31	25
9	69	65	54	31	25
10	74	66	54	33	25
Média	74	66	54	33	26
CV	2,34%	1,03%	1,11%	2,75%	5,28%
EPM	0,546	0,215	0,188	0,286	0,437
Máximo	75	67	54	34	29
Mínimo	69	65	52	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 18 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 Prata *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	76	66	57	34	27
2	71	62	54	32	25
3	72	62	54	33	26
4	73	63	53	33	26
5	73	62	54	33	26
6	74	63	55	33	26
7	74	65	55	34	27
8	75	65	56	34	27
9	75	65	56	34	27
10	75	64	56	34	27
Média	74	64	55	33	26
CV	2,19%	2,37%	2,23%	2,37%	2,42%
EPM	0,512	0,477	0,388	0,251	0,202
Máximo	76	66	57	34	27
Mínimo	71	62	53	32	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 19 - Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 Prata *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	71	61	55	34	27
2	72	61	55	34	26
3	71	64	55	34	26
4	71	64	55	34	27
5	72	63	55	34	26
6	70	63	56	35	27
7	70	66	56	35	26
8	70	65	56	35	27
9	72	66	56	35	27
10	72	66	57	36	28
Média	71	64	55	35	27
CV	1,35%	3,03%	1,49%	2,04%	2,12%
EPM	0,303	0,612	0,260	0,224	0,179
Máximo	72	66	57	36	28
Mínimo	70	61	55	34	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

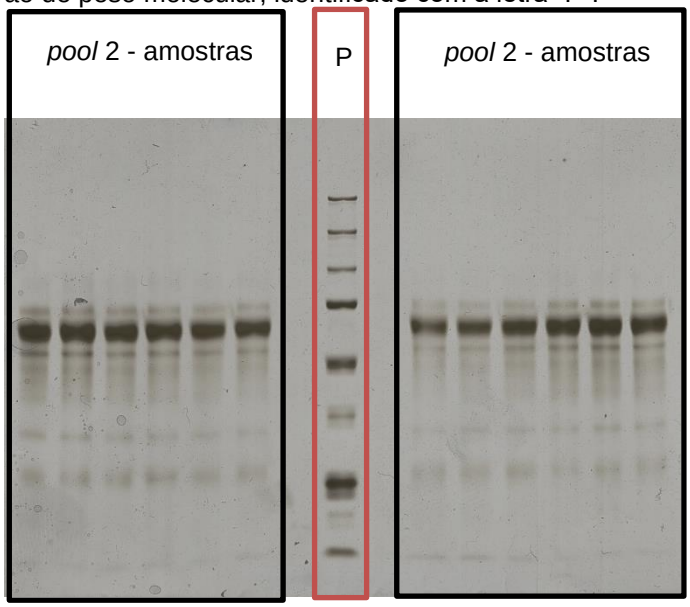
Tabela 20 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata.

Dia	*pool* 2 Prata	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	75	67	54	33	27
	2	73	66	54	34	27
	3	75	66	54	33	26
	4	75	66	54	34	26
	5	74	66	53	33	27
	6	74	66	54	33	29
	7	75	65	53	32	25
	8	73	66	52	31	25
	9	69	65	54	31	25
	10	74	66	54	33	25
2	1	76	66	57	34	27
	2	71	62	54	32	25
	3	72	62	54	33	26
	4	73	63	53	33	26
	5	73	62	54	33	26
	6	74	63	55	33	26

	7	74	65	55	34	27
	8	75	65	56	34	27
	9	75	65	56	34	27
	10	75	64	56	34	27
3	1	71	61	55	34	27
	2	72	61	55	34	26
	3	71	64	55	34	26
	4	71	64	55	34	27
	5	72	63	55	34	26
	6	70	63	56	35	27
	7	70	66	56	35	26
	8	70	65	56	35	27
	9	72	66	56	35	27
	10	72	66	57	36	28
	Média	73	64	55	34	26
	CV	2,65%	2,71%	2,17%	3,21%	3,52%
	EPM	0,353	0,319	0,217	0,197	0,170
	Máximo	76	67	57	36	29
	Mínimo	69	61	52	31	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata, amostra do *pool* 2, nas delimitações das linhas pretas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 21, 22, 23 e 24 encontram-se dispostos os resultados referentes aos pesos moleculares do *pool* 2 do traçado eletroforético das proteínas urinária em gel

de poliacrilamida corados pelo Stain-Free® , determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também o mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 12 apresenta um gel corado pelo método Stain-Free®.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio para o método do Stain-Free® foram na maioria de valores baixos, sendo que a variação foi de 0,63 a 3,86%, e para o inter ensaio de 1,02 a 2,30%.

Tabela 21 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**.

Dia 1 Stain-Free® *Pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	75	66	58	34	26
2	76	66	58	34	26
3	75	65	56	33	26
4	75	65	57	33	26
5	74	65	56	33	25
6	75	65	55	34	25
7	75	65	53	33	25
8	75	66	53	33	26
9	75	65	53	33	26
10	76	66	53	33	26
Média	75	65	55	33	26
CV	0,65%	0,68%	3,86%	1,49%	1,41%
EPM	0,154	0,141	0,675	0,156	0,115
Máximo	76	66	58	34	26
Mínimo	74	65	53	33	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 22 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	75	64	56	34	27
2	76	64	56	34	27
3	75	64	56	34	27
4	75	64	56	34	26
5	75	64	56	34	26
6	74	64	56	34	27
7	74	63	55	33	26
8	74	63	55	33	27
9	74	63	55	33	27
10	74	64	55	32	26
Média	74	64	56	33	27
CV	0,90%	0,79%	0,89%	1,42%	1,52%
EPM	0,212	0,160	0,157	0,150	0,127
Máximo	76	64	56	34	27
Mínimo	74	63	55	32	26

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 23 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**.

Dia 3 Stain-Free® *pool* 2	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	75	64	56	33	26
2	74	64	55	33	26
3	74	63	55	33	26
4	74	64	55	33	26
5	74	64	55	34	25
6	73	63	54	34	25
7	73	62	54	33	26
8	73	62	55	34	27
9	73	62	55	33	26
10	73	63	55	34	27
Média	74	63	55	33	26
CV	0,89%	1,16%	0,73%	0,63%	2,08%
EPM	0,207	0,231	0,126	0,066	0,172
Máximo	75	64	56	34	27
Mínimo	73	62	54	33	25

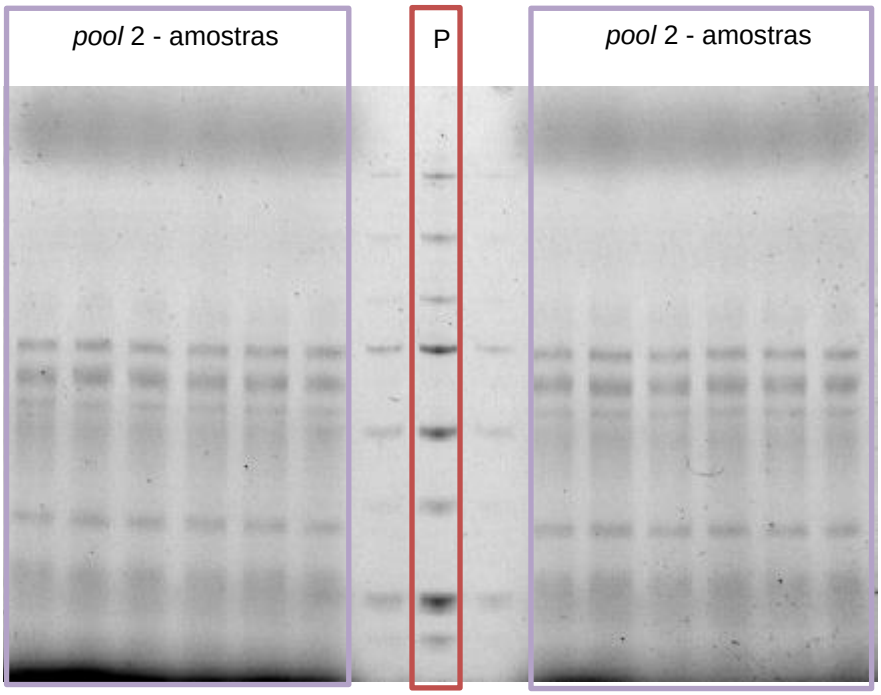
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 24 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free®.

Dia	*pool* 2 Stain-Free®	PM - kDa Banda 1	PM - kDa Banda 2	PM - kDa Banda 3	PM - kDa Banda 4	PM - kDa Banda 5
1	1	75	66	58	34	26
	2	76	66	58	34	26
	3	75	65	56	33	26
	4	75	65	57	33	26
	5	74	65	56	33	25
	6	75	65	55	34	25
	7	75	65	53	33	25
	8	75	66	53	33	26
	9	75	65	53	33	26
	10	76	66	53	33	26
2	1	75	64	56	34	27
	2	76	64	56	34	27
	3	75	64	56	34	27
	4	75	64	56	34	26
	5	75	64	56	34	26
	6	74	64	56	34	27
	7	74	63	55	33	26
	8	74	63	55	33	27
	9	74	63	55	33	27
	10	74	64	55	32	26
3	1	75	64	56	33	26
	2	74	64	55	33	26
	3	74	63	55	33	26
	4	74	64	55	33	26
	5	74	64	55	34	25
	6	73	63	54	34	25
	7	73	62	54	33	26
	8	73	62	55	34	27
	9	73	62	55	33	26
	10	73	63	55	34	27
	Média	74	64	55	33	26
	CV	1,02%	1,78%	2,30%	1,26%	2,02%
	EPM	0,139	0,208	0,232	0,077	0,097
	Máximo	76	66	58	34	27
	Mínimo	73	62	53	32	25

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Figura 12 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo Stain-Free® da amostra do *Pool* 2, nas delimitações das linhas roxas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra "P"



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

As tabelas 25, 26, 27 e 28 apresentam os pesos moleculares das bandas de proteínas urinária do *pool* 3 obtidas na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 13 apresenta um gel corado pelo azul brilhante de Coomassie.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio em todos os três dias (dias 1, 2 e 3) foram menores que 5%, com exceção apenas no dia 1, na banda 10, que foi de 6,55%. No relativo ao inter ensaio, todos os coeficientes de variação de todas as bandas foram inferiores a 5%.

Tabela 25 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizados no **dia 1.**

Dia 1 CO *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	137	107	85	67	65	57	50	34	27	22
2	139	105	83	69	64	55	50	35	27	25

3	145	104	85	71	63	57	52	32	27	22
4	140	107	83	69	64	59	50	32	26	22
5	137	101	81	68	60	56	51	32	27	20
6	137	101	82	69	64	59	51	33	26	22
7	137	104	82	71	64	57	51	32	28	23
8	141	114	90	70	67	57	50	31	27	23
9	139	112	92	70	65	58	50	32	26	22
10	141	112	89	72	65	57	50	32	27	24
Média	139	107	85	70	64	57	50	33	27	22
CV	1,84%	4,45%	4,48%	2,07%	2,56%	1,82%	1,26%	3,50%	1,79%	6,55%
EPM	0,809	1,505	1,205	0,455	0,518	0,329	0,201	0,361	0,151	0,465
Máximo	145	114	92	72	67	59	52	35	28	25
Mínimo	137	101	81	67	60	55	50	31	26	20

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, CO = Azul Brilhante de Coomassie

Tabela 26 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizados no **dia 2**.

Dia 2 CO *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	135	114	89	73	62	54	49	34	28	23
2	137	109	89	75	62	54	48	35	27	24
3	135	107	90	73	62	54	49	33	27	23
4	140	107	90	73	61	54	49	34	27	23
5	132	109	89	74	61	54	48	34	27	23
6	134	107	89	74	62	54	48	34	27	23
7	135	108	93	74	62	55	49	34	27	24
8	133	113	89	73	61	55	48	34	26	23
9	133	108	90	72	61	54	48	33	27	23
10	139	111	91	71	61	55	49	34	27	23
Média	135	109	90	73	62	54	48	34	27	23
CV	1,96%	2,43%	1,46%	1,52%	0,87%	0,86%	0,41%	1,25%	1,28%	0,69%
EPM	0,840	0,839	0,414	0,352	0,169	0,147	0,063	0,134	0,109	0,051
Máximo	140	114	93	75	62	55	49	35	28	24
Mínimo	132	107	89	71	61	54	48	33	26	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, CO = Azul Brilhante de Coomassie.

Tabela 27 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 3**.

Dia 3 CO *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	146	117	95	74	63	55	51	33	26	24
2	142	116	97	74	64	56	51	33	27	23
3	140	111	92	72	63	56	49	33	26	24
4	139	109	92	72	63	56	51	33	26	24
5	139	114	91	71	61	55	49	34	26	23
6	136	104	92	72	62	55	49	33	26	23
7	139	118	93	73	62	54	50	32	26	24
8	140	111	90	72	62	54	50	33	26	23
9	136	111	86	72	61	54	50	33	26	23
10	140	106	89	73	61	54	50	33	25	23
Média	140	112	92	73	62	55	50	33	26	23
CV	2,03%	4,13%	3,38%	1,32%	1,73%	1,63%	1,59%	1,13%	2,15%	1,03%
EPM	0,895	1,459	0,979	0,304	0,340	0,283	0,251	0,118	0,178	0,076
Máximo	146	118	97	74	64	56	51	34	27	24
Mínimo	136	104	86	71	61	54	49	32	25	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, CO = Azul Brilhante de Coomassie.

Tabela 28 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO).

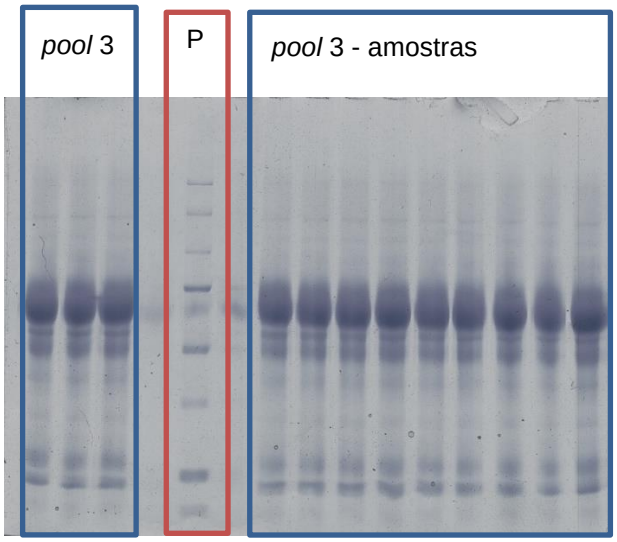
DIA	*pool* 3 CO	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	1	137	107	85	67	65	57	50	34	27	22
	2	139	105	83	69	64	55	50	35	27	25
	3	145	104	85	71	63	57	52	32	27	22
	4	140	107	83	69	64	59	50	32	26	22
	5	137	101	81	68	60	56	51	32	27	20
	6	137	101	82	69	64	59	51	33	26	22
	7	137	104	82	71	64	57	51	32	28	23
	8	141	114	90	70	67	57	50	31	27	23
	9	139	112	92	70	65	58	50	32	26	22
	10	141	112	89	72	65	57	50	32	27	24
2	1	135	114	89	73	62	54	49	34	28	23
	2	137	109	89	75	62	54	48	35	27	24
	3	135	107	90	73	62	54	49	33	27	23
	4	140	107	90	73	61	54	49	34	27	23

	5	132	109	89	74	61	54	48	34	27	23
	6	134	107	89	74	62	54	48	34	27	23
	7	135	108	93	74	62	55	49	34	27	24
	8	133	113	89	73	61	55	48	34	26	23
	9	133	108	90	72	61	54	48	33	27	23
	10	139	111	91	71	61	55	49	34	27	23
3	1	146	117	95	74	63	55	51	33	26	24
	2	142	116	97	74	64	56	51	33	27	23
	3	140	111	92	72	63	56	49	33	26	24
	4	139	109	92	72	63	56	51	33	26	24
	5	139	114	91	71	61	55	49	34	26	23
	6	136	104	92	72	62	55	49	33	26	23
	7	139	118	93	73	62	54	50	32	26	24
	8	140	111	90	72	62	54	50	33	26	23
	9	136	111	86	72	61	54	50	33	26	23
	10	140	106	89	73	61	54	50	33	25	23
	Média	138	109	89	72	63	55	50	33	27	23
	CV	2,41%	4,07%	4,48%	2,83%	2,46%	2,77%	2,03%	2,81%	2,15%	4,07%
	EPM	0,608	0,811	0,726	0,371	0,282	0,280	0,184	0,170	0,104	0,171
	MA	146	118	97	75	67	59	52	35	28	25
	MI	132	101	81	67	60	54	48	31	25	20

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, CO = Azul Brilhante de Coomassie, MA = Máximo, MI = Mínimo.

Figura 13 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie G-250 da amostra do *Pool* 3, nas delimitações das linhas azuis encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 29, 30, 31 e 32 encontram-se descritos os resultados individuais dos pesos moleculares das bandas de proteínas urinária do *pool* 3 obtidos na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida coradas pela Prata, determinados em

10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 14 apresenta um gel corado pela Prata.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio em todos os três dias (dias 1, 2 e 3) foram menores que 5% com exceção apenas no dia 1, na banda 3, que foi de 6,02%. No relativo ao inter ensaio, todos os coeficientes de variação de todas as bandas foram inferiores a 5%.

Tabela 29 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 PRATA *pool* 3	**PM kDa Banda 1**	**PM kDa Banda 2**	**PM kDa Banda 3**	**PM kDa Banda 4**	**PM kDa Banda 5**	**PM kDa Banda 6**	**PM kDa Banda 7**	**PM kDa Banda 8**	**PM kDa Banda 9**	**PM kDa Banda 10**
1	144	126	101	70	64	57	50	33	27	24
2	147	116	98	70	64	56	51	34	27	23
3	147	127	106	70	62	56	50	34	27	23
4	150	124	100	74	63	57	52	34	27	24
5	151	121	96	73	63	56	50	34	27	23
6	150	119	94	72	63	57	50	33	26	25
7	147	116	92	71	63	56	50	33	27	24
8	148	121	92	70	64	57	51	32	27	23
9	140	113	90	72	65	57	51	33	27	23
10	144	111	86	69	65	57	51	33	26	23
Média	147	119	95	71	64	57	50	33	27	23
CV	2,30%	4,41%	6,02%	2,07%	1,17%	0,95%	1,28%	1,76%	1,26%	2,48%
EPM	1,068	1,664	1,818	0,466	0,236	0,169	0,205	0,185	0,107	0,184
Máximo	151	127	106	74	65	57	52	34	27	25
Mínimo	140	111	86	69	62	56	50	32	26	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 30 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 PRATA *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	129	109	90	73	60	55	50	34	28	24
2	131	107	89	73	60	55	49	33	27	23
3	135	110	89	73	66	56	49	33	27	24
4	131	109	92	72	62	56	50	33	27	24
5	136	111	92	72	64	55	49	33	27	24
6	138	111	91	73	62	55	49	33	27	24
7	137	110	92	73	65	54	49	33	27	24
8	138	113	91	73	65	55	49	33	27	24
9	139	113	91	73	65	55	49	33	27	24
10	135	111	95	72	61	56	50	33	27	25
Média	135	110	91	73	63	55	49	33	27	24
CV	2,52%	1,65%	1,77%	0,78%	3,33%	1,05%	1,19%	0,77%	1,32%	1,79%
EPM	1,076	0,577	0,511	0,178	0,664	0,183	0,185	0,081	0,112	0,135
Máximo	139	113	95	73	66	56	50	34	28	25
Mínimo	129	107	89	72	60	54	49	33	27	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 31 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 PRATA *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	136	114	93	73	63	55	50	34	27	24
2	145	111	91	72	58	55	49	33	26	24
3	139	115	93	73	59	55	49	33	26	24
4	136	109	90	72	61	56	50	34	27	24
5	139	108	91	73	61	55	49	34	27	24
6	136	112	93	72	60	55	49	34	27	24
7	142	109	88	73	60	55	49	34	27	24
8	138	111	90	73	60	55	49	33	27	24
9	140	114	91	73	60	54	49	33	27	24
10	136	114	95	75	62	55	50	34	27	24
Média	139	112	91	73	60	55	49	34	27	24
CV	2,16%	2,28%	2,06%	1,18%	2,33%	0,92%	0,54%	0,99%	1,10%	1,19%
EPM	0,949	0,806	0,594	0,271	0,445	0,160	0,084	0,106	0,093	0,090
Máximo	145	115	95	75	63	56	50	34	27	24
Mínimo	136	108	88	72	58	54	49	33	26	24

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

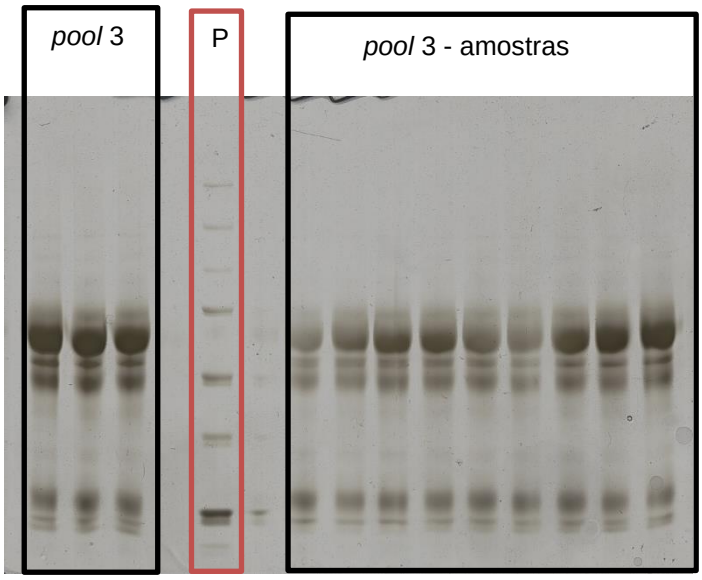
Tabela 32 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pela Prata (PR).

DIA	*pool* 3 PR	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	1	144	126	101	70	64	57	50	33	27	24
	2	147	116	98	70	64	56	51	34	27	23
	3	147	127	106	70	62	56	50	34	27	23
	4	150	124	100	74	63	57	52	34	27	24
	5	151	121	96	73	63	56	50	34	27	23
	6	150	119	94	72	63	57	50	33	26	25
	7	147	116	92	71	63	56	50	33	27	24
	8	148	121	92	70	64	57	51	32	27	23
	9	140	113	90	72	65	57	51	33	27	23
	10	144	111	86	69	65	57	51	33	26	23
2	1	129	109	90	73	60	55	50	34	28	24
	2	131	107	89	73	60	55	49	33	27	23
	3	135	110	89	73	66	56	49	33	27	24
	4	131	109	92	72	62	56	50	33	27	24
	5	136	111	92	72	64	55	49	33	27	24
	6	138	111	91	73	62	55	49	33	27	24
	7	137	110	92	73	65	54	49	33	27	24
	8	138	113	91	73	65	55	49	33	27	24
	9	139	113	91	73	65	55	49	33	27	24
	10	135	111	95	72	61	56	50	33	27	25
3	1	136	114	93	73	63	55	50	34	27	24
	2	145	111	91	72	58	55	49	33	26	24
	3	139	115	93	73	59	55	49	33	26	24
	4	136	109	90	72	61	56	50	34	27	24
	5	139	108	91	73	61	55	49	34	27	24
	6	136	112	93	72	60	55	49	34	27	24
	7	142	109	88	73	60	55	49	34	27	24
	8	138	111	90	73	60	55	49	33	27	24
	9	140	114	91	73	60	54	49	33	27	24
	10	136	114	95	75	62	55	50	34	27	24
	Média	140	114	93	72	62	56	50	33	27	24
	CV	4,26%	4,62%	4,35%	1,80%	3,33%	1,58%	1,60%	1,40%	1,28%	2,03%
	EPM	1,090	0,961	0,736	0,238	0,380	0,160	0,145	0,085	0,062	0,088
	MA	151	127	106	75	66	57	52	34	28	25
	MI	129	107	86	69	58	54	49	32	26	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, PR = Prata, MA = Máximo, MI = Mínimo.

Figura 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pela Prata da amostra do *Pool* 3, nas delimitações das linhas pretas encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra "P**".**



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Os valores individuais dos pesos moleculares das proteínas urinárias do *pool* 3 avaliados pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® estão dispostos nas tabelas 33, 34, 35 e 36. Os pesos moleculares foram determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também o mesmo procedimento foi realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 15 apresenta um gel corado pela referida técnica.

Os coeficientes de variação observados no intra ensaio em todos os três dias (dias 1, 2 e 3) foram menores que 5%, sendo o valor máximo de 2,95%, como também para o inter ensaio em que o valor máximo detectado foi de 2,44%. Observa-se que os menores coeficientes de variação foram detectados para o Stain-Free® em comparação com as colorações do azul brilhante de Coomassie e da Prata.

Tabela 33 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**.

Dia 1 Stain-Free® *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	137	118	92	75	63	56	50	34	28	24
2	139	113	93	74	62	55	49	34	27	24
3	139	113	93	74	61	55	49	34	27	24
4	137	111	92	73	60	54	49	34	27	23
5	138	111	92	73	60	54	48	33	26	23

6	138	111	92	73	59	54	48	33	26	23
7	139	112	93	73	60	54	49	34	27	24
8	137	111	92	72	59	54	48	33	27	23
9	139	112	92	73	60	54	49	34	27	23
10	140	114	93	73	61	55	49	34	27	23
Média	138	113	92	73	60	55	49	34	27	23
CV	0,83%	2,02%	0,74%	1,07%	2,03%	1,00%	1,12%	0,91%	1,40%	1,28%
EPM	0,360	0,718	0,216	0,248	0,388	0,173	0,174	0,097	0,119	0,095
Máximo	140	118	93	75	63	56	50	34	28	24
Mínimo	137	111	92	72	59	54	48	33	26	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 34 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	140	114	93	73	61	54	49	34	27	24
2	140	114	93	73	60	55	49	34	27	23
3	137	112	93	73	60	54	49	34	27	24
4	137	111	92	72	60	53	48	34	27	24
5	137	111	92	72	60	53	48	34	27	24
6	137	109	93	72	60	54	49	34	27	24
7	138	111	92	73	60	54	49	34	27	24
8	137	113	91	73	60	54	49	34	27	23
9	140	118	94	73	60	55	49	34	27	23
10	140	114	94	73	61	55	49	33	27	23
Média	138	113	93	73	60	54	49	34	27	24
CV	1,26%	2,44%	1,06%	0,58%	0,61%	1,02%	0,50%	0,49%	0,77%	0,76%
EPM	0,553	0,870	0,309	0,134	0,115	0,175	0,077	0,052	0,065	0,057
Máximo	140	118	94	73	61	55	49	34	27	24
Mínimo	137	109	91	72	60	53	48	33	27	23

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 35 – Intra ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**.

Dia 3 Stain-Free® *pool* 3	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	144	119	98	75	63	56	51	34	27	23
2	142	112	94	73	61	54	49	34	26	23
3	135	111	92	73	60	53	49	33	26	23

4	133	108	93	72	59	53	48	33	26	23
5	133	108	92	72	59	53	48	33	26	23
6	133	108	92	72	59	53	49	33	26	23
7	134	110	91	73	60	53	49	33	26	22
8	134	110	92	73	60	53	49	33	26	23
9	136	113	93	73	61	54	49	34	26	23
10	137	113	95	75	62	55	51	35	28	24
Média	136	111	93	73	60	54	49	34	26	23
CV	2,95%	2,86%	2,01%	1,60%	1,92%	1,87%	1,73%	1,60%	1,87%	1,83%
EPM	1,270	1,006	0,591	0,370	0,366	0,319	0,270	0,170	0,157	0,133
Máximo	144	119	98	75	63	56	51	35	28	24
Mínimo	133	108	91	72	59	53	48	33	26	22

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular

Tabela 36 – Inter ensaio para avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida coradas pelo Stain-Free®.

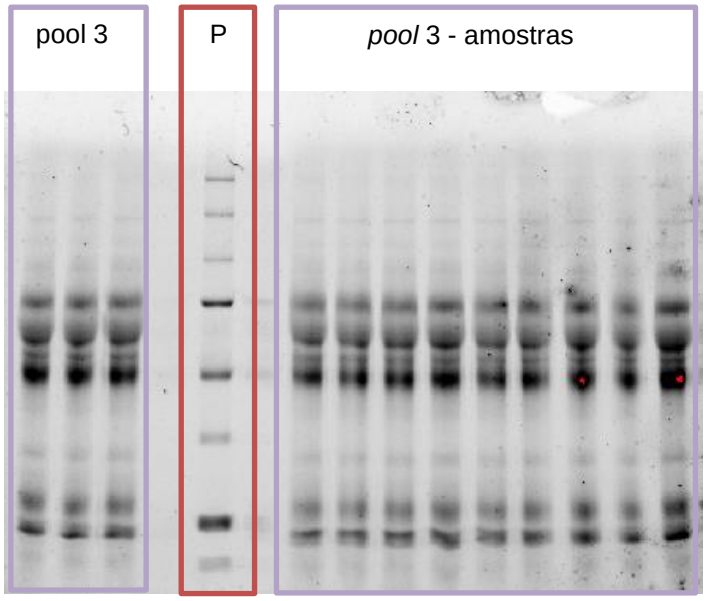
DIA	*pool* 3 Stain-Free®	PM kDa Banda 1	PM kDa Banda 2	PM kDa Banda 3	PM kDa Banda 4	PM kDa Banda 5	PM kDa Banda 6	PM kDa Banda 7	PM kDa Banda 8	PM kDa Banda 9	PM kDa Banda 10
1	1	137	118	92	75	63	56	50	34	28	24
	2	139	113	93	74	62	55	49	34	27	24
	3	139	113	93	74	61	55	49	34	27	24
	4	137	111	92	73	60	54	49	34	27	23
	5	138	111	92	73	60	54	48	33	26	23
	6	138	111	92	73	59	54	48	33	26	23
	7	139	112	93	73	60	54	49	34	27	24
	8	137	111	92	72	59	54	48	33	27	23
	9	139	112	92	73	60	54	49	34	27	23
	10	140	114	93	73	61	55	49	34	27	23
2	1	140	114	93	73	61	54	49	34	27	24
	2	140	114	93	73	60	55	49	34	27	23
	3	137	112	93	73	60	54	49	34	27	24
	4	137	111	92	72	60	53	48	34	27	24
	5	137	111	92	72	60	53	48	34	27	24
	6	137	109	93	72	60	54	49	34	27	24
	7	138	111	92	73	60	54	49	34	27	24
	8	137	113	91	73	60	54	49	34	27	23
	9	140	118	94	73	60	55	49	34	27	23
	10	140	114	94	73	61	55	49	33	27	23
3	1	144	119	98	75	63	56	51	34	27	23
	2	142	112	94	73	61	54	49	34	26	23
	3	135	111	92	73	60	53	49	33	26	23
	4	133	108	93	72	59	53	48	33	26	23

	5	133	108	92	72	59	53	48	33	26	23
	6	133	108	92	72	59	53	49	33	26	23
	7	134	110	91	73	60	53	49	33	26	22
	8	134	110	92	73	60	53	49	33	26	23
	9	136	113	93	73	61	54	49	34	26	23
	10	137	113	95	75	62	55	51	35	28	24
	Média	137	112	93	73	60	54	49	34	27	23
	CV	1,97%	2,44%	1,37%	1,19%	1,61%	1,41%	1,25%	1,10%	1,63%	1,66%
	EPM	0,493	0,499	0,232	0,158	0,177	0,139	0,111	0,068	0,080	0,071
	MA	144	119	98	75	63	56	51	35	28	24
	MI	133	108	91	72	59	53	48	33	26	22

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, PM = Peso Molecular, MA = Máximo, MI = Mínimo.

Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo sistema Stain-Free® da amostra do *Pool* 3 nas delimitações das linhas roxa encontram-se as amostras de urina e na delimitação da linha vermelha o padrão de peso molecular, identificado com a letra “P”



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

5.2 Porcentagens da densidade óptica das bandas de proteínas dos *pools*

As tabelas 37, 38, 39 e 40 apresentam os resultados obtidos das porcentagens das densidades ópticas do *pool* 1 determinadas pela eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida e corados pelo azul brilhante de Coomassie determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Todos os coeficientes de variação constatados foram superiores a 5% para o intra ensaio a variação foi de 5,23 a 19,60% e para o inter ensaio de 6,14 a 17,18%.

Tabela 37 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**.

Dia 1 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	27,6	29,2	8,9	19,1	15,2
2	29,0	34,8	9,2	12,6	14,5
3	31,7	30,3	8,2	11,8	18,0
4	31,2	27,6	8,1	11,6	21,5
5	28,0	26,3	11,6	16,3	17,8
6	27,9	28,1	9,0	13,0	22,1
7	28,3	29,6	9,7	11,5	21,0
8	30,1	30,2	12,6	12,8	14,3
9	27,7	32,7	9,4	14,2	16,1
10	30,0	30,4	11,8	11,6	16,3
Média	29,1	29,9	9,9	13,4	17,7
CV	5,23%	8,21%	15,99%	18,56%	16,63%
EPM	0,482	0,777	0,498	0,789	0,929
Máximo	31,7	34,8	12,6	19,1	22,1
Mínimo	27,6	26,3	8,1	11,5	14,3

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 38 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**.

Dia 2 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	28,3	27,8	7,5	15,6	20,8
2	27,2	32,7	8,8	14,4	16,9
3	31,8	27,4	9,9	16,5	14,5
4	33,2	27,4	7,8	15,2	16,4
5	33,8	25,7	10,5	16,3	13,7
6	29,5	27,9	9,2	18,6	14,8
7	28,2	31,1	6,9	17,1	16,7
8	29,8	27,3	9,4	15,2	18,3
9	30,3	31,8	5,3	15,5	17,2
10	29,9	27,5	10,4	14,4	17,8
Média	30,2	28,7	8,6	15,9	16,7
CV	7,16%	8,11%	19,60%	8,14%	12,32%
EPM	0,684	0,735	0,531	0,408	0,651
Máximo	33,8	32,7	10,5	18,6	20,8
Mínimo	27,2	25,7	5,3	14,4	13,7

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 39 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**.

Dia 3 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	26,2	31,7	7,4	13,9	20,8
2	26,8	29,0	9,4	16,8	18,0
3	29,9	30,9	8,3	13,1	17,8
4	30,6	30,4	8,4	10,7	20,0
5	31,2	30,1	8,5	12,7	17,5
6	30,3	25,9	9,7	17,5	16,6
7	28,8	26,2	10,7	15,8	18,6
8	31,1	27,0	11,5	10,5	20,0
9	30,2	30,8	8,1	11,1	19,9
10	29,1	31,5	8,1	15,0	16,4
Média	29,4	29,3	9,0	13,7	18,5
CV	5,84%	7,54%	14,36%	18,42%	8,28%
EPM	0,544	0,699	0,408	0,799	0,486
Máximo	31,2	31,7	11,5	17,5	20,8
Mínimo	26,2	25,9	7,4	10,5	16,4

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 40 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie.

Dia	*pool* 1 Azul Brilhante de Coomassie	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	27,6	29,2	8,9	19,1	15,2
	2	29,0	34,8	9,2	12,6	14,5
	3	31,7	30,3	8,2	11,8	18,0
	4	31,2	27,6	8,1	11,6	21,5
	5	28,0	26,3	11,6	16,3	17,8
	6	27,9	28,1	9,0	13,0	22,1
	7	28,3	29,6	9,7	11,5	21,0
	8	30,1	30,2	12,6	12,8	14,3
	9	27,7	32,7	9,4	14,2	16,1
	10	30,0	30,4	11,8	11,6	16,3
2	1	28,3	27,8	7,5	15,6	20,8
	2	27,2	32,7	8,8	14,4	16,9
	3	31,8	27,4	9,9	16,5	14,5
	4	33,2	27,4	7,8	15,2	16,4

	5	33,8	25,7	10,5	16,3	13,7
	6	29,5	27,9	9,2	18,6	14,8
	7	28,2	31,1	6,9	17,1	16,7
	8	29,8	27,3	9,4	15,2	18,3
	9	30,3	31,8	5,3	15,5	17,2
	10	29,9	27,5	10,4	14,4	17,8
3	1	26,2	31,7	7,4	13,9	20,8
	2	26,8	29,0	9,4	16,8	18,0
	3	29,9	30,9	8,3	13,1	17,8
	4	30,6	30,4	8,4	10,7	20,0
	5	31,2	30,1	8,5	12,7	17,5
	6	30,3	25,9	9,7	17,5	16,6
	7	28,8	26,2	10,7	15,8	18,6
	8	31,1	27,0	11,5	10,5	20,0
	9	30,2	30,8	8,1	11,1	19,9
	10	29,1	31,5	8,1	15,0	16,4
	Média	29,6	29,3	9,1	14,3	17,6
	CV	6,14%	7,88%	17,18%	16,57%	13,06%
	EPM	0,332	0,422	0,286	0,434	0,421
	Máximo	33,8	34,8	12,6	19,1	22,1
	Mínimo	26,2	25,7	5,3	10,5	13,7

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Nas tabelas 41, 42, 43 e 44 apresentam as porcentagens das densidades ópticas das bandas de proteína urinária do *pool* 1 obtidas na eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata, determinadas em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 16 apresenta um gel corado pela Prata.

Os coeficientes de variação foram superiores a 5%, a exceção no dia 2 (intra ensaio), na banda 5, que foi de 4,67%. No intra ensaio a variação foi de 4,67 a 17,67% e para o inter ensaio de 8,43 a 21,53%.

Tabela 41 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 Prata *pool* 1	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**
1	26,8	22,2	10,8	18,9	21,3
2	26,5	30,7	10,0	15,3	17,6

3	27,7	26,8	9,9	18,0	17,6
4	29,3	29,0	10,4	11,4	19,9
5	27,1	27,3	13,7	12,6	19,3
6	26,6	26,5	10,6	15,8	20,6
7	29,6	27,1	13,6	12,8	17,0
8	25,1	30,4	10,8	14,4	19,3
9	25,4	29,5	13,6	11,8	19,7
10	27,8	29,6	14,3	14,4	14,0
Média	27,2	27,9	11,8	14,5	18,6
CV	5,39%	9,04%	15,03%	17,34%	11,46%
EPM	0,464	0,798	0,559	0,797	0,675
Máximo	29,6	30,7	14,3	18,9	21,3
Mínimo	25,1	22,2	9,9	11,4	14,0

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 42 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 Prata *pool* 1	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**
1	24,3	27,7	11,4	15,1	21,6
2	24,6	26,9	10,9	17,4	20,2
3	24,4	28,7	8,0	18,5	20,4
4	25,7	26,3	9,0	17,4	21,6
5	25,2	30,2	9,2	14,6	20,9
6	29,9	28,1	9,5	12,6	19,9
7	30,9	30,4	6,9	10,7	21,2
8	29,0	30,1	9,2	12,8	19,0
9	29,7	27,9	7,7	15,6	19,2
10	26,5	32,4	6,7	14,7	19,7
Média	27,0	28,9	8,8	14,9	20,4
CV	9,61%	6,44%	17,56%	16,30%	4,67%
EPM	0,821	0,588	0,491	0,770	0,301
Máximo	30,9	32,4	11,4	18,5	21,6
Mínimo	24,3	26,3	6,7	10,7	19,0

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 43 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 Prata *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	25,4	30,3	10,1	16,1	18,1
2	24,4	28,7	7,9	18,0	21,0
3	22,6	35,9	7,1	16,1	18,3
4	29,7	28,3	10,7	11,9	19,6
5	31,2	30,6	5,9	15,1	17,3
6	30,2	26,6	9,1	15,7	18,4
7	30,7	27,4	10,6	15,7	15,5
8	30,8	30,3	9,6	11,3	18,1
9	27,8	31,2	8,2	15,1	17,7
10	28,0	31,4	8,9	16,2	15,5
Média	28,1	30,1	8,8	15,1	17,9
CV	10,73%	8,65%	17,67%	13,52%	9,24%
EPM	0,952	0,823	0,492	0,646	0,524
Máximo	31,2	35,9	10,7	18,0	21,0
Mínimo	22,6	26,6	5,9	11,3	15,5

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

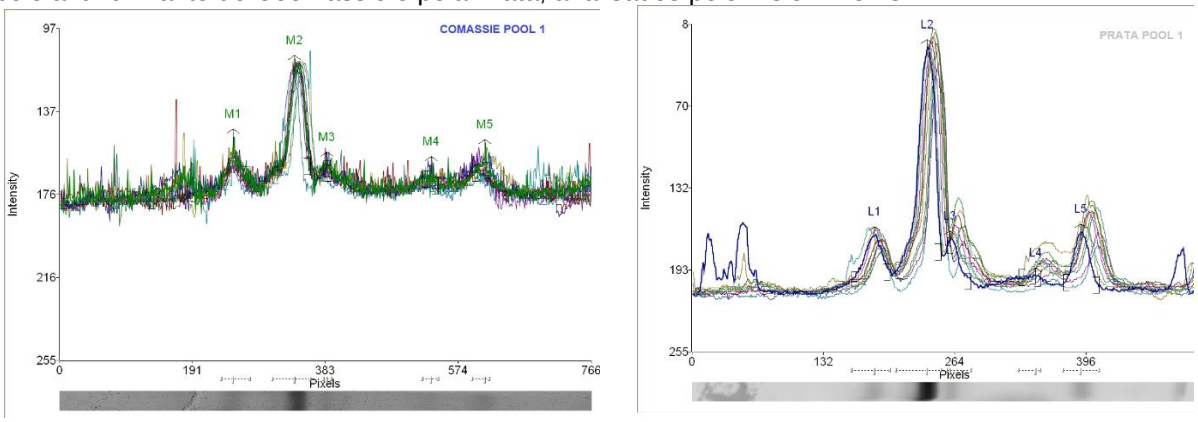
Tabela 44 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata.

Dia	*pool* 1 Prata	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	26,8	22,2	10,8	18,9	21,3
	2	26,5	30,7	10,0	15,3	17,6
	3	27,7	26,8	9,9	18,0	17,6
	4	29,3	29,0	10,4	11,4	19,9
	5	27,1	27,3	13,7	12,6	19,3
	6	26,6	26,5	10,6	15,8	20,6
	7	29,6	27,1	13,6	12,8	17,0
	8	25,1	30,4	10,8	14,4	19,3
	9	25,4	29,5	13,6	11,8	19,7
	10	27,8	29,6	14,3	14,4	14,0
2	1	24,3	27,7	11,4	15,1	21,6
	2	24,6	26,9	10,9	17,4	20,2
	3	24,4	28,7	8,0	18,5	20,4
	4	25,7	26,3	9,0	17,4	21,6
	5	25,2	30,2	9,2	14,6	20,9
	6	29,9	28,1	9,5	12,6	19,9
	7	30,9	30,4	6,9	10,7	21,2

	8	29,0	30,1	9,2	12,8	19,0
	9	29,7	27,9	7,7	15,6	19,2
	10	26,5	32,4	6,7	14,7	19,7
3	1	25,4	30,3	10,1	16,1	18,1
	2	24,4	28,7	7,9	18,0	21,0
	3	22,6	35,9	7,1	16,1	18,3
	4	29,7	28,3	10,7	11,9	19,6
	5	31,2	30,6	5,9	15,1	17,3
	6	30,2	26,6	9,1	15,7	18,4
	7	30,7	27,4	10,6	15,7	15,5
	8	30,8	30,3	9,6	11,3	18,1
	9	27,8	31,2	8,2	15,1	17,7
	10	28,0	31,4	8,9	16,2	15,5
	Média	27,4	28,9	9,8	14,9	19,0
	CV	8,78%	8,43%	21,53%	15,30%	10,01%
	EPM	0,440	0,445	0,385	0,415	0,347
	Máximo	31,2	35,9	14,3	18,9	21,6
	Mínimo	22,6	22,2	5,9	10,7	14,0

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Figura 16 - Gráficos dos valores da densidade óptica do *pool* 1 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 45, 46, 47 e 48 encontram-se dispostos os resultados referentes as porcentagens das densidades ópticas do *pool* 1 do traçado eletroforético das proteínas urinária em gel de poliacrilamida marcados pelo sistema Stain-Free®, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também o mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Todos os coeficientes de variação observados foram superiores a 5%, a exceção somente para no dia 2, na banda 1, que foi de 3,46%. No intra ensaio a variação foi de 3,46 a 16,82% e para o inter ensaio de 6,10 a 15,24%.

Tabela 45 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**.

Dia 1 Stain-Free® *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	34,1	22,4	8,8	16,6	18,2
2	26,8	24,6	7,5	20,9	20,2
3	29,9	21,1	8,2	23,3	17,5
4	30,8	24,8	7,9	16,0	20,5
5	30,4	22,1	10,4	18,8	18,4
6	28,6	18,2	9,8	21,3	22,1
7	27,5	22,6	10,1	21,3	18,6
8	28,0	26,6	11,7	17,6	16,2
9	27,6	25,0	10,7	18,9	17,8
10	26,2	26,2	11,8	16,7	19,1
Média	29,0	23,3	9,7	19,1	18,9
CV	8,10%	11,08%	15,86%	12,84%	9,03%
EPM	0,742	0,818	0,485	0,777	0,539
Máximo	34,1	26,6	11,8	23,3	22,1
Mínimo	26,2	18,2	7,5	16,0	16,2

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 46 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	30,6	24,1	8,6	16,5	20,2
2	28,2	25,4	8,2	20,0	18,3
3	29,8	21,1	8,0	20,1	21,1
4	30,3	32,3	8,5	13,4	15,5
5	28,6	22,0	12,8	18,1	18,5
6	30,7	27,5	10,6	15,9	15,3
7	30,3	26,3	9,4	16,5	17,6
8	31,5	26,6	8,6	14,9	18,4
9	30,2	29,3	11,2	13,8	15,4
10	31,1	24,1	9,4	18,5	16,8
Média	30,1	25,9	9,5	16,8	17,7

CV	3,46%	12,97%	16,15%	14,23%	11,23%
EPM	0,330	1,061	0,487	0,754	0,629
Máximo	31,5	32,3	12,8	20,1	21,1
Mínimo	28,2	21,1	8,0	13,4	15,3

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 47 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**.

Dia 3 Stain-Free® *pool* 1	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	29,6	24,1	10,6	17,8	17,9
2	28,3	22,3	8,0	21,4	20,0
3	27,0	26,1	9,5	22,9	14,5
4	31,7	27,3	10,0	14,8	16,2
5	31,3	23,8	10,4	19,4	15,1
6	29,1	27,8	9,6	16,2	17,3
7	32,6	26,3	6,8	16,5	17,9
8	31,9	25,3	10,0	15,7	17,0
9	29,6	31,4	8,7	14,3	16,0
10	29,6	27,7	8,2	15,2	19,4
Média	30,1	26,2	9,2	17,4	17,1
CV	5,83%	9,71%	13,19%	16,82%	10,27%
EPM	0,554	0,805	0,382	0,927	0,556
Máximo	32,6	31,4	10,6	22,9	20,0
Mínimo	27,0	22,3	6,8	14,3	14,5

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 48 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 1 (RPC = 0,04) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®.

Dia	*pool* 1 Stain-Free®	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	34,1	22,4	8,8	16,6	18,2
	2	26,8	24,6	7,5	20,9	20,2
	3	29,9	21,1	8,2	23,3	17,5
	4	30,8	24,8	7,9	16,0	20,5
	5	30,4	22,1	10,4	18,8	18,4
	6	28,6	18,2	9,8	21,3	22,1
	7	27,5	22,6	10,1	21,3	18,6
	8	28,0	26,6	11,7	17,6	16,2
	9	27,6	25,0	10,7	18,9	17,8
	10	26,2	26,2	11,8	16,7	19,1
2	1	30,6	24,1	8,6	16,5	20,2

	2	28,2	25,4	8,2	20,0	18,3
	3	29,8	21,1	8,0	20,1	21,1
	4	30,3	32,3	8,5	13,4	15,5
	5	28,6	22,0	12,8	18,1	18,5
	6	30,7	27,5	10,6	15,9	15,3
	7	30,3	26,3	9,4	16,5	17,6
	8	31,5	26,6	8,6	14,9	18,4
	9	30,2	29,3	11,2	13,8	15,4
	10	31,1	24,1	9,4	18,5	16,8
3	1	29,6	24,1	10,6	17,8	17,9
	2	28,3	22,3	8,0	21,4	20,0
	3	27,0	26,1	9,5	22,9	14,5
	4	31,7	27,3	10,0	14,8	16,2
	5	31,3	23,8	10,4	19,4	15,1
	6	29,1	27,8	9,6	16,2	17,3
	7	32,6	26,3	6,8	16,5	17,9
	8	31,9	25,3	10,0	15,7	17,0
	9	29,6	31,4	8,7	14,3	16,0
	10	29,6	27,7	8,2	15,2	19,4
	Média	29,7	25,1	9,5	17,8	17,9
	CV	6,10%	12,12%	14,83%	15,24%	10,64%
	EPM	0,331	0,556	0,256	0,494	0,348
	Máximo	34,1	32,3	12,8	23,3	22,1
	Mínimo	26,2	18,2	6,8	13,4	14,5

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

As tabelas 49, 50, 51 e 52 apresentam os resultados obtidos das porcentagens de densidades ópticas do *pool* 2 pela eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida, corados pelo azul brilhante de Coomassie determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Todos os coeficientes de variação foram superiores a 5%, a exceção somente no intra ensaio no dia 3, na banda 2, que foi de 3,72%, sendo a variação de 3,72 a 24,13%. Para o inter ensaio a variação foi de 6,93 a 20,30%.

Tabela 49 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 1**.

Dia 1 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	19,9	35,7	14,2	19,4	10,8
2	19,8	35,7	20,9	8,2	15,4
3	22,8	34,1	16,5	14,6	12,0
4	22,2	34,4	21,1	12,5	9,8
5	18,8	34,7	17,2	13,1	16,3
6	20,3	34,9	20,5	9,7	14,7
7	18,2	40,5	14,2	12,0	15,0
8	21,1	40,9	11,4	12,8	13,7
9	19,5	37,5	15,8	16,6	10,5
10	19,5	37,4	14,1	13,4	15,6
Média	20,2	36,6	16,6	13,2	13,4
CV	7,19%	6,76%	19,94%	24,13%	17,93%
EPM	0,460	0,782	1,046	1,010	0,758
Máximo	22,8	40,9	21,1	19,4	16,3
Mínimo	18,2	34,1	11,4	8,2	9,8

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 50 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 2**.

Dia 2 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	21,2	33,7	15,8	19,0	10,3
2	17,4	34,5	12,8	18,3	17,1
3	19,2	34,5	12,8	15,6	17,9
4	19,4	36,6	12,2	18,9	13,0
5	18,2	33,0	10,4	19,2	19,2
6	19,6	33,5	16,1	15,4	15,4
7	18,9	35,0	14,9	18,4	12,8
8	20,1	39,6	13,7	9,9	16,7
9	19,3	40,2	15,1	13,4	12,0
10	19,0	37,4	14,3	13,2	16,2
Média	19,2	35,8	13,8	16,1	15,1
CV	5,29%	7,14%	13,09%	19,66%	19,17%
EPM	0,321	0,808	0,572	1,003	0,913
Máximo	21,2	40,2	16,1	19,2	19,2
Mínimo	17,4	33,0	10,4	9,9	10,3

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 51 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie realizado no **dia 3**.

Dia 3 Azul Brilhante de Coomassie *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	20,4	38,8	13,3	13,6	13,9
2	21,3	39,5	10,9	13,9	14,5
3	17,2	37,1	12,9	16,3	16,6
4	20,1	36,7	13,5	17,4	12,3
5	16,4	38,0	15,3	15,3	15,0
6	17,0	40,7	11,6	12,7	18,0
7	17,8	39,6	12,2	14,4	16,0
8	18,0	40,5	14,3	14,5	12,7
9	17,5	39,2	15,2	14,5	13,7
10	18,5	40,8	14,1	11,0	15,6
Média	18,4	39,1	13,3	14,3	14,8
CV	8,84%	3,72%	11,15%	12,44%	12,02%
EPM	0,515	0,460	0,470	0,565	0,564
Máximo	21,3	40,8	15,3	17,4	18,0
Mínimo	16,4	36,7	10,9	11,0	12,3

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 52 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie.

Dia	*pool* 2 Azul Brilhante de Coomassie	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	19,9	35,7	14,2	19,4	10,8
	2	19,8	35,7	20,9	8,2	15,4
	3	22,8	34,1	16,5	14,6	12,0
	4	22,2	34,4	21,1	12,5	9,8
	5	18,8	34,7	17,2	13,1	16,3
	6	20,3	34,9	20,5	9,7	14,7
	7	18,2	40,5	14,2	12,0	15,0
	8	21,1	40,9	11,4	12,8	13,7
	9	19,5	37,5	15,8	16,6	10,5
	10	19,5	37,4	14,1	13,4	15,6
2	1	21,2	33,7	15,8	19,0	10,3
	2	17,4	34,5	12,8	18,3	17,1
	3	19,2	34,5	12,8	15,6	17,9
	4	19,4	36,6	12,2	18,9	13,0
	5	18,2	33,0	10,4	19,2	19,2

	6	19,6	33,5	16,1	15,4	15,4
	7	18,9	35,0	14,9	18,4	12,8
	8	20,1	39,6	13,7	9,9	16,7
	9	19,3	40,2	15,1	13,4	12,0
	10	19,0	37,4	14,3	13,2	16,2
3	1	20,4	38,8	13,3	13,6	13,9
	2	21,3	39,5	10,9	13,9	14,5
	3	17,2	37,1	12,9	16,3	16,6
	4	20,1	36,7	13,5	17,4	12,3
	5	16,4	38,0	15,3	15,3	15,0
	6	17,0	40,7	11,6	12,7	18,0
	7	17,8	39,6	12,2	14,4	16,0
	8	18,0	40,5	14,3	14,5	12,7
	9	17,5	39,2	15,2	14,5	13,7
	10	18,5	40,8	14,1	11,0	15,6
	Média	19,3	37,2	14,6	14,6	14,4
	CV	7,97%	6,93%	18,47%	20,30%	16,88%
	EPM	0,281	0,470	0,491	0,540	0,445
	Máximo	22,8	40,9	21,1	19,4	19,2
	Mínimo	16,4	33,0	10,4	8,2	9,8

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

As tabelas 53, 54, 55 e 56 apresentam porcentagens das densidades óptica das bandas de proteínas urinária do *pool* 2 obtidas na eletroforese em gel de poliacrilamida, coradas pela Prata e determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio) em diferentes dias. A figura 17 apresenta os gráficos obtidos das diferentes bandas para a coloração de azul brilhante de Coomassie e Prata.

Todos os coeficientes de variação observados foram superiores a 5%, apenas a exceção para o dia 3, na banda 2, que foi de 4,15%, sendo que a variação do intra ensaio foi de 4,15 a 19,85%. Para para o inter ensaio a variação foi de 5,57 a 20,23%.

Tabela 53 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 Prata *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	14,4	37,4	19,4	16,2	12,7
2	14,9	39,5	17,2	14,3	14,0
3	17,4	42,0	17,8	11,1	11,7
4	19,3	38,5	16,6	13,6	12,1
5	19,5	37,5	16,2	17,0	9,8
6	21,2	37,7	13,1	14,0	13,9
7	20,4	38,3	13,1	15,0	13,2
8	20,4	35,7	15,3	14,5	14,1
9	22,9	38,9	14,8	13,2	10,3
10	19,4	34,8	16,2	12,6	16,9
Média	19,0	38,0	16,0	14,1	12,9
CV	14,08%	5,22%	12,34%	12,01%	16,02%
EPM	0,846	0,627	0,623	0,537	0,652
Máximo	22,9	42,0	19,4	17,0	16,9
Mínimo	14,4	34,8	13,1	11,1	9,8

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 54 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 Prata *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	20,6	32,3	13,7	13,5	19,9
2	19,8	40,1	13,1	13,0	14,0
3	18,0	38,1	13,4	12,4	18,1
4	21,0	36,1	13,7	15,3	14,0
5	18,7	38,2	13,1	10,9	19,2
6	20,7	36,1	13,5	12,9	17,0
7	21,0	36,9	16,6	10,1	15,4
8	20,6	32,7	12,8	10,4	23,4
9	18,8	37,8	11,2	13,8	18,5
10	18,7	37,4	11,8	16,4	15,7
Média	19,8	36,6	13,3	12,9	17,5
CV	5,74%	6,67%	10,64%	15,82%	16,70%
EPM	0,359	0,771	0,447	0,644	0,925
Máximo	21,0	40,1	16,6	16,4	23,4
Mínimo	18,0	32,3	11,2	10,1	14,0

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 55 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 Prata *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	20,7	37,4	8,1	13,5	20,4
2	22,5	37,8	12,8	11,8	15,1
3	21,9	39,5	9,4	13,6	15,6
4	19,0	35,8	9,7	16,9	18,6
5	21,9	37,7	13,4	9,4	17,6
6	17,8	37,1	14,9	11,0	19,3
7	19,5	36,4	11,7	13,6	18,9
8	18,9	39,4	11,6	9,7	20,3
9	18,7	39,8	13,8	10,7	17,0
10	19,8	40,6	9,2	11,9	18,6
Média	20,1	38,1	11,4	12,2	18,1
CV	8,09%	4,15%	19,85%	18,46%	9,93%
EPM	0,513	0,500	0,719	0,712	0,570
Máximo	22,5	40,6	14,9	16,9	20,4
Mínimo	17,8	35,8	8,1	9,4	15,1

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

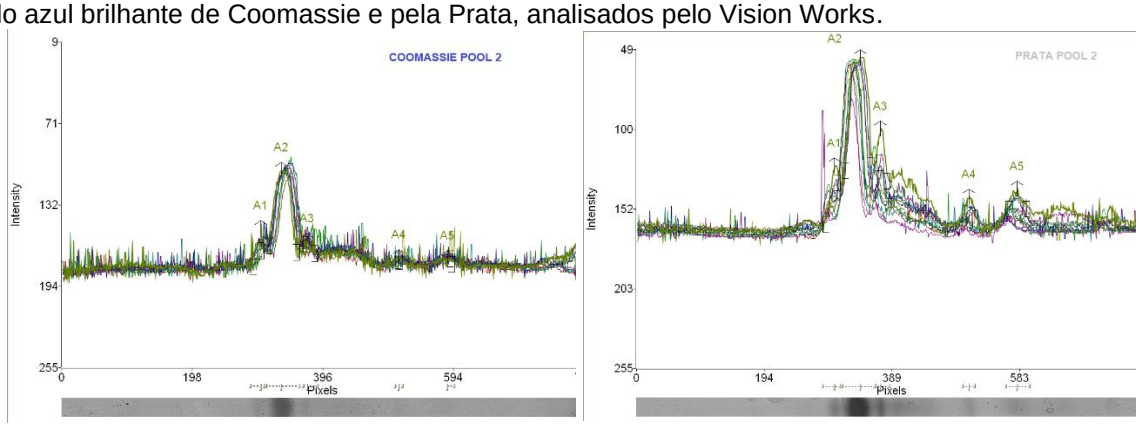
Tabela 56 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata.

Dia	*pool* 2 Prata	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	14,4	37,4	19,4	16,2	12,7
	2	14,9	39,5	17,2	14,3	14,0
	3	17,4	42,0	17,8	11,1	11,7
	4	19,3	38,5	16,6	13,6	12,1
	5	19,5	37,5	16,2	17,0	9,8
	6	21,2	37,7	13,1	14,0	13,9
	7	20,4	38,3	13,1	15,0	13,2
	8	20,4	35,7	15,3	14,5	14,1
	9	22,9	38,9	14,8	13,2	10,3
	10	19,4	34,8	16,2	12,6	16,9
2	1	20,6	32,3	13,7	13,5	19,9
	2	19,8	40,1	13,1	13,0	14,0
	3	18,0	38,1	13,4	12,4	18,1
	4	21,0	36,1	13,7	15,3	14,0
	5	18,7	38,2	13,1	10,9	19,2
	6	20,7	36,1	13,5	12,9	17,0

	7	21,0	36,9	16,6	10,1	15,4
	8	20,6	32,7	12,8	10,4	23,4
	9	18,8	37,8	11,2	13,8	18,5
	10	18,7	37,4	11,8	16,4	15,7
3	1	20,7	37,4	8,1	13,5	20,4
	2	22,5	37,8	12,8	11,8	15,1
	3	21,9	39,5	9,4	13,6	15,6
	4	19,0	35,8	9,7	16,9	18,6
	5	21,9	37,7	13,4	9,4	17,6
	6	17,8	37,1	14,9	11,0	19,3
	7	19,5	36,4	11,7	13,6	18,9
	8	18,9	39,4	11,6	9,7	20,3
	9	18,7	39,8	13,8	10,7	17,0
	10	19,8	40,6	9,2	11,9	18,6
	Média	19,6	37,6	13,6	13,1	16,2
	CV	9,74%	5,57%	19,48%	16,10%	20,23%
	EPM	0,349	0,382	0,482	0,384	0,597
	Máximo	22,9	42,0	19,4	17,0	23,4
	Mínimo	14,4	32,3	8,1	9,4	9,8

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Figura 17 – Gráficos dos valores da densidade óptica do *pool* 2 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Nas tabelas 57, 58, 59 e 60 encontram-se dispostos os resultados referentes as porcentagens das densidades óptica do *pool* 2 do traçado eletroforético das proteínas urinária em gel de poliacrilamida, corados pelo Stain-Free®, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Menores coeficientes de variação foram observados para o método Stain Free® em comparação ao azul brilhante de Coomassie e a Prata, principalmente para as

bandas 1 e 2 dos dias 1 e 2, e que variaram de 3,18 a 4,41% no intra ensaio. Também para o inter ensaio, os coeficientes de variação foram menores em comparação com os observados nas duas outras colorações e que variaram de 4,75 a 11,40%.

Tabela 57 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**

Dia 1 Stain-Free® *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	21,7	34,2	11,7	15,9	16,5
2	19,3	33,8	10,9	14,8	21,2
3	21,3	33,7	9,5	17,4	18,1
4	20,2	35,7	11,4	17,6	15,1
5	19,4	32,9	11,2	15,9	20,6
6	20,4	35,9	11,2	17,1	15,4
7	19,7	33,3	11,5	15,6	19,9
8	19,4	34,1	11,7	18,2	16,6
9	21,4	33,0	10,2	17,5	17,9
10	20,6	32,4	9,8	15,8	21,4
Média	20,3	33,9	10,9	16,6	18,3
CV	4,41%	3,38%	7,31%	6,70%	13,01%
EPM	0,284	0,363	0,252	0,351	0,752
Máximo	21,7	35,9	11,7	18,2	21,4
Mínimo	19,3	32,4	9,5	14,8	15,1

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 58 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	19,1	32,9	11,7	16,7	19,6
2	20,7	36,1	11,7	13,8	17,7
3	20,1	35,4	10,1	17,2	17,2
4	20,1	35,6	11,3	14,6	18,4
5	19,3	33,3	8,4	18,9	20,1
6	19,7	34,0	9,5	18,4	18,3
7	20,6	35,8	11,1	17,2	15,3
8	19,6	33,4	8,2	17,4	21,4
9	21,1	37,5	11,3	15,2	14,9
10	19,8	35,5	11,0	16,0	17,7
Média	20,0	35,0	10,4	16,5	18,1

CV	3,18%	4,20%	12,70%	9,85%	11,25%
EPM	0,201	0,465	0,420	0,515	0,642
Máximo	21,1	37,5	11,7	18,9	21,4
Mínimo	19,1	32,9	8,2	13,8	14,9

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 59 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3.**

Dia 3 Stain-Free® *pool* 2	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	21,5	30,6	11,0	16,2	20,7
2	21,5	33,3	11,2	17,6	16,5
3	19,0	32,0	10,1	17,9	21,0
4	19,7	30,3	13,4	16,5	20,1
5	20,8	35,3	12,9	13,8	17,2
6	21,3	34,9	9,4	13,8	20,7
7	20,6	35,5	9,0	17,0	17,8
8	23,6	34,9	9,7	15,0	16,8
9	18,8	34,4	9,4	17,8	19,6
10	24,5	33,5	10,2	15,7	16,1
Média	21,1	33,5	10,6	16,1	18,6
CV	8,74%	5,71%	14,08%	9,57%	10,47%
EPM	0,584	0,605	0,474	0,488	0,617
Máximo	24,5	35,5	13,4	17,9	21,0
Mínimo	18,8	30,3	9,0	13,8	16,1

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 60 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 2 (RPC = 1,48) das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®.

Dia	*pool* 2 Stain-Free®	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5
1	1	21,7	34,2	11,7	15,9	16,5
	2	19,3	33,8	10,9	14,8	21,2
	3	21,3	33,7	9,5	17,4	18,1
	4	20,2	35,7	11,4	17,6	15,1
	5	19,4	32,9	11,2	15,9	20,6
	6	20,4	35,9	11,2	17,1	15,4
	7	19,7	33,3	11,5	15,6	19,9
	8	19,4	34,1	11,7	18,2	16,6
	9	21,4	33	10,2	17,5	17,9
	10	20,6	32,4	9,8	15,8	21,4
2	1	19,1	32,9	11,7	16,7	19,6

	2	20,7	36,1	11,7	13,8	17,7
	3	20,1	35,4	10,1	17,2	17,2
	4	20,1	35,6	11,3	14,6	18,4
	5	19,3	33,3	8,4	18,9	20,1
	6	19,7	34,0	9,5	18,4	18,3
	7	20,6	35,8	11,1	17,2	15,3
	8	19,6	33,4	8,2	17,4	21,4
	9	21,1	37,5	11,3	15,2	14,9
	10	19,8	35,5	11,0	16,0	17,7
3	1	21,5	30,6	11,0	16,2	20,7
	2	21,5	33,3	11,2	17,6	16,5
	3	19,0	32,0	10,1	17,9	21,0
	4	19,7	30,3	13,4	16,5	20,1
	5	20,8	35,3	12,9	13,8	17,2
	6	21,3	34,9	9,4	13,8	20,7
	7	20,6	35,5	9,0	17,0	17,8
	8	23,6	34,9	9,7	15,0	16,8
	9	18,8	34,4	9,4	17,8	19,6
	10	24,5	33,5	10,2	15,7	16,1
	Média	20,5	34,1	10,7	16,4	18,3
	Desvio Padrão	1,29	1,62	1,22	1,41	2,07
	CV	6,30%	4,75%	11,40%	8,59%	11,29%
	EPM	0,236	0,296	0,222	0,257	0,378
	Máximo	24,5	37,5	13,4	18,9	21,4
	Mínimo	18,8	30,3	8,2	13,8	14,9

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

As tabelas 61, 62, 63 e 64 apresentam porcentagens das densidades óptica das bandas de proteínas urinária do *pool* 3, obtidas na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida coradas pelo azul brilhante de Coomassie, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Todos coeficientes de variação foram superiores a 5%, para o intra ensaio a variação foi de 7,27 a 28,95% e para o inter ensaio de 12,55 a 28,03%.

Tabela 61 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 1**.

Dia 1 CO *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	3,6	7,0	8,3	6,2	20,4	11,9	10,0	13,1	6,3	13,3
2	3,6	7,4	8,8	6,7	20,0	8,8	10,4	11,4	10,3	12,5
3	3,6	8,0	7,8	8,0	23,8	8,5	9,1	9,8	10,5	11,0
4	3,7	8,7	6,4	12,2	19,7	8,9	11,4	10,9	8,3	10,0
5	3,7	7,9	8,7	8,9	19,1	9,5	10,6	12,4	10,6	8,7
6	3,6	8,6	8,8	11,1	19,1	9,1	10,3	9,1	8,7	11,6
7	3,1	7,2	7,7	10,8	19,2	7,1	11,6	13,3	11,0	9,2
8	4,5	8,4	6,1	8,1	22,2	9,0	11,0	12,6	7,9	10,1
9	3,2	8,8	8,1	7,8	19,5	8,6	9,2	12,3	10,7	11,7
10	3,5	8,2	8,1	8,9	19,2	10,5	8,4	12,2	11,6	9,4
Média	3,6	8,0	7,9	8,9	20,2	9,2	10,2	11,7	9,6	10,8
CV	10,70%	7,88%	12,24%	21,94%	7,80%	13,89%	9,99%	11,99%	17,63%	13,98%
EPM	0,122	0,199	0,305	0,615	0,499	0,403	0,322	0,444	0,534	0,475
Máximo	4,5	8,8	8,8	12,2	23,8	11,9	11,6	13,3	11,6	13,3
Mínimo	3,1	7,0	6,1	6,2	19,1	7,1	8,4	9,1	6,3	8,7

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica, CO = Azul Brilhante de Coomassie

Tabela 62 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 2**.

Dia 2 CO *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	5,4	7,7	7,9	5,4	23,7	11,8	7,6	14,2	9,7	6,6
2	6,4	8,0	8,6	6,5	21,4	8,9	13,9	8,0	11,5	6,8
3	6,0	7,9	7,5	6,7	25,2	8,7	9,2	8,0	11,4	9,6
4	6,0	8,7	8,2	5,9	19,2	8,7	12,3	9,0	9,9	12,2
5	6,1	7,9	7,3	9,1	21,8	9,5	13,9	8,1	7,2	9,3
6	6,9	8,7	7,6	6,0	22,5	10,4	8,8	9,5	9,1	10,5
7	4,7	8,5	8,0	5,6	21,1	8,6	7,6	11,2	13,0	11,7
8	5,7	8,5	7,3	5,7	22,6	7,1	9,8	12,2	11,8	9,5
9	5,6	8,4	9,6	5,6	19,7	8,7	8,2	9,7	11,1	13,5
10	6,2	6,8	7,7	5,4	19,1	9,8	15,7	9,8	9,3	10,2
Média	5,9	8,1	8,0	6,2	21,6	9,2	10,7	10,0	10,4	10,0
CV	10,17%	7,27%	8,92%	17,70%	9,07%	13,69%	27,80%	20,26%	16,07%	21,75%
EPM	0,189	0,187	0,225	0,346	0,621	0,398	0,939	0,638	0,528	0,687
Máximo	6,9	8,7	9,6	9,1	25,2	11,8	15,7	14,2	13,0	13,5
Mínimo	4,7	6,8	7,3	5,4	19,1	7,1	7,6	8,0	7,2	6,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica, CO = Azul Brilhante de Coomassie

Tabela 63 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo azul brilhante de Coomassie (CO) realizado no **dia 3**.

Dia 3 CO *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	6,5	5,7	5,6	5,0	24,3	10,2	15,1	6,2	10,9	10,5
2	3,8	6,7	3,9	6,0	28,3	5,8	12,5	7,5	16,9	8,6
3	3,3	4,3	3,4	5,5	28,2	8,8	16,0	6,7	14,4	9,3
4	3,3	5,0	3,1	5,3	26,1	6,8	15,1	6,7	15,8	12,9
5	3,1	6,1	3,3	8,0	25,8	7,5	14,3	8,7	12,0	11,4
6	3,3	4,2	3,5	5,7	25,0	7,4	11,4	11,2	14,9	13,4
7	5,3	5,1	4,5	6,2	21,5	8,5	8,0	9,7	15,9	15,4
8	5,3	4,1	5,3	4,8	25,2	6,1	12,9	11,1	13,9	11,2
9	4,1	4,0	6,6	6,7	21,5	5,8	13,5	9,7	13,7	14,5
10	6,1	5,9	5,9	8,8	21,3	8,7	14,7	5,9	10,1	12,7
Média	4,4	5,1	4,5	6,2	24,7	7,6	13,3	8,4	13,9	12,0
CV	28,95%	18,78%	27,78%	20,81%	10,58%	19,65%	17,50%	24,06%	16,12%	18,20%
EPM	0,401	0,303	0,396	0,407	0,827	0,470	0,739	0,635	0,706	0,690
Máximo	6,5	6,7	6,6	8,8	28,3	10,2	16,0	11,2	16,9	15,4
Mínimo	3,1	4,0	3,1	4,8	21,3	5,8	8,0	5,9	10,1	8,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica, CO = Azul Brilhante de Coomassie

Tabela 64 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida corada pelo azul brilhante de Coomassie.

DIA	*pool* 3 CO	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	1	3,6	7,0	8,3	6,2	20,4	11,9	10,0	13,1	6,3	13,3
	2	3,6	7,4	8,8	6,7	20,0	8,8	10,4	11,4	10,3	12,5
	3	3,6	8,0	7,8	8,0	23,8	8,5	9,1	9,8	10,5	11,0
	4	3,7	8,7	6,4	12,2	19,7	8,9	11,4	10,9	8,3	10,0
	5	3,7	7,9	8,7	8,9	19,1	9,5	10,6	12,4	10,6	8,7
	6	3,6	8,6	8,8	11,1	19,1	9,1	10,3	9,1	8,7	11,6
	7	3,1	7,2	7,7	10,8	19,2	7,1	11,6	13,3	11,0	9,2
	8	4,5	8,4	6,1	8,1	22,2	9,0	11,0	12,6	7,9	10,1
	9	3,2	8,8	8,1	7,8	19,5	8,6	9,2	12,3	10,7	11,7
	10	3,5	8,2	8,1	8,9	19,2	10,5	8,4	12,2	11,6	9,4
2	1	5,4	7,7	7,9	5,4	23,7	11,8	7,6	14,2	9,7	6,6
	2	6,4	8,0	8,6	6,5	21,4	8,9	13,9	8,0	11,5	6,8
	3	6,0	7,9	7,5	6,7	25,2	8,7	9,2	8,0	11,4	9,6
	4	6,0	8,7	8,2	5,9	19,2	8,7	12,3	9,0	9,9	12,2

	5	6,1	7,9	7,3	9,1	21,8	9,5	13,9	8,1	7,2	9,3
	6	6,9	8,7	7,6	6,0	22,5	10,4	8,8	9,5	9,1	10,5
	7	4,7	8,5	8,0	5,6	21,1	8,6	7,6	11,2	13,0	11,7
	8	5,7	8,5	7,3	5,7	22,6	7,1	9,8	12,2	11,8	9,5
	9	5,6	8,4	9,6	5,6	19,7	8,7	8,2	9,7	11,1	13,5
	10	6,2	6,8	7,7	5,4	19,1	9,8	15,7	9,8	9,3	10,2
3	1	6,5	5,7	5,6	5,0	24,3	10,2	15,1	6,2	10,9	10,5
	2	3,8	6,7	3,9	6,0	28,3	5,8	12,5	7,5	16,9	8,6
	3	3,3	4,3	3,4	5,5	28,2	8,8	16,0	6,7	14,4	9,3
	4	3,3	5,0	3,1	5,3	26,1	6,8	15,1	6,7	15,8	12,9
	5	3,1	6,1	3,3	8,0	25,8	7,5	14,3	8,7	12,0	11,4
	6	3,3	4,2	3,5	5,7	25,0	7,4	11,4	11,2	14,9	13,4
	7	5,3	5,1	4,5	6,2	21,5	8,5	8,0	9,7	15,9	15,4
	8	5,3	4,1	5,3	4,8	25,2	6,1	12,9	11,1	13,9	11,2
	9	4,1	4,0	6,6	6,7	21,5	5,8	13,5	9,7	13,7	14,5
	10	6,1	5,9	5,9	8,8	21,3	8,7	14,7	5,9	10,1	12,7
	Média	4,6	7,1	6,8	7,1	22,2	8,6	11,4	10,0	11,3	10,9
	CV	27,17%	22,46%	28,03%	27,19%	12,55%	17,51%	22,74%	22,52%	23,21%	19,10%
	EPM	0,229	0,290	0,347	0,351	0,508	0,276	0,474	0,411	0,478	0,380
	Máximo	6,9	8,8	9,6	12,2	28,3	11,9	16,0	14,2	16,9	15,4
	Mínimo	3,1	4,0	3,1	4,8	19,1	5,8	7,6	5,9	6,3	6,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica, CO = Azul Brilhante de Coomassie

Nas tabelas 65, 66, 67 e 68 encontram-se descritos os resultados individuais das porcentagens das densidades óptica das bandas de proteínas urinária do *pool* 3 obtidos na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida, coradas pela Prata, determinados em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também pelo mesmo procedimento realizadas em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio). A figura 18 apresenta os gráficos obtidos das diferentes bandas para as colorações de azul brilhante de Coomassie e Prata.

Todos os coeficientes de variação foram superiores a 5%: para o intra ensaio a variação foi de 7,28 a 24,36% e para o inter ensaio de 8,86 a 24,75%.

Tabela 65 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 1**.

Dia 1 PRATA *pool* 3	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**	**DO % Banda 6**	**DO % Banda 7**	**DO % Banda 8**	**DO % Banda 9**	**DO % Banda 10**
1	4,7	4,7	4,3	6,2	29,4	11,5	16,2	4,3	10,7	8,1
2	3,5	3,4	4,1	10,1	26,6	10,8	16,9	7,5	10,0	7,0
3	4,8	4,9	4,8	7,9	26,8	8,1	17,7	4,9	12,7	7,3

4	3,7	3,7	4,1	10,9	29,8	10,2	16,1	3,9	11,1	6,5
5	4,3	4,7	4,1	6,7	28,8	14,8	15,6	4,1	10,0	7,0
6	4,5	4,9	5,0	6,7	22,9	12,9	21,2	4,9	7,2	9,7
7	5,5	5,5	5,6	7,4	26,0	12,0	14,5	5,0	8,1	10,4
8	4,6	4,3	4,8	7,1	28,3	10,3	21,3	4,6	8,0	8,8
9	5,7	5,7	5,8	8,7	28,8	8,5	10,7	5,7	11,6	8,7
10	5,6	5,6	5,5	7,1	29,0	12,7	14,1	6,0	8,2	6,2
Média	4,7	4,7	4,8	7,9	27,6	11,2	16,4	5,1	9,8	8,0
CV	16,15%	16,16%	13,74%	19,83%	7,59%	18,20%	19,37%	21,14%	18,63%	17,52%
EPM	0,239	0,242	0,209	0,495	0,664	0,644	1,005	0,341	0,576	0,441
Máximo	5,7	5,7	5,8	10,9	29,8	14,8	21,3	7,5	12,7	10,4
Mínimo	3,5	3,4	4,1	6,2	22,9	8,1	10,7	3,9	7,2	6,2

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 66 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 2**.

Dia 2 PRATA *pool* 3	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**	**DO % Banda 6**	**DO % Banda 7**	**DO % Banda 8**	**DO % Banda 9**	**DO % Banda 10**
1	4,5	3,7	3,9	5,2	26,2	10,1	18,9	6,8	9,1	11,8
2	3,7	3,5	3,9	5,0	28,5	9,7	15,7	9,4	13,0	7,7
3	3,5	3,5	3,3	6,8	22,8	8,4	19,4	6,8	18,1	7,6
4	4,2	4,1	5,2	5,2	24,0	5,5	18,3	6,1	15,2	12,2
5	4,3	4,3	4,2	4,5	24,1	10,9	18,2	6,2	10,7	12,7
6	3,7	4,7	3,7	4,8	25,9	9,1	20,1	7,9	12,9	7,1
7	3,0	3,1	4,4	6,0	26,9	8,4	16,5	5,0	12,4	14,2
8	3,8	3,8	4,0	6,3	26,6	8,8	21,6	6,8	9,0	9,4
9	3,3	3,3	3,2	5,0	26,8	8,1	19,1	7,8	11,7	11,7
10	3,5	3,5	3,6	4,8	23,2	8,0	19,1	9,6	11,0	13,6
Média	3,8	3,7	3,9	5,4	25,5	8,7	18,7	7,2	12,3	10,8
CV	12,83%	12,90%	14,96%	13,85%	7,28%	16,73%	8,94%	19,99%	22,53%	24,36%
EPM	0,152	0,153	0,186	0,235	0,587	0,460	0,528	0,457	0,876	0,832
Máximo	4,5	4,7	5,2	6,8	28,5	10,9	21,6	9,6	18,1	14,2
Mínimo	3,0	3,1	3,2	4,5	22,8	5,5	15,7	5,0	9,0	7,1

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 67 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata realizado no **dia 3**.

Dia 3 PRATA *pool* 3	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**	**DO % Banda 6**	**DO % Banda 7**	**DO % Banda 8**	**DO % Banda 9**	**DO % Banda 10**
1	3,8	3,6	3,0	7,1	28,0	8,9	14,0	7,8	11,3	12,6
2	4,1	3,3	3,5	9,1	24,7	7,3	16,6	7,8	14,4	9,2
3	3,2	3,4	4,5	8,4	23,5	7,3	16,7	6,8	16,8	9,4

4	3,8	3,7	3,5	7,5	22,1	10,1	16,8	5,0	17,1	10,5
5	3,5	4,4	3,5	7,8	24,0	10,2	15,4	4,0	14,7	12,5
6	3,0	4,1	4,8	7,2	25,8	8,1	17,3	6,7	13,4	9,6
7	4,1	3,1	3,9	9,0	26,3	8,4	13,6	6,7	14,0	11,1
8	3,5	3,7	3,8	7,3	25,1	7,1	17,9	8,6	12,9	10,1
9	3,0	3,1	3,1	7,3	28,2	8,1	15,1	6,5	12,3	13,3
10	2,8	2,9	2,7	4,1	30,9	7,9	16,6	6,2	11,0	14,9
Média	3,5	3,5	3,6	7,5	25,9	8,3	16,0	6,6	13,8	11,3
CV	13,06%	13,46%	18,03%	18,60%	10,08%	13,16%	8,91%	20,63%	14,96%	17,04%
EPM	0,144	0,150	0,207	0,440	0,824	0,347	0,451	0,431	0,652	0,609
Máximo	4,1	4,4	4,8	9,1	30,9	10,2	17,9	8,6	17,1	14,9
Mínimo	2,8	2,9	2,7	4,1	22,1	7,1	13,6	4,0	11,0	9,2

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 68 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pela Prata (PR).

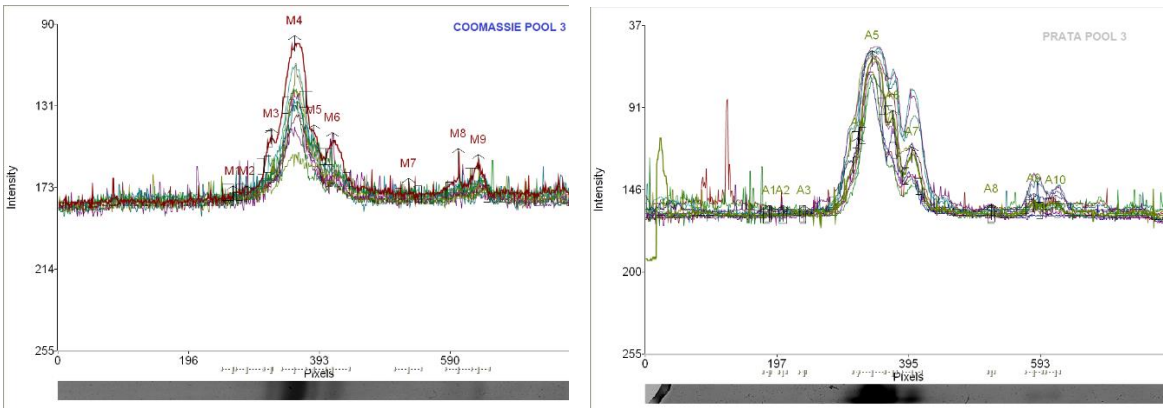
DIA	***pool* 3 PR**	**DO % Banda 1**	**DO % Banda 2**	**DO % Banda 3**	**DO % Banda 4**	**DO % Banda 5**	**DO % Banda 6**	**DO % Banda 7**	**DO % Banda 8**	**DO % Banda 9**	**DO % Banda 10**
1	1	4,7	4,7	4,3	6,2	29,4	11,5	16,2	4,3	10,7	8,1
	2	3,5	3,4	4,1	10,1	26,6	10,8	16,9	7,5	10,0	7,0
	3	4,8	4,9	4,8	7,9	26,8	8,1	17,7	4,9	12,7	7,3
	4	3,7	3,7	4,1	10,9	29,8	10,2	16,1	3,9	11,1	6,5
	5	4,3	4,7	4,1	6,7	28,8	14,8	15,6	4,1	10,0	7,0
	6	4,5	4,9	5,0	6,7	22,9	12,9	21,2	4,9	7,2	9,7
	7	5,5	5,5	5,6	7,4	26,0	12,0	14,5	5,0	8,1	10,4
	8	4,6	4,3	4,8	7,1	28,3	10,3	21,3	4,6	8,0	8,8
	9	5,7	5,7	5,8	8,7	28,8	8,5	10,7	5,7	11,6	8,7
	10	5,6	5,6	5,5	7,1	29,0	12,7	14,1	6,0	8,2	6,2
2	1	4,5	3,7	3,9	5,2	26,2	10,1	18,9	6,8	9,1	11,8
	2	3,7	3,5	3,9	5,0	28,5	9,7	15,7	9,4	13,0	7,7
	3	3,5	3,5	3,3	6,8	22,8	8,4	19,4	6,8	18,1	7,6
	4	4,2	4,1	5,2	5,2	24,0	5,5	18,3	6,1	15,2	12,2
	5	4,3	4,3	4,2	4,5	24,1	10,9	18,2	6,2	10,7	12,7
	6	3,7	4,7	3,7	4,8	25,9	9,1	20,1	7,9	12,9	7,1
	7	3,0	3,1	4,4	6,0	26,9	8,4	16,5	5,0	12,4	14,2
	8	3,8	3,8	4,0	6,3	26,6	8,8	21,6	6,8	9,0	9,4
	9	3,3	3,3	3,2	5,0	26,8	8,1	19,1	7,8	11,7	11,7
	10	3,5	3,5	3,6	4,8	23,2	8,0	19,1	9,6	11,0	13,6
3	1	3,8	3,6	3,0	7,1	28,0	8,9	14,0	7,8	11,3	12,6
	2	4,1	3,3	3,5	9,1	24,7	7,3	16,6	7,8	14,4	9,2
	3	3,2	3,4	4,5	8,4	23,5	7,3	16,7	6,8	16,8	9,4
	4	3,8	3,7	3,5	7,5	22,1	10,1	16,8	5,0	17,1	10,5
	5	3,5	4,4	3,5	7,8	24,0	10,2	15,4	4,0	14,7	12,5

	6	3,0	4,1	4,8	7,2	25,8	8,1	17,3	6,7	13,4	9,6
	7	4,1	3,1	3,9	9,0	26,3	8,4	13,6	6,7	14,0	11,1
	8	3,5	3,7	3,8	7,3	25,1	7,1	17,9	8,6	12,9	10,1
	9	3,0	3,1	3,1	7,3	28,2	8,1	15,1	6,5	12,3	13,3
	10	2,8	2,9	2,7	4,1	30,9	7,9	16,6	6,2	11,0	14,9
	Média	4,0	4,0	4,1	6,9	26,3	9,4	17,0	6,3	12,0	10,0
	CV	19,30%	19,53%	19,31%	24,16%	8,86%	21,23%	14,45%	24,66%	23,00%	24,75%
	EPM	0,140	0,143	0,146	0,305	0,426	0,364	0,449	0,284	0,502	0,453
	Máximo	5,7	5,7	5,8	10,9	30,9	14,8	21,6	9,6	18,1	14,9
	Mínimo	2,8	2,9	2,7	4,1	22,1	5,5	10,7	3,9	7,2	6,2

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica, PR = Prata

Figura 18 - Gráficos de resultados do *pool* 3 de amostras de urina coradas pelo azul brilhante de Coomassie e pela Prata, analisados pelo Vision Works.



Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Os valores individuais das porcentagens das densidades óptica das proteínas urinárias do *pool 3,* avaliados pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®, estão dispostos nas tabelas 69, 70, 71 e 72. As densidades óptica foram determinadas em 10 corridas eletroforéticas no mesmo dia (para o intra ensaio), como também o mesmo procedimento foi realizado em 3 dias consecutivos (para o inter ensaio).

Os coeficientes de variação foram menores em comparação aos observados nas colorações pelo azul brilhante de Coomassie e a Prata, e no intra ensaio o CV variou de 2,20 a 27,73%, sendo que nas bandas 5, 7 e 10, do dia 1, o CV foi inferior a 5%, como também nas bandas 5 e 7 do dia 3. No relativo ao inter ensaio, a variação do CV foi de 4,16 a 24,68% e em apenas uma banda o CV foi menor que 5%, banda 7 com o valor de 4,16%.

Tabela 69 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 1**.

Dia 1 Stain-Free® *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	0,9	0,6	1,2	13,6	20,9	3,6	34,4	2,4	8,5	13,9
2	0,6	0,4	1,2	13,0	21,4	3,2	33,3	2,7	10,2	14,0
3	0,8	0,7	1,6	12,2	20,6	3,1	34,7	2,5	10,2	13,6
4	0,8	0,5	1,4	12,7	21,3	3,1	31,9	2,6	11,8	13,8
5	0,7	0,4	1,4	13,3	21,9	3,3	31,3	2,6	11,1	13,8
6	0,6	0,5	1,6	13,0	21,8	3,1	31,5	2,8	11,2	13,8
7	0,7	0,5	0,9	15,2	19,9	3,0	31,5	2,5	11,6	14,3
8	0,6	0,5	1,7	13,3	21,1	2,9	32,2	3,2	10,5	13,9
9	0,6	0,5	1,3	13,6	21,5	2,4	32,8	2,8	10,4	14,2
10	0,7	0,4	1,3	11,6	18,7	3,3	34,9	2,9	11,2	14,9
Média	0,7	0,5	1,4	13,1	20,9	3,1	32,9	2,7	10,7	14,0
CV	14,17%	19,75%	17,97%	7,26%	4,67%	9,67%	4,23%	8,11%	8,89%	2,68%
EPM	0,032	0,031	0,078	0,302	0,309	0,095	0,439	0,069	0,300	0,119
Máximo	0,9	0,7	1,7	15,2	21,9	3,6	34,9	3,2	11,8	14,9
Mínimo	0,6	0,4	0,9	11,6	18,7	2,4	31,3	2,4	8,5	13,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 70 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 2**.

Dia 2 Stain-Free® *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	0,8	0,5	1,6	15,2	20,7	3,2	33,5	3,4	6,5	14,5
2	0,8	0,7	2,0	16,3	20,7	2,9	29,3	3,1	8,8	15,6
3	0,6	0,5	1,3	14,0	21,4	4,0	31,9	2,5	9,0	14,8
4	1,0	0,9	1,4	12,3	20,9	4,1	31,1	3,9	8,8	15,4
5	0,7	0,5	1,7	14,5	19,5	3,4	32,6	2,9	8,2	16,1
6	1,0	0,5	1,5	14,6	19,1	2,7	32,9	2,8	8,6	16,2
7	0,9	0,8	0,9	14,6	19,9	3,1	34,3	2,4	7,4	15,7
8	0,5	0,4	1,6	15,9	19,8	2,8	32,8	3,3	6,8	16,0
9	0,8	0,8	1,5	16,8	22,6	3,0	29,7	2,6	8,1	14,1
10	0,7	0,5	1,5	13,7	21,7	2,7	34,2	2,7	5,9	16,4
Média	0,8	0,6	1,5	14,8	20,6	3,2	32,2	3,0	7,8	15,5
CV	19,99%	27,73%	18,33%	8,89%	5,26%	15,64%	5,42%	15,97%	14,11%	5,01%
EPM	0,049	0,053	0,087	0,416	0,343	0,158	0,552	0,150	0,349	0,245
Máximo	1,0	0,9	2,0	16,8	22,6	4,1	34,3	3,9	9,0	16,4
Mínimo	0,5	0,4	0,9	12,3	19,1	2,7	29,3	2,4	5,9	14,1

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 71 – Intra ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free® realizado no **dia 3**.

Dia 3 Stain-Free® *pool* 3	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	1,1	0,4	1,7	14,3	20,7	3,4	32,7	2,6	10,4	12,6
2	0,9	0,4	1,3	12,5	20,2	4,5	30,9	2,6	13,2	13,6
3	0,9	0,5	1,1	11,4	19,4	5,5	32,5	2,6	12,3	13,7
4	0,8	0,6	1,6	13,8	19,6	3,3	31,7	2,5	12,3	13,8
5	0,7	0,5	1,3	13,1	19,0	4,6	31,6	2,5	12,6	14,2
6	0,8	0,4	1,2	13,4	19,1	4,2	31,5	2,3	13,0	14,2
7	0,7	0,5	1,3	12,5	19,2	4,1	32,3	2,4	12,6	14,4
8	0,9	0,6	1,6	13,5	18,7	4,2	31,5	2,7	12,6	13,8
9	1,0	0,6	1,1	12,4	18,0	3,9	32,9	2,6	12,4	15,1
10	1,0	0,4	0,9	11,7	18,4	4,6	32,9	1,9	11,5	16,7
Média	0,9	0,5	1,3	12,9	19,2	4,2	32,1	2,5	12,3	14,2
CV	16,83%	16,67%	19,79%	7,22%	4,18%	15,14%	2,20%	9,07%	6,56%	7,62%
EPM	0,046	0,025	0,082	0,294	0,254	0,203	0,223	0,071	0,255	0,342
Máximo	1,1	0,6	1,7	14,3	20,7	5,5	32,9	2,7	13,2	16,7
Mínimo	0,7	0,4	0,9	11,4	18,0	3,3	30,9	1,9	10,4	12,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

Tabela 72 – Inter ensaio para avaliação das porcentagens de **densidade óptica** do *pool* 3 (RPC = 14,41) das bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 das proteínas urinária pela eletroforese em gel de poliacrilamida e coradas pelo Stain-Free®.

DIA	*Pool* 3 Stain-Free®	DO % Banda 1	DO % Banda 2	DO % Banda 3	DO % Banda 4	DO % Banda 5	DO % Banda 6	DO % Banda 7	DO % Banda 8	DO % Banda 9	DO % Banda 10
1	1	0,9	0,6	1,2	13,6	20,9	3,6	34,4	2,4	8,5	13,9
	2	0,6	0,4	1,2	13,0	21,4	3,2	33,3	2,7	10,2	14,0
	3	0,8	0,7	1,6	12,2	20,6	3,1	34,7	2,5	10,2	13,6
	4	0,8	0,5	1,4	12,7	21,3	3,1	31,9	2,6	11,8	13,8
	5	0,7	0,4	1,4	13,3	21,9	3,3	31,3	2,6	11,1	13,8
	6	0,6	0,5	1,6	13,0	21,8	3,1	31,5	2,8	11,2	13,8
	7	0,7	0,5	0,9	15,2	19,9	3,0	31,5	2,5	11,6	14,3
	8	0,6	0,5	1,7	13,3	21,1	2,9	32,2	3,2	10,5	13,9
	9	0,6	0,5	1,3	13,6	21,5	2,4	32,8	2,8	10,4	14,2
	10	0,7	0,4	1,3	11,6	18,7	3,3	34,9	2,9	11,2	14,9
2	1	0,8	0,5	1,6	15,2	20,7	3,2	33,5	3,4	6,5	14,5
	2	0,8	0,7	2,0	16,3	20,7	2,9	29,3	3,1	8,8	15,6
	3	0,6	0,5	1,3	14,0	21,4	4,0	31,9	2,5	9,0	14,8
	4	1,0	0,9	1,4	12,3	20,9	4,1	31,1	3,9	8,8	15,4
	5	0,7	0,5	1,7	14,5	19,5	3,4	32,6	2,9	8,2	16,1

	6	1,0	0,5	1,5	14,6	19,1	2,7	32,9	2,8	8,6	16,2
	7	0,9	0,8	0,9	14,6	19,9	3,1	34,3	2,4	7,4	15,7
	8	0,5	0,4	1,6	15,9	19,8	2,8	32,8	3,3	6,8	16,0
	9	0,8	0,8	1,5	16,8	22,6	3,0	29,7	2,6	8,1	14,1
	10	0,7	0,5	1,5	13,7	21,7	2,7	34,2	2,7	5,9	16,4
3	1	1,1	0,4	1,7	14,3	20,7	3,4	32,7	2,6	10,4	12,6
	2	0,9	0,4	1,3	12,5	20,2	4,5	30,9	2,6	13,2	13,6
	3	0,9	0,5	1,1	11,4	19,4	5,5	32,5	2,6	12,3	13,7
	4	0,8	0,6	1,6	13,8	19,6	3,3	31,7	2,5	12,3	13,8
	5	0,7	0,5	1,3	13,1	19,0	4,6	31,6	2,5	12,6	14,2
	6	0,8	0,4	1,2	13,4	19,1	4,2	31,5	2,3	13,0	14,2
	7	0,7	0,5	1,3	12,5	19,2	4,1	32,3	2,4	12,6	14,4
	8	0,9	0,6	1,6	13,5	18,7	4,2	31,5	2,7	12,6	13,8
	9	1,0	0,6	1,1	12,4	18,0	3,9	32,9	2,6	12,4	15,1
	10	1,0	0,4	0,9	11,7	18,4	4,6	32,9	1,9	11,5	16,7
	Média	0,8	0,5	1,4	13,6	20,3	3,5	32,4	2,7	10,3	14,6
	CV	18,96%	24,68%	18,91%	9,98%	5,90%	20,13%	4,16%	13,76%	20,43%	6,93%
	EPM	0,027	0,024	0,048	0,248	0,218	0,129	0,246	0,068	0,382	0,184
	Máximo	1,1	0,9	2,0	16,8	22,6	5,5	34,9	3,9	13,2	16,7
	Mínimo	0,5	0,4	0,9	11,4	18,0	2,4	29,3	1,9	5,9	12,6

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: CV = Coeficiente de Variação, EPM = Erro padrão da média, DO = Densidade óptica

5.3 Coeficiente de variação das amostras de urina dos *pools* 1, 2 e 3

As tabelas 73, 74 e 75 apresentam a compilação dos coeficientes de variação dos pesos moleculares e das densidades ópticas obtidos na eletroforese de proteínas urinária em gel de poliacrilamida, nas diferentes colorações ou no marcador de bandas, determinadas em três dias subsequentes e realizadas para a amostra de *pool* 1 (intra e inter ensaios).

Tabela 73 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares,** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações e método de marcação de bandas.

***pool* 1 PM**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**			**BANDA 4**			**BANDA 5**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	2,73	1,55	1,15	0,98	0,63	2,48	1,50	1,40	2,22	1,42	1,39	6,15	1,23	1,83	2,24
PR	CV% TRA	2,63	0,89	0,84	0,66	1,41	0,58	1,29	1,09	0,92	2,94	1,79	1,39	1,21	1,38	1,24
ST	CV% TRA	2,60	0,93	1,15	1,60	0,79	0,99	1,88	1,86	1,41	1,67	0,80	1,00	1,41	1,71	1,09
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX	
CO		1,90	93 - 99		2,06	61 - 67		3,50	51 - 58		3,95	32 - 41		4,08	26 - 30	
PR		4,23	86 - 99		2,43	62 - 68		2,43	53 - 58		**5,85**	31 - 37		**5,29**	25 - 29	
ST		3,32	87 - 98		2,55	61 - 67		3,25	51 - 55		3,69	31 - 35		3,73	25 - 29	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: PM = Peso Molecular, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias.

Tabela 74 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 1, 2 e 3 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 1 DO**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	5,23	7,16	5,84	8,21	8,11	7,54	15,99	19,60	14,36
PR	CV% TRA	5,39	9,61	10,73	9,04	6,44	8,65	15,03	17,56	17,67
ST	CV% TRA	8,10	3,46	5,83	11,08	12,97	9,71	15,86	16,15	13,19
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX	
CO		6,14	26,2 – 33,8		7,88	25,7 – 34,8		17,18	5,3 – 12,6	
PR		8,78	22,6 – 31,2		8,43	22,2 – 35,9		21,53	5,9 – 14,3	
ST		6,10	26,2 34,1		12,12	18,2 – 32,3		14,83	6,8 – 12,8	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Tabela 75 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 1**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 1 DO**		**BANDA 4**			**BANDA 5**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	18,56	8,14	18,42	16,63	12,32	8,28
PR	CV% TRA	17,34	16,30	13,52	11,46	**4,67**	9,24
ST	CV% TRA	12,84	14,23	16,82	9,03	11,23	10,27
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX	
CO		16,57	10,5 – 19,1		13,06	13,7 – 22,1	
PR		15,30	10,7 – 18,9		10,01	14,0 – 21,6	
ST		15,24	13,4 – 23,3		10,64	14,0 – 22,1	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020
Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Os coeficientes de variação do intra ensaio do ***pool* 1**, no referente aos **pesos moleculares**, em todas as colorações (azul brilhante de Coomassie, Prata e Stain-Free®), foram inferiores a 5% em todas as bandas de proteínas. Em relação ao inter ensaio, somente na coloração pela Prata foi detectado coeficiente de variação acima de 5% nas bandas de menor peso molecular (Bandas 4 e 5, CV = 5,85 a 5,29% respectivamente).

Em relação a avaliação do intra ensaio das porcentagens de **densidade óptica** das bandas referentes aos pesos moleculares nas três colorações do gel de poliacrilamainda, os coeficientes de variação foram superiores a 5% em todos os ensaios, a exceção na banda 5 no intra ensaio do dia 2 com a coloração de Prata e a banda 1 no dia 2 com o Stain-Free®. Quanto ao inter ensaio, todos os coeficientes de variação foram superiores a 5%, observando-se valores máximos de até 21,53%. Os maiores coeficientes de variação foram observados em todas as colorações, principalmente nas bandas 3 e 4, sendo que foi detectado para a coloração Prata o maior coeficiente de variação na banda 3.

Nas tabelas 76, 77 e 78 estão descritos os coeficientes de variação dos **pesos moleculares** e das porcentagens da densidade óptica referentes as três colorações dos traçados eletroforéticos para as avalições do intra e inter ensaios para a amostra de urina do *pool* 2.

Tabela 76 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 2 PM**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**			**BANDA 4**			**BANDA 5**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	1,48	1,74	0,98	1,89	1,34	0,99	3,72	1,01	0,83	4,64	2,15	0,72	3,66	2,38	1,48
PR	CV% TRA	2,34	2,19	1,35	1,03	2,37	3,03	1,11	2,23	1,49	2,75	2,37	2,04	**5,28**	2,42	2,12
ST	CV% TRA	0,65	0,90	0,89	0,68	0,79	1,16	3,86	0,89	0,73	1,49	1,42	0,63	1,41	1,52	2,08
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX	
CO		1,51	73 - 77		1,98	62 - 68		3,29	50 - 57		3,32	33 - 38		3,41	26 - 29	
PR		2,65	69 - 76		2,71	61 - 67		2,17	52 - 57		3,21	31 - 36		3,52	25 - 29	
ST		1,02	73 - 76		1,78	62 - 66		2,30	53 - 58		1,26	32 - 34		2,02	25 - 27	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: PM = Peso Molecular, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias.

Tabela 77 - Coeficientes de variação das porcentagens de **densidades óptica** das bandas 1, 2 e 3 do intra e inter ensaios do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 2 DO**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	7,19	5,29	8,84	6,76	7,14	3,72	19,94	13,09	11,15
PR	CV% TRA	14,08	5,74	8,09	5,22	6,67	4,15	12,34	10,64	19,85
ST	CV% TRA	4,41	3,18	8,74	3,38	4,20	5,71	7,31	12,70	14,08

		D1, D2 e D3		D1, D2 e D3		D1, D2 e D3	
		CV% TER	%DO MIN-MAX	CV% TER	%DO MIN-MAX	CV% TER	%DO MIN-MAX
CO		7,97	16,4 – 22,8	6,93	33,0 – 40,9	18,47	10,4 – 21,1
PR		9,74	14,4 – 22,9	5,57	32,3 – 42,0	19,48	8,1 – 19,4
ST		6,30	18,8 – 24,5	4,75	30,3 – 37,5	11,40	8,2 – 13,4

Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Tabela 78 - - Coeficientes de variação das porcentagens de **densidades óptica** das bandas 4 e 5 do intra e inter ensaios nos dias 1, 2 e 3 do ***pool* 2**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 2 DO**		BANDA 4			BANDA 5		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	24,13	19,66	12,44	17,93	19,17	12,02
PR	CV% TRA	12,01	15,82	18,46	16,02	16,70	9,93
ST	CV% TRA	6,70	9,85	9,57	13,01	11,25	10,47
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX	
CO		20,30	8,2 – 21,1		16,88	9,8 – 19,2	
PR		16,10	9,4 – 17,0		20,23	9,8 – 23,4	
ST		8,59	13,8 - 18,9		11,29	14,9 – 21,4	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Em relação ao intra ensaio na avaliação dos **pesos moleculares** do *pool* 2, o coeficiente de variação foi inferior a 5% para todas as colorações, com exceção apenas para a banda 5 no dia 1 para a coloração Prata. Para o inter ensaio, os coeficientes de variação foram menores que 5% em todas as colorações para todas as bandas (1, 2, 3, 4 e 5).

Quanto a avaliação das porcentagens das **densidades ópticas** em todas as colorações foram detectados coeficientes de variação superiores a 5% para o intra ensaio, sendo que valores maiores que 10% foram observados a partir da banda 3, exceto a banda 1 no dia 1 na coloração Prata , e sendo observado principalmente para as colorações azul brilhante de Coomassie (banda 3 no dia 1, banda 4 nos dias 1 e 2 e banda 5 no dia 2) e Prata (banda 3 no dia 3); o Stain-free® foi o que apresentou menor coeficiente de variação em todas as bandas. No referente ao inter ensaio do *pool* 2 para as porcentagens das densidades ópticas em todas as colorações, os coeficientes de variação foram maiores que 5%, sendo que os maiores coeficientes

foram observados a partir da banda 3, principalmente para as colorações azul brilhante de Coomassie e Prata; o Stain-Free® apresentou os menores coeficientes de variação quando comparados aos observados nas colorações de azul brilhante de Coomassie e Prata.

Nas tabelas 79, 80, 81, 82 e 83 estão apresentados, no referente a amostra de urina do *pool* 3, os coeficientes de variação dos pesos moleculares e das porcentagens da densidade óptica das três colorações empregadas nos traçados eletroforéticos para as avalições do intra e inter ensaios.

Tabela 79 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 1, 2, 3, 4 e 5 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 3 PM**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**			**BANDA 4**			**BANDA 5**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	1,84	1,96	2,03	4,45	2,43	4,13	4,48	1,46	3,38	2,07	1,52	1,32	2,56	0,87	1,73
PR	CV% TRA	2,30	2,52	2,16	4,41	1,65	2.28	6,02	1,77	2,06	2,07	0,78	1,18	1,17	3,33	2,33
ST	CV% TRA	0,83	1,26	2,95	2,02	2,44	2,86	0,74	1,06	2,01	1,07	0,58	1,60	2,03	0,61	1,92
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX	
CO		2,41	132 - 146		4,07	101 - 118		4,48	81 - 97		2,83	67 - 75		2,46	60 - 67	
PR		4,26	129 - 151		4,62	107 - 127		4,35	86 - 106		1,80	69 - 75		3,33	58 - 66	
ST		1,97	133 - 144		2,44	108 - 119		1,37	91 - 98		1,19	72 - 75		1,61	59 - 63	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: PM = Peso Molecular, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias.

Tabela 80 - Coeficientes de variação dos **pesos moleculares** das bandas 6, 7, 8, 9 e 10 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 3 PM**		**BANDA 6**			**BANDA 7**			**BANDA 8**			**BANDA 9**			**BANDA 10**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	1,82	0,86	1,63	1,26	0,41	1,59	3,50	1,25	1,13	1,79	1,28	2,15	6,55	0,69	1,03
PR	CV% TRA	0,95	1,05	0,92	1,28	1,19	0,54	1,76	0,77	0,99	1,26	1,32	1,10	2,48	1,79	1,19
ST	CV% TRA	1,00	1,02	1,87	1,12	0,50	1,73	0,91	0,49	1,60	1,40	0,77	1,87	1,28	0,76	1,83
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX		CV% TER	PM MIN/MAX	
CO		2,77	54 - 59		2,03	48 - 52		2,81	31 - 35		2,15	25 - 28		4,07	20 - 25	
PR		1,58	54 - 57		1,60	49 - 52		1,40	32 - 34		1,28	26 - 28		2,03	23 - 25	
ST		1,41	53 - 56		1,25	48 - 51		1,10	33 - 35		1,63	26 - 28		1,66	22 - 24	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: PM = Peso Molecular, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias.

Tabela 81 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 1, 2, 3 e 4 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 3 DO**		**BANDA 1**			**BANDA 2**			**BANDA 3**			**BANDA 4**		
		D1	D2	D3	D2	D3	D3	D1	D2	D3	D1	D2	D3
CO	CV% TRA	10,70	10,17	28,95	7,88	7,27	18,78	12,24	8,92	27,78	21,94	17,70	20,81
PR	CV% TRA	16,15	12,83	13,06	16,16	12,90	13,46	13,74	14,96	18,03	19,83	13,85	18,60
ST	CV% TRA	14,17	19,99	16,83	19,75	27,73	16,67	17,97	18,33	19,79	7,26	8,89	7,22
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX	
CO		27,17	3,1 – 6,9		22,46	4,0 – 8,8		28,03	3,1 – 9,6		27,19	4,8 – 12,2	
PR		19,30	2,8 – 5,7		19,53	2,9 – 5,7		19,31	2,7 – 5,8		24,16	4,1 – 10,9	
ST		18,96	0,5 – 1,1		24,68	0,4 – 0,9		18,91	0,9 – 2,0		9,98	11,4 – 16,8	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Tabela 82 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 5, 6 e 7 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 3 DO**		**BANDA 5**			**BANDA 6**			**BANDA 7**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	7,80	9,07	10,58	13,89	13,69	19,65	9,99	27,80	17,50
PR	CV% TRA	7,59	7,28	10,08	18,20	16,73	13,16	19,37	8,94	8,91
ST	CV% TRA	4,67	5,26	4,18	9,67	15,64	15,14	4,23	5,42	2,20
		D1, D2 e D3			**D1, D2 e D3**			**D1, D2 e D3**		
		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX		CV% TER	%DO MIN-MAX	
CO		12,55	19,1 – 28,3		17,51	5,8 – 11,9		22,74	7,6 – 16,0	
PR		8,86	22,1 – 30,9		21,23	5,5 – 14,8		14,45	10,7 – 21,6	
ST		5,90	18,0 – 22,6		20,13	2,4 – 5,5		4,16	29,3 – 34,9	

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Tabela 83 - Coeficientes de variação das porcentagens das **densidades óptica** das bandas 8, 9 e 10 do intra e inter ensaios do ***pool* 3**, segundo as diferentes colorações.

***pool* 3 DO**		**BANDA 8**			**BANDA 9**			**BANDA 10**		
		D1	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
CO	CV% TRA	11,99	20,26	24,06	17,63	16,07	16,12	13,98	21,75	18,20
PR	CV% TRA	21,14	19,99	20,63	18,63	22,53	14,96	17,52	24,36	17,04
ST	CV% TRA	8,11	15,97	9,07	8,89	14,11	6,56	2,68	5,01	7,62

		D1, D2 e D3		D1, D2 e D3		D1, D2 e D3	
		CV% TER	%DO MIN-MAX	CV% TER	%DO MIN-MAX	CV% TER	%DO MIN-MAX
CO		22,52	5,9 – 14,2	23,21	6,3 – 16,9	19,10	6,6 – 15,4
PR		24,66	3,9 – 9,6	23,00	7,2 – 18,1	24,75	6,2 – 14,9
ST		13,76	1,9 – 3,9	20,43	5,9 – 13,2	6,93	12,6 – 16,7

Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Legenda: DO = Densidade óptica, CV% TRA = Coeficiente de Variação Intra ensaio, CV% TER = Coeficiente de Variação Inter ensaio, CO = Coomassie, PR = Prata, ST = Stain-free®, D = Dias, MIN = Mínimo, MAX = Máximo.

Para o intra ensaio do *pool* 3, no referente aos **pesos moleculares**, foram detectados coeficientes de variação menores que 5% em todas as colorações nas bandas de proteína em sua grande maioria, com exceção da coloração pela Prata na banda 3 do dia 1, e pelo azul brilhante de Coomassie, na banda 10 do dia 1. No inter ensaio, os coeficientes de variação foram inferiores a 5% em todas as colorações e bandas (1 a 10). Em relação ao coeficiente de variação da percentagem de **densidade óptica**, no intra ensaio, referente a todas as colorações, somente a coloração pelo Stain-Free® apresentou o coeficiente de variação inferior a 5%. No inter ensaio, o coeficiente de variação superior a 5% foi observado em todas as colorações avaliadas no gel em poliacrilamida, entretanto nas bandas 5, 7 e 10 do dia 1 e as bandas 5 e 7 no dia 3 o coeficiente de variação observado no Stain-Free® foi inferior a 5%. No atinente ao inter ensaio, em todas as colorações e bandas, os coeficientes de variação foram maiores que 5%, exceto a banda 7 no Stain-Free®. Para o Stain-Free® (banda 4), a Prata e Stain-Free® (banda 5) e o Stain-Free® na banda 10 apresentaram coeficientes de variação entre 5% a 10%, sendo os demais acima de 10%.

5.4 Análise estatística dos *pools*

A análise estatística pela ANOVA para a avaliação dos pesos moleculares na amostra de urina do *pool* 1, comparando-se as três marcações de bandas de proteínas para a eletroforese em gel de poliacrilamida, está descrita nas tabelas 84, 85, 86, 87 e 88. Observa-se que o sistema Stain-Free® apresentou diferença significante com a coloração pela Prata nas bandas 2 e 3, como também com o azul brilhante de Coomassie, mas somente para a banda 3.

Tabela 84 - Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 85 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	**P<0,05**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 86 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 1 (RPC = 0,04) , segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,01**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 87 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P<0,01	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 88 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 1 (RPC = 0,04) , segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,0	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

No relativo à avaliação estatística da porcentagem de densidade óptica das bandas de proteínas na comparação das três colorações/marcações de bandas na eletroforese em gel de poliacrilamida, referente as diferentes bandas dos pesos moleculares do *pool* 1, está apresentada nas tabelas 89, 90, 91,92 e 93. Nota-se que a coloração Stain-Free® foi o que apresentou diferença significante com o azul brilhante de Coomassie nas bandas 2 e 4 e com a Prata nas bandas 1 e 4. A diferença

das colorações do azul brilhante de Coomassie com a Prata somente foi detectada na banda 1.

Tabela 89 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,05**	
Stain-Free®	P>0,05	**P<0,01**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 90 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 91 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 3**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 92 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 93 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 1 (RPC = 0,04), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

No relativo à avaliação dos pesos moleculares da eletroforese de proteínas urinária do *pool* 2, somente foi observada diferença entre o Stain-Free® com o azul brilhante de Coomassie na banda 5 (tabelas 94, 95, 96, 97 e 98).

Tabela 94 - Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 95 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 96 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 97 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 98 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Quanto a porcentagem da densidade óptica na comparação entre as colorações/marcação de bandas na eletroforese do *pool* 2 (tabelas 99, 100, 101, 102 e 103), diferenças foram detectadas em relação ao Stain-Free® com o azul brilhante de Coomassie e a Prata nas bandas 2, 3 e 4, e na banda 5 foi observada diferença do Stain-Free® com a Prata, como também a Prata com o azul brilhante de Coomassie.

Tabela 99 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 100 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 101 - Estatística da **porcentagem da Densidade Óptica da banda 3**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 102 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,05**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 103 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 2 (RPC = 1,48), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	P>0,05	**P<0,01**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Na análise estatística dos pesos moleculares do *pool* 3 (RPC = 14,41), nas bandas detectadas pelas três diferentes colorações/marcação de bandas do gel em poliacrilamida, o sistema Stain-Free® foi diferente do azul brilhante de Coomassie somente na banda 3, e o Stain-Free® com a Prata somente na banda 5. A coloração pela Prata foi diferente com o azul brilhante de Coomassie nas bandas 2, 3 e 10 (Tabelas 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 e 113).

Tabela 104 – Estatística do **peso molecular da banda 1**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 105 - Estatística do **peso molecular da banda 2**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,01**	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 106 - Estatística do **peso molecular da banda 3**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,01**	
Stain-Free®	**P<0,01**	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 107 - Estatística do **peso molecular da banda 4**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 108 - Estatística do **peso molecular da banda 5**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P<0,05	**P<0,05**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 109 - Estatística do **peso molecular da banda 6**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 110 - Estatística do **peso molecular da banda 7**, do p*ool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 111 - Estatística do **peso molecular da banda 8**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 112 - Estatística do **peso molecular da banda 9**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 113 - Estatística do **peso molecular da banda 10**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	P>0,05	P>0,05

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Quanto a análise das porcentagens de densidade óptica no perfil eletroforético do *pool* 3, o sistema Stain-Free® foi diferente com a coloração pela Prata em todas as 10 bandas detectadas e, ainda, o Stain-Free® foi diferente com a coloração Coomassie em 9 do total de 10 bandas (exceto na banda 9). A diferença entre as colorações pela Prata com o azul brilhante de Coomassie ocorreu em 7 bandas do total de 10 bandas (bandas 1, 2, 3, 5, 7, 8 e 10) (Tabelas 114, 115, 116,117,118,119, 120, 121, 121 e 123).

Tabela 114- Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 1**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,05**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 115 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 2**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 116 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 3**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 117 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 4**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 118 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 5**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	**P<0,01**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 119 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 6**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 120 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 7**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 121 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 8**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P<0,001**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 122 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 9**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	P>0,05	
Stain-Free®	P>0,05	**P<0,05**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

Tabela 123 - Estatística da **porcentagem da densidade óptica da banda 10**, do *pool* 3 (RPC = 14,41), segundo a comparação com os métodos de coloração da eletroforese de proteínas urinárias.

	Coomassie	Prata
Coomassie		
Prata	**P>0,05**	
Stain-Free®	**P<0,001**	**P<0,001**

Análise de variância, seguido por teste Tukey-Kramer Multiple Comparisons
Fonte: arquivo pessoal – Ricardo Duarte Lopes, 2020

6. DISCUSSÃO

O estudo da validação da técnica de eletroforese de proteínas urinárias em gel de poliacrilamida se faz necessário para a investigação e o diagnóstico adequado da origem da perda de proteínas na urina (por exemplo, do segmento do nefron comprometido – glomérulo e/ ou túbulos) e, consequentemente, para a indicação condizente de terapia. Assim, a escolha para o uso de um determinado corante ou de uma técnica para marcação ou identificação dos pesos moleculares das bandas de proteínas, como também de suas respectivas concentrações, seria de suma importância, pois a repetitividade e a reprodutibilidade alicerçariam informações fidedignas, confiabilidade no método e interpretação clínica adequada.

A avaliação do coeficiente de variação usualmente é indicada para verificar o quanto os valores obtidos dos pesos moleculares e das densidades ópticas apresentam dispersão de uma distribuição de probabilidade, e segundo estudos realizados de eletroforese em que foram empregados géis denominados como convencionais, ou seja, aqueles confeccionados de forma manual, relata-se como sendo aceitáveis valores de coeficiente de variação de até 10% e não de 5%, valor

esse usualmente considerado para a maioria das técnicas laboratoriais, mas que no relativo a eletroforese, alguns fatores devem ser considerados que possam influir na diminuição da precisão dos resultados (SCHERBERICH et al., 1989; BIANCHI-BOSISIO et al., 1991) .

Assim, no presente estudo, em relação a identificação das bandas dos **pesos moleculares** de proteínas urinaria, observou-se que na maioria das análises em que foi utilizado os diferentes corantes e marcadores de bandas de proteínas, o coeficiente de variação era inferior a 5%, tanto para o intra como para o inter ensaios, e quando se observava valores superiores a 5%, estes eram constatados em menor frequência. O intervalo dos valores do coeficiente de variação constatado no presente estudo, para a análise dos pesos moleculares na eletroforese em gel de poliacrilamida, foi próximo a um outro estudo em que foi empregado um gel de origem comercial, o PhastGels® (8-25%), em que foram detectados valores de coeficientes de variação entre 0,41 a 6,76% (SCHERBERICH et al., 1989; BIANCHI-BOSISIO et al., 1991).

Assim, observa-se a importância da escolha na metodologia empregada no presente estudo de um gel comercial de poliacrilamida (Bio-rad® - TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Solutions), cuja justificativa foi, então, com o intuito de minimizar as interferências que pudessem ocorrer durante a confecção manual do gel, que usualmente são observadas pelo uso dos géis denominados como convencionais. Estes referidos géis usualmente foram empregados nos estudos previamente publicados e que foram confeccionados seguindo-se protocolos químicos e, portanto, poderiam estar sujeitos as variações e interferências tais como entre os operadores e a técnica. Particularmente para a preparação dos géis em poliacrilamida, relata-se a importante interferência da concentração da poliacrilamida utilizada, como também do fator temperatura que interfere na polimerização do gel e das proteínas agregadas (WESTERMEIER, 2007; KURIEN; SCOFIELD, 2019).

Quanto as diferentes colorações ou métodos de detecção das bandas de proteínas que foram empregadas no gel de poliacrilamida comercial no presente estudo, com a finalidade de identificação das bandas dos **pesos moleculares**, observou-se que houve boa repetitividade e reprodutibilidade, ou seja, tanto para o intra como para o inter ensaios e, portanto, tanto para amostras de urina com menores concentrações de proteína (*pool* 1; RPC de 0,04) quanto para aquelas amostras com concentrações de proteínas de discreta a intensa (*pools* 2 e 3, respectivamente de RPC = 1,48 e RPC = 14,41), sugerindo-se, assim, que para a identificação dos pesos

moleculares em amostras de urina, independente da concentração de proteínas presente, poderá ser indicado o uso de qualquer uma das colorações ou do marcador de banda (Stain-Free®).

A identificação das bandas de proteínas pelo peso molecular pela técnica do Stain-Free® foi o que apresentou os menores coeficientes de variação quando comparadas com as colorações azul brilhante de Coomassie e Prata, principalmente nas amostras de urina com quantidades de proteína de discreta a intensa, nos *pools* 2 e 3, respectivamente. Possivelmente a justificativa para esse achado tenha base no fato da técnica do Stain-Free® não requerer um processo ou etapa química de coloração após a corrida eletroforética, ou seja, de não ter tido a necessidade da manipulação manual para a transferência do gel para um outro sistema, da forma como foi necessária quando da execução do processo de coloração pelo azul brilhante de Coomassie ou pela Prata. Portanto, o achado de valores menores do coeficiente de variação para o método do Stain-Free® possa ser justificado por esta técnica não estar vulnerável a manipulação do gel e, assim, não comprometendo o alinhamento das posições das bandas de proteínas e respectivos pesos moleculares, como também com o alinhamento das bandas do padrão de pesos moleculares.

Ainda no atinente a identificação das bandas de proteínas / pesos moleculares, os coeficientes de variação para as colorações pela Prata e azul brilhante de Coomassie foram semelhantes para as referidas colorações, entretanto foram maiores em comparação aos observados para o Stain-Free® mas, ainda, inferiores a 5% em sua maioria. Estes achados podem, então, serem justificados pela necessidade do procedimento manual na manipulação dos géis após a corrida eletroforética e que foram similares para ambas as colorações.

No referente as colorações do azul brilhante de Coomassie e da Prata, os resultados obtidos sugerem que a coloração pelo azul brilhante de Coomassie parece ser a mais indicada para a identificação das bandas dos pesos moleculares na eletroforese em gel de poliacrilamida para as amostras de urina com quantidades menores de proteínas, ou seja, a semelhança do *pool* 1 (RPC = 0,04), visto que para a referida coloração foram detectados os menores coeficientes de variação.

No referente a avaliação da **porcentagem da densidade óptica** das bandas, ou seja, na quantificação das proteínas existentes na referida banda correspondente ao peso molecular, observou-se coeficientes de variação de valores muito maiores

quando comparados com os coeficientes de variação detectados para a identificação dos pesos moleculares. Nota-se que para marcação da área referente a porcentagem de densidade óptica, existe maiores possibilidades de interferência quando do uso de colorações ou do método de identificação das proteínas, e que pode estar relacionada com a maior ou a menor sensibilidade para a marcação das proteínas e também de outros fatores. Na literatura consultada, não foram identificados estudos sobre intra e inter ensaios, para avaliação dos pesos moleculares e as respectivas porcentagens de densidade óptica, entretanto há um estudo de inter ensaio em que foi avaliado, de forma visual, o número de bandas e as respectivas intensidade ou densitometria da banda, e nesta metodologia, o coeficiente de variação foi de 10% (ZINI; BONFANTI; ZATELLI, 2004; HOKAMP et al., 2018). Um outro estudo com amostras de urina de pacientes humanos, mas em gel de agarose contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-AGE), foi relatado coeficientes de variação entre 2 a 5% para inter ensaio, e de 1 a 4% para o intra ensaio em proteínas de baixo peso molecular (BRICON et al., 1998).

Assim, as avaliações das repetitividade e reprodutibilidade no relativo aos métodos para a detecção da quantidade de proteína presente nas bandas dos pesos moleculares podem suscitar discussões acerca das técnicas empregadas, e para aquelas que utilizam corantes, estas podem apresentar menor reprodutibilidade, pois a coloração das proteínas, em particular no gel de poliacrilamida, estaria na dependência da concentração de poliacrilamida presente no gel. Assim, em situações em que há menores concentrações de poliacrilamida e que podem ocorrer, principalmente, nos géis confeccionados manualmente, o desenvolvimento da coloração ocorre de forma mais rápida e numa situação oposta, ou seja, nas regiões com maiores concentrações de poliacrilamida, pode ocorrer o retardo no aparecimento da coloração, acarretando, assim, no achado de colorações desiguais (BIANCHI-BOSISIO et al., 1991).

No presente estudo, a detecção de valores maiores de coeficientes de variação na avaliação das **porcentagens de densidade óptica** ocorreu nas colorações com o azul brilhante de Coomassie e a Prata em comparação com o Stain-Free®, e este achado poderia ser justificado, possivelmente, pela interferência da maior sensibilidade dos corantes ou mesmo pela distribuição de concentrações diferentes de poliacrilamida no gel, mesmo sendo este de confecção com metodologia padronizada, ou seja, de um kit comercial. Ainda, outra possibilidade a ser aventada, seria que a coloração pela Prata poderia necessitar de tempos variados para o

desenvolvimento da coloração final, ou seja, um outro fator a ser considerado, referente ao tempo de exposição do gel com a Prata no processo de manipulação da técnica. Assim, este procedimento poderia ter a interferência do técnico ou do operador para a decisão do término do processo de coloração, pois cada gel pode apresentar um ponto de parada de coloração diferente e que também estaria na dependência da quantidade de proteínas presentes, justificando-se, assim, no comprometimento da reprodutibilidade da coloração (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006; SASSEL; GALLAGHER, 2009; BERNDT et al., 2018). Também deve ser considerada a influência da temperatura no sistema de coloração e que está na dependência da temperatura ambiente, fator muito importante nesse processo, o que pode, portanto, justificar a observação dos maiores coeficientes de variação detectados no presente estudo para a coloração pela Prata a semelhança ao observado na coloração pelo azul brilhante de Coomassie, principalmente no dia 3 dos inter ensaios nos *pools* 1, 2 e 3 (BIANCHI-BOSISIO et al., 1991).

Também em um outro estudo em que foi empregado a coloração pela Prata na eletroforese em gel de poliacrilamida 2D, utilizando-se proteínas comerciais e soros de pacientes humanos, observou-se coeficientes de variação entre 3,87 a 7,41%, sendo que os maiores coeficientes de variação foram constatados no soro, fato este que pode estar associado a presença de inúmeras proteínas no soro em comparação com as proteínas específicas purificadas presentes no padrão comercial (HARRISON et al., 1992). No presente estudo, as amostras de urina de cães não foram previamente tratadas ou purificadas e, assim, suscita-se a possibilidade da existência de variados tipos de proteínas oriundas do sistema urinário e que pode ter acarretado no comprometimento da repetitividade e reprodutibilidade. Estudos futuros empregando-se um processo de purificação ou diálise das amostras de urina em comparação com amostras de urina sem purificação poderiam ser conduzidos para assim obter informações mais verticalizadas e, consequentemente, para a melhora dos procedimentos laboratoriais.

Há também de se considerar com o intuito de justificar as variações maiores nos valores dos coeficientes de variação observados nas porcentagens de densidade óptica, a possibilidade, apesar da confecção do gel comercial ter seguido as recomendações segundo o fabricante, da interferência não apenas da distribuição homogênea do corante nos géis, como também da capacidade de captura da imagem do gel em pixels no momento do escaneamento, ou ainda, no relativo ao processo de

análise da imagem do gel no software e que podem, portanto, ter interferido no aumento dos valores do coeficiente de variação. Assim o presente estudo cumpriu com a finalidade do seu objetivo que foi de verificar a repetitividade e reprodutibilidade nas condições disponíveis, ou seja, o estudo em amostras de urina não purificadas obtidas na rotina clínica e submetidas a metodologia com o uso de equipamentos mais recentes e tecnologicamente disponíveis nos laboratórios de pesquisa e de rotina clínica. A detecção de menores coeficientes de variação para a porcentagem de densidade óptica com o uso do Stain-Free® em comparação com as colorações pelo azul brilhante de Coomassie e Prata acena a possibilidade deste método ter menos interferências, visto que no Stain-Free® não há a necessidade de manipulação do gel como ocorre no processo de coloração (azul brilhante de Coomassie e Prata), bem como no relativo ao escaneamento da imagem e, assim, pode ser justificada a melhor repetitividade e reprodutibilidade para o Stain-Free®.

Fica evidente que a marcação das bandas de proteínas pelo Stain-Free® difere das colorações pelo azul brilhante de Coomassie e a Prata, visto que nessas referidas colorações foi observada maior semelhança dos coeficientes de variação tanto para a análise dos pesos moleculares como para a porcentagem de densidade óptica quando comparadas com o Stain-Free® e que foram avaliadas pela análise de variância, principalmente para as amostras de urina dos *pools* 1 e 2 com RPC de 0,04 e 1,48, respectivamente. No referente ao *pool* 3, amostra de urina com RPC de 14,41, na avaliação das porcentagens de densidade ópticas das bandas de proteínas, observou-se que os coeficientes de variação são relativamente semelhantes entre o azul brilhante de Coomassie e a Prata. O método Stain-Free® foi o que mais apresentou diferença entre as referidas colorações, sugerindo que para as amostras de urina com altas concentrações de proteínas, as colorações pela Prata e pelo azul brilhante de Coomassie para a identificação das bandas de proteínas, e respectivas densidades óptica, podem ser indicadas, entretanto, deve-se ressaltar que os menores coeficientes de variação ainda foram observados para o Stain-Free®.

No referente as **limitações do presente estudo**, as diferenças observadas entre as colorações e o método de marcação de bandas pelo Stain-Free®, nas comparações dos pesos moleculares e das porcentagens de densidade óptica (ANOVA), podem ter ocorrido em decorrência do uso de diferentes densitometros e softwares para o Stain-Free® e para as colorações com o azul brilhante de Coomassie

e a Prata, observando-se melhor repetitividade e reprodutibilidade para o Stain-Free®. Entretanto há de se considerar que para uma melhor análise comparativa dos métodos ou colorações, o emprego de um mesmo equipamento seria o mais adequado (COLELLA et al., 2012). Ainda, no que se refere as particularidades da coloração pela Prata que foi realizada de forma manual, mesmo com o uso de luvas durante o procedimento e outras precauções, há possibilidade de ocorrer manchas no gel decorrentes da manipulação e especificamente para reverter esse fato, há protocolos para reversão e reiniciar o processo de coloração (RIZZI et al., 2002; BURGESS, 2009).

Sobre as **vantagens** detectadas no estudo, observou-se que o processo para a confecção do gel (SDS-PAGE) obtidos de kit comercial, como também a execução do método Stain-Free® foram conduzidos de forma rápida e mais simples, pelo fato no Stain-Free® não requerer a manipulação do gel para a realização de um processo de coloração e, sim, aguardar apenas 5 minutos para que ocorresse a ativação no sistema de Ultravioleta. Ainda, o processo do Stain-Free® apresenta custo menor em comparação com as técnicas de colorações, pois não houve o custo da aquisição do corante. Na sequência, em termos de execução técnica, a coloração pelo azul brilhante de Coomassie foi a que apresentou maior facilidade para a execução, tais como o tempo de realização do procedimento de aproximadamente 60 minutos e de baixo custo. A coloração pela Prata foi o que apresentou uma maior dificuldade para a realização de todo o procedimento de cerca de aproximadamente 5 horas, além do custo mais elevado, principalmente relacionado como o valor dos reagentes (CHEVALLET; LUCHE; RABILLOUD, 2006; SASSEL; GALLAGHER, 2009; BERNDT et al., 2018).

Outra importante situação que deve ser levada em consideração seria o destino ou o descarte dos produtos químicos. O processo pelo Stain-Free® não acarreta na produção de resíduos químicos, como ocorre nos casos pelas colorações pelo azul brilhante de Coomassie e a Prata, sendo, portanto, o Stain-Free® acarretando um menor impacto para o meio ambiente, além do menor custo (COMISSÃO NACIONAL DE SEGURANÇA QUÍMICA, GOUVEIA, 2015).

No relativo a temperatura e tempo de conservação das amostras de urina do presente estudo, todas foram mantidas a – 20 ºC até o momento da análise. Em um estudo conduzido por Théron et al (2017), em amostras mantidas as temperaturas de

4ºC, - 20º C e – 80º C por até 1 ano, houve apenas uma pequena diferença nos valores da RPC nas amostras mantidas a -20ºC somente após o tempo de armazenamento de 90 dias, mas sem ocorrer uma mudança drástica na interpretação dos resultados. Nas amostras de urina mantidas a -20º C foram observadas o aumento da intensidade da banda no peso molecular ≥ 150 kDa após 15 dias de armazenamento, como também a diminuição da intensidade das bandas de proteínas / peso molecular, entretanto, não foram conduzidos estudos relativos a avaliação dos coeficientes de variação aceitáveis e, ainda, como limitação do referido estudo, foram utilizados diferentes lotes de reagentes devido ao longo tempo de condução do estudo (360 dias) (THÉRON et al., 2017). Assim, seria importante a condução de um estudo de validação mais completa para avaliar o efeito do armazenamento e estabilidade das amostras e possíveis interferentes. Possibilidades como contaminação bacteriana ou crescimento bacteriano, além do fracionamento da albumina causado por proteases, podem ser levados em consideração nesta temperatura de -20º C de conservação, o qual foram mantidas as amostras neste estudo e sem nenhum prévio tratamento das amostras de urina (KANIA et al., 2010; SMETS et al., 2010; THÉRON et al., 2017).

7. CONCLUSÃO

Nas condições em que o estudo foi conduzido, pode-se concluir que:

- para a detecção das bandas dos **pesos moleculares** pelas colorações com o azul brilhante de Coomassie e a Prata, como também pelo método do Stain-Free®, constatou-se bons resultados de repetitividade e reprodutibilidade;
- para a análise das **porcentagens da densidade óptica** das bandas dos pesos moleculares, a repetitividade e reprodutibilidade variaram de acordo com o corante e foram constatados altos coeficientes de variação, principalmente nas bandas de baixo peso molecular pelas colorações azul brilhante de Coomassie e Prata, e o método de Stain-Free® foi o que apresentou os menores coeficientes de variação;
- a coloração pelo azul brilhante de Coomassie foi o que apresentou os menores coeficientes de variação para a amostra de urina do *pool* 1, ou seja, naquela com menor concentração de proteínas;

- para amostras de urina com quantidades de discreta a intensa de proteínas (*pools* 2 e 3), os três procedimentos de colorações para a identificação dos pesos moleculares e respectivas porcentagens de densidade óptica foram semelhantes, entretanto o método do Stain-Free® apresentou coeficientes de variação menores quando comparados com as colorações azul brilhante de Coomassie e Prata;
- a coloração pela Prata foi a que apresentou os maiores coeficientes de variação, possivelmente devido maior sensibilidade na detecção de proteínas e variações no procedimento técnico, sendo que para essa coloração sugere-se que haja cautela na interpretação de resultados.

REFERÊNCIAS

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

BEATRICE, L. et al. Comparison of urina protein-to-creatinine ration in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 236, n. 11, p. 1221–1224, 2010.

BERNDT, N. et al. Silver staining techniques of polyacrylamide gels. **Methods in Molecular Biology**, v. 1853, p. 47–52, 2018.

BIANCHI-BOSISIO, A. et al. Sodium dodecyl sulphate electrophoresis of urinary proteins. **Journal of Chromatography**, v. 569, n. 1–2, p. 243–260, 1991.

BIRN, H.; CHRISTENSEN, E. I. Renal albumin absorption in physiology and pathology. **Kidney International**, v. 69, n. 3, p. 440–449, 2006. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ki.5000141>.

BRAY, J.; ROBINSON, G. B. Influence of charge on filtration across renal basement membrane films in vitro. **Kidney International**, v. 25, n. 3, p. 527–533, 1984. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.1984.49>.

BRICON, T. Le et al. Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: Application to multiple myeloma. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1191–1197, 1998.

BROWN, S. et al. Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 27–43, 2013.

BURGESS, R. R. **Important but Little Known (or Forgotten) Artifacts in Protein Biochemistry**. 1. ed. Wisconsin: Elsevier Inc., 2009. v. 463

CANDIANO, G. et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, v. 25, n. 9, p. 1327–1333, 2004.

CARAGELASCO, D. S. et al. Urine protein electrophoresis study in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism during therapy with trilostane. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 7, p. 734–740, 2017.

CAVALCANTE, C. Z. C. Z. et al. Avaliação da albuminúria e da eletroforese de proteínas urinárias de cães com hiperadrenocorticismo e a relação com a pressão

arterial sistêmica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 11, p. 1364–1370, 2013.

CHACAR, F. et al. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2017.

CHEVALLET, M.; LUCHE, S.; RABILLOUD, T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Nature Protocols**, v. 1, n. 4, p. 1852–1858, 2006.

CHRISTENSEN, E. I.; GBUREK, J. **Protein reabsorption in renal proximal tubule - Function and dysfunction in kidney pathophysiologyPediatric Nephrology**, 2004. .

COLELLA, A. D. et al. Comparison of Stain-Free gels with traditional immunoblot loading control methodology. **Analytical Biochemistry**, v. 430, n. 2, p. 108–110, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.015>.

COMISSÃO NACIONAL DE SEGURANÇA QUÍMICA. **Programa Nacional de Segurança Química - PRONASQ**. Disponível em: <https://www.mma.gov.br/estruturas/smcq_seguranca/_arquivos/pronasq_ult_versao1_143.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2020.

DRISCOLL, W. C. Robustness of the ANOVA and Tukey-Kramer statistkal tests. **Computers and Industrial Engineering**, v. 31, n. 1–2, p. 265–268, 1996.

DUFFY, M. E.; SPECHT, A.; HILL, R. C. Comparison between urine protein: Creatinine ratios of samples obtained from dogs in home and hospital settings. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1029–1035, 2015.

FISSELL, W. H.; MINER, J. H. What is the glomerular ultrafiltration barrier? **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 29, n. 9, p. 2262–2264, 2018.

FRY, M. M. Urinalysis. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. J. (Ed.). **Nephrology and Urology of Small Animals**. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011. p. 46–57.

GHOSH, R. et al. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. **Expert Review Proteomics**, v. 11, n. 5, p. 549–560, 2014.

GIORI, L. et al. High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 4, p. 682–690, 2011.

GIRALDI, M.; PALTRINIERI, S.; SCARPA, P. Electrophoretic patterns of proteinuria in feline spontaneous chronic kidney disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, 2019.

GIZZARELLI, M. et al. Prevalence of Proteinuria in Owned Dogs from Italy : A

Multicentric Study. **Veterinary Medicine International**, p. 5, 2019.

GRAHAMMER, F.; SCHELL, C.; HUBER, T. B. The podocyte slit diaphragm - From a thin grey line to a complex signalling hub. **Nature Reviews Nephrology**, v. 9, n. 10, p. 587–598, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2013.169>.

GRAUER, G. F. Proteinuria : Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>.

GÜRTLER, A. et al. Stain-Free technology as a normalization tool in Western blot analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 433, n. 2, p. 105–111, 2013.

HARRISON, H. H. et al. Quality assurance and reproducibility of high-resolution two-dimensional electrophoresis and silver staining in polyacrylamide gels. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 97, n. 1, p. 97–105, 1992.

HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit I . Staining of sodium dodecyl sulfate gels. **Electrophoresis**, v. 9, n. 1, p. 28–32, 1988.

HOKAMP, J. A. et al. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, p. 425–434, 2018.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY. **IRIS Staging of CKD (modified 2019)**. modified. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf>.

JACOB, F. et al. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 3, p. 393–400, 2005.

KANIA, K. et al. Urinary proteases degrade albumin: Implications for measurement of albuminuria in stored samples. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 151–157, 2010.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. Artifacts and common errors in protein gel electrophoresis. **Methods in Molecular Biology**, v. 1855, p. 511–518, 2019.

LAVOUÉ, R. et al. Characterization of proteinuria in dogue de bordeaux dogs, a breed predisposed to a familial glomerulonephropathy: A retrospective study. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. 1–16, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0133311>.

LEES, G. E. et al. 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. 377–385, 2005.

LITTMAN, M. P. et al. Consensus Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 19–26, 2013.

MARIA, A.; CAVALHEIRO, C.; BREGMAN, R. Revisão : Proteinúria – marcador clássico de comprometimento glomerular Proteinuria : a classic marker of disease. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 23, n. 4, p. 217–220, 2001.

MARTORELLI, C. R. et al. Sequential evaluation of proteinuria, albuminuria and urinary protein electrophoresis in dogs with diabetes mellitus. **Online Journal of Veterinary Research**, v. 20, n. 8, p. 547–556, 2016.

MEINDL, A. G. et al. Relationships among urinary protein-to-creatinine ratio, urine specific gravity, and bacteriuria in canine urine samples. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 1, p. 192–199, 2019.

NABITY, M. B. et al. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011.

NIELSEN, R.; CHRISTENSEN, E. I.; BIRN, H. Megalin and cubilin in proximal tubule protein reabsorption: From experimental models to human disease. **Kidney International**, v. 89, n. 1, p. 58–67, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kint.2015.11.007>.

PIECH, T. L.; WYCISLO, K. L. Importance of Urinalysis. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 49, n. 2, p. 233–245, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.10.005>.

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

REBECCA, A. K. et al. Glomerular Lipidosis in Dogs. **Veterinary Pathology**, v. 54, n. 5, p. 795–801, 2018.

RIBANI, M. et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RIZZI, C. et al. Fully reversible procedure for silver staining improves densitometry of complex mixtures of biopolymers resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 23, n. 19, p. 3266–3269,

2002.

ROSSI, G. et al. The effect of inter-laboratory variability on the protein: Creatinine (UPC) ratio in canine urine. **Veterinary Journal**, v. 204, n. 1, p. 66–72, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.01.029>.

SASSEL, J.; GALLAGHER, S. R. Staining proteins in gels. **Current Protocols in Molecular Biology**, n. SUPPL. 85, p. 1–27, 2009.

SCHERBERICH, J. E. et al. Routine diagnosis with PhastSystem compared to conventional electrophoresis: Automated sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, silver staining and Western blotting of urinary proteins. **Electrophoresis**, v. 10, n. 1, p. 58–62, 1989.

SCHLÖNDORFF, D.; WYATT, C. M.; CAMPBELL, K. N. Revisiting the determinants of the glomerular filtration barrier: what goes round must come round. **Kidney International**, v. 92, n. 3, p. 533–536, 2017.

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

SHROPSHIRE, S.; QUIMBY, J.; CERDA, R. Comparison of Single, Averaged, and Pooled Urine Protein:Creatinine Ratios in Proteinuric Dogs Undergoing Medical Treatment. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 1, p. 288–294, 2018.

SISKA, W. D. et al. Identification of contaminant interferences which cause positive urine reagent test strip reactions in a cage setting for the laboratory-housed nonhuman primate, Beagle dog, and Sprague???Dawley rat. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 46, n. 1, p. 85–90, 2017.

SMETS, P. M. Y. Y. et al. Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl-β-D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 6, p. 896–902, 2010.

SMETS, P. M. Y. Y. et al. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. **Veterinary Journal**, v. 192, n. 3, p. 532–534, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.05.027>.

SMITH, G. European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say? **Bioanalysis**, v. 4, n. 8, p. 865–868, 2012.

SUGAHARA, G. et al. Pathological features of proteinuric nephropathy

resembling Alport syndrome in a young Pyrenean Mountain dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 9, p. 1175–1178, 2015.

SUSNEA, I. et al. Application of MALDI-TOF-Mass Spectrometry to Proteome Analysis Using Stain-Free Gel Electrophoresis. **Topics in Current Chemistry**, v. 331, p. 37–54, 2013.

TAYLOR, S. C. et al. A defined methodology for reliable quantification of western blot data. **Molecular Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 217–226, 2013.

THÉRON, M.-L. et al. Effects of storage conditions on results for quantitative and qualitative evaluation of proteins in canine urine. **American Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 8, p. 9900 999, 2017.

TOJO, A.; KINUGASA, S. Mechanisms of glomerular albumin filtration and tubular reabsorption. **International Journal of Nephrology**, v. 2012, 2012.

VERROUST, P. J. Pathophysiology of cubilin : of rats , dogs and men. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 17, n. 9, p. 55–56, 2002.

VINGE, L. et al. The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 25, n. 8, p. 2458–2467, 2010.

WAKI, M. F. Estudo Da Progressão Da Donça Renal Crônica Em Cães, Segundo a Classificação Em Estágios, pela Avaliação Sequencial De Proteinúria Pela Eletroforese De Proteina Urinárias E Determinação De Albuminúria. **Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo**, p. 194, 2013. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10136/tde-14052013-112906/pt-br.php>.

WEHNER, A.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGER, J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. **The Veterinary Record**, v. 162, n. 5, p. 141–147, 2008.

WESTERMEIER, R. Frequently made mistakes in electrophoresis. **Proteomics**, v. 1, p. 60–63, 2007.

YU, S. M. W. et al. Proteinuric kidney diseases: A podocyte’s slit diaphragm and cytoskeleton approach. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. SEP, p. 1–15, 2018.

ZARAGOZA, C. et al. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. **Veterinary Research**, v. 34, p. 137–151, 2003.

ZINI, E.; BONFANTI, U.; ZATELLI, A. Diagnostic relevance of qualitative

proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 7, p. 964–971, 2004.