

**ÂNGELA BACIC DE ARAÚJO E SILVA REGO**

**Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão  
sanguínea sistêmica**

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

**Departamento:**  
Clínica Médica

**Área de concentração:**  
Clínica Veterinária

**Orientador:**  
Profa. Dra. Márcia Mery Kogika

São Paulo  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.





UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
*Comissão Bioética*

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sangüínea sistêmica", Protocolo nº378/2003, utilizando 70 cães, sob a responsabilidade da Profª Drª Márcia Mery Kogika, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Microalbuminuria in dogs with chronic renal failure: relationship with systemic blood pressure" protocol number 378/2003, utilizing 70 dogs, under the responsibility of Profª Drª Márcia Mery Kogika, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 12 de fevereiro de 2004

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

**FOLHA DE AVALIAÇÃO**

NOME: REGO, Ângela Bacic de Araújo e Silva

TÍTULO: Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sangüínea sistêmica

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

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

**BANCA EXAMINADORA**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## DEDICATÓRIA

Ao meu marido Alexandre, por sua imensa  
compreensão e por, muitas vezes, cuidar  
sozinho de nossa pequena Luíza, nas horas  
em que estive ausente, me dedicando  
exclusivamente a este trabalho.

A toda minha família, sentido maior de  
minha vida.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Márcia Mery Kogika, pelo exemplo de profundo perfeccionismo e dedicação profissional e por ter me confiado a realização de mais este trabalho.

Ao Doutor Marcelo Larami Santoro, do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, não só pela co-orientação, transmitindo-me todos os conhecimentos necessários para a realização da parte experimental deste trabalho, mas também pela amizade sincera e exemplo de ser humano.

À pesquisadora Kátia Cristina Bárbaro, pelas orientações e sugestões na parte experimental e correções do artigo científico relacionado.

À Dra. Ida Shigueko Sano-Martins pelo convívio amistoso e permissão do uso do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, sob sua chefia.

À também pesquisadora do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, Dra. Anita Mitiko Tanaka-Azevedo, pela permissão de uso de seu freezer e, sobretudo, pela terna amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan, Neucely C. Oliveira, Iracema Severo Luiz, Neusa Tadeu Penas Picon, Nicolau de Braga pela amizade e préstimos e, especialmente, à Silvana Pinho de Oliveira, pelo auxílio nas colheitas de sangue dos coelhos e pelo exemplo de superação pessoal.

A todos os colegas médicos veterinários dos Serviços de Clínica Médica da FMVZ-USP, UniFMU e Universidade Anhembi-Morumbi, que colaboraram na indicação de casos clínicos: Bruna Maria Pereira Coelho, Júlia Yuzuki Habu Ikesaki, Paula Romy Monteiro Strafezzi, Denise Maria Nunes Simões, Vera A. B. Fortunato Wirthl, Khadine K. Kanayama, Patrícia Guerra, Samantha Ive Myashiro, Márcio A. Batistela, Rubens D'Angelino e Rodrigo Gonzáles.

Às funcionárias do Serviço de Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, médica veterinária Maria Luíza Franchini e técnicas Maria Helena da Silva Pelissari, Edna Santana dos Santos, Marli Elisabete Ferreira de Castro e Creide Donizete Costa pela colaboração em relação aos exames laboratoriais.

Aos funcionários do Serviço de Clínica Médica de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, Antonio Carlos Malaquias, Carlito dos Santos Belau, Geraldo Natalino Tezzi, Gilberto Pereira da Cruz e, em especial, Milton Gregório dos Santos, pela ajuda na colheita de amostras.

Aos colegas pós-graduandos Márcio Dentello Lustoza, Luciano Henrique Giovaninni, Carolina Zaghi Cavalcante e Mônica Kanashiro Oyafuso pela amizade e indicação de casos clínicos.

À acadêmica Cristina Satiko pelo auxílio na seleção de casos e colheita de amostras.

Aos colegas professores e diretores hospitalares, Dra. Márcia Marques Jericó (Universidade Anhembi-Morumbi) e Eduardo Lopes Eziliano (UniFMU), por permitirem colheitas nos respectivos hospitais.

A todos os professores do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, pelo convívio agradável e, em especial, à Professora Doutora Mitika Kuribayshi Hagiwara, pela amizade e história exemplar de vida.

A todos os proprietários de cães, em especial à Carol, proprietária do canil Golden Trip, e à graduanda Patrícia Braconaro (Universidade Anhembi-Morumbi) por gentilmente permitirem a colheita de amostras de seus animais.

Aos amigos, Carla Lorigados, Maria Luíza Franchini, Samantha Ive Myashiro, Sandra Regina Tartaglia, Márcia Maria Cavaleiro e Eliana Kobayashi por me alegrarem em todos os momentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.



## RESUMO

REGO, A. B. A. S. **Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica: relação com pressão sangüínea sistêmica.** [Microalbuminuria in chronic kidney failure dogs: relationship with systemic blood pressure]. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

A avaliação de microalbuminúria (MA) é frequentemente utilizada em medicina humana para o diagnóstico precoce de doença renal precoce em humanos que pode evoluir concomitantemente durante o curso de várias outras afecções. Quando a doença renal progride para insuficiência renal, a albuminúria pode atingir concentrações elevadas (>30 mg/dL), que recebe, neste momento, a denominação de macroalbuminúria, que, por sua vez, resulta em proteinúria maciça. A coexistência de hipertensão arterial sistêmica pode acelerar a progressão da doença. Em Medicina Veterinária, não há relatos sobre a magnitude desta albuminúria em cães já diagnosticados com insuficiência renal crônica (IRC) como também sobre o grau de coexistência de hipertensão, parâmetros estes que constituíram o escopo do presente estudo. As concentrações urinárias de albumina, detectadas pela técnica ELISA, foram determinadas em 40 cães com IRC e em 40 cães sadios (controles). As pressões sangüíneas sistólicas também foram mensuradas para comparações. A concentração de albumina normalizada (AN), relação albumina:creatinina (RAC) e relação proteína:creatinina (RPC) foram calculadas para todos os cães. Todos os cães controles apresentaram valores abaixo da faixa de microalbuminúria para ambos os índices (AN e RAC).. Nos cães com IRC, 42,5% e 65% apresentaram-se dentro da faixa microalbuminúrica segundo seus valores de AN e RAC, respectivamente. Um aumento gradual nos valores de RPC foi seguido por um aumento igualmente gradual nos valores de RAC. Similarmente, um aumento nos valores de RAC foi acompanhado por um aumento na porcentagem de cães doentes com hipertensão, a

qual compreendeu de 87,5 % e 85,7% dos cães macroalbuminúricos, segundo seus valores de AN e RAC, respectivamente. Finalmente, os cães com IRC hipertensos (> 180 mmHg de pressão sistólica) apresentaram valores mais altos de RAC que os cães não hipertensos (P = 0,023). Portanto, como primeiro relato na literatura veterinária, foi demonstrado que a hipertensão pode exercer um efeito adverso sobre o rim de cães com IRC, similarmente ao que é observado na medicina humana.

Palavras-chave: Cães. Insuficiência renal crônica. Hipertensão. Microalbuminúria. ELISA.

## ABSTRACT

REGO, A. B. A. S. **Microalbuminuria in dogs with chronic kidney failure: relationship with systemic blood pressure.** [Microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica; relação com pressão sanguínea sistêmica]. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Detection of microalbuminuria (MA) is commonly recommended by human clinicians to diagnose early renal disease in people presenting different diseases. When kidney disease has progressed to renal failure, albuminuria can reach higher levels (>30 mg/dL), considering that stage as macroalbuminuria, which, in turn, eventually results in overt proteinuria. In veterinary medicine, no data related to what levels of albuminuria can be observed in dogs with chronic renal failure (CRF), as well as the degree of correlation with systemic hypertension, is available, being therefore, the scope of this study. Urinary albumin concentrations, detected by ELISA, were determined in 40 dogs with CRF and 40 healthy dogs (controls). Arterial pressures were registered for comparisons. Normalized albumin concentrations (NAC), urinary albumin to urinary creatinine ratio (UAC) and urinary protein to urinary creatinine ratio (UPC) were calculated for all dogs. All control dogs were below the microalbuminuric range for both parameters. In dogs with CRF, 42,5% and 65% were within the microalbuminuric range based on their AN and UAC values, respectively. A gradual increase in the level of UPC was followed by an also gradual increase in UAC values. Similarly, an increase in the UAC values was accompanied by an increase of the percentage of dogs with hypertension, which affected 87,5 % and 85.7% of the macroalbuminuric CRF dogs, according to their AN and RAC values, respectively. Finally, hypertensive CRF dogs (>180 mmHg mean systolic pressure) had greater UAC values than normotensive CRF dogs ( $P =$

0.023). Thus, for the first time in veterinary literature, it is shown that hypertension seems to exert an adverse effect on renal function of CRF dogs, similarly to what is observed in human medicine.

Key words: Dogs. Chronic renal failure. Hypertension. Microalbuminuria. ELISA.

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos dos animais imunizados - São Paulo - 2006.....	43
Quadro 2 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos purificados - São Paulo - 2006.....	47
Quadro 3 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos biotinilados - São Paulo - 2006.....	49
Quadro 4 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para teste de soluções bloqueadoras - São Paulo - 2006.....	51
Quadro 5 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para teste da melhor diluição do anticorpo biotinilado - São Paulo - 2006.....	52
Quadro 6 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para teste da melhor diluição dos tampões de incubação e de lavagem - São Paulo - 2006.....	53
Quadro 7 -	Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para determinação da microalbuminúria - São Paulo - 2006.....	54
Quadro 8 -	Absorbâncias dos poços da placa de ELISA para teste de soluções bloqueadoras obtidas em leitor de ELISA a 492 nm, segundo o tipo de bloqueio testado - São Paulo - 2006.....	64
Quadro 9 -	Valores individuais da proteína total, creatinina, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada (AN) e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	66
Quadro 10 -	Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	71
Quadro 11 -	Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	72
Quadro 12 -	Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo	

	de estudo) - São Paulo - 2006.....	73
Quadro 13 -	Valores individuais da proteína total, creatinina, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	74
Quadro 14 -	Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães sadios (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	98
Quadro 15 -	Valores séricos individuais de uréia e creatinina dos cães sadios (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	99
Quadro 16 -	Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	100
Quadro 17 -	Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	101
Quadro 18 -	Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006.....	102
Quadro 19 -	Dados referentes à idade, sexo, definição racial, método de colheita de urina e média de pressão sanguínea sistólica dos cães com insuficiência renal crônica - São Paulo - 2006.....	103
Quadro 20 -	Dados individuais dos achados de anamnese dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	104
Quadro 21 -	Dados individuais do eritrograma dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	105
Quadro 22 -	Dados individuais do leucograma dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	106
Quadro 23 -	Valores individuais de bioquímica sérica dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	107
Quadro 24 -	Dados da avaliação ultra-sonográfica individual dos rins dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	108

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 - Valores da média, da mediana, do desvio padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) segundo o sexo - São Paulo - 2006..... 69
- Tabela 2 - Tabela 2 - Valores da média, da mediana, do desvio padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais machos (grupo controle) segundo o método de colheita - São Paulo - 2006..... 70
- Tabela 3 - Valores da média, da mediana, do desvio-padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) e dos cães com insuficiência renal (grupo de estudo) - São Paulo - 2006..... 79
- Tabela 4 - Valores da média, do erro padrão da média, do desvio-padrão, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães com IRC (grupo controle) segundo a existência de hipertensão - São Paulo - 2006..... 81

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Perfil cromatográfico de IgG de coelho anti-albumina canina aplicada em coluna de resina tiofílica, em temperatura ambiente, sob um fluxo constante de 2 mL/min, eluída com gradiente de tampões B + A , em partes iguais - São Paulo - 2006..... 64
- Gráfico 2 - Absorbâncias obtidas da leitura de microplacas após técnica de ELISA, contendo IgG (20,15 mg/ml) em diluição seriada (1:100-1:209715200) como anticorpo de captura e IgG (20,15 mg/ml) na diluição 1:16000 como anticorpo de detecção (biotinilado) - São Paulo - 2006..... 65
- Gráfico 3 - Curva-padrão de albumina canina utilizada em um dos testes ELISA. A albumina canina purificada foi diluída seriamente na ordem de três, foi capturada com IgG de coelho anti-albumina canina e detectada com o mesmo anticorpo marcado com biotina. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da media de três experimentos diferentes - São Paulo - 2006..... 65
- Gráfico 4 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras laterais) da concentração de albumina normalizada dos cães sadios (controle) - São Paulo - 2006..... 67
- Gráfico 5 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras laterais) dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios (controle) - São Paulo - 2006..... 67
- Gráfico 6 - Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios ( $r = 0,206$ ,  $P = 0,106$ ) - São Paulo - 2006..... 68
- Gráfico 7 - Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios, excetuando-se os com densidade urinária específica acima de 1,040 ( $r = 0,892$ ,  $P = 0,000$ ) - São Paulo - 2006..... 68
- Gráfico 8 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras laterais) da concentração de albumina normalizada dos cães doentes (grupo de estudo) - São Paulo - 2006..... 75
- Gráfico 9 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras laterais) da



	relação albumina:creatinina dos cães doentes (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.....	75
Gráfico 10 -	Porcentagens de cães doentes classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significativa segundo seus valores de albumina normalizada - São Paulo - 2006.....	76
Gráfico 11 -	Porcentagens de cães doentes classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significativa segundo seus valores da relação albumina:creatinina - São Paulo - 2006.....	76
Gráfico 12 -	Porcentagens de cães doentes com fita reagente negativa para proteína na urinálise de rotina, classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significativa segundo seus valores de albumina normalizada e relação albumina:creatinina - São Paulo - 2006.....	77
Gráfico 13 -	Frequência de cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os valores da relação proteína creatinina (RPC) e as concentrações de albumina normalizada (mg/dL) - São Paulo - 2006.....	77
Gráfico 14 -	Frequência de cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os valores da relação proteína creatinina (RPC) e os valores da relação albumina:creatinina - São Paulo - 2006.....	78
Gráfico 15 -	Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/ml) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães com insuficiência renal crônica, ( $r = 0,921$ , $P = 0,000$ ) - São Paulo - 2006...	78
Gráfico 16 -	Frequência (%) dos cães com insuficiência renal crônica segundo os níveis de albumina normalizada e a pressão sistólica- São Paulo - 2006.....	80
Gráfico 17 -	Frequência (%) dos cães com insuficiência renal crônica segundo os níveis da relação albumina:creatinina e a pressão sistólica - São Paulo - 2006.....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho representativo do ELISA para titulação dos anticorpos.....	44
Figura 2 - Desenho representativo do ELISA para titulação dos anticorpos biotinilados.....	50
Figura 3 - Desenho representativo do ELISA para escolha da diluição do anticorpo biotinilado .....	52
Figura 4 - Perfil cromatográfico da albumina canina aplicada em coluna de afinidade Blue-Sepharose de 1 mL, em temperatura ambiente, sob fluxo constante de 1 mL/min e eluição com tampão B. (Linha contínua = pico correspondente à albumina subseqüentemente recromatografada em Q-sepharose).....	62
Figura 5 - Perfil cromatográfico da albumina canina aplicada em coluna de vidro de 2 cm de diâmetro por 9 cm de comprimento, contendo resina de troca iônica Q-sepharose, em temperatura ambiente, sob um fluxo constante de 2 mL/min, eluída com gradiente de tampões A e B, em partes iguais. (Linha contínua = pico correspondente à albumina purificada; tubos 16 a 32).....	62
Figura 6 - Gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida a 10% contendo padrão de peso molecular (lane 1), albumina canina não purificada (2) e albumina canina final purificada (3) pelas técnicas cromatográficas descritas.....	63
Figura 7 Western blotting de uma amostra de urina de um cão sadio (faixa 1), de uma amostra de urina de um cão doente (faixa 2), de uma amostra de soro de um cão sadio (faixa 3) e da albumina canina purificada (faixa 4), reduzidos, incubados com IgG de coelho anti-albumina canina purificada.....	63

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AN	Albumina normalizada
IRC -	Insuficiência renal crônica
n -	Número de animais
RAC -	Relação albumina:creatinina urinária
RPC -	Relação proteína:creatinina urinária

**LISTA DE SÍMBOLOS**

$\%$	porcentagem
$>$	maior
$\geq$	maior ou igual
$<$	menor
$\leq$	menor ou igual
$^{\circ}\text{C}$	graus Celsius

## SUMÁRIO

	Página
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1 ASPECTOS GERAIS DA IRC	
<b>1.1.1 Aspectos clínicos</b> .....	23
<b>1.1.2 Alterações nos exames complementares</b>	
1.1.2.1 Exames laboratoriais.....	25
1.1.2.2 Exames de imagem.....	27
1.2 PATOFISIOLOGIA DA PROTEINÚRIA.....	27
<b>1.2.1 Métodos de determinação da proteína urinária</b> .....	29
<b>1.2.2 Relação proteína:creatinina (RPC)</b> .....	30
<b>1.2.3 Proteinúria</b> .....	30
<b>1.2.4 Microalbuminúria</b> .....	32
<b>1.2.5 Técnicas de ELISA para microalbuminúria</b> .....	34
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	35
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	
4.1 ANIMAIS	
<b>4.1.1 Grupo controle – cães saudáveis</b> .....	37
<b>4.1.2 Grupo de estudo – cães com insuficiência renal crônica</b> .....	37
4.2 METODOLOGIA.....	38
<b>4.2.1 Urinálise</b> .....	38
<b>4.2.2 Determinação da concentração de proteína urinária (P-U) dos cães</b> .....	39
<b>4.2.3 Determinação da concentração de creatinina urinária (C-U) dos cães</b> .....	39
<b>4.2.4 Determinação da albumina urinária</b> .....	40
4.2.4.1 Purificação da albumina canina.....	40
<i>4.2.4.1.1 Determinação da concentração protéica da solução de albumina canina purificada</i> .....	41
4.2.4.2 Imunização dos animais	
<i>4.2.4.2.1 Imunização de coelhos com albumina canina purificada</i> .....	41
4.2.4.3 Extração de anticorpos	
<i>4.2.4.3.1 Extração de IgG do soro dos coelhos</i> .....	42
<i>4.2.4.3.2 Titulação dos anticorpos através de método ELISA</i> .....	43
4.2.4.4 Purificação dos anticorpos	
<i>4.2.4.4.1 Purificação dos anticorpos por cromatografia tiofílica</i> .....	44
<i>4.2.4.4.1.1 Determinação da concentração protéica dos anticorpos purificados pela cromatografia com resina tiofílica</i> .....	45
<i>4.2.4.4.2 Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade</i>	
<i>4.2.4.4.2.1 Acoplamento de albumina à NHS-Sepharose</i> .....	45
<i>4.2.4.4.2.2 Passagem de imunoglobulinas IgG anti-albumina canina por coluna de Albumina-Sepharose</i> .....	45
<i>4.2.4.4.2.3 Determinação da concentração protéica dos anticorpos submetidos à cromatografia de afinidade</i> .....	46
<i>4.2.4.4.5 ELISA para titulação dos anticorpos purificados por cromatografia com resina tiofílica e de afinidade (albumina-sepharose)</i> .....	46
<i>4.2.4.4.6 Caracterização por meio de Western Blotting dos anticorpos anti-albumina canina</i> .....	47
<i>4.2.4.4.7 Conjugação dos anticorpos totais anti-albumina canina purificada com biotina</i> .....	48

4.2.4.7.1 <i>ELISA para titulação das imunoglobulinas biotinizadas</i> .....	49
4.2.4.8 Padronização do ELISA anti-albumina canina	
4.2.4.8.1 <i>Teste de soluções bloqueadoras</i> .....	50
4.2.4.8.2 <i>Teste para escolha da diluição do anticorpo biotinizado</i> .....	51
4.2.4.8.3 <i>Teste para escolha da melhor concentração dos tampões de incubação e de lavagem</i> .....	53
4.2.4.8.4 <i>Protocolo definitivo da técnica de ELISA para determinação da microalbuminúria</i> .....	54
4.2.4.9 Análise dos dados.....	55
<b>5 RESULTADOS</b>	
5.1 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA CANINA.....	57
5.2 ANTICORPOS	
5.2.1 <b>Purificação dos anticorpos de coelho anti-albumina canina</b> .....	58
5.2.2 <b>Acoplamento dos anticorpos à biotina</b> .....	58
5.3 TESTES DE PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA.....	58
5.4 DETERMINAÇÕES REALIZADAS NOS CÃES	
5.4.1 <b>Cães sadios</b> .....	59
5.4.2 <b>Cães doentes</b> .....	60
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	82
<b>8 CONCLUSÃO</b> .....	89
REFERÊNCIAS	90
ANEXOS	98

## 1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica é freqüentemente observada em cães e gatos. Independentemente da etiologia da doença, ela é caracterizada por lesões estruturais irreversíveis, que podem evoluir progressivamente para insuficiência renal crônica (IRC), falência renal e uremia (POLZIN et al., 2005).

O termo falência renal é análogo à falência hepática ou cardíaca, no sentido de que é descrito um grau de disfunção orgânica e não uma doença específica. Similarmente, o termo insuficiência renal implica disfunção renal, porém em um grau menos severo que o termo falência renal (POLZIN et al., 2005). Dentre as afecções que podem culminar em insuficiência renal estão a pielonefrite bacteriana, a nefrolitíase, o linfoma renal e doenças imunomediadas (POLZIN; OSBORNE, 1995).

Existem ainda doenças renais de origem congênita, hereditária (juvenil), familiar ou adquirida que evoluem para IRC em animais adultos jovens (com menos de 3 anos de idade) (POLZIN et al., 1997; RUBIN, 1997). Nas doenças renais congênitas, as alterações do parênquima renal estão presentes ao nascimento e decorrem de anomalia genética ou de exposição a fatores ambientais adversos durante a gestação. Nas doenças renais juvenis (hereditárias), as lesões renais são constatadas em idade precoce, mas não são necessariamente detectadas ao nascimento. Uma doença renal familiar é aquela que ocorre com freqüência na mesma família; nesses casos, os indivíduos apresentam o rim normal ao nascimento, mas gradativamente surgem alterações morfológicas e funcionais progressivas antes da idade adulta (VADEN, 1995).

Dentre as doenças renais mais comuns em cães jovens estão a nefrite hereditária, a displasia renal, o rim policístico, a glomerulopatia hereditária e a atrófica, a glomeruloesclerose, a doença túbulo-intersticial, a agenesia renal unilateral, a teleangiectasia, a amiloidose e a glomerulonefrite (DIBARTOLA, 1995; LEES, 1996).

A incidência da IRC, entretanto, geralmente aumenta com a idade. Em um estudo, a idade média dos cães acometidos foi de 12,6 anos e 45% deles apresentavam idade superior a 10 anos (POLZIN, 2000). A insuficiência renal crônica em cães jovens ocorre com maior freqüência nos animais com raça definida, conforme observaram Coelho et al. (2001), em que apenas 4% dos cães não eram de raça definida. Neste estudo, as raças mais acometidas foram cocker spaniel inglês, pastor alemão, shih tzu, yorkshire, husky siberiano, akita, basset hound, lhasa apso, poodle, weimaraner, grifon, boxer e labrador.

Após estabelecida a IRC, a magnitude da disfunção renal geralmente permanece estável por meses ou declina vagarosamente no decorrer de meses a anos. Não é necessário que o processo patológico responsável pela lesão inicial esteja presente para que ocorra uma disfunção progressiva (ELLIOT et al.; 1998; JACOB, 2002).

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA IRC

A seguir, será feita uma breve revisão sobre os principais aspectos clínicos e alterações observadas nos exames complementares de cães com IRC.

### 1.1.1 Aspectos clínicos

O início e o espectro dos eventos clínicos e bioquímicos que ocorrem em pacientes com IRC podem variar, dependendo da natureza, gravidade, duração, velocidade de progressão da afecção subjacente, presença de enfermidade coexistente mas não relacionada, idade e espécie do paciente e administração de agentes terapêuticos (POLZIN et al., 1997).

A uremia é o estado clínico para o qual convergem todas as doenças renais generalizadas e progressivas, sendo definida como a presença de quantidades anormais de constituintes da urina no sangue, associada a uma síndrome tóxica polisistêmica (POLZIN; OSBORNE, 1995).

O paciente com IRC pode estar na fase oligúrica (produção de menos de 1,0 mL de urina/kg/hora) ou não oligúrica. Em cães, a poliúria ocorre quando dois terços da capacidade funcional de ambos os rins estiver prejudicada, ocorrendo a azotemia somente quando houver perda funcional superior a três quartos dos néfrons (POLZIN e OSBORNE, 1995). A IRC é geralmente caracterizada por poliúria, mas os animais podem estar transitariamente oligúricos quando desidratados ou a oligúria pode se desenvolver durante a descompensação, na fase terminal (CHEW, 2000).

No sistema digestório, a anorexia e a perda de peso são achados inespecíficos comuns, que podem preceder outros sinais de uremia. O vômito é achado freqüente porém inconsistente e decorre da ação de toxinas urêmicas sobre a zona quimiorreceptora do centro



bulbar do vômito e da gastroenterite urêmica, caracterizada histopatologicamente pela atrofia glandular, edema da lâmina própria, infiltração por mastócitos, fibroplasia, mineralização e arterite submucosa (CHEW; DIBARTOLA, 1989). A hipergastrinemia, decorrente da redução da excreção renal, ocasiona a hiperacidez gástrica que culmina em ulceração, hemorragia e subsequente hematemesa. Ainda, a degradação da uréia em amônia por ação da urease sintetizada por bactérias pode contribuir para o desenvolvimento de ulcerações orais e glossite necrosante. (CHEW; DIBARTOLA, 1989).

Efeitos decorrentes da ação direta do acúmulo de toxinas urêmicas, da hipertensão arterial secundária e do hiperparatireoidismo renal secundário levam ao aparecimento de sintomas neuromusculares como a apatia, mioclonias, convulsões e coma. Em seres humanos com IRC, foi demonstrado que o acúmulo de uma toxina urêmica dialisável promove anormalidades no fluxo iônico sarcolêmico, levando á redução no potencial de membrana muscular (COTTON; KNOCHEL, 1985).

No que tange ao sistema hematopoético, é comum a ocorrência de anemia hipoproliferativa progressiva em pacientes com doença em estágios de evolução considerados de moderada a severa, em decorrência dos baixos níveis circulantes do hormônio eritropoetina, que seria sintetizado nos rins. No exame físico, observa-se palidez de mucosas, apatia e anorexia (COWGIL, 1992). A hemorragia presente em alguns pacientes é resultante de tromboastenia e de anormalidades da interação entre as plaquetas e a parede vascular. A produção de plaquetas e dos fatores de coagulação estão normais em pacientes com IRC. (CHEW; DIBARTOLA, 1989).

No sistema esquelético, as altas concentrações circulantes de paratormônio (PTH) e conseqüente desenvolvimento de hiperparatireoidismo, ocasionam o aparecimento de alterações ósseas principalmente na mandíbula e na maxila de cães, por razões ainda não definidas. Os ossos, devido ao grau de desmineralização, comprometem os dentes, resultando na inserção inadequada na arcada dentária e a proliferação marcante de tecido conjuntivo pode evoluir para uma distorção facial (POLZIN et al., 2005).

A hipertensão sistêmica é uma das complicações cardiovasculares mais freqüentemente reconhecidas da IRC em cães e gatos, considerando-se que ocorre em 50 a 93% dos cães acometidos (COWGIL; KALLET, 1986), sendo principalmente de origem secundária (ROSS, 1995). Não se conhece exatamente o mecanismo etiológico da hipertensão associada à IRC, não tendo sido demonstrado nenhum fator isolado responsável pelo seu estabelecimento. Provavelmente, vários fatores em combinação levam ao desenvolvimento de uma hipertensão sistêmica secundária, a saber: expansão do volume do líquido extracelular,

aumento dos níveis séricos de norepinefrina, aumento da resposta vascular à norepinefrina, diminuição da atividade do sistema cinina-caliceína, aumento do débito cardíaco, aumento da resistência periférica e ativação do sistema-renina-angiotensina (SMITH; DUNN, 1991).

Exceto em pacientes com manifestações oculares, a presença de hipertensão é facilmente despercebida, porque, com frequência, este é um evento clinicamente silencioso (POLZIN et al., 1997). A hipertensão sistêmica em cães pode resultar em glomeruloesclerose, atrofia glomerular e glomerulite proliferativa. As lesões arteriolares renais hipertensivas podem causar degeneração tubular e fibrose intersticial (BARTGES, 1996).

O aumento da pressão sanguínea sistêmica pode acelerar a progressão da insuficiência renal crônica (TOTO et al., 1995). A hipertensão sistêmica é identificada como um fator de risco significativo para o desenvolvimento de insuficiência renal terminal (KLAG et al., 1996). Recentemente, Jacob et al. (2003) descobriram que uma alta pressão sanguínea sistólica no momento do diagnóstico inicial da IRC em cães é associada com um risco aumentado de ocorrência de crise urêmica, risco de morte e taxa de declínio da função renal.

### **1.1.2 Alterações nos exames complementares**

A anamnese e o exame físico são de grande valia para o diagnóstico presuntivo da IRC em cães; entretanto, faz-se necessário a realização de exames complementares, cujas principais alterações serão abordadas a seguir, para o correto estabelecimento do diagnóstico definitivo.

#### **1.1.2.1 Exames laboratoriais**

Azotemia e hiperfosfatemia são as alterações mais comuns de bioquímica sérica, sendo decorrentes da diminuição da taxa de filtração glomerular. Geralmente, ambos os aumentos ocorrem em paralelo. Aumentos na atividade sérica do paratormônio (PTH) estão diretamente relacionados ao grau de hiperfosfatemia (CHEW; DIBARTOLA, 1989; LAZARETTI et al., 2006).

Brown (1999), na tentativa de facilitar a instituição de prognóstico e tratamentos adequados ao grau de severidade da doença renal crônica, dividiu a mesma em estágios, a saber:

- Estágio 1 (não azotêmico): ausência de sintomas evidentes de uremia; exceto poliúria e polidipsia e creatinina sérica menor que 1,4 mg/dL.
- Estágio 2 (azotemia renal discreta): ausência de sintomas evidentes de uremia, exceto poliúria e polidipsia e creatinina sérica entre 1,4 e 2,0 mg/dL.
- Estágio 3 (azotemia renal moderada): sintomas moderados de uremia e creatinina sérica entre 2,1 e 5,0 mg/dL.
- Estágio 4 (azotemia renal severa): sintomas graves de uremia e creatinina sérica maior que 5,0 mg/dL.

Dentro de cada estágio, o paciente é subcategorizado de acordo com o grau de proteinúria e pressão sangüinea sistêmica. Os estágios 2 e 3 incluem os pacientes com IRC, onde a presença de azotemia reflete a perda de mais de dois terços dos néfrons funcionais. O termo falência renal é aplicado aos pacientes categorizados no estágio 4 (POLZIN et al., 2005).

A presença de hipocalcemia é mais comum em gatos na fase poliúrica (DOW, 1989). Nas fases finais, em que o paciente progride para oligúria, tanto cães quanto gatos podem apresentar hipercalemia, com suas conseqüências sobre o ritmo cardíaco (bradicardia e parada atrial, nos casos mais graves) (CHEW, 2000).

No hemograma, pode-se observar anemia normocítica normocrômica arregenerativa, principalmente nos casos de IRC de evolução mais avançada. É importante confirmar o grau de regeneração pela contagem de reticulócitos, visto que casos de anemia regenerativas hemolíticas já foram relatados em animais com IRC (NOTOMI et al., 2004)

Na hemogasometria, pode ser observada acidose metabólica decorrente de diminuição da capacidade de excreção de  $H^+$  pela amoniogênese renal e acúmulo de íons hidrogênio. A acidose metabólica freqüentemente é bem compensada em pacientes com IRC que se encontram estabilizados devido à adaptação renal tubular e mecanismo respiratório compensatório. Entretanto, pacientes com IRC descompensada freqüentemente apresentam acidose metabólica grave (CHEW, 2000). Nassar (2000) observou que 60% dos cães com IRC de seu estudo apresentavam acidose metabólica. Kogika et al. (2006)<sup>1</sup> observaram uma grande

---

<sup>1</sup> KOGIKA, M. M. ; LUSTOZA, M. D. ; NOTOMI, M. K. ; FORTUNATO, V. A. B. ; MIRANDOLA, R. M. S. ; HAGIWARA, M. K. . Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. *Veterinary Clinical Pathology*, v. PRELO, 2006

variação nas concentrações séricas de cálcio ionizado de cães com IRC em acidose metabólica em comparação às concentrações séricas de cálcio total, recomendando a avaliação do primeiro neste grupo de cães.

Na urinálise, podem ser observados isostenúria (densidade urinária semelhante à do soro) e proteinúria em intensidade variável (a ser discutida em maiores detalhes adiante).

#### 1.1.2.2 Exames de imagem

O exame ultra-sonográfico dos rins geralmente demonstra presença de aumento da ecogenicidade dos rins, pouca definição do limite córtico-medular, redução do tamanho renal e contornos renais irregulares (POLZIN et al., 1992, RUBIN, 1997).

Na avaliação radiográfica, pode-se observar redução do tamanho dos rins, contornos renais irregulares, mineralização renal, osteomalácia ou osteíte fibrosa (POLZIN et al., 1992) e graus variados de descalcificação óssea devido ao hiperparatireoidismo secundário renal.

### 1.2 PATOFISIOLOGIA DA PROTEINÚRIA

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

A albumina, com um peso molecular aproximado de 66 kDa, normalmente não está presente na urina (DIBARTOLA et al., 1980; WALLER et al., 1989). Entretanto, alguns

autores relatam que 25 a 70% da proteína total presente na urina é representada pela albumina (BARSANTI; FINCO, 1979; HARVEY; HOE, 1966;). Proteínas de alto peso molecular (como, por exemplo, a imunoglobulina M, que tem um peso molecular de 900 kDa) normalmente não aparecem no ultrafiltrado glomerular em quantidades detectáveis.

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

Outro importante fator que interfere na formação do filtrado glomerular é aquele relacionado à atuação de forças eletrostáticas repelentes, conferidas à membrana basal glomerular por partículas de dextran carregadas negativamente. Muitas proteínas séricas, como a albumina, possuem uma carga elétrica negativa em pH fisiológico e, portanto, são repelidas pela barreira glomerular, enquanto que polications, como a proteína lisozima, são livremente filtrados (WALLER et al., 1989).

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

Além das proteínas provenientes da filtração glomerular, também se detecta na urina aquelas resultantes de secreção tubular, como, por exemplo, a proteína de Tamm-Horsfall ou uromodulina, com peso molecular de  $23 \times 10^6$  dáltons, formada na superfície epitelial da porção grossa ascendente da alça de Henle e do túbulo contornado distal. Considera-se que ela tenha propriedades anti-virais e esteja envolvida na formação de cilindros (KASISKE; KEANE, 1991; WALLER et al., 1989;).

### 1.2.1 Métodos de determinação da proteína urinária

Para a determinação da concentração de proteína urinária existem métodos quantitativos (turbidimétricos, de ligação a corantes e químicos) e os semi-quantitativos (fitas reagentes). Os reagentes mais utilizados nos métodos turbidimétricos são o ácido sulfosalicílico e o tricloroacético. Dentre os métodos de ligação a corantes, utilizam-se mais frequentemente, o azul brilhante de Coomassie e o Ponceau-S e, finalmente, para a determinação química, preconizam-se a reação de Folin-Lowry e a precipitação com o ácido tânico. Dentre todos estes métodos, o mais sensível é o do corante azul brilhante de Coomassie, que chega a detectar concentrações de proteína de até 0,25 mg/dL (HOHNADDEL, 1989).

Os métodos semi-quantitativos são geralmente realizados utilizando-se de fitas reagentes contendo indicadores colorimétricos sensíveis ao pH. Ocorre uma mudança de cor quanto os grupos amino das proteínas se ligam a este indicador. A sensibilidade destas fitas varia de 5 a 20 mg/dL, sendo maior para a albumina, que possui mais grupos amino livres que as globulinas, hemoglobina, proteína de Bence-Jones e mucoproteínas. Resultados falso-negativos podem ocorrer se a proteína urinária predominante não for a albumina, ou se a amostra de urina estiver muito diluída. Falsos-positivos podem ocorrer em urinas muito alcalinas ( $\text{pH} > 7,0$ ), contaminadas com sangue, antisépticos, meios de contraste radiográfico, penicilina, tolbutamida, cefalosporinas e sulfisoxazol (KASISKE; KEANE, 1991; OSBORNE et al., 1995). Ademais, existe uma alta variabilidade na interpretação dos resultados da fita reagente, devido à subjetividade na leitura das alterações de cores (KASISKE; KEANE, 1991).

A concentração de proteína urinária é a quantidade de proteína por volume de urina (mg/mL) e o conteúdo de proteína na urina é o produto do volume de urina pela sua concentração (FINCO, 1995). Alguns autores relacionam o conteúdo de proteína com o peso do animal, num período de colheita de 24 horas (mg/kg/24 horas), para fornecer valores de referência de excreção de proteína urinária diária para a espécie canina.

Barsanti e Finco (1979) analisaram amostras aleatórias de urina de 157 cães pelos métodos Ponceau S-ácido tricloroacético e azul brilhante de Coomassie, encontrando valores de 0,04 a 0,95 mg/mL e 0,04 a 0,65 mg/mL, respectivamente. Estes mesmos autores observaram uma diferença significativa entre a concentração de proteína urinária de machos e fêmeas normais, a qual julgaram ser causada pelas amostra colhidas por micção espontânea,

uma vez que a mesma inexistia entre as amostras colhidas por cistocentese ou cateterismo uretral.

Rego et al. (2001) observaram um valor médio de concentração de proteína urinária de 0,230 mg/mL para 20 cães machos e de 0,112 mg/mL para 20 cães fêmeas saudáveis, cujas amostras haviam sido colhidas por micção espontânea ou cateterismo uretral, com o método do azul brilhante de Coomassie. Após realização de análise de variância de duas entradas (sexo e método de colheita), foi constatada diferença significativa entre os valores de concentração de proteína urinária entre machos e fêmeas ( $P < 0,0001$ ), mas não entre os métodos de colheita ( $P > 0,05$ ).

### **1.2.2 Relação proteína:creatinina (RPC)**

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

White et al. (1984) demonstraram, em cães, uma alta correlação entre o valor de excreção de proteína urinária em 24 horas e a relação proteína:creatinina (RPC) de amostras de urinas aleatórias, fundamentando-se no fato de que a creatinina é produzida numa taxa constante, é livremente filtrada pelo glomérulo e não é significativamente secretada nem reabsorvida pelos túbulos renais. Ao se dividir a concentração de proteína urinária (mg/mL) pela concentração de creatinina (mg/mL), o efeito do volume de urina sobre a concentração de proteína em uma amostra de urina é anulado. Os autores constataram que uma perda diária de proteína urinária de 30 mg/kg/24 horas, considerada como o limite superior para a excreção de proteína urinária diária por cães, seria correspondente a uma RPC de aproximadamente 1,0, valor este que passou a ser utilizado como o máximo para esta relação em cães normais.

### **1.2.3 Proteinúria**

O termo proteinúria é definido como a presença de proteína na urina. Porém, esse termo usualmente é utilizado para indicar uma quantidade anormal de proteína na urina (LEES et al., 2005; LULICH; OSBORNE, 1990), geralmente identificada por um valor de RPC acima de 1,0. Frequentemente, ela é detectada como um achado acidental durante exame laboratorial de rotina em pacientes geriátricos, em pacientes no período pós-operatório e em pacientes doentes.

A classificação da proteinúria baseia-se em critérios temporais (transitória e permanente) e anatômicos (pré-renal, renal e pós-renal).

A proteinúria pré-renal é geralmente o resultado de condições caracterizadas pela saturação dos rins com grandes quantidades de proteínas, capazes de escapar a barreira glomerular (DIBARTOLA et al., 1980). Segundo Squires (1994), seria aquela encontrada em pacientes com anemia hemolítica auto-imune, toxicidade por cebola, por paracetamol ou por cobre, com polimiosite, mieloma múltiplo, erliquiose ou naquelas submetidos à infusão de quantidade excessiva de proteína.

A proteinúria de origem renal compreende as decorrentes de alterações estruturais na barreira glomerular, que causam a passagem de uma quantidade maior de proteína em direção ao filtrado glomerular, e as decorrentes da não reabsorção destas proteínas pelos túbulos proximais (OSBORNE et al., 1995). Esse tipo de proteinúria pode ser encontrado nos casos de glomerulonefrite, amiloidose, síndrome de Fanconi, intoxicação com antibióticos aminoglicosídeos e metais pesados (SQUIRES, 1994).

A proteinúria de origem pós-renal resulta da adição de proteína ao longo do trato urinário inferior, provenientes de processos patológicos no ureter, vesícula urinária ou uretra. A diferenciação deste tipo de proteinúria com a de origem renal pode ser realizada pela avaliação de sintomas clínicos e do sedimento urinário. A proteinúria pós-renal é acompanhada geralmente de leucocitúria e/ou hematúria (LULICH; OSBORNE, 1990).

Recentemente, a proteinúria foi incriminada como um mediador independente da progressão da doença renal (BURTON; HARRIS, 1996). Esta associação é reforçada pela observação de que a magnitude da proteinúria se correlaciona com a taxa de progressão da insuficiência renal em ratos com insuficiência renal experimentalmente induzida e em humanos com IRC de ocorrência natural (WALLS, 2001). Uma diminuição na magnitude da proteinúria depois do tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina reduziu a taxa de progressão da insuficiência renal em ratos e em humanos (ANDERSON et al., 1986; RUGGENENTI et al., 1997). Os resultados de 2 estudos com cães com proteinúria de origem renal (GRAUER et al., 2000; GRODECKI et al., 1997) demonstraram que o



tratamento com enalapril reduziu significativamente a magnitude da proteinúria, retardou a progressão da doença renal e prolongou o tempo de sobrevivência.

Jacob et al. (2005) demonstrou que uma RPC maior que 1,0 em 45 cães com IRC foi associada com um maior risco de desenvolvimento de crise urêmica e morte em comparação com cães cujas RPC eram menores que 1,0. Estes autores, portanto, concluíram que a determinação da RPC em cães com IRC de ocorrência natural pode ser usada com valor prognóstico.

Vários estudos realizados em humanos comprovam a existência de uma relação entre proteinúria e hipertensão, visto que o controle terapêutico da última está implicado em uma diminuição da magnitude da primeira (BROWN et al., 1993, 2003; GRAUER et al., 2000). Sabe-se, ainda, que pacientes humanos proteinúricos devem receber um tratamento anti-hipertensivo mais agressivo do que os não proteinúricos, alvejando-se pressões sistêmicas mais baixas, de modo a se alcançar níveis similares de proteção da função renal (HEBERT et al., 1997; PETERSON et al., 1995). A coexistência de hipertensão e proteinúria já foi relatada em cães com hiperadrenocorticismo (ORTEGA et al., 1996) e em cães com diabetes mellitus (STRUBLE et al., 1998).

#### **1.2.4 Microalbuminúria**

O termo microalbuminúria se refere a um tipo e grau particular de proteinúria representada por uma quantidade anormal de proteína em uma amostra de urina que, entretanto, não é detectada pelos testes convencionais de dosagens protéicas. Devido ao fato de o limite inferior de detecção de proteína pelas fitas reagentes de urinálise ser de aproximadamente 30 mg/dL, definiu-se o termo microalbuminúria como sendo uma quantidade de albumina urinária maior que 1,0 mg/dL e menor que 30 mg/dL. Concentrações maiores de albumina urinária também são anormais e são denominadas de macroalbuminúria (LEES et al., 2005).

Similarmente ao que acontece com a concentração de proteína urinária, a concentração de albumina urinária deve ser, de alguma forma, ajustada quanto a diferenças no volume e concentração da amostra de urina para permitir a comparação entre indivíduos e com valores do mesmo indivíduo em momentos diferentes. O procedimento ideal para isso seria a mensuração da taxa de excreção urinária de albumina. No entanto, esta mensuração requer a

colheita de urina de 24 horas. Winocour (1992) contornou este problema ao observar que a relação albumina urinária:creatinina urinária (RAC) é altamente correlacionada com a concentração de albumina urinária nas amostras de 24 horas em humanos.

Em Medicina Humana, a faixa de classificação para microalbuminúria com base na RAC é de 0,03 a 3,0. Assim como a RPC, esta relação é adimensional se for calculada a partir da divisão das concentrações de albumina e creatinina nas mesmas unidades ou pode ser expressa em mg/g (30-300 mg/g) se a albumina expressa em mg/mL for dividida pela creatinina expressa em g/mL. Struble et al. (1998), entretanto, relataram valores médios de RAC de 0,56 mg/dL em cães diabéticos e de 0 mg/dL em cães normais. Os mesmos autores não demonstraram como chegaram a esta representação da RAC em unidade de massa por volume.

A determinação da microalbuminúria pode ser utilizada como um fator preditivo para o desenvolvimento de nefropatia diabética em humanos. Pessoas diabéticas com pouca ou nenhuma proteinúria na urinálise de rotina, mas que tenham uma microalbuminúria demonstrável, têm um risco 20 vezes maior de desenvolvimento de uma nefropatia clínica e proteinúria persistente (RITCHIE et al., 1995). Similarmente, Lees et al. (2002) também observaram a ocorrência de microalbuminúria precedendo a proteinúria em cães com nefropatia hereditária.

Segundo Lees (1996), a mensuração da albuminúria só é justificada em cães com RPC < 1,0, pois nos casos em que ela é maior que 1,0, certamente há tal abundância de albumina na urina que o teste seria desnecessário, não trazendo nenhum valor diagnóstico adicional.

Para os pacientes humanos, existem disponíveis no mercado várias tiras reagentes para a determinação tanto da concentração urinária de albumina quanto da relação albumina urinária:creatinina urinária. Estas tiras podem ser usadas como métodos de triagem para a nefropatia diabética, mas, no entanto, não foram validadas para uso em veterinária (PRESSLER et al., 2002). Em humanos, há o cuidado de descartar as amostras de urina com piúria, pois estas sabidamente resultam em resultados falso-positivos para microalbuminúria (WATTS et al., 1996). Em Medicina Veterinária, sabe-se que muitos cães com piúria não têm albuminúria ou proteinúria; entretanto, a albuminúria pode ser mais provável em cães com piúria e bacteriúria ou hematúria concomitantes. A hematúria pode não causar um aumento na concentração de albumina nas amostras de urina de cães, até que ela se torne macroscópica e, mesmo assim, pode não haver aumento da RPC (VADEN et al., 2004).

A hipertensão é um achado comum em pacientes diabéticos com microalbuminúria, havendo uma correlação positiva entre elas (CAMPOS-PASTOR et al., 2000; RITCHIE et al., 1995; RUILOPE; RODICIO, 1993).

Não está claro se uma pressão sanguínea elevada é o resultado de uma doença renal assintomática ou se as pessoas com hipertensão têm maior probabilidade de desenvolver nefropatia e microalbuminúria. Uma vez que a nefropatia tenha se desenvolvido, ela pode iniciar um ciclo vicioso de hipertensão, exacerbando a doença renal pré-existente (VIBERTI et al., 1982).

Uma vez observada a ocorrência de hipertensão associada a microalbuminúria, medidas terapêuticas específicas poderão ser indicadas. A utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina em pacientes humanos com diabetes mellitus tipo 1, hipertensão e microalbuminúria é capaz de diminuir a progressão para o aparecimento de proteinúria maciça (HERMANS et al., 1992). Este mesmo tratamento também pode ser benéfico para pacientes humanos diabéticos normotensos e com microalbuminúria (MARRE et al., 1999; MATHIESEN et al., 1991). Similarmente, já foi comprovado que o tratamento de ratos com o modelo experimental do rim remanescente com inibidores da enzima conversora de angiotensina reduz o nível de proteinúria em comparação com os controles e diminui o grau de alteração estrutural nos glomérulos e no interstício renal (ANDERSON et al., 1986)

### **1.2.5 Técnicas de ELISA para microalbuminúria**

Atualmente, existem tiras comerciais descartáveis específicas para a determinação semi-quantitativa da microalbuminúria em cães (E.R.D.- HealthScreen®). No entanto, essas tiras não estão disponíveis no mercado nacional e, inclusive, são semi-quantitativas, sendo, portanto, incapazes de detectar variações sutis, porém estatisticamente significantes, que possam ocorrer entre grupos de estudo em trabalhos experimentais.

Alguns estudos foram realizados para avaliar a prevalência da microalbuminúria em cães utilizando-se a técnica de ELISA competitivo, sendo os resultados padronizados para uma densidade urinária de 1,010, ao invés da determinação da sua relação com a creatinina urinária, devido à sua maior praticidade (GRAUER et al., 2002; JENSEN et al., 2001; PRESSLER et al., 2001; VADEN et al., 2001, 2002).

## **2 JUSTIFICATIVA**

O desenvolvimento da técnica de ELISA para determinação quantitativa da microalbuminúria em cães com insuficiência renal crônica, aliado à mensuração da pressão arterial sistêmica, poderia trazer subsídios para a compreensão da gênese das alterações sistêmicas freqüentemente observadas neste grupo de animais e servir como referência para a realização de estudos posteriores sobre a instituição de regimes preventivos e/ou terapêuticos específicos.

### **3 OBJETIVOS**

O objetivo deste projeto foi o de desenvolver uma técnica de ELISA sanduíche para a detecção de albumina presente em pequenas quantidades na urina de cães, atualmente inexistente no país. Posteriormente, esta técnica foi utilizada para avaliar a existência e a magnitude da microalbuminúria e sua correlação com o aumento da pressão sanguínea sistêmica em cães com insuficiência renal crônica.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Inicialmente apresenta-se a composição dos grupos de cães dos quais foi determinada a pressão sanguínea e a microalbuminúria e, posteriormente, é descrita a técnica de determinação laboratorial da mesma.

### **4.1 ANIMAIS**

#### **4.1.1 Grupo controle – cães sadios**

Foram avaliados e selecionados 40 cães clinicamente hígidos, com idades entre 12 e 60 meses, 23 machos e 17 fêmeas, com ou sem definições raciais variadas, pertencentes a proprietários (domiciliados), cujos dados de anamnese e exame clínico e complementar (determinações séricas de uréia e creatinina, realizados pelo Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, segundo as técnicas rotineiramente empregadas) excluíram a existência de doença renal ou insuficiência renal crônica e de hipertensão arterial sistêmica.

#### **4.1.2 Grupo de estudo – cães com insuficiência renal crônica**

Foram selecionados 40 cães, 20 machos e 20 fêmeas, com idade variando entre 24 e 218 meses, de definições raciais variadas, provenientes do atendimento dos Serviços de Clínica Médica de Pequenos Animais e do Pronto Atendimento de Pequenos Animais do Departamento de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e de clínicas veterinárias de iniciativa privada, com dados de anamnese, exame clínico e exames laboratoriais compatíveis com

insuficiência renal crônica (azotemia crônica de origem renal; creatinina sérica acima de 2,0 mg/dL e uréia sérica acima de 60 mg/dL) e que não estavam recebendo terapia anti-hipertensiva.

De ambos os grupos, foram colhidas amostras de urina, de maneira asséptica (por cistocentese ou cateterização uretral) e foi também mensurada a pressão arterial sistêmica nas artérias da região caudal do metacarpo com auxílio de aparelho de Doppler (Doppler Ultrasound Parks Medical-Model 811-B) e manguitos cujas larguras eram aproximadamente 30 a 40% da circunferência do membro no sítio de colocação dos mesmos.

Foram descartados os animais com evidências macro e microscópicas de infecção do trato urinário (urina turva e com piúria, hematúria e bacteriúria) e com hematúria macroscópica.

Para excluir a subjetividade no momento da escolha do manguito, a medida exata da circunferência do membro no sítio de colocação do mesmo foi cuidadosamente obtida com auxílio de fita métrica. Quando o tamanho calculado do manguito foi intermediário entre os disponíveis, foi utilizado o manguito superior para prevenir a super-estimação da pressão sangüínea. Para cada cão, foram realizadas, no mínimo, três determinações, sendo registrada a média destas. A pressão sistólica de 180 mmHg foi utilizada como valor de corte para efeito de comparações entre os cães doentes, evitando-se assim classificar como hipertensos animais com valores limítrofes; sendo assim, os cães com valores de pressão sistólica iguais ou acima de 180 mmHg foram considerados como indubitavelmente hipertensos (ELLIOT, 2006)

## 4.2 METODOLOGIA

A seguir, serão detalhados os procedimentos laboratoriais usados na análise da urina dos cães normais e com IRC e, após, será abordada a purificação de albumina canina e a subsequente inoculação em coelhos para produção de anticorpos específicos, usados na técnica de ELISA para determinação de microalbuminúria canina.

### 4.2.1 Urinálise

Cada amostra de urina foi avaliada fisicamente quanto á cor, aspecto, odor e densidade; este último em refratômetro com limite máximo de mensuração de 1,040. O exame químico foi realizado pela imersão rápida de fita reagente específica para urinálise (Combur - 10® - Roche) e leitura contra padrão de cores estabelecido pelo fabricante, após decorrido um minuto. A sedimentoscopia foi realizada após a amostra ser centrifugada a 950 g por 10 minutos, segundo técnica rotineiramente empregada no Laboratório de Análises Clínicas do Departamento de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. O sobrenadante foi separado e aliqotado em microtubos que foram armazenados a – 20°C para as determinações de proteína, creatinina e albumina, segundo técnicas descritas a seguir.

#### **4.2.2 Determinação da concentração de proteína urinária (P-U) dos cães**

Para a determinação da proteína urinária (P-U) foi utilizado o método do azul brilhante de Coomassie G-250, conforme técnica descrita por BRADFORD (1976). A determinação foi realizada no sobrenadante, mantido a – 20°C, das amostras de urina submetidas á urinálise. O método, aqui adaptado para uso em microplacas, baseia-se na ligação do corante a resíduos  $\text{NH}_3^+$  presentes nas proteínas, sendo essa ligação completada em cerca de dois minutos após o início da reação. Forma-se um complexo de cor púrpura, estável por uma hora, passível de absorção em comprimento de onda de 595 nm. Como solução padrão, utilizou-se padrão aquoso de proteínas totais.

#### **4.2.3 Determinação da concentração de creatinina urinária (C-U) dos cães**

Para a determinação da creatinina urinária (C-U) foi utilizada a reação de Jaffé segundo metodologia descrita por Lustagarden e Wenk (1972), cujo princípio baseia-se na reação da creatinina com o ácido pícrico em meio alcalino, produzindo picrato de creatinina, com posterior leitura em comprimento de onda de 515 nm em analisador bioquímico automático (Lysis). As amostras de urina foram apropriadamente diluídas em solução salina previamente à mensuração, de modo a atingir a faixa de linearidade do teste.



#### 4.2.4 Determinação da albumina urinária

Antes do detalhamento final da técnica de ELISA usada na determinação da microalbuminúria canina, serão abordadas as fases anteriores de purificação da albumina canina e inoculação em coelhos para produção de anticorpos específicos.

##### 4.2.4.1 Purificação da albumina canina

Para tanto, frações de albumina canina liofilizada (Fração V, Sigma, USA), totalizando quinhentos e trinta miligramas, foram dissolvidas em tampão A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM) e aplicadas em colunas de afinidade Blue Sepharose (HiTrap Blue HP – Pharmacia) previamente equilibradas com o mesmo tampão e mantidas em temperatura ambiente, sob um fluxo constante de 1 mL/min. Após nova estabilização da linha de base do tampão A, foi aplicado um volume suficiente de tampão B ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM; KCl 1,5M) para eluição completa. As frações, colhidas em tubos plásticos, tiveram sua concentração protéica estimada pela leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro digital (Ultrospec 2100 pro), utilizando-se como referência o coeficiente de extinção de 0,7 para albumina. Foram reunidas as frações que apresentaram valores maiores de absorbância, indicativos de uma maior concentração protéica.

As frações da cromatografia anterior que continham albumina (66 kDa) porém com proteínas de peso molecular superior como contaminantes, conforme verificado por eletroforese em gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida (SDS-PAGE) a 10% segundo técnica descrita por Laemli (1970) e corados com nitrato de prata segundo técnica descrita por Blum *et. al* (1987), foram recromatografadas em coluna de vidro de 2 cm de diâmetro por 9 cm de comprimento, contendo resina de troca iônica Q-sepharose, em temperatura ambiente. Previamente à aplicação, na velocidade de 2 mL/min, as amostras foram diluídas 1:2 com tampão A de modo a diminuir a sua concentração iônica, verificada em condutivímetro Micronal B331, e a eluição foi realizada com gradiente de partes iguais de tampão A e de tampão B.

As frações ainda contaminadas, conforme verificação em SDS-PAGE, foram reunidas e dialisadas durante 72 horas a 4°C com 7,5 L de tampão A, sendo novamente aplicadas à

coluna de Q-sepharose, nas mesmas condições de temperatura e velocidade, porém agora com gradiente em partes iguais de tampão A e tampão C ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50mM; KCl 0,2 M) para eluição. O material ainda adsorvido à coluna foi finalmente eluído com gradiente de volumes iguais de tampão B e C.

As amostras purificadas foram reunidas, tiveram sua concentração protéica determinada pelo método do ácido bicinconínico (descrito a seguir) para o cálculo do rendimento de purificação (obtido pela divisão da quantidade total de albumina purificada pela quantidade total de albumina inicial) e foram divididas em alíquotas de 1 mL (2,1 mg/mL) em microtubos de 1,5 mL, sendo finalmente armazenadas a  $-20^\circ\text{C}$  para imunização dos animais.

#### *4.2.4.1.1 Determinação da concentração protéica da solução de albumina canina purificada.*

As amostras de albumina canina purificadas foram reunidas e tiveram sua concentração protéica determinada pelo método do ácido bicinconínico, conforme descrito por Smith et al. (1985), para o cálculo do rendimento de purificação (obtido pela divisão da quantidade total de albumina purificada pela quantidade total de albumina inicial). Sucintamente, o ácido bicinconínico é um sal sódico estável e hidrossolúvel capaz de monitorar os íons cúpricos produzidos da reação da proteína com  $\text{Cu}^{2+}$  alcalino, resultando em um complexo de cor púrpura intensa. A cor produzida nesta reação é estável e aumenta de maneira proporcional sobre uma ampla variedade de soluções protéicas de concentrações crescentes. Foi utilizada como proteína padrão a albumina sérica bovina.

#### *4.2.4.2 Imunização dos animais*

##### *4.2.4.2.1 Imunização de coelhos com albumina canina purificada*

Dois coelhos de aproximadamente 3 kg cada foram imunizados contra a albumina canina purificada nas cromatografias descritas anteriormente. Inicialmente, cada coelho recebeu uma injeção i.m. de 0,5 mL de adjuvante de Freund completo e 0,5 mL de uma

solução de albumina purificada 2,1 mg/mL. A intervalos quinzenais, os coelhos receberam mais quatro reforços, pela mesma via e nas mesmas concentrações de antígeno, porém utilizando-se o adjuvante de Freund incompleto. Amostras de sangue foram obtidas antes da primeira imunização e no momento de cada reforço, por punção da veia marginal auricular direita ou esquerda, com auxílio de um escalpe de calibre 21 G, para determinação do título de anticorpos.

Um mês após a última inoculação, foi aplicado um último reforço. Após mais trinta dias deste, os coelhos foram anestesiados com tiopental (50 mg/kg i.v.) e o sangue foi obtido mediante punção da artéria carótida, previamente dissecada. O sangue foi deixado coagular em tubo de plástico a 4°C durante 18 h e posteriormente centrifugado a 3000 rpm durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi retirado e foi mantido a -70°C até o momento da purificação dos anticorpos.

#### 4.2.4.3 Extração de anticorpos

##### 4.2.4.3.1 Extração de IgG do soro dos coelhos

Os anticorpos IgG do soro dos coelhos foram extraídos seguindo o protocolo descrito por McKinney e Parkinson (1987). Sucintamente, a um volume de soro foram adicionados quatro volumes de tampão acetato 60 mM (pH 4,0) e o pH foi acertado para 4,5 com HCl 1 M. A cada mililitro da solução anterior, foram adicionados 25 microlitros de ácido caprílico, gota a gota, em capela, para a separação dos anticorpos de outras proteínas séricas, deixando-se homogeneizar durante 30 minutos com auxílio de agitador magnético. Após a centrifugação a 10 000 g durante 30 minutos, em temperatura ambiente, foram adicionadas uma parte de PBS 10 vezes concentrado para cada 9 partes do sobrenadante previamente filtrado em lã de vidro e o pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 1 M. Este sobrenadante foi subsequentemente resfriado a 4°C e se adicionaram 0,277 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para a precipitação da IgG. Após 30 minutos de homogeneização e centrifugação a 5000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de IgG obtido foi dissolvido em salina tamponada. Em seguida dialisou-se a IgG contra 100 volumes do mesmo tampão por duas vezes durante 12 horas. Após a diálise, a solução de IgG foi aquecida a 50°C durante 20 minutos e submetida a uma

última centrifugação (5000 g; 20 minutos). O sobrenadante obtido foi diluído 1:2 com glicerol 100%.

#### 4.2.4.3.2 Titulação dos anticorpos pelo método ELISA

Para a titulação dos anticorpos IgG, placas de ELISA Poli-Sorb (Nunc) foram tratadas conforme demonstrado no quadro 1 e figura 1. Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%).

FASES	PROCEDIMENTOS
Sensibilização (18 h; 4°C)	Albumina canina purificada (10 µg/mL), diluída em tampão carbonato pH 9,6 (100 µL/poço)
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% (200 µL/poço)
Anticorpo (1h; 37°C)	Diluições seriadas, na razão de 2 da IgG anti- albumina canina purificada, em tampão de incubação (PBS; gelatina de peixe 0,4%, Tween 20 0,05%; pH 7,4) (100 µL/poço)
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado de IgG-peroxidase anti-IgG de coelho (Sigma A6154), diluído 1/5.000 diluído em tampão de incubação (100 µL/poço)
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)
FASES	PROCEDIMENTOS
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µL/poço)
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)

Quadro 1 - Sequência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos dos animais imunizados - São Paulo - 2006

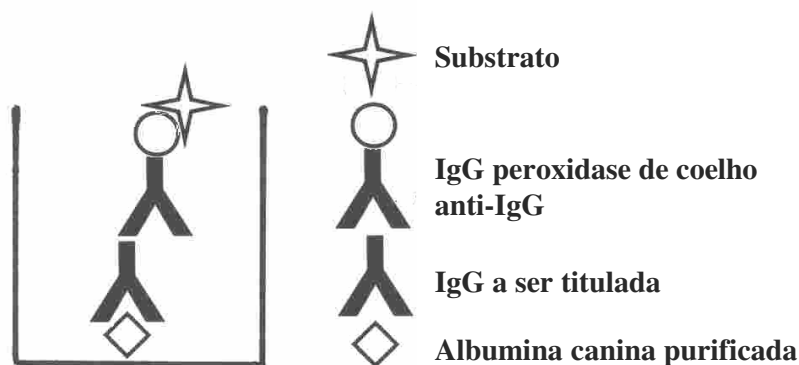


Figura 1 – Desenho representativo do ELISA para titulação dos anticorpos

Definiu-se como título, a menor concentração de anticorpo capaz de desenvolver uma leitura igual ou superior a 0,100, ao se subtraírem as absorvâncias das diluições seriadas dos poços sensibilizados com antígeno e dos seus respectivos brancos (poços não sensibilizados com antígeno).

#### 4.2.4.4 Purificação dos anticorpos

##### 4.2.4.4.1 Purificação dos anticorpos por cromatografia tiofílica

Para que se obtivesse somente IgGs anti-albumina canina e se excluíssem outras proteínas presentes nas soluções de anticorpos que pudessem interferir na determinação de albumina canina por ELISA, as mesmas foram passadas em uma coluna de resina tiofílica. A coluna foi preparada com o empacotamento de resina tiofílica em coluna de vidro com base de vidro sinterizado e equilibrada com tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,5 M, pH 7,4 (tampão B). As soluções de anticorpos (IgG e IgY, separadamente) foram diluídas 1:2 com o tampão B e aplicadas na coluna, sob um fluxo constante de 1 mL/min. Após retorno à linha de base com aplicação do tampão B, foi realizada a eluição dos anticorpos específicos com um gradiente de partes iguais de tampão A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7,4) e B. O tampão A foi utilizado para completar o retorno até a linha de base e o tampão B foi passado novamente para reequilibrar a coluna, mantida posteriormente sob refrigeração para novo uso. As frações,

colhidas em tubos plásticos, tiveram sua concentração protéica estimada pela leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro digital (Ultrospec 2100 pro).

#### 4.2.4.4.1.1 Determinação da concentração protéica dos anticorpos purificados pela cromatografia com resina tiofílica

A determinação da concentração protéica dos anticorpos purificados pela cromatografia com resina tiofílica foi realizada pelo método do ácido bicinconínico, conforme descrito anteriormente no item 4.2.4.1.1.

#### 4.2.4.4.2 *Purificação dos anticorpos por cromatografia de afinidade*

##### 4.2.4.4.2.1 Acoplamento de albumina a NHS-Sepharose

Com o intuito de se remover imunoglobulinas inespecíficas das soluções de IgG obtidas dos animais imunizados, as mesmas foram passadas em uma coluna de albumina canina acoplada à NHS-Sepharose. O protocolo seguido para o acoplamento de albumina canina foi o recomendado pelo fabricante da coluna (HiTrap NHS-Sepharose, 1 mL, Pharmacia). Para tanto, utilizaram-se 1,7 mL da albumina purificada (conforme descrito anteriormente) dialisados contra 1 litro de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,2). A eficiência do acoplamento foi de 99,6%. Após o acoplamento, a coluna foi lavada e mantida a 4°C em tampão Tris-HCl, NaCl 0,15 M, pH 7,5, até a sua utilização.

##### 4.2.4.4.2.2 Passagem de imunoglobulinas IgG anti-albumina canina por coluna de Albumina-Sepharose

Para a purificação da IgG específica para albumina canina, estas soluções de anticorpos foram individualmente dialisadas contra tampão Tris-HCl, NaCl 0,15 M, pH 7,5. As amostras retiradas da diálise foram, a seguir, centrifugadas a 3000 g por 15 minutos a 20°C. Os sobrenadantes foram individualmente aplicados à coluna sob um fluxo de 0,5 mL/min. Após a aplicação das amostras, a coluna foi lavada com tampão Tris-HCl, NaCl 0,15 M, pH 7,5, até retorno à linha de base. A seguir, a coluna foi lavada com Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,8 M, pH 7,5, para retirar as proteínas adsorvidas inespecificamente à coluna. A coluna foi posteriormente lavada com água destilada e os anticorpos específicos anti-albumina canina foi eluído com tampão de eluição (glicina 100 mM; 1,4-dioxano 10%; pH 2,5). As imunoglobulinas específicas para albumina canina eluídas da coluna foram imediatamente recolhidas em frasco contendo uma solução de Tris 1,0 M, pH 7,5 a fim de que os anticorpos não se desnaturassem com o pH baixo do tampão de eluição. A coluna foi regenerada, lavando-a com 10 mL de tampão Tris-HCl, NaCl 0,15 M, pH 7,5. Ao anticorpo eluído, adicionou-se sulfato de sódio para obtenção de uma solução final de 55% (0,352 g de sulfato de amônio/mL de eluído). Esta solução foi mantida a 4°C por 18 h e, a seguir, centrifugada a 10 000 g por 15 minutos. O precipitado foi dissolvido em 3,5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, NaCl 0,30 M, pH 7,5 e posteriormente diluída 1:2 com glicerol 100%, para que a solução fosse mantida a - 20°C.

#### 4.2.4.4.2.3 Determinação da concentração protéica dos anticorpos submetidos á cromatografia de afinidade

Para a determinação da concentração protéica dos anticorpos submetidos á cromatografia, foi utilizado o método do ácido bicinonínico, conforme anteriormente descrito no item 4.2.4.1.

#### 4.2.4.5 ELISA para titulação dos anticorpos purificados por cromatografia com resina tioflica e de afinidade (albumina-sepharose)

Para a titulação dos anticorpos específicos obtidos por cromatografia, placas de ELISA Poli-Sorb (Nunc) foram tratadas conforme detalhado no quadro 2 e figura 1 (item 4.2.4.3.2). Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%). As frações purificadas de anticorpos tiveram sua concentração protéica previamente determinada e ambas foram previamente diluídas para a mesma concentração.

Definiu-se como título, a menor concentração de anticorpo capaz de desenvolver uma leitura igual ou superior a 0,100, ao se subtraírem as absorbâncias das diluições seriadas dos poços sensibilizados com antígeno e dos seus respectivos brancos (poços não sensibilizados com antígeno)

FASES	PROCEDIMENTOS
Sensibilização (18 h; 4°C)	Albumina canina purificada (10 µg/mL), diluída em tampão carbonato pH 9,6 (100 µl/poço)
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% (200 µL/poço)
Anticorpo (1h; 37°C)	Diluições seriadas, na razão de 2 da IgG anti- albumina canina purificada, em tampão de incubação (PBS; gelatina de peixe 0,4%, Tween 20 0,05%; pH 7,4) (100 µl/poço)
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado de IgG-peroxidase anti-IgG de coelho (Sigma A 6154), diluído 1/5.000 em tampão de incubação (100 µl/poço)
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µl/poço)
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)

Quadro 2 - Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos purificados - São Paulo - 2006

#### 4.2.4.6 Caracterização por meio de Western Blotting dos anticorpos anti-albumina canina.



O protocolo para a realização de Western Blotting com IgG total anti-albumina canina se baseou naquele descrito por Harlow e Lane (1988). Inicialmente, realizou-se a eletroforese da albumina purificada não reduzida, de soro de cão normal, urina de cão normal e de urina de cão com proteinúria (10 µg/poço) em dois géis de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) (LAEMLI, 1970). A corrida eletroforética foi realizada em amperagem constante de 30 mA/gel. Após a eletroforese, os géis foram equilibrados em 50 mL de tampão de transferência (Tris 48 mM; glicina 39 mM; metanol 20%, SDS 0,037%, pH 9,2), mantido a 4°C, por 5 minutos. Cortaram-se uma folha de membrana de nitrocelulose (poros de 0,22 µm, Sigma) para cada gel, que foram umedecidas em água destilada por 2 minutos e depois em tampão de transferência. Os papéis de filtro também foram cortados e umedecidos por 20 minutos em tampão de transferência. Os papéis de filtro, as membranas de nitrocelulose e os géis foram dispostos segundo recomendação do fabricante, em uma cuba de transferência semi-seca (BioRad). A transferência foi realizada com voltagem constante de 15 V durante 2 h. Após a transferência, as membranas de nitrocelulose foram secas em estufa a 37°C, para a fixação das proteínas às mesmas. Depois de secas, as membranas foram umedecidas por 1 minuto em água destilada e coradas com solução de Ponceau S (Ponceau S 0,2%; ácido tricloroacético 0,18 M; ácido sulfossalicílico 3%) por 10 minutos, sob agitação, e descoradas com tampão de lavagem (Tris 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,1%, pH 7,5) e, a seguir, incubadas por 18 h à 4°C com solução de bloqueio (gelatina de peixe a 5% (v/v), sigma G7765, em tampão de lavagem). Após o bloqueio, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com solução de lavagem. Adicionaram-se as soluções de anticorpos (Ig G e IgY, em membranas separadas) na diluição 1:5000 em tampão de incubação contendo gelatina de peixe a 0,05%, às membranas de nitrocelulose e incubou-se sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 2 horas. Após esta incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com solução de lavagem. Às tiras incubadas com IgG, adicionou-se solução de conjugado de IgG-peroxidase anti-IgG de coelho, diluído 1:2 500 em tampão de incubação. Após incubação de 2 horas, à temperatura ambiente e sob agitação constante, as membranas foram lavadas 3 vezes, por 5 minutos, com solução de lavagem. A seguir, adicionou-se o substrato cromógeno (5,0 mg de tetra-hidrocloro de 3,3' diaminobenzidina (DAB); 10 mL de tampão imidazol 0,1 M; 125 µL de CoCl<sub>2</sub> 0,2 M; 3,4 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) (PUKAC et al., 1997). A reação foi interrompida lavando-se a membrana exaustivamente com água destilada.

#### 4.2.4.7 Conjugação dos anticorpos totais anti-albumina canina purificada com biotina

A conjugação dos anticorpos com biotina foi realizada com uma modificação das metodologias descritas por HARLOW e LANE (1988) e OLOVSSO e LARSSON (1993). As soluções de anticorpos (IgG) foram dialisadas contra tampão bicarbonato 0,1 M a 4°C durante 12 h. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10 000 g por 5 minutos e a concentração protéica determinada em 280 nm (20,15 mg IgG/mL e 21,48 mg/mL IgY). As amostras foram então diluídas, com tampão bicarbonato 0,1 M, para alcançar a concentração protéica de 1,0 mg/mL (volume final = 2,0 mL). Adicionaram-se 60 µL de NHS-Biotina (Sigma) em DMSO (10 mg/mL) em cada amostra de imunoglobulina e incubaram-se as misturas, sob agitação, à temperatura ambiente por 1 hora. Após este período, adicionaram-se 16 µL de NH<sub>4</sub>Cl 1 M a cada solução e incubou-se, sob agitação, por 10 minutos à temperatura ambiente. Dialisou-se, em seguida, cada amostra contra 3 litros de tampão Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5, durante 12 h a 4°C. As amostras foram retiradas e submetidas novamente às mesmas condições de diálise. Finalmente, a IgG conjugada com a biotina foi retirada da última diálise e armazenada, em alíquotas de 100 µL, em microtubos mantidos a - 20°C.

#### 4.2.4.7.1 ELISA para titulação das imunoglobulinas biotinizadas

Para a titulação dos anticorpos biotinizados, placas de ELISA Poli-Sorb (Nunc) foram tratadas conforme detalhado no quadro 3 e figura 2. Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%).

Definiu-se como título, a menor concentração de anticorpo capaz de desenvolver uma leitura igual ou superior a 0,100, ao se subtraírem as absorbâncias das diluições seriadas dos poços sensibilizados com antígeno e dos seus respectivos brancos (poços não sensibilizados com antígeno).

FASES	PROCEDIMENTOS
Sensibilização (18 h; 4°C)	Albumina canina purificada (10 µg/mL), diluída em tampão carbonato pH 9,6 (100 µl/poço)
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% (200 µL/poço)

Anticorpos (1h; 37°C)	Diluições seriadas, na razão de 2 da IgG anti- albumina canina purificada, em tampão de incubação (PBS; gelatina de peixe 0,4%, Tween 20 0,05%; pH 7,4) (100 µl/poço)
FASES	PROCEDIMENTOS
Conjugado (1h; 37°C)	Solução de conjugado avidina-peroxidase (Sigma A3151) (100 µl/poço)
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µl/poço)
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)

Quadro 3 - Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para titulação dos anticorpos biotinizados - São Paulo- 2006

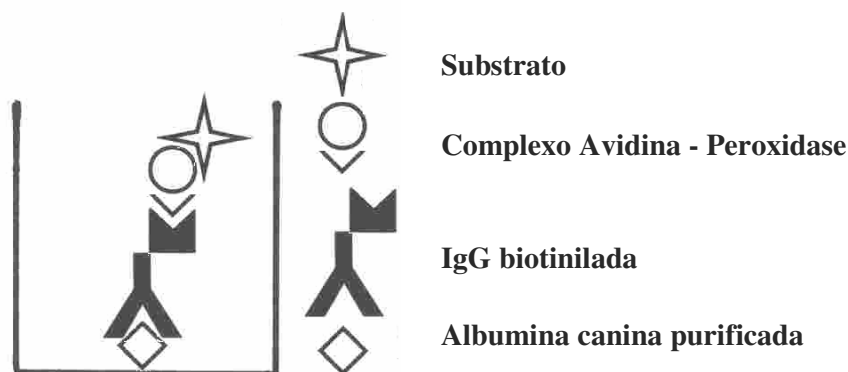


Figura 2 – Desenho representativo do ELISA para titulação dos anticorpos biotinizados

#### 4.2.4.8 Padronização do ELISA anti-albumina canina

##### 4.2.4.8.1 Teste de soluções bloqueadoras

Para teste do melhor bloqueio a ser utilizado na técnica de ELISA final para determinação da microalbuminúria nos cães, placas de ELISA Poli-Sorb (Nunc) foram

tratadas conforme detalhado no quadro 4. Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%).

PLACA	1	2	3	4	5	6	7	8
Sensibilização (18 h; 4°C)	Albumina canina purificada (10 µg/mL), diluída em tampão carbonato pH 9,6 (100 µl/poço)							
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína (Merck VK 488041) (200 µL/poço)			Gelatina de peixe (Sigma G7765) (200 µL/poço)			Leite de soja (Molico Nestlé) (200 µL/poço)	
	1%	2%	4%	1%	2%	4%	1%	2%
Anticorpo (1h; 37°C)	IgG total de coelho anti-albumina canina purificada diluído 1/5000 em tampão de incubação (100 µl/poço)							
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado de IgG-peroxidase anti-IgG de coelho (A 6154/Sigma), diluído 1/5.000 em tampão de incubação (100 µl/poço)							
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)							
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µl/poço)							
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)							

Quadro 4 - Sequência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Poli-sorb (Nunc) para teste de soluções bloqueadoras - São Paulo - 2006

#### 4.2.4.8.2 Teste para escolha da diluição do anticorpo biotilado

Para teste da melhor diluição do anticorpo biotilado, placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) foram tratadas conforme demonstrado no quadro 5 e figura 3. Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,05%). Os tampões de sensibilização e de incubação foram os mesmos já descritos anteriormente.

FASES	PROCEDIMENTOS
Anticorpo de captura (18 h; 4°C)	IgG anti-albumina canina (1:1.600) em tampão carbonato (pH 9,6)  (100 µL/poço)
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% (200 µL/poço)
Antígeno (1h; 37°C)	Albumina canina purificada (10 µg/mL; 100 µL/poço)
Anticorpo de detecção (1h; 37°C)	IgG anti-albumina canina biotinizada em diluição seriada (1:50 – 1:419.430.400)  (100 µL/poço)
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado avidina-peroxidase (Sigma, A3151)  (1 µL/200 µL tampão incubação; 100 µL/poço)
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µL/poço)
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)

Quadro 5 - Sequência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para teste da melhor diluição do anticorpo biotinizado - São Paulo - 2006

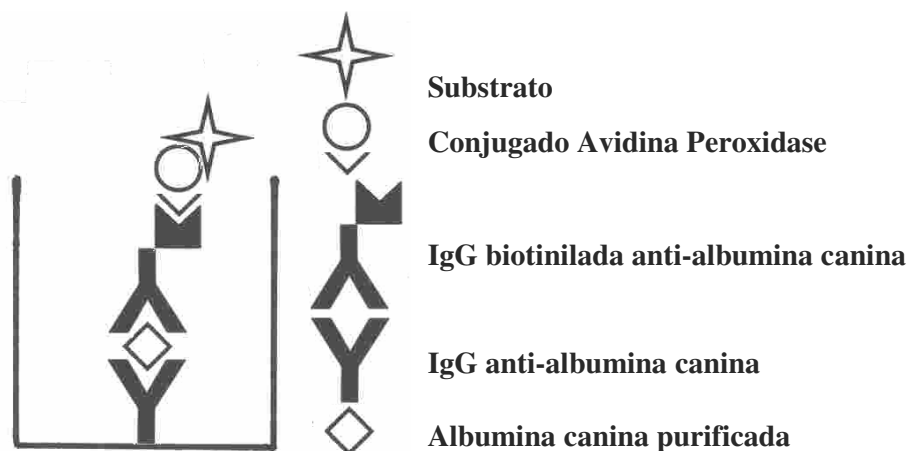


Figura 3 – Desenho representativo do ELISA para escolha da diluição do anticorpo biotinizado

#### 4.2.4.8.3 Teste para escolha da melhor concentração dos tampões de incubação e de lavagem

Para teste da melhor diluição dos tampões de incubação e de lavagem, placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) foram tratadas conforme demonstrado no quadro 6 e figura 3 (item 4.2.4.8.2). Entre cada uma das fases detalhadas, foram feitas três lavagens com o tampão de lavagem em avaliação. Nas placas 1A e 1B foram utilizados os mesmos tampões de incubação e lavagem descritos anteriormente. Nas placas restantes, foram utilizados um novo tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,075%) e de incubação (PBS; gelatina de peixe 0,6%; Tween 20 0,075%).

PLACAS	1	2	3
Anticorpo de captura (18 h; 4°C)	IgG anti-albumina canina (1:1.600) em tampão carbonato (pH 9,6) (100 µL/poço)		
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% (200 µL/poço)		
Antígeno (1h; 37°C)	Albumina canina purificada em diluição seriada (2000 a 0,0009 ng/mL) (100 µL/poço)		
Anticorpo de detecção (1h; 37°C)	IgG anti-albumina canina biotinilada (1:6400)	IgG anti-albumina canina biotinilada (1:1600)	IgG anti-albumina canina biotinilada (1:6400)
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado avidina-peroxidase (Sigma, A3151) (1 µL/200 µL tampão incubação; 100 µL/poço)		
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)		
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µL/poço)		
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)		

Quadro 6 - Sequência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para teste da melhor diluição dos tampões de incubação e de lavagem - São Paulo - 2006

#### 4.2.4.8.4 Protocolo definitivo da técnica de ELISA para determinação da microalbuminúria

A técnica de ELISA padronizada a partir dos testes anteriores encontra-se pormenorizada no quadro 7 e figura 3 (item 4.2.4.8.3). Entre cada uma das fases detalhadas foram realizadas três lavagens com tampão de lavagem (NaCl 154 mM; Tween 20 0,075%). As amostras, o anticorpo de detecção e o conjugado foram diluídos em tampão de incubação (PBS; gelatina de peixe 0,6%; Tween 20 0,075%). A curva de regressão, obtida a partir da curva padrão de albumina purificada, para obtenção da concentração de albumina nas amostras de urina foi obtida com auxílio do programa Curve Expert 1.3.

FASE	PROCEDIMENTOS
Anticorpo de captura (18 h; 4°C)	IgG anti-albumina canina (1:1.600) em tampão carbonato (pH 9,6)  (100 µL/poço)
Bloqueio (2 h; 37°C)	Caseína 1% em tampão carbonato (pH 9,6)  (200 µL/poço)
Antígeno (1h; 37°C)	Curva-padrão de albumina purificada (1,03 a 250 ng/mL) e amostras de urina na diluição apropriada (100 µL/poço)
Anticorpo de detecção (1h; 37°C)	IgG anti-albumina canina biotinizada (1:6.400)  (100 µL/poço)
Conjugado (1h; 37°C)	Conjugado avidina-peroxidase (Sigma, A3151)  (1 µL/200 µL tampão incubação; 100 µL/poço)
Revelação (4 minutos)	Solução recém-preparada de substrato ( <i>o</i> -fenilenodiamina (OPD) 2 mg/mL e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 0,03% dissolvidas em tampão citrato 0,1 M, pH 5,0) (100 µL/poço)
Interrupção	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 30% (50 µL/poço)
Leitura	492 nm (Leitor de ELISA Multiskan EX)

Quadro 7 - Seqüência de tratamentos aplicados às placas de ELISA Maxi-sorb (Nunc) para determinação da microalbuminúria canina - São Paulo - 2006

Para comparação entre os valores de albumina urinária dos cães, foram obtidos os valores da relação albumina urinária:creatinina urinária (RAC), dividindo-se o valor de

albumina em mg/mL pelo de creatinina também em mg/mL e da albumina normalizada para uma densidade de 1,010 utilizando-se de fórmula proposta por Pressler et al. (2002): Albumina normalizada = concentração mensurada de albumina urinária x (0,01/[densidade urinária - 1,0]). O valor de 1,040 foi usado para as amostras com densidades acima de 1,040.

Considerou-se como portador de microalbuminúria, os cães que apresentaram valores de 1,0-30,0 mg/dL de albumina normalizada e/ou de 30 to 300 mg/g (0,03 a 3) nas suas amostras de urina.

#### 4.2.4.9 Análise dos dados

Em relação aos cães dos grupos controle e estudo (cães com IRC), os valores de proteína total, creatinina, relação proteína:creatinina, concentração de albumina, albumina normalizada e relação albumina:creatinina, assim como os resultados dos exames físico, químico e do sedimento urinário das respectivas amostras de urina estão apresentados individualmente, sob a forma de quadros.

De ambos os grupos de animais foram calculadas a média, a mediana, o desvio-padrão da média, o erro padrão da média, os valores máximo e mínimo dos valores de proteína total, creatinina, relação proteína:creatinina, concentração de albumina, albumina normalizada e relação albumina:creatinina de suas amostras de urina, estando todos estes valores representados na forma de tabelas e, para os dois últimos parâmetros, também em gráficos do tipo boxplot.

Após a verificação da forma de distribuição dos parâmetros anteriores foram feitas transformações para atingir homocedasticidade e distribuição normal a fim de se aplicar testes estatísticos paramétricos. O programa estatístico SigmaStat<sup>TM</sup> (Jandel Scientific, USA) foi utilizado para a comparação entre grupos de animais.

Para a comparação estatística dos valores de proteína total, relação proteína:creatinina, concentração de albumina, albumina normalizada e relação albumina:creatinina entre os cães saudáveis e doentes, utilizou-se a Análise de Variância de um fator (pressão sanguínea) a um nível de significância de 5%.

Para a comparação estatística dos valores de proteína total, relação proteína:creatinina, concentração de albumina, albumina normalizada e relação albumina:creatinina entre os cães saudáveis machos e fêmeas, empregou-se o teste t de Student a um nível de



significância de 5%. O mesmo teste foi utilizado na avaliação dos mesmos parâmetros entre as formas de colheita das amostras de urina nos cães machos.

Tanto para o grupo de animais sadios quanto para o de doentes, foram obtidos gráficos de dispersão entre as variáveis albumina normalizada e relação albumina:creatinina para se verificar a forma de relacionamento entre as mesmas. O coeficiente de correlação de Pearson ® foi então calculado utilizando-se o programa Minitab™.

Para verificar a porcentagem de cães doentes microalbuminúricos com reação negativa para proteína na fita reagente da urinálise de rotina foi construído um histograma, no qual são apresentados os valores percentuais de cães sem albuminúria significativa, micro e macroalbuminúricos segundo os valores das variáveis albumina normalizada e relação albumina:creatinina.

Para obter o valor da relação proteína:creatinina acima do qual os cães com IRC fossem todos classificados como macroalbuminúricos, estes foram divididos em três classes ( $1,0 \leq \text{RPC} < 3,0$ ;  $3,0 \leq \text{RPC} < 6,0$ ;  $\text{RPC} \geq 6,0$ ) e, depois, as porcentagens de cães macro e microalbuminúricos foram determinadas dentro de cada uma.

Os dados relativos à concentração de albumina normalizada e relação albumina:creatinina dos cães com IRC, foram apresentados em frequência, de acordo com a distribuição de valores em porcentagem de observações de valores normais, aumentados e diminuídos, após comparação com os valores de classificação para microalbuminúria obtidos da literatura. Para a observação do número de animais hipertensos de acordo com a classe de albuminúria foram construídos histogramas de frequências.

Em anexo, encontram-se os dados relativos à identificação pormenorizada dos cães de ambos os grupos. Encontram-se também dispostos, para o grupo de animais doentes, seus achados de anamnese, valores de hemograma, de bioquímica sérica, incluindo as concentrações séricas de uréia e de creatinina e achados ultra-sonográficos dos rins direito e esquerdo.

## 5 RESULTADOS

Inicialmente, apresentam-se os resultados referentes à purificação da albumina e produção do teste ELISA para detecção de albumina canina e, a seguir, apresentam-se os resultados relativos às determinações realizadas nos cães sadios e doentes.

### 5.1 PURIFICAÇÃO DA ALBUMINA CANINA

O perfil cromatográfico na coluna de Blue Sepharose, Q-Sepharose e eletroforético da albumina canina purificada pelas técnicas descritas anteriormente estão respectivamente demonstrados nas figuras 4 e 5. Na figura 6, encontra-se imagem digitalizada do gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida, demonstrando diminuição no número de bandas protéicas contaminantes na região de aplicação da albumina purificada.

Após a determinação da concentração protéica, através do método do ácido bicinconínico, das amostras de albumina canina purificadas e reunidas, obteve-se uma quantidade final de 209,86 miligramas de albumina purificada. Alíquotas de 1 mL contendo 2,14 mg de albumina purificada foram armazenadas em microtubos mantidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  para utilização na posterior imunização dos animais, na titulação dos anticorpos dos mesmos, na padronização da técnica de ELISA e na técnica de ELISA final para determinação de microalbuminúria nos cães sadios e doentes.

Comparando-se a soma da quantidade total de albumina canina (530 mg) aplicada nas colunas de cromatografia, conforme procedimentos descritos anteriormente, e observando-se que a quantidade final obtida de albumina purificada, conforme método do ácido bincinconínico, foi de 209,86 mg, pôde-se calcular um rendimento de purificação de 46,9%, o que pode ser considerado bom em vista das perdas que ocorreram em cada uma das passagens nas diferentes colunas.

### 5.2 ANTICORPOS

Os anticorpos extraídos dos coelhos imunizados com a albumina canina purificada mostraram-se capazes de reconhecer com especificidade a albumina canina, conforme verificado por Western Blotting (Figura 7). A IgG total anti-albumina canina ainda revelou algumas bandas de proteínas no *blotting*; entretanto, a banda de maior intensidade foi a de massa equivalente à da albumina canina (66 kDa).

### **5.2.1 Purificação dos anticorpos de coelho anti-albumina canina**

Inicialmente, a IgG total de coelho anti-albumina canina foi aplicada em coluna de NHS-sepharose (item 4.2.4.4.2) e os títulos pré e pós-cromatografia foram verificados conforme descrito no item 4.2.4.5, obtendo-se, entretanto, diminuição dos mesmos.

Posteriormente, foi realizada cromatografia com resina tiofílica, conforme descrito no item 4.2.4.4.1. O perfil cromatográfico da IgG total de coelho anti-albumina canina na coluna tiofílica está representado no gráfico 1, onde pode ser observada a separação de dois picos distintos. Os títulos destes picos foram verificados por técnica ELISA, conforme citado acima, observando-se aumento de apenas duas vezes para ambos os picos em relação ao anticorpo extraído (1:51.200 vs 1:25.600, respectivamente).

### **5.2.2 Acoplamento dos anticorpos à biotina**

Em vista da alta especificidade dos anticorpos extraídos no reconhecimento da albumina canina e da não obtenção de aumentos significativos de seus títulos após os procedimentos cromatográficos preconizados, optou-se pelo acoplamento da IgG à biotina para utilização direta na técnica de ELISA final para a determinação de microalbuminúria canina. O título obtido após o acoplamento foi de 1:4096000 para a IgG total-biotina anti-albumina canina.

## **5.3 TESTES DE PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE ELISA**

Na tabela 1, está demonstrada a absorbância obtida da leitura da placa de ELISA com os 8 tipos de soluções bloqueadoras testadas. Observou-se que a caseína a 1% apresentou uma absorbância média maior que a dos poços controles (sem bloqueio), sendo esta então escolhida como a solução bloqueadora a ser utilizada na técnica de ELISA final.

Após realização de técnica de ELISA descrita no item 4.2.4.8.2 utilizando-se a IgG total de coelho anti-albumina canina como o anticorpo de captura e a IgG total biotinizada de coelho anti-albumina canina como o anticorpo de detecção, observou-se a formação de um *plateau*, visto no gráfico 2, onde se comparam as absorbâncias obtidas frente às várias diluições do primeiro anticorpo. A diluição ótima da IgG total não biotinizada foi estimada em 1:1.600 (12,59 µg/mL). A diluição da IgG total biotinizada foi também de, inicialmente, 1:1.600. Entretanto, observamos que uma diluição quatro vezes maior (i.e., de 1:6.400), produziu resultados similares, sendo esta então, a diluição escolhida com vistas à maximização do uso dos anticorpos.

No teste para escolha do tampão de lavagem e de incubação, foram escolhidos o tampão de lavagem com Tween 20 0,075% e o tampão de incubação com gelatina de peixe a 0,6%.

## 5.4 DETERMINAÇÕES REALIZADAS NOS CÃES

### 5.4.1 Cães sadios

No quadro 9, encontram-se dispostos os valores individuais obtidos nas amostras de urina relativos à proteína total, creatinina, relação proteína-creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães sadios. Nos gráficos 4 e 5, respectivamente, encontram-se representados os valores individuais, os valores das medianas, os valores dos percentis de 25% e 75% e os valores máximos e mínimos dos parâmetros albumina normalizada e RAC.

Considerando-se 0,01 a 0,3 mg/mL como a faixa de variação da microalbuminúria, nenhum dos cães sadios pode ser classificado como microalbuminúrico com base nos seus valores de albumina normalizada. Similarmente, considerando-se a faixa de variação de 0,03 a

3,0 como intervalo de classificação da microalbuminúria com base na RAC, nenhum deles pode novamente ser classificado como microalbuminúrico.

A correlação entre as variáveis albumina normalizada e RAC foi fraca ( $r = 0,206$ ,  $P = 0,106$ ; Gráfico 6) considerando-se todos os cães saudáveis em conjunto. Ao se excluírem os cães com densidades urinárias específicas iguais ou maiores que 1,040, houve aumento da correlação entre as mesmas ( $r = 0,892$ ;  $P = 0,000$ ; Gráfico 7).

A análise estatística dos dados (Tabela 1) demonstrou não existir diferença significativa entre os parâmetros anteriores entre machos e fêmeas. Analisando-se os mesmos parâmetros de acordo com o método de colheita nos cães machos (cateterização uretral ou cistocentese), não houve também diferença significativa entre os mesmos (Tabela 2). A mesma análise não foi possível com as fêmeas, visto que somente uma fêmea teve sua amostra de urina obtida por cateterização uretral (Quadro 14, Anexo), não preenchendo-se, portanto, os critérios mínimos para uma análise estatística adequada entre os métodos de colheita neste sexo.

#### **5.4.2 Cães doentes**

Os resultados dos exames físico, químico e do sedimento urinário dos cães do grupo II encontram-se nos quadros 9, 10 e 11, respectivamente. Em relação aos aspectos físicos, observou-se que todos os cães apresentaram valores de densidade específica abaixo de 1,030; compatível com existência de poliúria e que 60,0% apresentavam pressões sanguíneas sistólicas iguais ou superior a 180 mmHg.

No quadro 13, encontram-se dispostos os valores urinários individuais de proteína total, creatinina, relação proteína-creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães doentes (grupo de estudo). Nos gráficos 8 e 9, respectivamente, encontram-se representados os valores individuais, os valores das medianas, os valores dos percentis de 25% e 75% e os valores máximos e mínimos dos parâmetros albumina normalizada e RAC.

Considerando-se seus valores de albumina normalizada, 42,5% dos cães doentes apresentaram microalbuminúria, 40%, macroalbuminúria e 17,5% não apresentaram albuminúria insignificante ( $<1,0$  mg/dL; Gráfico 10). Ao se classificar os níveis de

albuminúria com base nas suas RACs, 65% apresentaram microalbuminúria, 17,5% macroalbuminúria e 17,5% não apresentaram albuminúria significativa ( $<0,03$ , Gráfico 11).

A urinálise de rotina não foi capaz de detectar ou detectou apenas traços de proteína em 27,5% dos cães; destes, 36,4% e 45,4% foram classificados como microalbuminúricos segundo seus valores de albumina normalizada e RAC, respectivamente (Gráfico 12).

Ao se verificar a significância da proteinúria pela RPC, observou-se que 35% dos cães não apresentou proteinúria significativa, dentre os quais 50% e 57,2% apresentaram microalbuminúria segundo os valores de albumina normalizada e de RAC, respectivamente. Ao se analisar as três classes de cães com RPCs acima de 1,0 (de 1,0 a 3,0; de 3,1 a 6,0 e acima de 6,1), observou-se que a porcentagem de cães com macroalbuminúria apresentou um aumento gradativo no decorrer das mesmas, sendo de 11,0% e 22,2%, respectivamente de RAC e albumina normalizada, na primeira classe e atingindo 57,2% e 100%, respectivamente, na última classe (Gráficos 13 e 14).

A correlação entre os valores de albumina normalizada e RAC foi fortemente positiva para os cães doentes ( $r = 0,921$ ;  $P = 0,000$ ; Gráfico 15).

A análise estatística dos parâmetros proteína total, RPC, albumina normalizada e RAC entre os cães sadios e os doentes demonstrou existir diferença significativa entre estes ( $P < 0,001$ ), para todos os parâmetros anteriores (Tabela 3)

Ao se observar a porcentagem de cães hipertensos em relação aos seus níveis de albuminúria, detectou-se uma tendência a uma relação direta, ou seja, observou-se uma maior porcentagem de cães hipertensos nos níveis mais altos de albuminúria. A maioria dos cães que apresentaram macroalbuminúria, com base nas concentrações de albumina normalizada, era hipertensa (87,5%; Gráfico 16). O mesmo foi observado com a RAC, onde 85,7% dos cães macroalbuminúricos eram hipertensos (Gráfico 17). A comparação dos valores de RAC entre cães hipertensos e não hipertensos mostrou uma diferença significativa ( $P = 0,023$ ; Tabela 4). O mesmo não ocorreu quando da comparação dos valores de albumina normalizada entre os mesmos grupos de cães ( $P = 0,064$ ); todavia, há de se notar o baixo valor de “P” obtido, próximo do nível de significância adotado ( $P < 0,05$ ).

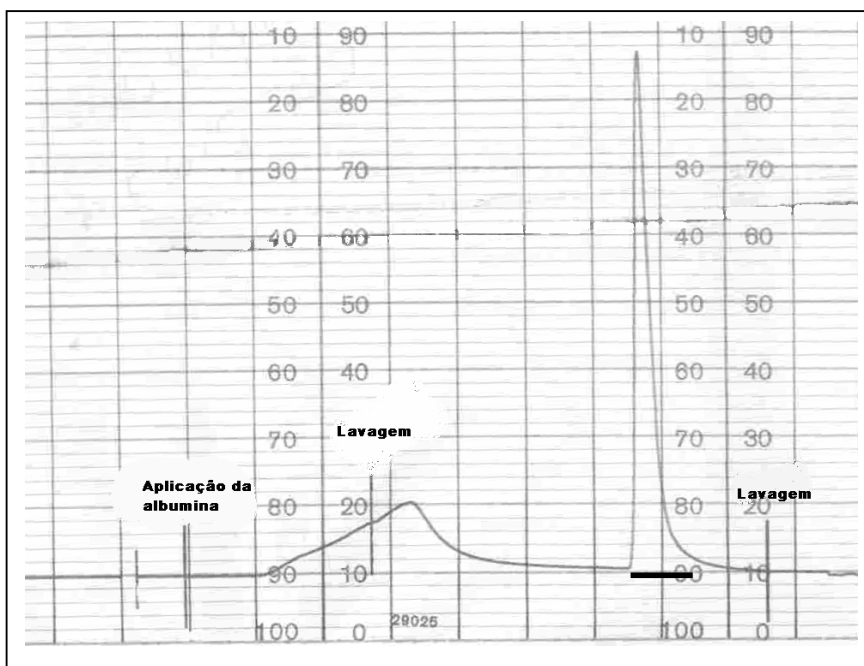


Figura 4 – Perfil cromatográfico da albumina canina aplicada em coluna de afinidade Blue-Sepharose de 1 mL, em temperatura ambiente, sob fluxo constante de 1 mL/min e eluição com tampão B. (Linha contínua = pico correspondente à albumina subseqüentemente recromatografada em Q-sepharose) - São Paulo - 2006

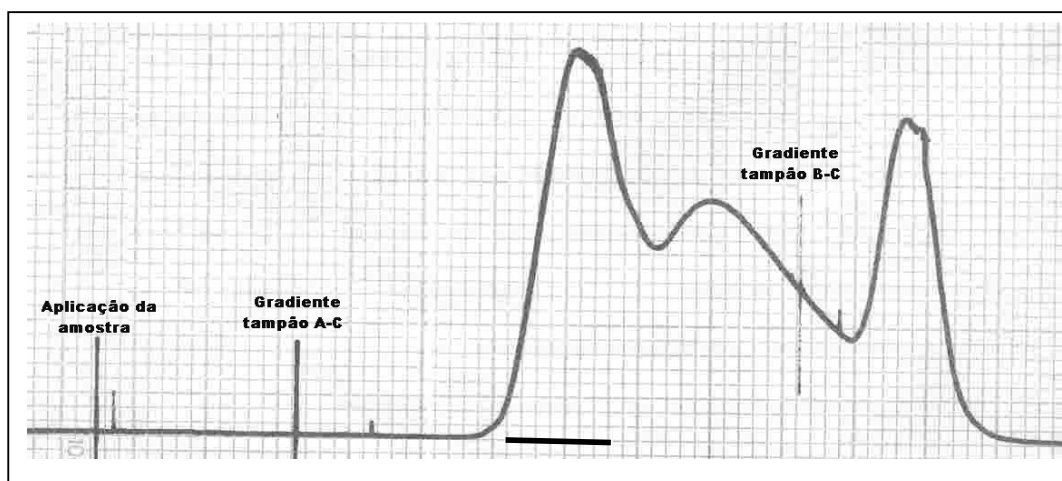


Figura 5 – Perfil cromatográfico da albumina canina aplicada em coluna de vidro de 2 cm de diâmetro por 9 cm de comprimento, contendo resina de troca iônica Q-sepharose, em temperatura ambiente, sob um fluxo constante de 2 mL/min, eluída com gradiente de tampões A e B, em partes iguais. (Linha contínua = pico correspondente à albumina purificada; tubos 16 a 32) - São Paulo - 2006

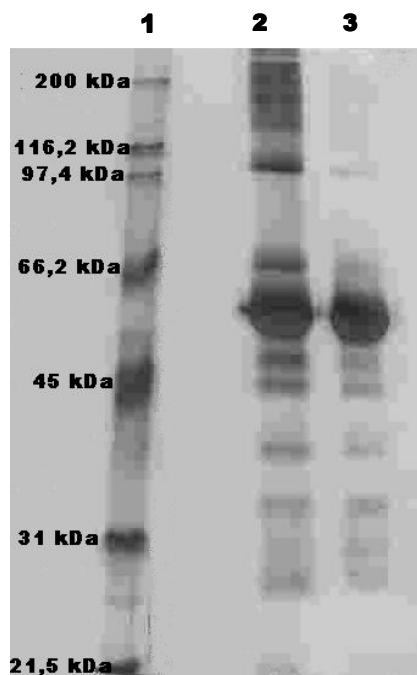


Figura 6 – Gel de sódio-dodecil-sulfato poliacrilamida a 10% contendo padrão de peso molecular (faixa 1), albumina canina não purificada (faixa 2) e albumina canina final purificada (faixa 3) pelas técnicas cromatográficas descritas - São Paulo - 2006.

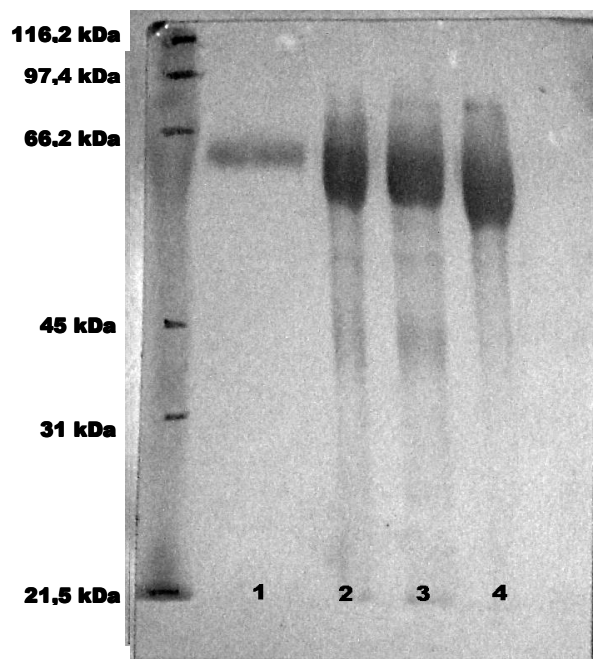


Figura 7 – Western blotting contendo uma amostra de urina de um cão sadio (faixa 1), uma amostra de urina de um cão doente (faixa 2), uma amostra de soro de um cão sadio (faixa 3) e uma amostra de albumina canina purificada (faixa 4), reduzidas, incubadas com IgG de coelho anti-albumina canina purificada - São Paulo - 2006



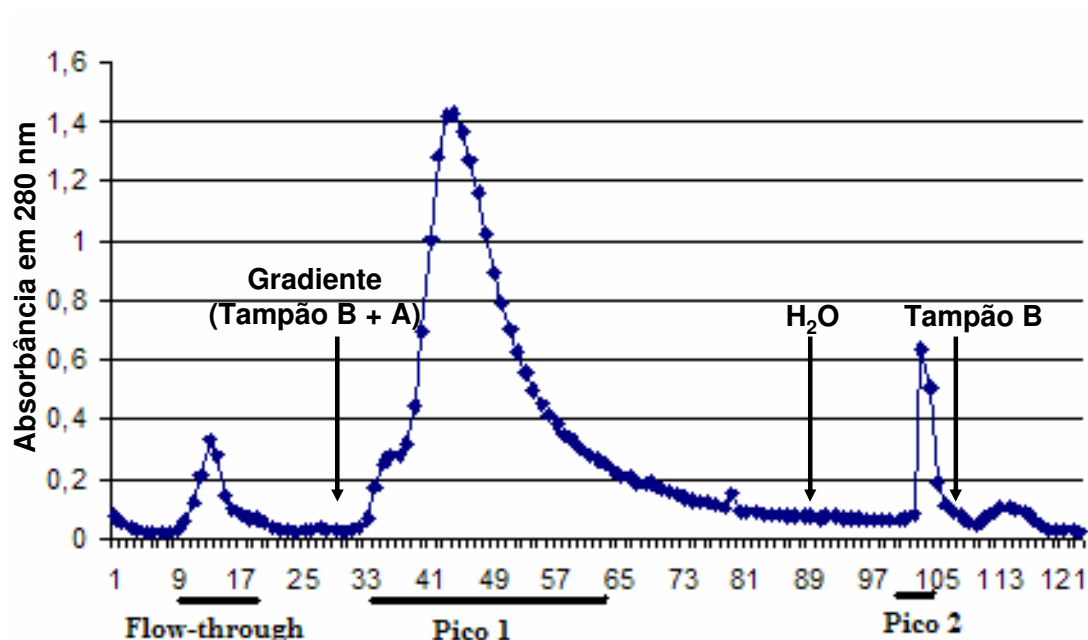


Gráfico 1 - Perfil cromatográfico de IgG de coelho anti-albumina canina aplicada em coluna de resina tiofílica, em temperatura ambiente, sob um fluxo constante de 2 mL/min, eluída com gradiente de tampões B + A, em partes iguais - São Paulo - 2006.

SOLUÇÃO BLOQUEADORA	ABSORBÂNCIA DO POÇO N. 1	ABSORBÂNCIA DO POÇO N. 2	MÉDIA DAS DUAS ABSORBÂNCIAS
Caseína 1%	1,6667	1,7027	1,6847
Caseína 2%	1,6314	1,7107	1,6710
Caseína 4%	1,5216	1,5299	1,5257
Gelatina de peixe 1%	1,4830	1,4648	1,4739
Gelatina de peixe 2%	1,4766	1,4264	1,4515
Gelatina de peixe 4%	1,4515	1,4848	1,4681
Leite de soja 1%	1,4883	1,5396	1,5139
Leite de soja 2%	1,5290	1,5574	1,5432
Sem bloqueio (controle)	1,3443	1,4137	1,3790

Quadro 8 – Absorbâncias dos poços da placa de ELISA para teste de soluções bloqueadoras obtidas em leitor de ELISA a 492 nm, segundo o tipo de bloqueio testado - São Paulo - 2006

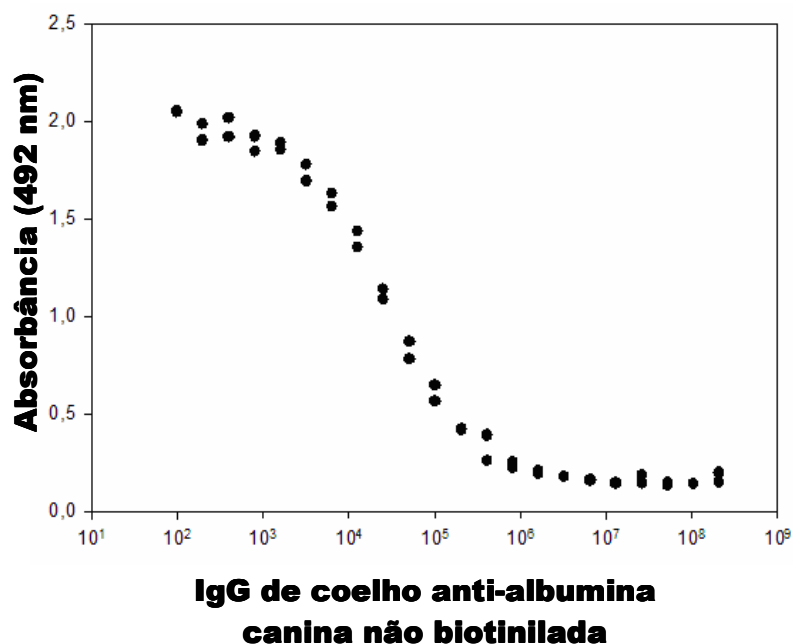


Gráfico 2 - Absorbâncias obtidas da leitura de microplacas após técnica de ELISA, contendo: (A) IgG (20,15 mg/mL) em diluição seriada (1:100- 1:209715200) como anticorpo de captura e IgG (20,15 mg/mL) na diluição 1:16000 como anticorpo de detecção (biotinizado) - São Paulo - 2006

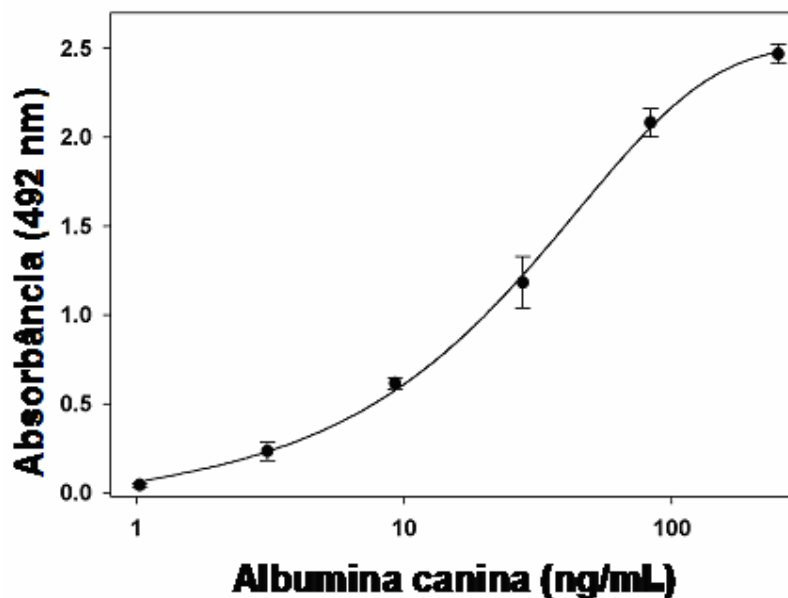


Gráfico 3 - Curva-padrão de albumina canina utilizada em um dos testes ELISA. A albumina canina purificada foi diluída seriadamente na ordem de três, foi capturada com IgG de coelho anti-albumina canina e detectada com o mesmo anticorpo marcado com biotina. Cada ponto representa a média  $\pm$  erro padrão da media de três experimentos diferentes - São Paulo - 2006

N.	Proteína (mg/mL)	Creatinina (mg/mL)	RPC	Albumina (mg/mL)	Albumina N (mg/mL)	RAC
1	0,15	2,24	0,07	0,002	0,0004	0,0007
2	0,20	1,60	0,13	0,007	0,0016	0,004
3	0,11	1,12	0,10	0,006	0,0022	0,006
4	0,21	2,08	0,10	0,004	0,0009	0,002
5	0,07	0,61	0,11	0,002	0,0009	0,003
6	0,30	2,56	0,12	0,009	0,0086	0,003
7	0,08	1,84	0,04	0,001	0,0003	0,0006
8	0,45	2,40	0,19	0,004	0,001	0,002
9	0,07	1,32	0,06	0,002	0,0005	0,001
10	0,14	2,64	0,05	0,003	0,0008	0,001
11	0,06	1,00	0,06	0,012	0,0053	0,012
12	0,23	1,92	0,12	0,002	0,0006	0,001
13	0,23	1,56	0,15	0,004	0,0011	0,003
14	0,04	0,56	0,06	0,002	0,0007	0,003
15	0,88	3,00	0,29	0,010	0,0025	0,003
16	0,04	0,68	0,06	0,002	0,0008	0,002
17	0,50	3,80	0,13	0,002	0,0008	0,0005
18	0,09	0,68	0,13	0,002	0,0008	0,003
19	0,25	3,48	0,07	0,005	0,0012	0,001
20	0,04	0,52	0,07	0,001	0,0007	0,002
21	0,08	0,12	0,66	0,004	0,0009	0,03
22	0,15	1,36	0,11	0,001	0,0004	0,001
23	0,42	1,72	0,24	0,003	0,0008	0,002
24	0,07	0,36	0,20	0,001	0,0006	0,004
25	0,27	1,80	0,15	0,002	0,0005	0,001
26	0,30	2,36	0,13	0,005	0,0012	0,002
27	0,08	1,60	0,05	0,001	0,0004	0,0008
28	0,17	2,40	0,07	0,007	0,0018	0,003
29	0,15	1,54	0,10	0,014	0,0034	0,009
30	0,20	1,30	0,16	0,002	0,0006	0,001
31	0,10	0,64	0,15	0,003	0,0016	0,005
32	0,10	1,00	0,10	0,0006	0,0002	0,0006
33	0,17	1,47	0,11	0,003	0,0011	0,002
34	0,07	0,81	0,08	0,0005	0,0002	0,0006
35	0,03	0,54	0,06	0,003	0,0027	0,005
36	0,09	1,68	0,05	0,001	0,0004	0,0008
37	0,08	1,64	0,05	0,002	0,0004	0,001
38	0,19	3,20	0,06	0,002	0,0006	0,0007
39	0,06	0,49	0,13	0,0008	0,0005	0,002
40	0,03	0,47	0,06	0,0006	0,0006	0,001

Quadro 9 - Valores individuais da proteína total, creatinina, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada (AN) e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006

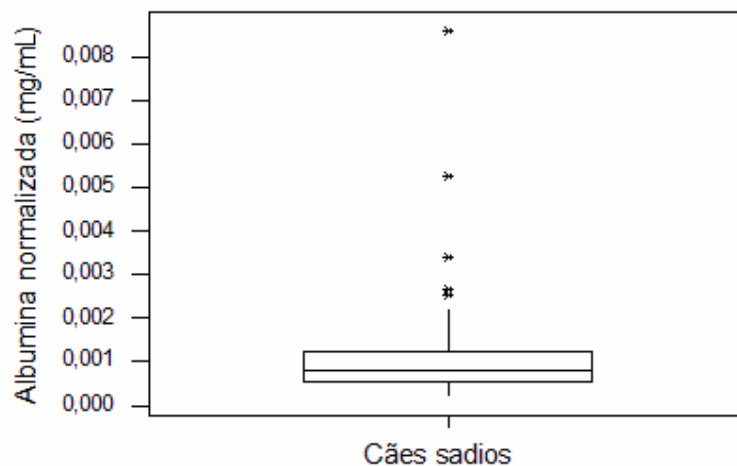


Gráfico 4 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada dos cães sadios (controle) - São Paulo - 2006

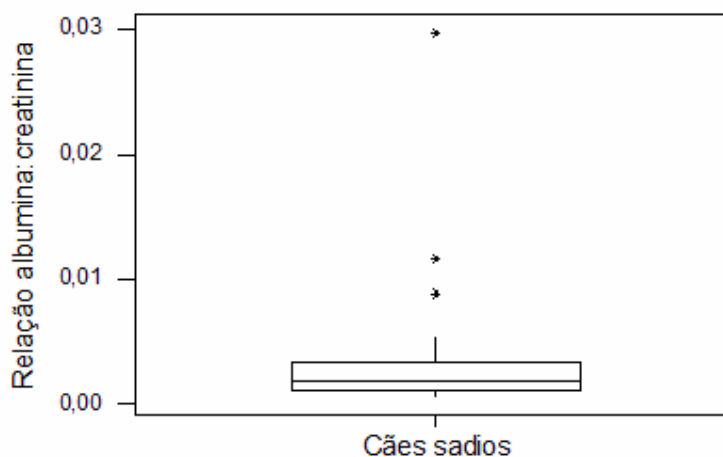


Gráfico 5 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios (controle) - São Paulo - 2006

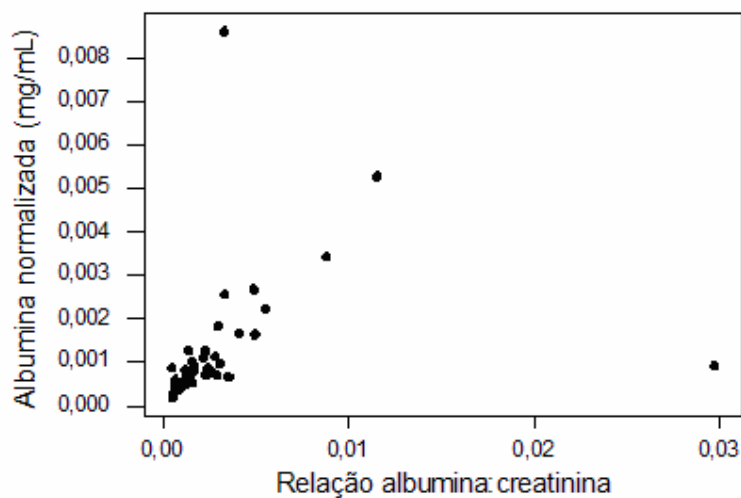


Gráfico 6 - Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios ( $r = 0,206$ ,  $P = 0,106$ ) - São Paulo - 2006

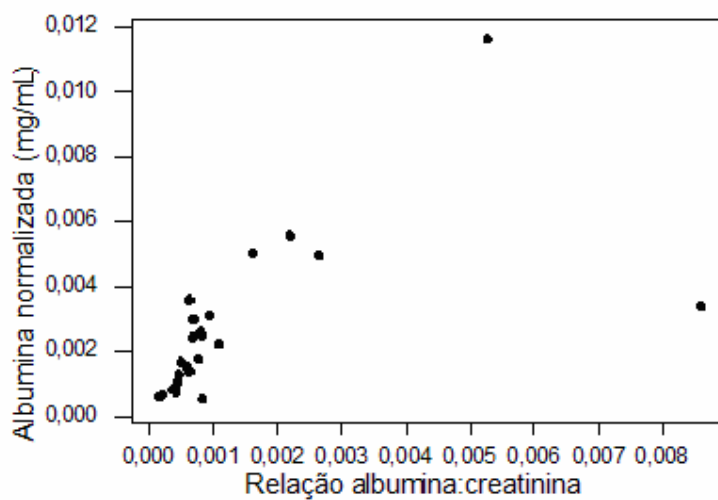


Gráfico 7 - Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães sadios, excetuando-se os com densidade urinária específica acima de 1,040 ( $r = 0,892$ ,  $P = 0,000$ ) - São Paulo - 2006

Tabela 1 - Valores da média, da mediana, do desvio padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) segundo o sexo - São Paulo - 2006

PARÂMETRO	ESTATÍSTICA	FÊMEAS	MACHOS	SIGNIFICÂNCIA*
Proteína total (mg/mL)	Média	0,1339	0,2027	P=0,383
	Mediana	0,0870	0,1670	
	Desvio-padrão da média	0,1105	0,1885	
	Erro padrão da média	0,0268	0,0393	
	Mínimo-máximo	0,0350-0,4970	0,0290-0,8760	
RPC	Média	0,1163	0,1237	P=0,334
	Mediana	0,0708	0,1180	
	Desvio-padrão da média	0,1433	0,0628	
	Erro padrão da média	0,0348	0,0131	
	Mínimo-máximo	0,0506-0,6612	0,0435-0,2920	
Albumina (mg/mL)	Média	0,00348	0,00345	P=0,330
	Mediana	0,00189	0,00250	
	Desvio-padrão da média	0,00292	0,00328	
	Erro padrão da média	0,00071	0,00068	
	Mínimo-máximo	0,0012-0,0116	0,0005-0,0136	
Albumina normalizada (mg/mL)	Média	0,00117	0,00135	P=0,202
	Mediana	0,00080	0,00078	
	Desvio-padrão da média	0,00119	0,00179	
	Erro padrão da média	0,00029	0,00037	
	Mínimo-máximo	0,0003-0,0052	0,0002-0,0086	
RAC	Média	0,00429	0,00238	P=0,915
	Mediana	0,00239	0,00172	
	Desvio-padrão da média	0,00710	0,00190	
	Erro padrão da média	0,00172	0,00040	
	Mínimo-máximo	0,0005-0,2979	0,0007-0,0089	

\*Teste t de Student, diferença significativa quando  $P < 0,05$

Tabela 2 - Valores da média, da mediana, do desvio padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais machos (grupo controle) segundo o método de coleta - São Paulo - 2006

PARÂMETRO	ESTATÍSTICA	CATETERIZAÇÃO	CISTOCENTESE	SIGNIFICÂNCIA*
<b>Proteína total (mg/mL)</b>	<b>Média</b>	0,2306	0,1723	P=0,406
	<b>Mediana</b>	0,1595	0,1930	
	<b>Desvio-padrão da média</b>	0,2321	0,1304	
	<b>Erro padrão da média</b>	0,0670	0,0393	
	<b>Mínimo-máximo</b>	0,0420-0,8760	0,0290-0,4470	
<b>RPC</b>	<b>Média</b>	0,1480	0,0972	P=0,038
	<b>Mediana</b>	0,1385	0,1029	
	<b>Desvio-padrão da média</b>	0,0678	0,0463	
	<b>Erro padrão da média</b>	0,0196	0,0140	
	<b>Mínimo-máximo</b>	0,0614-0,2920	0,0435-0,1863	
<b>Albumina (mg/mL)</b>	<b>Média</b>	0,00393	0,00292	P=0,689
	<b>Mediana</b>	0,00271	0,00250	
	<b>Desvio-padrão da média</b>	0,00403	0,00228	
	<b>Erro padrão da média</b>	0,00116	0,00069	
	<b>Mínimo-máximo</b>	0,0005-0,0137	0,0006-0,0086	
<b>Albumina normalizada (mg/mL)</b>	<b>Média</b>	0,001140	0,00157	P=0,804
	<b>Mediana</b>	0,000810	0,00640	
	<b>Desvio-padrão da média</b>	0,000970	0,00243	
	<b>Erro padrão da média</b>	0,000280	0,00073	
	<b>Mínimo-máximo</b>	0,0002-0,0031	0,0003-0,0086	
<b>RAC</b>	<b>Média</b>	0,00280	0,00192	P=0,528
	<b>Mediana</b>	0,00227	0,00163	
	<b>Desvio-padrão da média</b>	0,00230	0,00131	
	<b>Erro padrão da média</b>	0,00066	0,00040	
	<b>Mínimo-máximo</b>	0,00055-0,00887	0,00057-0,00496	

\*Teste t de Student, diferença significativa quando  $P < 0,05$

<b>Número</b>	<b>Cor</b>	<b>Odor</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Densidade</b>
41	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,020
42	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,017
43	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,010
44	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,015
45	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,012
46	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,012
47	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,016
48	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,014
49	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,012
50	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,016
51	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,012
52	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,020
53	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,018
54	Amarelo Citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,020
55	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
56	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,010
57	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
58	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
59	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,013
60	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,010
61	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
62	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,006
63	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
64	Amarelo Citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,020
65	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
66	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
67	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,018
68	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
69	Amarelo Citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,016
70	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,015
71	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
72	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,020
73	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
74	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,010
75	Amarelo Citrino	Límpido	Sui generis	1,015
76	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
77	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,015
78	Amarelo palha	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,017
79	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,006
80	Amarelo Citrino	Límpido	Sui generis	1,012

Quadro 10 - Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.



N.	pH	Proteína	Glicose	Corpos cetônicos	Bilirrubina	Sangue oculto	Urobilino-gênio
41	6,0	+++	-	-	-	+	-
42	5,0	++	-	-	-	(+)	-
43	5,0	++	-	-	-	(+)	-
44	5,5	Traços	-	-	-	-	-
45	5,0	-	-	-	-	-	-
46	5,0	Traços	-	-	-	+	-
47	7,5	Traços	(+)	-	-	+	-
48	6,0	+++	-	-	-	+	-
49	7,0	++	-	-	-	-	-
50	5,0	+	+	-	-	+	-
51	7,0	+++	-	-	-	+	-
52	5,0	+	+	-	+	-	-
53	5,0	Traços	-	-	-	-	-
54	5,0	+	-	-	-	+	-
55	6,0	+	-	-	-	(+)	-
56	5,0	Traços	-	-	-	(+)	-
57	6,0	+++	+	-	-	-	-
58	6,0	++	-	-	-	-	-
59	5,0	+	-	-	-	-	-
60	5,5	+	-	-	-	-	-
61	6,5	+++	-	-	-	+	-
62	7,0	++	++	-	-	-	-
63	6,0	+	(+)	-	-	-	-
64	5,0	-	-	-	-	-	-
65	6,0	+	-	-	-	-	-
66	6,5	+	-	-	-	-	-
67	5,0	+	-	-	-	-	-
68	6,0	Traços	-	-	-	(+)	-
69	6,0	+	-	-	-	+	-
70	6,0	-	-	-	-	(+)	-
71	6,0	+++	-	-	-	-	-
72	5,0	+++	-	-	-	-	-
73	6,0	+++	-	-	-	-	-
74	6,5	+++	-	-	-	-	-
75	6,0	Traços	-	-	-	-	-
76	5,0	+	-	-	-	-	-
77	6,0	++	++	-	-	+	-
78	6,0	+	-	-	-	+	-
79	5,0	+	-	-	-	-	-
80	6,0	Traços	-	-	-	+	-

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

Quadro 11 - Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.

N.	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bact.	Outros
41	0-1	0-1	T+	-	-	(+)	-
42	4-6	0-2	-	-	ER+/P++	(+)	S(+)
43	0-1	0-1	G(+)	-	T+/E(+)	(+)	-
44	0-2	2-4	-	-	E(+)	(+)	-
45	Raras	Raros	-	-	E(+)	-	-
46	0-1	0-1	-	-	T(+)	-	-
47	3-6	0-1	-	-	-	-	-
48	10-15	0-5	G(+)/C(+)	-	T++/E+	(+)	-
49	Raras	Raros	H(+)	-	T(+)	(+)	-
50	5-10	0-2	G(+)	-	T+	-	-
51	3-4	1-2	-	-	T+	(+)	-
52	0-1	0-1	-	-	T+/E(+)	-	-
53	2-4	4-6	-	-	T+	-	-
54	0-2	0-2	H+	-	T(+)	(+)	-
55	Raras	Raros	-	-	E(+)	-	-
56	2-4	2-4	-	UA(+)	T++/E+	-	-
57	5-10	5-10	H(+)	UA(+)	T+	E+	(+)
58	0-1	0-1	-	-	T+	-	-
59	Raras	Raros	H(+)	-	E(+)	-	-
60	0-2	Raros	G(+)	-	E(+)	-	-
61	2-4	4-6	-	-	T+/E(+)	(+)	-
62	4-6	0-2	-	-	E(+)/T(+)	-	-
63	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
64	0-2	0-2	-	-	E(+)	(+)	-
65	5-10	5-10	-	-	T+/E+	(+)	-
66	5-10	5-10	-	-	T+/E(+)	(+)	-
67	0-2	2-4	H+	-	E+	-	-
68	2-4	0-2	-	-	T+/E(+)	(+)	-
69	10-15	2-4	-	B+	T+/E(+)	-	S(+)
70	8-10	2-4	-	-	E(+)	(+)	-
71	Raras	Raros	-	-	T++	(+)	-
72	Raras	Raros	H(+)	-	T+/E(+)	-	-
73	Raras	Raros	-	-	E(+)	-	-
74	0-2	2-4	-	-	T(+)	-	-
75	0-2	Raros	-	-	-	-	-
76	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
77	4-6	4-6	-	-	T++	(+)	-
78	6-8	0-2	-	-	P+/E(+)	(+)	S+
79	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
80	0-1	1-2	-	-	T(+)	-	-

Nota: G = cilindro granuloso; H = cilindro hialino; C = cilindro céreo; OC = oxalato de cálcio; FT = fosfato triplo; E = células escamosas; P = células da pelve renal; EP= células do epitélio renal; T = células de transição; S = espermatozóides; Bact. = bactérias

Quadro 12 - Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

N.	Proteína (mg/mL)	Creatinina (mg/mL)	RPC	Albumina (mg/mL)	Albumina N (mg/mL)	RAC
41	3,09	0,48	6,44	2,207	1,103	4,60
42	0,88	0,27	3,24	0,175	0,103	0,65
43	2,30	0,28	8,10	0,748	0,748	2,63
44	0,88	0,27	3,28	1,295	0,863	4,83
45	0,08	0,40	0,21	0,010	0,546	0,02
46	0,30	0,44	0,67	0,019	0,016	0,04
47	0,12	0,14	0,85	0,006	0,004	0,05
48	1,83	0,43	4,28	0,764	0,546	1,79
49	1,84	0,21	8,85	0,806	0,672	3,88
50	0,60	0,64	0,93	0,050	0,031	0,08
51	2,60	0,39	6,63	0,815	0,679	2,08
52	0,60	0,50	1,19	0,101	0,050	0,20
53	0,15	0,57	0,27	0,007	0,004	0,01
54	0,41	0,56	0,73	0,037	0,019	0,07
55	0,36	0,20	1,76	0,097	0,064	0,47
56	0,12	0,24	0,51	0,004	0,004	0,02
57	3,98	0,41	9,75	1,216	0,810	2,98
58	1,13	0,36	3,17	0,295	0,197	0,83
59	0,14	0,38	0,38	0,002	0,002	0,01
60	0,24	0,23	1,01	0,012	0,012	0,05
61	4,64	0,34	13,7	2,300	1,534	6,77
62	1,11	0,37	3,01	0,607	1,012	1,65
63	0,29	0,29	1,00	0,025	0,017	0,09
64	0,10	0,47	0,22	0,003	0,002	0,01
65	0,29	0,30	0,95	0,035	0,023	0,11
66	1,26	0,27	4,70	0,308	0,205	1,15
67	5,32	0,21	25,1	1,672	0,929	7,89
68	0,53	0,40	1,35	0,092	0,061	0,23
69	0,59	0,86	0,68	0,055	0,034	0,06
70	0,76	0,24	3,13	0,071	0,047	0,29
71	2,14	0,37	5,82	1,033	0,689	2,81
72	2,48	0,62	4,00	1,474	0,737	2,38
73	1,74	0,35	5,01	2,781	1,854	7,99
74	0,95	0,32	2,98	0,494	0,494	1,54
75	0,03	0,25	0,13	0,0005	0,0004	0,002
76	0,51	0,26	1,96	0,194	0,130	0,75
77	0,82	0,37	2,21	0,077	0,051	0,21
78	0,42	0,41	1,02	2,940	1,729	7,14
79	0,25	0,17	1,48	0,004	0,007	0,02
80	0,09	0,44	0,20	0,013	0,011	0,03

Quadro 13 - Valores individuais da proteína total, creatinina, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006.

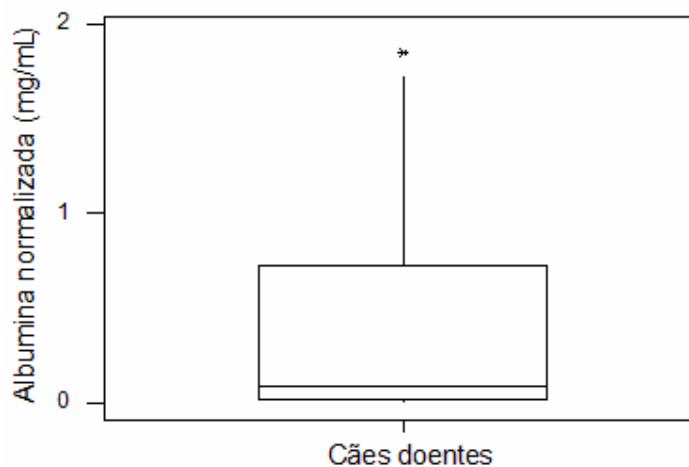


Gráfico 8 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração de albumina normalizada dos cães doentes (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

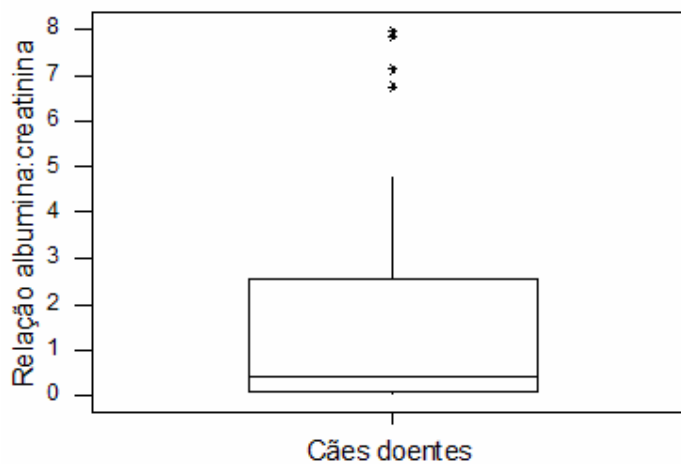


Gráfico 9 - Representação dos valores individuais (-) da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da relação albumina:creatinina dos cães doentes (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

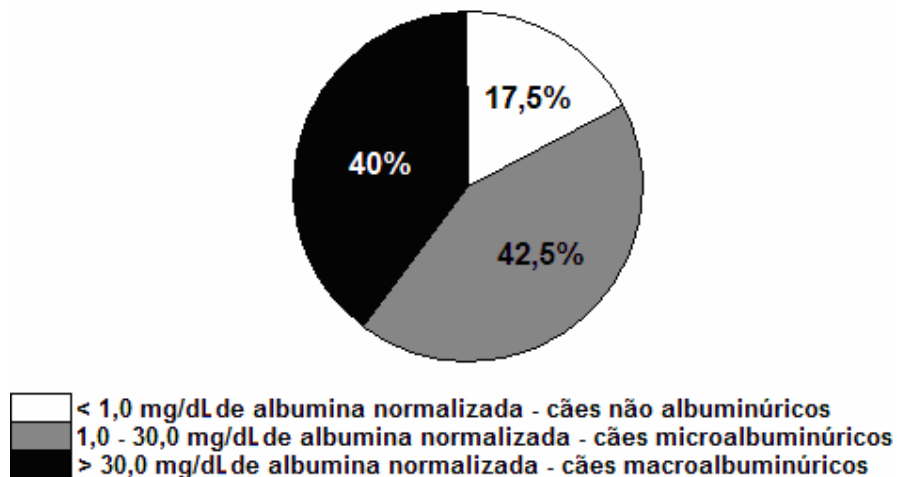


Gráfico 10 - Porcentagens de cães doentes classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significativa segundo seus valores de albumina normalizada - São Paulo - 2006

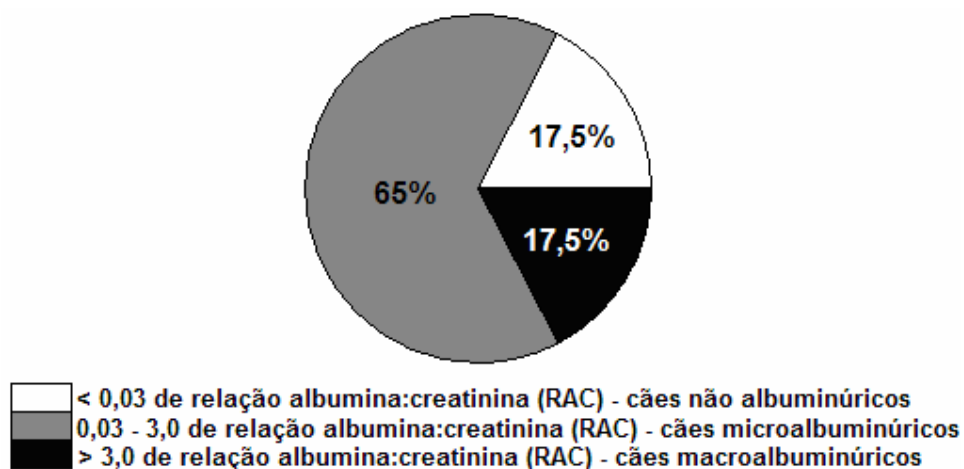


Gráfico 11 - Porcentagens de cães doentes classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significativa segundo seus valores da relação albumina:creatinina - São Paulo - 2006

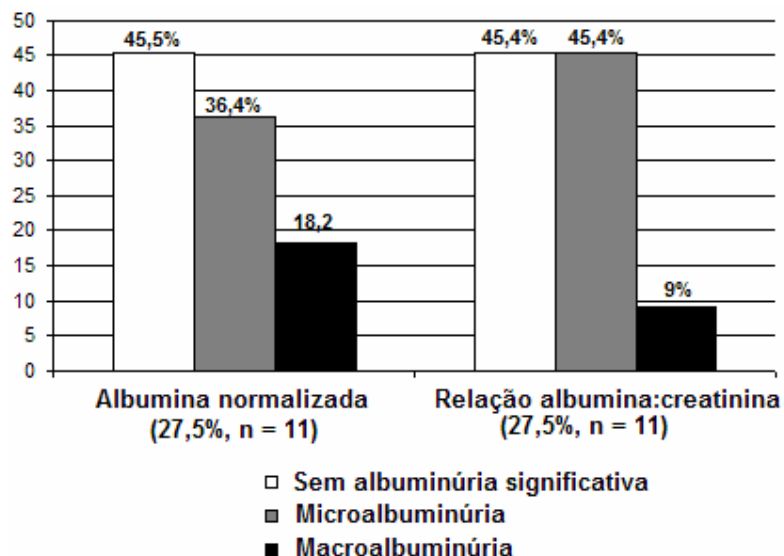


Gráfico 12 - Porcentagens dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) que apresentavam reação negativa à fita reagente para proteína na urinálise de rotina e que foram classificados como microalbuminúricos, macroalbuminúricos e sem albuminúria significante segundo seus valores de albumina normalizada e relação albumina:creatinina - São Paulo - 2006

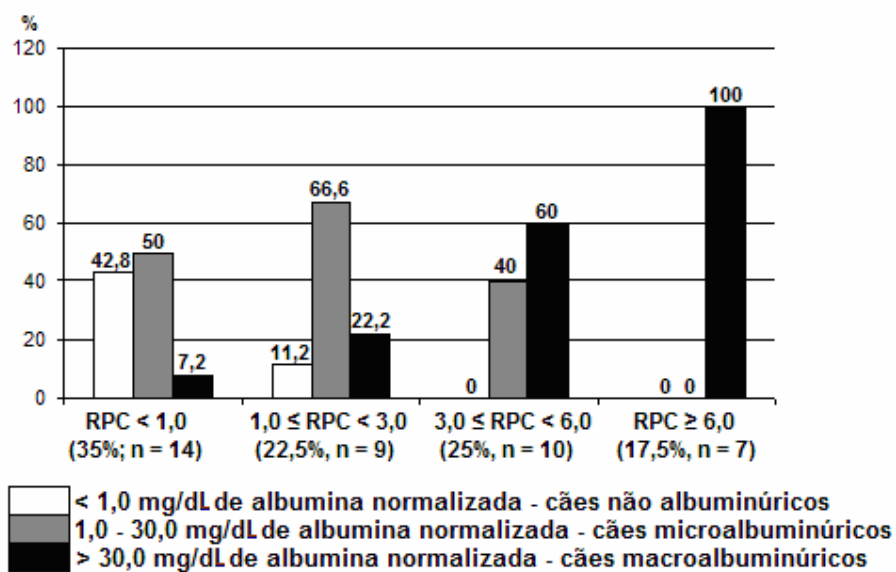


Gráfico 13 – Frequência (%) de cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os valores da relação proteína creatinina (RPC) e as concentrações de albumina normalizada (mg/dL) - São Paulo - 2006

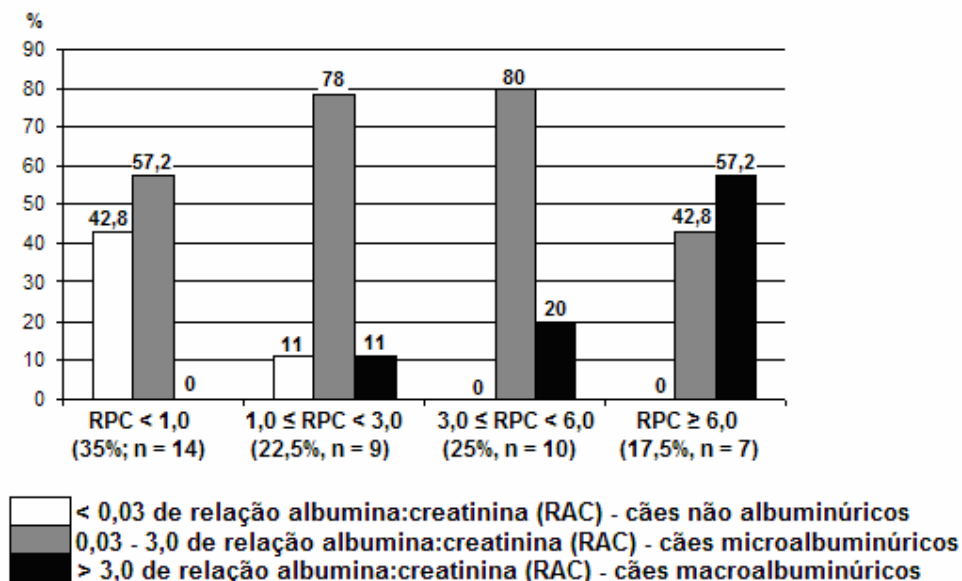


Gráfico 14 – Frequência (%) de cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os valores da relação proteína creatinina (RPC) e os valores da relação albumina:creatinina (RAC) - São Paulo - 2006

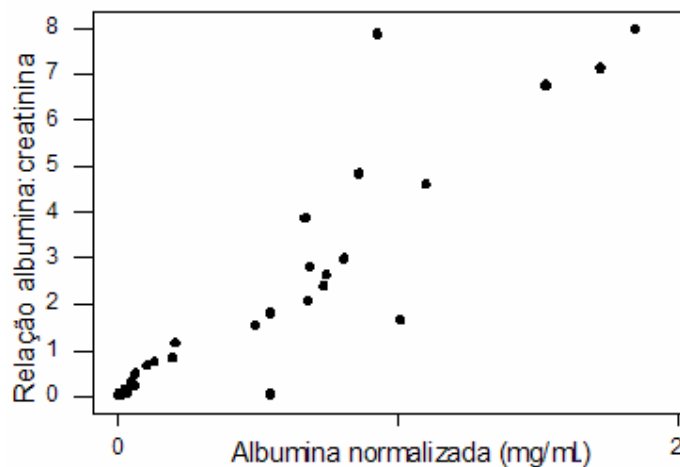


Gráfico 15 - Dispersão dos valores da concentração de albumina normalizada (mg/mL) e dos valores da relação albumina:creatinina dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo), ( $r = 0,921$ ,  $P = 0,000$ ) - São Paulo - 2006

Tabela 3 - Valores da média, da mediana, do desvio-padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) e dos cães com insuficiência renal (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

PARÂMETRO	ESTATÍSTICA	CÃES SADIOS	CÃES COM IRC	SIGNIFICÂNCIA*
Proteína total (mg/mL)	Média	0,1735	1,149	P<0,001
	Mediana	0,1260	0,595	
	Desvio-padrão da média	0,1620	1,294	
	Erro padrão da média	0,0256	0,205	
	Mínimo-máximo	0,029-0,876	0,032-5,318	
RPC	Média	0,1206	3,520	P<0,001
	Mediana	0,1016	1,861	
	Desvio-padrão da média	0,1033	4,651	
	Erro padrão da média	0,0163	0,735	
	Mínimo-máximo	0,0435-0,6612	0,129-25,085	
Albumina (mg/mL)	Média	0,00346	0,571	P<0,001
	Mediana	0,00237	0,099	
	Desvio-padrão da média	0,00309	0,817	
	Erro padrão da média	0,00049	0,129	
	Mínimo-máximo	0,0005-0,0136	0,001-2,940	
Albumina normalizada (mg/mL)	Média	0,00127	0,4010	P<0,001
	Mediana	0,00080	0,0838	
	Desvio-padrão da média	0,00154	0,5142	
	Erro padrão da média	0,00024	0,0813	
	Mínimo-máximo	0,0001-0,0086	0,0004-1,8540	
RAC	Média	0,00319	1,660	P<0,001
	Mediana	0,00172	0,382	
	Desvio-padrão da média	0,00486	2,362	
	Erro padrão da média	0,00077	0,373	
	Mínimo-máximo	0,0005-0,0297	0,002-7,992	

\* ANOVA de um critério (pressão sanguínea sistólica), diferença significante quando P<0,001



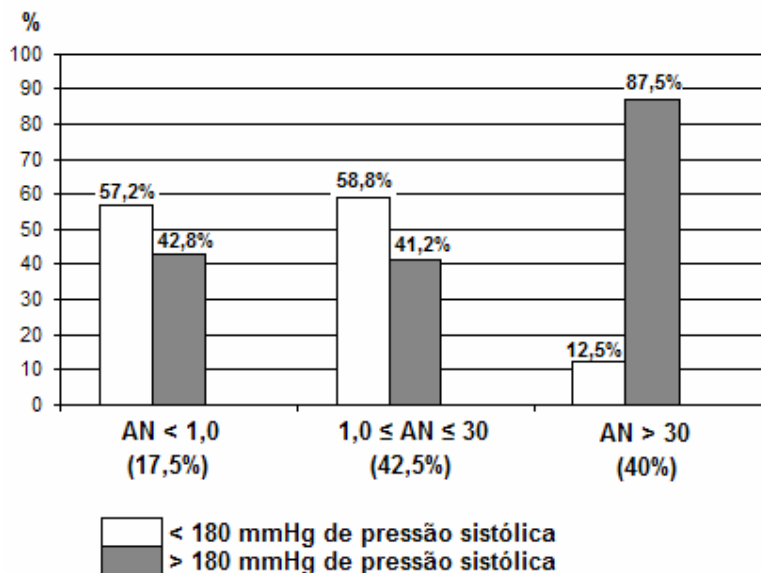


Gráfico 16 - Frequência (%) dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os níveis de albumina normalizada (AN) e a pressão arterial sistólica - São Paulo - 2006

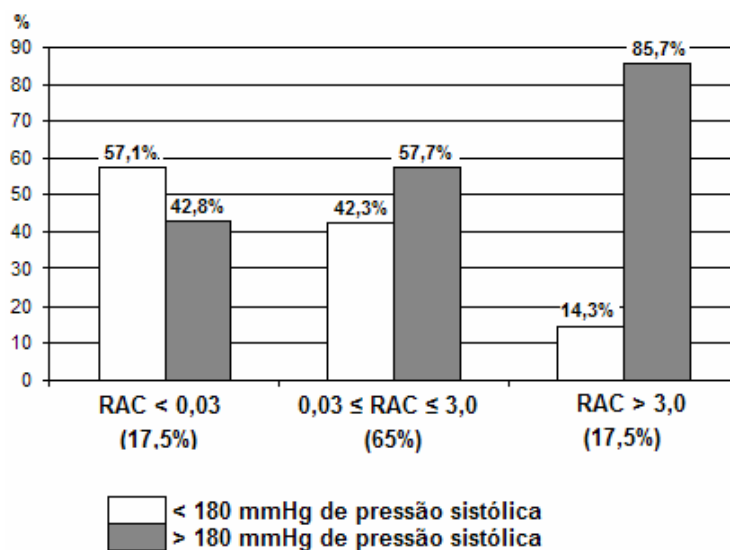


Gráfico 17 - Frequência (%) dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) segundo os níveis da relação albumina:creatinina (RAC) e a pressão arterial sistólica - São Paulo - 2006

Tabela 4 - Valores da média, da mediana, do desvio-padrão da média, do erro padrão da média, máximo e mínimo da proteína total, relação proteína creatinina (RPC), albumina, albumina normalizada e relação albumina-creatinina (RAC) das amostras de urina dos cães com IRC (grupo controle) segundo a existência de hipertensão -São Paulo - 2006.

PARÂMETRO	ESTATÍSTICA	NÃO HIPERTENSOS	HIPERTENSOS	SIGNIFICÂNCIA
Proteína total (mg/mL)	Média	0,479	1,595	P = 0,009
	Mediana	0,294	1,031	
	Desvio-padrão da média	0,392	1,489	
	Erro padrão da média	0,098	0,304	
	Mínimo- máximo	0,032-1,260	0,087-5,318	
RPC	Média	1,632	4,780	P=0,056
	Mediana	1,101	3,070	
	Desvio-padrão da média	1,331	5,600	
	Erro padrão da média	0,333	1,140	
	Mínimo- máximo	0,129-4,701	0,200-25,080	
Albumina (mg/mL)	Média	0,154	0,849	P=0,009
	Mediana	0,029	0,678	
	Desvio-padrão da média	0,320	0,930	
	Erro padrão da média	0,080	0,190	
	Mínimo- máximo	0,005-1,295	0,002-2,940	
Albumina normalizada (mg/mL)	Média	0,135	0,578	P=0,064
	Mediana	0,037	0,609	
	Desvio-padrão da média	0,238	0,574	
	Erro padrão da média	0,059	0,117	
	Mínimo- máximo	0,0004-0,863	0,002-1,854	
RAC	Média	0,546	2,402	P=0,023
	Mediana	0,100	1,718	
	Desvio-padrão da média	1,193	2,663	
	Erro padrão da média	0,298	0,544	
	Mínimo- máximo	0,002-4,832	0,006-7,992	

\*Anova de um critério (pressão arterial sistólica), diferença significativa quando  $P < 0,05$

## 6 DISCUSSÃO

A solução de IgG total dos coelhos imunizados com albumina canina purificada foi capaz de reconhecer majoritariamente bandas de proteínas com massas moleculares ao redor de 66 kDa, o que equivale ao peso aproximado da albumina, em amostras de urina e de soro de cães e na própria solução de albumina canina utilizada na imunização (Figura 7). Entretanto, devido à existência de algumas poucas bandas de proteínas também ainda reconhecidas no *blotting* tentou-se a purificação da solução de IgG total pela de cromatografia tiofílica e de afinidade (NHS-sepharose), obtendo-se, entretanto, diminuição da sensibilidade no primeiro e um aumento pouco significativo no segundo procedimento (de apenas duas vezes).

Devido à alta especificidade apresentada pela solução total de IgG e sua grande sensibilidade, optamos pela sua utilização direta na técnica de ELISA, conjugando-a subsequentemente com biotina, apesar do insucesso nas tentativas de purificação, visto que a insistência nestas exigiria tempo e materiais não previstos neste trabalho.

Ademais, a técnica final de ELISA direto do tipo sanduíche, utilizando-se IgG de coelho anti-albumina canina tanto como anticorpo de captura quanto como de detecção apresentou bom desempenho (Gráficos 2 e 3), foi capaz de recuperar toda a albumina adicionada a uma amostra de urina de cão normal e não reconheceu uma proteína diferente (hemoglobina canina) adicionada a outra amostra de urina de cão normal.

Os valores de concentração de proteína urinária obtidos nos cães do grupo controle mostraram-se próximos aos relatados por Barsanti e Finco (1979) e Rego et al. (2001), demonstrando que a adaptação do método do azul brilhante de Coomassie G-250, também utilizado por estes autores, para microplacas, no presente estudo, foi satisfatória. Não foi observada uma diferença significativa entre os valores obtidos para machos e fêmeas (Tabela

1), em oposto aos trabalhos de Barsanti e Finco (1979) e Rego et al. (2001). Isso pode ter sido devido à utilização de cistocentese e cateterismo uretral como únicos métodos de colheita, enquanto que nos trabalhos dos autores supra-citados foram incluídos animais cujas amostras de urina foram obtidas por micção espontânea. Segundo Barsanti e Finco (1979) ao serem excluídos, do seu trabalho, os animais cujas amostras de urina haviam sido obtidas por micção espontânea, mantendo-se somente os cães submetidos à cistocentese ou cateterismo uretral, deixava de existir uma diferença significativa entre cães machos e fêmeas, o que, por final, corrobora os achados do presente estudo.

Quanto à comparação da concentração de proteína total segundo o método de colheita dentro de cada sexo, não se observou diferença entre as amostras obtidas por cistocentese e cateterismo uretral em cães machos. A mesma comparação não pode ser feita com os cães fêmeas, devido ao fato de que o cateterismo uretral foi utilizado em somente um dos animais deste grupo, o que impediu a realização de um teste estatístico adequado.

Similarmente, não foi observada uma diferença significativa entre os valores da relação proteína: creatinina urinária (RPC), albumina urinária, albumina normalizada e relação albumina:creatinina (RAC) entre cães machos e fêmeas e entre os métodos de colheita nos cães machos do grupo controle (Tabela 2).

Ao se avaliar a correlação entre os valores individuais de albumina normalizada com os da RAC dos cães normais, observou-se inicialmente que esta era muito fraca para os animais em conjunto. Entretanto, ao serem excluídos os cães cujas densidades urinárias haviam sido registradas como acima de 1,040, correspondente ao limite máximo de detecção do refratômetro utilizado no presente estudo, observou-se uma correlação positiva entre as duas variáveis. Isto pode ter ocorrido devido uma superestimação da albumina normalizada nestes cães, segundo a fórmula empregada. Este achado demonstra a necessidade de utilização da RAC para animais com densidade urinária acima de 1,040 para correta avaliação de sua

albuminúria ou a utilização de instrumentos de mensuração de densidade urinária com limite maior de detecção, como por exemplo, o urinômetro, que, entretanto, requer amostras com volume maior aos que foram obtidos dos animais de ambos os grupos.

Ainda, os dados observados na análise do grupo controle, onde foram incluídos somente cães sem alterações na sedimentoscopia e com um valor de RPC menor que 1,0, sugerem que a quantificação da perda urinária de albumina em animais que preencham os mesmos critérios acima seja desnecessária, visto que 100% destes cães apresentavam quantidades irrisórias de albumina em suas amostras de urina, abaixo dos limites classificados como microalbuminúria em humanos. De fato, visto que o valor máximo de albuminúria observado, no presente estudo, em cães normais foi muito abaixo do limite máximo estabelecido para a classificação de microalbuminúria em humanos, assim, a variação observada poderia, então, ser utilizada como referência em estudos futuros.

Contrariamente, Jensen et al. (2001) estudando a prevalência de microalbuminúria em cães clinicamente saudáveis, observou a ocorrência da mesma em 19% dos animais e, em 2%, foi encontrada macroalbuminúria. Os autores do referido estudo, entretanto, não excluíram amostras de urina com hematúria e/ou piúria e com RPC acima de 1,0.

Com relação aos animais do grupo de estudo, em todos foi observada densidade urinária igual ou abaixo de 1,030, compatível com existência de poliúria, que associada às concentrações elevadas de uréia e creatinina e inexistência de obstrução do trato urinário, permitiu o reconhecimento de azotemia renal. A poliúria, entretanto, foi percebida por somente 67,5% dos proprietários dos animais. Nos cães cujos proprietários alegavam não apresentar poliúria/polidipsia, 84,6% apresentavam episódios eméticos (Quadro 20, Anexo G). A maioria dos cães doentes (62,5%) encontrava-se no estágio 3 (azotemia moderada) da IRC e o restante, no estágio 4 (azotemia intensa ou falência renal), conforme classificação proposta por Brown (1999) (Quadro 23, Anexo J).

Em oposição aos cães normais, a avaliação da correlação entre os valores de RAC e de albumina normalizada para os cães doentes foi fortemente positiva. Isso provavelmente foi devido ao fato de nenhum dos cães doentes ter apresentado densidade urinária superior a 1,030, o que impediu a superestimação do valor de albumina normalizada.

Observou-se que a urinálise de rotina não detectou a presença de proteína em pouco mais de um quarto dos cães doentes (27,5%), dos 36,4% e 45,4% foi classificada como microalbuminúrica segundo seus valores de albumina normalizada e RAC, respectivamente. Isso demonstra que a urinálise de rotina pode não detectar pacientes que já apresentam uma lesão incipiente, representada pela microalbuminúria, em uma parcela razoável de pacientes. Ainda, foi também identificada uma porcentagem menor, porém ainda considerável (18,2% e 9,0% segundo seus valores de albumina normalizada e RAC, respectivamente) de cães, neste grupo, que se apresentavam macroalbuminúricos.

Verificou-se que a grande maioria dos cães doentes seria beneficiada pelo uso de testes de detecção de microalbuminúria na rotina clínica, visto que a maioria dos cães doentes (60% com base nos valores de albumina normalizada e 82,5% com base nos valores de RAC) apresentou albuminúria em limites insignificantes ou na faixa de microalbuminúria. Os testes para microalbuminúria poderiam ser usados como um método de monitoração terapêutica assim como de acompanhamento da evolução da progressão da doença não somente em cães microalbuminúricos como também em cães não albuminúricos. No último grupo, o seu uso teria como objetivo o reconhecimento do momento de aparecimento de uma microalbuminúria inicial e a subsequente adoção de manobras terapêuticas direcionadas ao seu controle de maneira precoce. No primeiro grupo, já microalbuminúrico, o objetivo seria o de adicionar novos fármacos ou de aumentar as doses dos já incluídos no regime terapêutico, tão logo fossem detectadas tendências abruptas de aumento de sua magnitude, retardando-se a progressão para macroalbuminúria.

Observou-se um aumento gradativo da porcentagem de cães macroalbuminúricos, concomitante ao aumento nos valores da RPC, até que, quando este valor era acima de 6,0, a maioria deles apresentava-se macroalbuminúrica, estando sujeitos a uma menor sobrevida segundo observações de Jacob et al. (2005). Nesta situação, os próprios valores de RPC podem ser usados para acompanhamento terapêutico, visto que uma vez que a microalbuminúria evoluiu para uma proteinúria evidente (macroalbuminúria), não seria mais necessário utilizar testes tão sensíveis quanto o ELISA.

Uma parcela considerável de cães doentes (60%, Quadro 19) apresentou valores elevados de pressão sangüínea sistólica, acima de 180 mmHg, podendo ser tidos como indubitavelmente hipertensos. Analisando-se mais criteriosamente os valores de pressão sistólica, uma porcentagem ainda maior poderia ser classificada como hipertensa segundo critérios de Polzin et al. (2005), que estabeleceu o valor de 150 mmHg como valor de corte para fins classificatórios, se forem comprovadas evidências extra-renais de lesão hipertensiva e a faixa de 150 a 180 mmHg, como hipertensão limítrofe, mesmo sem complicações extra-renais. Entretanto, optou-se por não utilizar este valor para evitar classificar como hipertensos cães que necessitariam avaliações mais aprofundadas e seqüenciais para confirmação da presença de hipertensão; assim, foram determinados, no presente estudo, dois grupos bem distintos para efeitos de comparação das taxas de excreção urinária de albumina e proteína.

Considerando-se este critério em particular, observou-se que a maioria dos cães que apresentava macroalbuminúria era claramente hipertensa (Gráficos 16 e 17), o que inicialmente aparentou mostrar uma relação positiva entre albuminúria e pressão sangüínea similarmente ao já anteriormente atestado em humanos (CAMPOS-PASTOR et al., 2000; RITCHIE et al., 1995; RUILOPE; RODICIO, 1993). Esta relação foi comprovada ao se demonstrar uma diferença estatisticamente significante nos valores médios de RAC entre os cães doentes hipertensos e não hipertensos.

Entretanto, quando comparou-se os valores de albumina normalizada entre os mesmos grupos anteriores, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa. Porém, devemos notar que o pequeno valor de “P” obtido ( $P = 0,064$ ) foi muito próximo ao nível de significância adotado (5%). Este achado suscita a possibilidade de que pode ter havido pequenas variações, não clinicamente, mas sim estatisticamente significantes, na determinação da densidade urinária pelo refratômetro. Uma diferença entre os grupos anteriores poderia ter sido observada se a albumina normalizada tivesse sido calculada a partir do valor de osmolalidade urinária ao invés da densidade urinária, visto que a primeira está mais estreitamente relacionada com a capacidade de concentração renal, enquanto que a última é uma função direta, mas não proporcional, do número de partículas de soluto na urina. A densidade urinária varia com o tipo de soluto presente, enquanto que a osmolalidade urinária não depende dos tipos de solutos, mas sim de seu número na urina. Devido ao seu alto peso molecular, a presença de proteínas na urina pode ter superestimado substancialmente a mensuração da densidade urinária levando a valores falsamente mais baixos de albumina normalizada nos cães com maior perda real de albumina (OSBORNE; STEVENS, 1999). Vistos esses interferentes, preferiu-se creditar mais valor ao resultado obtido com a comparação dos valores de RAC entre cães hipertensos e não hipertensos.

A porcentagem de cães hipertensos com perdas significativas de albumina urinária poderia ter sido ainda maior caso tivessem sido tomadas mensurações seriadas de ambos os parâmetros. Alguns cães podem não ter tido tempo suficiente para desenvolver micro ou macroalbuminúria secundariamente a uma hipertensão talvez recentemente diagnosticada. Diferenças ainda maiores entre os níveis de albuminúria segundo os níveis de pressão sanguínea poderiam ser obtidas se os níveis de albuminúria de um cão em isolamento fossem comparados com seus próprios níveis (dados emparelhados) antes e depois do desenvolvimento de hipertensão e não pela comparação entre cães classificados como



hipertensos, incluindo os recém diagnosticados como tal, com outros cães não hipertensos. Entretanto, a comparação dos valores antes e depois do desenvolvimento de hipertensão é viável somente em animais em que a mesma é induzida experimentalmente ou em casos de acompanhamento prolongado, não sendo viável em casos clínicos de avaliação pontual, nos quais foi baseado o presente estudo.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com as condições em que o estudo foi conduzido, pode-se concluir que:

- Nos cães sadios, não houve diferença significativa dos valores de albumina normalizada e RAC entre machos e fêmeas, nem entre os métodos de colheita utilizados nos cães machos.
- O melhor índice para avaliar a albuminúria em cães sadios foi a RAC.
- Os cães com IRC apresentaram valores significativamente maiores de albumina normalizada e RAC que os cães sadios.
- Existe uma forte correlação positiva entre os valores de albumina normalizada e RAC nos cães com IRC, sugerindo que ambos os índices podem ser utilizados para seu acompanhamento clínico.
- Testes de detecção de microalbuminúria podem ser relevantes na avaliação da grande maioria dos cães com IRC.
- A presença de microalbuminúria determinada pela relação albumina:creatinina urinária (RAC) foi mais evidente nos cães com insuficiência renal crônica que apresentavam hipertensão.

## REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

ANDERSON, S.; RENNKE, H. G.; BRENNER, B. M. Therapeutic advantage of converting enzyme inhibitors in arresting progressive renal disease associated with systemic hypertension in the rat. **Journal of Clinical Investigation**, n. 77, p. 1993-2000, 1986.

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

BARTGES, J. W. Hypertension and renal disease. **Veterinary Clinics of North América**, v. 26, n. 6, p. 1331-1345, 1996.

BIRGEL, E. H. Hematologia Clínica Veterinária. In: CONFERÊNCIA ANUAL DA SOCIEDADE PAULISTA DE MEDICINA VETERINÁRIA, 1982, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. p. 50.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

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

BROWN, S. Evaluation of chronic renal disease: a staged approach. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 21, p. 752-763, 1999

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

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

BURTON, C.; HARRIS, K. P. G. The role of proteinuria in the progression of chronic renal failure. **American Journal of Kidney Diseases**, n. 27, p. 765,775, 1996.

---

<sup>2</sup> Conforme as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. rev. atual. e ampl. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

CAMPOS-PASTOR M. M., ESCOBAR-JIMENEZ, F., MEZQUITA P., HERRERA-POMBO J. L., HAWKINS-CARRANZA F., LUNA J. D., AZRIEL, S., SERRACLARA A.; RIGOPOULOS, M. Factors associated with microalbuminuria in type 1 diabetes mellitus: a cross-sectional study. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 48, n. 1, p. 43-49, 2000.

CHEW, D. J. Fluid therapy during intrinsic renal failure. In: DIBARTOLA, S.P. **Fluid therapy in small animal practice**. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. p. 210-27.

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

COTTON, J.; KNOCHER, J. Correction of a uremic cellular injury with a protein restricted, amino acid supplemented diet. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 5, p. 233, 1985.

COWGILL, L. Pathophysiology and management of anemia in chronic progressive renal failure. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery**, v. 7, p. 175-199, 1992.

COWGILL, L.; KALLET, A. Systemic hypertension. In: KIRK, R. **Current veterinary therapy IX**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1986. p. 360-364.

DIBARTOLA, S. P. Familial renal disease in dogs and cats. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1995. p. 1763-1801.

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

DOW, S. W. Potassium depletion in cats: renal and dietary influences. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 191, p. 1569-1572, 1987.

ELLIOTT, J. Hypertension consensus report: an update. In: ANNUAL AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 24., 2006, Louisville, KY, USA. Proceedings...p.

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

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum protein by means of biuret reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 177, p. 751-766, 1949.

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

GRAUER, G. F.; OBERHAUSER, E. B.; BASARABA, R. J. Development of Microalbuminuria in Dogs with Heartworm Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 352, 2002.

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

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

HARVEY, J. N.; HOOK, K., PLATTS, J. K.; DEVARJOO, S.; MEADOWS, P. A. Prediction of albumin excretion from albumin-to-creatinine ratio (Letter). **Diabetes Care**, n. 22, p. 1597-1598, 1999.

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

HERMANS, M. P.; BIRCHARD, S. M.; COLIN, I.; BORGIES, P.; KETELSLEGERS, J. M.; LAMBERT, A. E. Long-term reduction of microalbuminuria after 3 years of angiotensin-converting enzyme inhibition by perindopril in hypertensive insulin treated diabetic patients. **American Journal of Medicine**, v. 92, p. 102S-107S, 1992. Suplemento 4B.

HOHNADEL, D. C. Urine protein. In: KAPLAN, L. A. PESCE, A. J. **Clinical chemistry – theory, analysis and correlation**. 2. ed. Ohio: Mosby, 1989. p.1060-1065.

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

JACOB, F. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, n. 220, p. 1163-1170, 2002.

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

JENSEN, W. A.; GRAUER, F. G.; ANDREWS, J.; SIMPSON, D. Prevalence of Microalbuminuria in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 300, 2001.

KASISKE, B. L.; KEANE, W. F. Laboratory assesment of renal disease, clearance, urinalysis and renal biopsy. In: BRENNER, B. M. **Brenner & rector's the kidney**. 5 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991. p. 1151.

KLAG, M. J.; WHELTON, P. K.; RANDELL, B. L.; NEATON, J. D.; BRANCATI, F. L.; FORD, C. E.; SHULMAN, N. B.; STAMLER, J. Blood pressure and end-stage renal disease in men. **The New England journal of medicine**, v. 334, p. 13-18, 1996.

KOGIKA, M. M. ; LUSTOZA, M. D. ; NOTOMI, M. K. ; FORTUNATO, V. A. B. ; MIRANDOLA, R. M. S. ; HAGIWARA, M. K. . Serum ionized calcium in dogs with chronic renal failure and metabolic acidosis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. PRELO, 2006

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

LAZARETTI, P. ; KOGIKA, M. M. ; HAGIWARA, M. K. ; LUSTOZA, M. D. ; MIRANDOLA, R. M. S. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, p. 489-494, 2006.

LEES, G. E. Congenital Renal Diseases. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 26, n. 6, p. 1379-1399, 1996.

LEES, G. E., BROWN, S. A., ELLIOTT, J., GRAUER, G. E., VADEN, S. L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (small animal). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, n. 3, p. 377-385, 2005.

LEES, G. E.; JENSEN, W. A.; SIMPSON, D. F.; KASHTAN, C. E. Persistent Albuminuria Precedes Onset of Overt Proteinuria in Male Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 16, p. 353, 2002.

LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A. Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 12, p. 59-72, 1990.

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

MARRE, M.; CHATELIER, G.; LEBLANC, I. I.; GUYENE, T. T.; MENARD, J.; PASSA, P. Prevention of diabetic nephropathy with enalapril in normotensive diabetic patients with microalbuminuria. **British Medical Journal**, v. 302, p. 210-216, 1999.

MATHIESEN, E. R.; HOMMEL, E.; GIESE, J.; PARVING, H. H. Efficacy of captopril in postponing nephropathy in normotensive insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria. **British Medical Journal**, v. 303, p. 81-87, 1991.

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

NASSAR, P. L. **Avaliação da concentração sérica de paratormônio intacto (PTH<sub>i</sub>), pelo método imunofluorométrico, em cães hígidos e cães com insuficiência renal crônica em hiperazotemia.** 2000. 93f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

NOTOMI, M. K.; ESAINE, L. A. L.; BATISTA, K. M.; LUSTOZA, M. D.; FRANCHINI, M. L.; KOGIKA, M. M. Intoxicação por ingestão de cebola (*Allium cepa* L.), com formação de corpúsculos de Heinz em um cão com insuficiência renal crônica – relato de caso. **Clínica Veterinária**, v. 53, p. 32-36, 2004.

ORTEGA, T. M.; FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W.; WILLITS, N.; COWGILL, L. D. Systemic arterial blood pressure and urine protein/creatinine ratio in dogs with hyperadrenocorticism. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 15, n. 209, p.1724-1729, 1996.

OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B. Urine Specific Gravity, Refractive Index, or Osmolality: Which One Would You Choose? In: \_\_\_\_\_. **Urinalysis: a clinical guide to compassionate patient care.** Leverkusen: Bayer Corporation, 1999. cap. 9, p. 73-85.

OSBORNE, C. A.; STEVENS, J. B.; LULICH, J. P.; ULRICH, L. K.; BIRD, K. A.; KOEHLER, L. A.; SWANSON, L. L. A clinician's analysis of urinalysis. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, D. R. **Canine and feline nephrology and urology.** 2. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1995. p. 136-205.

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

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A. Pathophysiology of Renal Failure and Uremia. In: OSBORNE, C.A.; FINCO, R.F. **Canine and feline nephrology and urology**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. p. 335-367.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; BARTGES, J.W. Chronic renal failure. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 5.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000. p. 1634-1662.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; BARTGES, J. W.; JAMES, K. M.; CHURCHILL, J. A. Insuficiência renal crônica. In: ETTINGER, S. J. **Tratado de medicina interna veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1997. p. 2394-2431.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; O'BRIEN, T. Moléstias dos rins e ureteres. In: ETTINGER, E. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1992. p. 2047-2138.

POLZIN, D. J.; OSBORNE, C. A.; ROSS, S. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 2005. p. 1767.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; JENSEN, W. A.; SIMPSON, D. Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative test strips designed for use with human urine. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 31, n. 2, p. 56-60, 2002.

PRESSLER, B. M.; VADEN, S. L.; JENSEN, W. A. SIMPSON, D. Prevalence of microalbuminuria in dogs evaluated at a referral veterinary hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 300, 2001.

PUKAC, L. A.; CARTER, J. E.; MORRISON, K. S.; KARNOVSKY, M. J. Enhancement of diaminobenzidine colorimetric signal in immunoblotting. **Biotechniques**, v. 23, p. 385-388, 1997.

REGO, A. B. A. S.; KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; SANTORO, M. L. Eletroforese das Proteínas Urinárias de Cães Normais e Cães com Doença Renal em Gel de Sódio-Dodecil-Sulfato Poliacrilamida. **Revista Veterinária Notícias**, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2001.



RITCHIE, C. M., MCKNIGHT, J. A., HADDEN, D. R.; BEATTY, O. L.; KENNEDY, L.; ATKINSON, A. B. Prevalence of hypertension and albuminuria in a teaching hospital diabetes clinic. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 27, n. 1, p. 69-76, 1995.

ROSS, L. A. Pathophysiology and Management of Systemic Hypertension Associated with Renal Dysfunction. In: OSBORNE, C. A.; FINCO, R. F. **Canine and feline nephrology and urology**. 1. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1995. p. 392-399.

RUBIN, S. I. Chronic renal failure and its management and nephrolithiasis. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 27, n. 6, p. 1331-1354, 1997

RUGGENENTI, P.; PERNA, A., MOSCONI, L. Randomised placebo-controlled trial of effect of ramipril on decline in glomerular filtration rate and risk of terminal renal failure in proteinuric, non-diabetic nephropathy. **Lancet**, n. 349, p. 1857-1863, 1997.

RUILOPE, L. M., RODICIO J. L.. Clinical relevance of proteinuria and microalbuminuria. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 2, n. 6, p. 962-967, 1993.

SMITH, M. C.; DUNN, M. J. Hypertension due to renal parenchymal disease. In: BRENNER, B. M; RECTOR, F. C. **The kidney**, 4. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991, p.1968-1996.

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

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

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

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987, 399 p.

TOTO, R. D., MITCHELL, H. C., SMITH, R. D., LEE, H. C., MCINTIRE, D., PETTINGER, W. A. Strict blood pressure control and progression of renal disease in hypertensive nephrosclerosis. **Kidney international**, v. 48, p. 851-859, 1995.

VADEN, S. L. Familial renal diseases in dogs and cats. Part 1. ACVIM Forum 13. **Proceedings**. Lake Buena Vista. Florida, 1995

VADEN, S. L.; JENSEN, W.; LONGHOFER, S.; SIMPSON, D. Longitudinal Study of Microalbuminuria in Soft-Coated Wheaten Terriers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 300, 2001.

VADEN, S. L.; PRESSLER, B. M.; LAPPIN, M. R.; JENSEN, W. A. Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 1, n. 33, p. 14-9, 2004

VIBERTI, G. C., JARRETT, R. J.; MAHMUD, U. Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 1430-1432, 1982.

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

WALLS, J. Relationship between proteinuria and progressive renal disease. **American Journal of Kidney Diseases**, n. 37, p. S13-S16, 2001. Supplement 2.

WATTS, G. F.; O'BRIEN, S. F.; SHAW, K. M. Urinary infection and albumin excretion in insulin-dependent diabetes mellitus: implications for the measurement of microalbuminuria. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 13, n. 60, p. 520-524, 1996

.

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

WILLIAMS, P. S.; FASS, G.; BONE, J. M. Renal pathology and proteinuria determine progression in untreated mild/moderate chronic renal failure. **The Quarterly Journal of Medicine**, v. 67, p. 343-354, 1988.

WINOCOUR, P. H. Microalbuminuria. **British Medical Journal**, v. 304, p. 1196-1197, 1992.

## ANEXO A

<b>N.</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Definição racial</b>	<b>Sexo</b>	<b>Método de colheita de urina</b>	<b>Média de pressão sanguínea sistólica (mmHg)</b>
1	25	SRD	Fêmea	Cistocentese	160
2	26	SRD	Fêmea	Cistocentese	130
3	30	SRD	Fêmea	Cistocentese	130
4	48	SRD	Macho	Cistocentese	160
5	36	SRD	Fêmea	Cistocentese	120
6	32	SRD	Macho	Cistocentese	150
7	12	SRD	Macho	Cistocentese	150
8	60	SRD	Macho	Cistocentese	140
9	54	SRD	Fêmea	Cistocentese	160
10	42	SRD	Fêmea	Cistocentese	120
11	60	SRD	Fêmea	Cistocentese	150
12	60	SRD	Macho	Cistocentese	140
13	36	Dachshund	Macho	Cistocentese	140
14	24	SRD	Fêmea	Cistocentese	130
15	24	Pit Bull	Macho	Cateterização uretral	150
16	36	Chow-Chow	Macho	Cateterização uretral	150
17	12	Dog Alemão	Fêmea	Cateterização uretral	130
18	18	SRD	Fêmea	Cistocentese	150
19	12	SRD	Fêmea	Cistocentese	130
20	24	SRD	Fêmea	Cistocentese	130
21	24	SRD	Fêmea	Cistocentese	160
22	24	SRD	Fêmea	Cistocentese	150
23	24	SRD	Macho	Cateterização uretral	130
24	30	Poodle	Macho	Cateterização uretral	150
25	60	Cocker	Macho	Cateterização uretral	130
26	24	Labrador	Macho	Cateterização uretral	150
27	54	SRD	Fêmea	Cistocentese	150
28	36	SRD	Fêmea	Cistocentese	120
29	48	Chow-chow	Macho	Cateterização uretral	140
30	60	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral	160
31	60	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral	150
32	12	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral	140
33	36	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral	160
34	60	Golden Retr.	Macho	Cateterização uretral	160
35	24	SRD	Macho	Cistocentese	160
36	36	SRD	Fêmea	Cistocentese	160
37	12	Golden Retr.	Macho	Cistocentese	120
38	24	SRD	Macho	Cistocentese	160
39	12	São Bernardo	Macho	Cistocentese	140
40	24	SRD	Macho	Cistocentese	120

Nota: SRD = sem raça definida

Quadro 14 - Dados referentes à idade, definição racial, sexo e método de colheita de amostras de urina dos cães saudáveis (grupo controle) - São Paulo - 2006

## ANEXO B

<b>Número</b>	<b>Uréia (mg/dl)</b>	<b>Creatinina (mg/dl)</b>
1	41,0	0,70
2	47,0	1,40
3	49,7	1,36
4	35,1	1,35
5	45,6	1,34
6	35,0	0,50
7	43,6	1,40
8	40,1	1,20
9	25,0	1,10
10	45,8	1,10
11	22,2	1,10
12	43,07	1,33
13	25,4	1,00
14	37,1	0,90
15	41,9	1,38
16	32,0	1,40
17	30,9	1,35
18	49,0	0,90
19	36,0	1,20
20	20,2	1,10
21	37,1	1,15
22	31,0	0,90
23	46,9	1,37
24	28,3	1,12
25	333,0	1,08
26	41,0	0,80
27	34,2	1,35
28	25,0	1,00
29	40,0	1,0
30	48,1	1,36
31	38,0	1,08
32	46,2	1,38
33	44,5	1,33
34	44,4	1,35
35	22,5	1,39
36	32,3	1,23
37	32,0	1,10
38	35,0	0,70
39	37,0	1,20
40	39,0	0,90

Quadro 15- Valores séricos individuais de uréia e creatinina dos cães sadios (grupo controle) - São Paulo - 2006

## ANEXO C

Número	Cor	Odor	Aspecto	Densidade
1	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,038
2	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
3	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,028
4	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,040
5	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,020
6	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,010
7	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
8	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
9	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,036
10	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,040
11	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,022
12	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
13	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,040
14	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,024
15	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
16	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,020
17	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,030
18	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,022
19	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
20	Amarelo palha	Límpido	Sui generis	1,018
21	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
22	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,032
23	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,038
24	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,020
25	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,045
26	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,045
27	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,035
28	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
29	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
30	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,032
31	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,020
32	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,035
33	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,030
34	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,025
35	Amarelo citrino	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,010
36	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,040
37	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,038
38	Amarelo ouro	Ligeiramente turvo	Sui generis	1,040
39	Amarelo ouro	Límpido	Sui generis	1,016
40	Amarelo citrino	Límpido	Sui generis	1,010

Nota: AC = amarelo citrino, AO = amarelo ouro; AP = amarelo palha; L = límpido; LT = ligeiramente turvo, SG = sui generis.

Quadro 16 - Dados individuais dos parâmetros do exame físico das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo -2006

## ANEXO D

N.	pH	Proteína	Glicose	Corpos cetônicos	Bilirrubina	Sangue oculto	Urobilino-gênio
1	5,0	Traços	-	-	+	-	-
2	5,0	+	-	-	-	+	-
3	5,0	Traços	-	-	-	+	-
4	6,0	Traços	-	-	-	-	-
5	6,0	Traços	-	-	-	-	-
6	6,0	+	-	-	-	(+)	-
7	6,0	-	-	-	-	-	-
8	8,0	+	-	-	-	-	-
9	5,0	-	-	-	-	-	-
10	5,0	-	-	-	-	-	-
11	5,0	-	-	-	-	-	-
12	7,5	-	-	-	-	-	-
13	6,0	Traços	-	-	+	-	-
14	6,5	-	-	-	-	-	-
15	6,0	+	-	-	+	+	-
16	6,0	-	-	-	-	-	-
17	7,0	+	-	-	-	-	-
18	8,0	-	-	-	-	-	-
19	6,0	Traços	-	-	-	-	-
20	8,0	-	-	-	-	-	-
21	6,0	-	-	-	-	-	-
22	8,0	-	-	-	-	-	-
23	8,0	Traços	-	-	-	-	-
24	9,0	Traços	-	-	-	-	-
25	6,5	Traços	-	-	-	-	-
26	6,0	Traços	-	-	-	-	-
27	5,0	-	-	-	-	-	-
28	6,5	Traços	-	-	-	-	-
29	7,0	+	-	-	++	-	-
30	9,0	-	-	-	-	-	-
31	8,0	+	-	-	-	-	-
32	9,0	-	-	-	-	-	-
33	8,0	Traços	-	-	-	-	-
34	9,0	+	-	-	-	-	-
35	7,0	+	-	-	-	+	-
36	6,0	Traços	-	-	-	-	-
37	9,0	+	-	-	-	-	-
38	7,0	+	-	-	-	-	-
39	7,5	-	-	-	+	-	-
40	8,0	-	-	-	-	-	-

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

Quadro 17 - Dados individuais dos parâmetros do exame químico das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006

## ANEXO E

N.	Hemácias	Leucócitos	Cilindros	Cristais	Células	Bact.	Outros
1	Raras	Raros	-	-	T	-	GG+
2	10-15	2-4	G(+)	-	T(+)	-	-
3	Raras	Raros	-	-	E(+)	-	GG+
4	0-1	0-1	G(+)	B+	T+	-	S++
5	Raras	Raros	-	-	E+	-	GG+
6	5-10	0-2	-	-	T+	-	-
7	Raras	Raros	-	-	E+	-	GG+
8	0-1	0-1	-	-	T(+)	-	S+
9	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
10	5-10	Raros	-	-	T+	-	-
11	Raras	Raros	-	-	T(+)	(+)	-
12	0-2	0-2	-	-	T+	-	-
13	0-1	0-1	-	-	T(+)	-	S+
14	Raras	Raros	-	-	-	-	-
15	0-1	0-1	G(+)	FT(+)	T+	(+)	-
16	0-2	0-4	-	-	T(+)	-	-
17	4-8	4-8	G(+)	FT++/B+	T+/E+	(+)	-
18	1-3	Raros	-	-	E+	-	-
19	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
20	5-10	Raros	-	-	E(+)	-	-
21	0-1	0-1	-	OC(+)	E(+)	-	-
22	0-1	0-1	-	OC(+)	E(+)	-	-
23	Raras	Raros	-	FT++	T+	-	-
24	Raras	Raros	-	-	T(+)	(+)	S++
25	Raras	Raros	G(+)	-	T(+)	(+)	S+
26	Raras	Raros	-	-	T(+)	(+)	S+
27	Raras	Raros	-	-	-	-	GG++
28	Raras	Raros	-	-	E(+)	-	-
29	0-1	0-1	-	-	T(+)	-	-
30	4-6	0-2	-	-	T+	-	-
31	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
32	Raras	Raros	-	FT+	T+/E+	-	-
33	2-4	Raros	-	G(+)	T++	-	-
34	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
35	Raras	Raros	-	-	-	-	S++
36	Raras	Raros	-	FT(+)	E(+)	-	-
37	Raras	Raros	-	FT+	-	-	-
38	0-2	Raros	-	FT++	E(+)	-	-
39	Raras	Raros	-	-	T(+)	-	-
40	Raras	Raros	-	-	-	-	-

Nota: G = cilindro granuloso; OC = oxalato de cálcio; FT = fosfato triplo; E = células escamosas; T = células de transição; S = espermatozóides, GG = gotículas de gordura; Bact. = bactérias

Quadro 18 - Dados individuais dos parâmetros do exame do sedimento urinário das amostras de urina dos cães normais (grupo controle) - São Paulo - 2006

## ANEXO F

<b>N.</b>	<b>Idade (meses)</b>	<b>Definição racial</b>	<b>Sexo</b>	<b>Método de colheita de urina</b>	<b>Média de pressão sanguínea sistólica (mmHg)</b>
41	96	SRD	Macho	Cateterização uretral	190
42	120	Rotweiller	Macho	Cateterização uretral	150
43	150	Dachshund	Macho	Cateterização uretral	210
44	60	Dachshund	Fêmea	Cistocentese	160
45	36	Lhasa Apso	Fêmea	Cateterização uretral	120
46	120	Poodle	Macho	Cistocentese	160
47	84	SRD	Fêmea	Cistocentese	160
48	218	Poodle	Macho	Cateterização uretral	280
49	120	SRD	Fêmea	Cistocentese	240
50	108	SRD	Fêmea	Cistocentese	210
51	24	Beagle	Fêmea	Cateterização uretral	240
52	144	Yorkshire	Fêmea	Cistocentese	140
53	96	SRD	Macho	Cistocentese	160
54	120	SRD	Fêmea	Cateterização uretral	190
55	24	Yorkshire	Macho	Cistocentese	120
56	156	Pinsher	Macho	Cistocentese	240
57	108	SRD	Macho	Cistocentese	240
58	108	Sharpei	Macho	Cistocentese	170
59	132	Doberman	Fêmea	Cistocentese	240
60	144	Cocker	Fêmea	Cistocentese	160
61	72	Bichon Frise	Macho	Cateterização uretral	230
62	120	Labrador	Macho	Cateterização uretral	240
63	96	Pastor Belga	Fêmea	Cistocentese	150
64	168	SRD	Fêmea	Cateterização uretral	210
65	144	Cocker	Macho	Cateterização uretral	170
66	96	Yorkshire	Macho	Cateterização uretral	150
67	24	Pinsher	Fêmea	Cistocentese	270
68	120	Schnauzer	Macho	Cateterização uretral	180
69	132	SRD	Macho	Cistocentese	220
70	120	SRD	Fêmea	Cistocentese	180
71	108	Poodle	Macho	Cateterização uretral	230
72	96	SRD	Fêmea	Cateterização uretral	230
73	84	Schnauzer	Fêmea	Cistocentese	210
74	36	Boxer	Fêmea	Cistocentese	180
75	120	Poodle	Fêmea	Cistocentese	170
76	120	Pequinês	Macho	Cistocentese	210
77	96	Labrador	Fêmea	Cistocentese	140
78	72	Labrador	Macho	Cateterização uretral	180
79	24	Lhasa Apso	Macho	Cistocentese	130
80	120	Pastor	Fêmea	Cistocentese	190

Quadro 19 - Dados referentes à idade, sexo, definição racial, método de colheita de urina e média de pressão sanguínea sistólica dos cães com insuficiência renal crônica - São Paulo - 2006



## ANEXO G

N.	PU/PD	Vômitos	Diarréia	Disorexia	Perda peso	Convulsão	Outros
41	-	+	-	-	-	-	-
42	-	+	-	+	+	-	-
43	+	+	-	+	+	-	-
44	+	+	-	+	+	-	-
45	+	-	-	-	+	-	-
46	+	-	-	-	+	-	-
47	+	-	-	-	+	-	-
48	+	-	-	-	+	-	-
49	+	-	-	-	+	-	Cegueira
50	+	-	-	+	+	-	-
51	-	+	-	+	-	-	-
52	-	+	-	+	-	-	-
53	+	+	-	-	-	-	-
54	+	-	-	+	-	-	-
55	+	-	+	+	-	-	Tremores
56	+	-	+	+	-	-	-
57	-	+	-	-	+	-	-
58	+	+	+	+	-	-	-
59	+	-	-	-	-	-	-
60	+	-	-	-	-	-	-
61	-	+	-	-	-	-	-
62	+	-	-	+	-	-	-
63	+	+	-	+	-	-	-
64	-	+	-	+	-	-	-
65	+	+	-	+	+	-	-
66	+	+	+	+	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-
68	-	+	-	+	-	-	-
69	+	-	-	-	+	-	-
70	+	-	-	+	-	-	-
71	-	+	-	+	-	-	-
72	+	-	-	+	-	-	-
73	-	+	-	+	-	-	-
74	+	+	-	+	-	-	-
75	-	-	-	-	-	-	-
76	+	-	-	-	-	-	-
77	+	+	-	-	-	-	-
78	+	+	-	+	-	-	-
79	-	+	-	+	+	-	-
80	+	+	+	+	+	-	-

Nota: PU/PD = poliúria/polidipsia; + = Presente; - = ausente

Quadro 20 - Dados individuais dos achados de anamnese dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

## ANEXO H

N.	He	Ht	Hb	VCM	HCM	CHCM	Observações
41	2,9	23	7,2	79,31	24,83	31,30	A+;P(+);R2,6%
42	2,0	15	5,0	75,00	25,00	33,33	A++;P+;R0,2%
43	4,0	29	9,0	72,50	22,50	21,03	A+; R3,2%
44	3,3	22	7,7	66,67	23,33	35,00	A+; R0,3%
45	-	41	-	-	-	-	-
46	4,6	35	12	75,59	25,91	34,28	A+
47	5,2	33	10,8	62,90	20,57	32,70	NDN
48	4,0	32	11	80,00	27,50	34,37	A(+)
49	-	38	-	-	-	-	-
50	5,1	39	14	76,17	27,34	35,84	A(+)
51	2,9	17	5,6	59,00	20,00	32,00	A+;P+
52	5,8	39	13,5	67,24	23,27	34,61	NDN
53	5,1	26	8,8	50,98	16,86	33,08	A(+)
54	5,4	37	12,3	68,4	22,77	33,2	NDN
55	1,4	12	4,0	85,71	28,57	33,30	A++;P(+);R0,2%
56	3,4	23	7,7	67,65	22,65	33,48	A(+); P(+);R0,2%
57	-	29	-	-	-	-	-
58	1,7	12	4,2	70,59	24,71	35,00	A+; R0,4%
59	5,8	36	12,3	62,07	21,21	34,17	NDN
60	5,6	36	11,9	64,29	21,25	33,06	NDN
61	6,2	45	14,6	72,58	23,55	32,44	NDN
62	4,0	28	9,4	70,00	23,50	33,57	A+; R0,2%
63	-	19	-	-	-	-	-
64	7,8	57	19,2	73,3	24,61	33,70	NDN
65	-	-	-	-	-	-	-
66	-	36	-	-	-	-	-
67	2,0	16	4,7	80,00	23,50	29,38	A++;R<0,1%
68	5,1	35	12	68,63	23,53	34,24	NDN
69	6,3	45	14,6	79,80	23,03	32,44	NDN
70	3,7	24	8,0	66,2	21,60	32,60	NDN
71	3,7	24	8,5	64,80	22,90	35,30	A(+)
72	2,7	19	6,1	70,37	22,59	32,11	A+;P(+);R1,6%
73	2,8	21	7,2	75,00	25,71	34,29	A(+); R0,8%
74	3,5	24	8	69,30	23,12	33,33	NDN
75	3,8	29	9,3	76,32	24,47	32,07	A+; P+, R0,6%
76	5,1	36	10,8	70,54	21,18	30,00	NDN
77	3,6	28	9,0	77,78	25,00	32,14	A+;R0,2%
78	-	38	-	-	-	-	-
79	2,7	19	6,1	69,09	22,18	32,11	NDN
80	3,4	23	7,7	67,25	20,76	30,87	NDN

Nota: He = hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ ); Ht = hematocrito (%); Hb = hemoglobina (g/dl);  
A = anisocitose; P = policromasia; R = reticulócitos; NDN = nada digno de nota.

Quadro 21 - Dados individuais do eritograma dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

## ANEXO I

N.	Leuco.	NS	NB	EOS	BAS	LINF	MON	Observações
41	8400	5376	0	1008	0	1428	588	NDN
42	13200	11616	0	528	132	528	396	NDN
43	9800	6958	0	294	0	2156	392	NDN
44	11400	9234	0	456	0	1254	456	Neut. hipersegm +
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	9950	7861	0	100	0	1592	398	NDN
47	9300	6900	0	100	0	1800	600	NDN
48	17900	13604	0	2148	0	895	1253	NDN
49	-	-	-	-	-	-	-	-
50	10750	9460	0	430	0	537	332	Neutrof. tóxicos ++
51	11600	10672	0	232	0	348	348	Vacuoliz citop.+
52	13900	10425	0	0	0	1946	1529	NDN
53	11400	9462	0	798	0	456	684	NDN
54	19200	14200	0	200	0	1700	3100	NDN
55	9900	7425	0	99	0	1782	594	NDN
56	7900	6873	0	316	0	474	237	NDN
57	-	-	-	-	-	-	-	-
58	10600	10282	0	106	0	212	0	NDN
59	3700	2442	0	222	0	962	74	NDN
60	17400	16356	0	0	0	522	522	THNS
61	6500	5785	0	65	0	455	195	NDN
62	3400	2448	0	612	0	2720	68	NDN
63	9200	-	-	-	-	-	-	-
64	12800	10400	500	400	0	800	800	NDN
65	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-
67	8800	6248	0	176	0	1672	704	NDN
68	17100	16074	0	171	0	171	684	NDN
69	15300	10251	0	612	0	3060	1377	NDN
70	23500	19505	0	235	0	2350	1410	NDN
71	17800	14774	0	178	0	1780	1068	NDN
72	10800	3564	0	324	0	6264	648	NDN
73	14900	13112	0	596	0	1043	149	NDN
74	7200	5472	0	432	0	936	360	THNS
75	19300	13510	0	1544	193	1930	2123	NDN
76	8900	-	-	-	-	-	-	-
77	13800	13386	0	0	0	414	0	Neutro. hipersegm(+)
78	10500	7350	0	0	0	2625	525	NDN
79	6900	5037	276	552	0	828	207	Neutrof. tóxicos +
80	7500	6075	300	0	0	750	375	Monoc. Reativos +

Nota: Leuco. = Contagem total de leucócitos (/mm<sup>3</sup>); NS = neutrófilos segmentados (/mm<sup>3</sup>), NB = neutrófilos bastonetes (/mm<sup>3</sup>); EOS = eosinófilos (/mm<sup>3</sup>); BAS = basófilos (/mm<sup>3</sup>); LINF = linfócitos (/mm<sup>3</sup>); MON = monócitos (/mm<sup>3</sup>); NDN = nada digno de nota; THNS = tendência à hiposegmentação dos neutrófilos segmentados.

Quadro 22 - Dados individuais do leucograma dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo- 2006

## ANEXO J

N.	Uréia (mg/dl)	Creat. (mg/dl)	Cálcio (mg/dl)	Fósforo (mg/dl)	Potássio (mEq/L)	P.T (g/dl)	Alb. (g/dl)	FA (U/L)	ALT (U/L)
41	117	2,6	9,7	6,4	7,1	-	2,3	-	-
42	350	5,7	-	-	-	6,0	2,2	339	52
43	290	3,9	11,1	8,7	5,7	-	-	-	-
44	387	3,7	-	-	-	-	-	-	-
45	205	3,4	-	-	-	-	-	-	-
46	189	3,1	-	6,9	5,9	9,0	-	-	-
47	540	4,4							
48	210	3,4	-	-	-	7,4	-	-	-
49	288	2,8	-	-	-	-	-	-	-
50	130	3,6	-	-	-	7,6	2,6	41,4	26,1
51	568	14,9	-	-	-	7,6	-	-	-
52	258	5,4	-	-	-	-	-	-	-
53	186	2,6	-	-	-	-	-	-	-
54	176	2,4	-	-	-	-	-	-	-
55	509	5,9	6,7	14,4	4,8				
56	231	3,8	-	-	-	6,2	2,4	35	73
57	120	4,0	-	-	-	-	-	-	-
58	327	9,0	9,2	8,5	3,6	-	-	-	-
59	227	6,5	11,1	11,0	-	-	-	3,0	-
60	170	5,4	9,2	7,9	5,2	-	2,9	-	-
61	301	3,3	5,5	9,6	4,3	4,8	1,9	22	39
62	275	6,0	10,0	4,8	-	-	2,7	-	-
63	466	11,4	9,6	-	5,1	-	-	-	-
64	356	4,1	-	-	-	-	-	-	-
65	227	2,7	-	-	-	-	-	-	-
66	220	4,1	11,4	8,9	-	-	-	-	-
67	496	3,1	-	-	-	-	-	-	-
68	419	8,6	-	-	-	7,4	2,9	116	152
69	129	3,7	-	4,4	-	8,8	-	-	-
70	215	2,8	-	-	-	-	-	-	-
71	160	3,1	-	-	-	-	-	-	-
72	139	2,9	9,8	4,7	4,8	8,3	2,1	121	60
73	228	5,7	9,8	8,9	5,3	5,9	2,5	57	22,9
74	209	6,5	11,8	6,2	6,1	7,4	-	-	-
75	467	7,5	12,8	11,6	-	-	1,8	126	41
76	157	2,6	10,0	5,6	4,7	-	-	-	-
77	401	10,8	-	-	4,3	7,3	3,1	86	74
78	153	3,4							
79	507	5,4	-	-	5,4	5,4	-	-	-
80	109	3,4	8,3	-	-	4,6	1,73	-	-

Nota: Creat. = creatinina; P.T. = proteína total; Alb. = albumina.

Quadro 23 - Valores individuais de bioquímica sérica dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo – 2006

## ANEXO K

N.	Rim direito				Rim esquerdo			
	Cont.	LCM	Ecog.	Tam.	Cont.	LCM	Ecog.	Tam.
41	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
42	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
43	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
44	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
45	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
47	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
48	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
49	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
50	-	-	-	-	-	-	-	-
51	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
52	Irreg.	Normal	Elevada	Normal	Irreg.	Normal	Elevada	Reduzido
53	Normal	Def. red.	Elevada	Reduzido	Normal	Def. red.	Elevada	Reduzido
54	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
55	-	-	-	-	-	-	-	-
56	Normal	Normal	Elevada	Reduzido	Normal	Normal	Elevada	Reduzido
57	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
58	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
59	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
60	Irreg.	Def. red.	Elevada	Normal	Irreg.	Def. red.	Elevada	Normal
61	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido
62	Normal	Normal	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
63	Irreg.	Normal	Elevada	Normal	Irreg.	Normal	Elevada	Normal
64	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
65	-	-	-	-	-	-	-	-
66	-	-	-	-	-	-	-	-
67	Normal	Normal	Elevada	Normal	Normal	Normal	Elevada	Normal
68	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
69	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido
70	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
71	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
72	-	-	-	-	-	-	-	-
73	Normal	Normal	Elevada	Normal	Normal	Normal	Elevada	Normal
74	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
75	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Elevada	Normal
76	Irreg.	Def. red.	Normal	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
77	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
78	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido	Normal	Def. red.	Normal	Reduzido
79	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido
80	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido	Irreg.	Def. red.	Elevada	Reduzido

Nota: Cont. = contorno; LCM = limite cortiço-medular; Ecog. = ecogenidade; Tam. = tamanho; Irreg. = irregular; Def. red. = definições reduzidas.

Quadro 24 - Dados da avaliação ultra-sonográfica individual dos rins dos cães com insuficiência renal crônica (grupo de estudo) - São Paulo - 2006

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)