

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**FATORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS DISCRIMINANTES NOS
DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES**

Layla Livia de Queiroz

Orientadora: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

GOIÂNIA

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

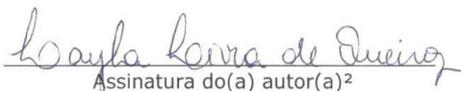
Nome completo do autor: Layla Livia de Queiroz

Título do trabalho: FATORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS DISCRIMINANTES NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 18 / 06 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

LAYLA LIVIA DE QUEIROZ

**FATORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS DISCRIMINANTES NOS
DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal junto à Escola de Veterinária e
Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

Área de Concentração:

Cirurgia, Patologia Animal e Clínica Médica

Linha de Pesquisa:

Clínica, diagnóstico por imagem e patologia
clínica na saúde de animais de companhia e
selvagens

Orientadora:

Prof^a. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti

Comitê de Orientação

Prof^a. Dra. Naida Cristina Borges

Prof^a. Dra. Aline Maria Vasconcelos de Lima

GOIÂNIA

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Queiroz, Layla Livia de
FATORES CLÍNICOS E LABORATORIAIS DISCRIMINANTES
NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM
CÃES [manuscrito] / Layla Livia de Queiroz. - 2019.
91 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti; co orientadora Dra. Naida Cristina Borges; co-orientador Dr. Aline Maria Vasconcelos de Lima.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. análise multivariada. 2. caninos. 3. eletroforese. 4. nefropatia.
5. proteinograma. I. Fioravanti, Maria Clorinda Soares, orient. II. Título.

CDU 639.09

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



1 ATA NÚMERO 271 DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DO PROGRAMA DE PÓS-
2 GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
3 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR Layla Livia de Queiroz. Às
4 14h00min do dia 28/05/2019, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em
5 Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus
6 Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao
7 julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) Layla Livia
8 de Queiroz, intitulada "Fatores clínicos e laboratoriais discriminantes nos diferentes estádios da
9 doença renal crônica em cães", apresentada para obtenção do Título de Doutor em Ciência
10 Animal, junto à Área de Concentração: Cirurgia, Patologia animal e Clínica médica desta
11 Universidade. O (A) Presidente da Comissão Julgadora Prof.ª Dr.ª Maria Clorinda Soares
12 Fioravanti, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) Layla Livia de Queiroz
13 para exposição em quarenta minutos do seu trabalho. A seguir, o (a) senhor (a) Presidente concedeu
14 a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato
15 (a), durante o prazo máximo de vinte minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder
16 aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a
17 Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado**
18 **(a) ou Reprovado (a):**

19 Prof.ª Dr.ª Maria Clorinda Soares Fioravanti	<u>aprovada</u>
20 Prof. Dr. Luciano Schneider da Silva	<u>APROVADA</u>
21 Prof.ª Dr.ª Alessandra Vitorino Naguetini	<u>aprovada</u>
22 Prof.ª Dr.ª Danieli Brolo Martins	<u>aprovada</u>
23 Prof.ª Dr.ª Rosângela Oliveira Alves de Carvalho	<u>APROVADA</u>

24 Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) Layla Livia de
25 Queiroz, Habilitada [(Habilitado (a) ou não Habilitado (a))] pelo(s) motivo(s)
26 abaixo exposto(s):

27 _____
28 _____
29 _____
30 _____
31 _____
32 _____
33 _____

34 _____

35 _____

36 _____

37 _____

38 A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

39 _____

40 _____

41 _____

42 _____

43 _____

44 _____

45 Nada mais havendo a tratar, eu, **Prof.ª Dr.ª Maria Clorinda Soares Fioravanti**, lavrei a presente ata
46 que, após lida e achada conforme, foi por todos assinada.

47 Prof.ª Dr.ª Maria Clorinda Soares Fioravanti

48 Prof. Dr. Luciano Schneider da Silva

49 Prof.ª Dr.ª Alessandra Vitorino Naguetini

50 Prof.ª Dr.ª Danieli Brolo Martins

51 Prof.ª Dr.ª Rosângela Oliveira Alves de Carvalho

M. Clorinda Soares Fioravanti
Luciano Schneider da Silva
Alessandra Vitorino Naguetini
Danieli Brolo Martins
Rosângela Oliveira Alves de Carvalho

Dedico este trabalho à Deus, pelas bênçãos diariamente concedidas.

Ao meu marido Thalisson pelo apoio incondicional oferecido.

À minha mãe, minha irmã e toda família, por estarem sempre torcendo por mim.

Aos meus sobrinhos Júlia e Heitor, para os quais desejo ser exemplo.

Aos meus filhos caninos Logan e Luna.

Aos pacientes, motivo de todo o trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por todas as bênçãos concedidas diariamente. Por ser bondoso e consolador, e por nunca me abandonar e sempre me dar forças quando pensei em desistir.

Agradeço ao meu marido Thalisson Oliveira Dias, meu companheiro de todos os momentos, meu apoio paciente para os momentos difíceis e meu maior admirador. Agradeço à toda minha família, por minha formação como ser humano. Principalmente minha mãe Lucelânia Pires F. de Queiroz e irmã Cintia Carla de Queiroz, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim.

À minha orientadora Prof^ª. Dra. Maria Clorinda Soares Fioravanti, pelos conhecimentos passados, pela paciência, flexibilidade e dedicação. Uma professora e pesquisadora ímpar, dedicada e incansável, e a servidora pública mais exemplar que conheço.

Aos colegas que trabalharam muito em prol desse projeto: Paula Costa Ariza, Veridiane da Rosa Gomes, Helton Freires, Camila Nunes Figs, Giovanna V. Rocha, Maria Clara S. Bastos e Letícia C. Vivas.

Ao professor Emmanuel Arnhold pelas análises estatísticas e paciência em esclarecer todas as dúvidas. À todos os professores da EVZ-UFG que contribuíram para a minha formação e me inspiram como docentes, entre eles prof^ª. Rosângela O. A. Carvalho, prof^ª. Aline M.V. Lima, prof^ª. Naida C. Borges, prof. Adilson D. Damasceno e prof^ª. Veridiana M. B. D. Moura.

Ao Hospital Veterinário da UFG e sua diretoria, que permitiram a realização de parte do trabalho em suas instalações. Aos colegas médicos veterinários da Clínica Pegasus e residentes do HV-UFG que desprendidamente me encaminharam inúmeros pacientes para este trabalho.

À Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por me proporcionarem uma formação de qualidade, tanto como profissional, quanto como ser humano. Ao CNPq pela bolsa concedida.

Aos animais que participaram de todo processo, aos que pude ajudar com meu conhecimento e me ajudaram fazendo parte do grupo desse trabalho. E aos meus animais, Logan e Luna, companheiros inseparáveis durante o processo de escrita desta tese.

À Banca Examinadora, por gentilmente aceitarem o convite de avaliação deste trabalho. A todos que contribuíram e acreditaram neste projeto, meus sinceros agradecimentos.

“Nós, seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar.”

Chico Xavier

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	01
1. Introdução.....	01
2. Revisão de literatura.....	02
2.1. Os rins.....	02
2.2. Fisiologia renal	03
2.3. Doença renal crônica.....	03
2.4. Biomarcadores de inflamação na DRC	06
2.5. Proteínas de fase aguda	07
2.5.1. Albumina	08
2.5.2. Haptoglobina.....	09
2.5.3. Alfa-1 glicoproteína ácida	09
2.5.4. Alfa-1 antitripsina	09
2.5.5. Transferrina.....	10
2.5.6. Ceruloplasmina	10
2.5.7. Imunoglobulina G	10
2.5.8. Imunoglobulina A	11
2.6. Eletroforese SDS-PAGE	11
2.7. Avaliação clínica e laboratorial de cães com DRC.....	13
2.8. Análise multivariada de dados.....	14
2.9. Justificativa e objetivos	14
Referências	15
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE MULTIVARIADA DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA NOS DIFERENTES ESTÁDIOS.....	21
Resumo.....	21
Abstract	21
1. Introdução	22
2. Material e métodos.....	23
2.1. Amostragem.....	23
2.2. Anamnese e exame clínico	24
2.3. Critérios de inclusão.....	24
2.4. Avaliações laboratoriais	25
2.5. Hemogasometria venosa.....	26
2.6. Aferição da pressão arterial	26
2.7. Divisão em grupos	27
2.8. Protocolos de tratamento	27
2.9. Análise estatística.....	28
3. Resultados e discussão	28
4. Conclusão	38
Referências	38
CAPÍTULO 3 – PROTENOGRAMA SÉRICO DE CÃES NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	42

Resumo.....	42
Abstract	42
1. Introdução.....	43
2. Material e métodos.....	45
2.1. Planejamento do estudo.....	45
2.2. Anamnese e exame clínico	45
2.3. Critérios de inclusão.....	46
2.4. Distribuição em grupos	46
2.5. Avaliações laboratoriais	46
2.6. Análise estatística.....	48
3. Resultados e discussão	48
3.1. Proteína total.....	51
3.2. Albumina	51
3.3. Alfa-1 antitripsina	52
3.4. Alfa-1 glicoproteína ácida	53
3.5. Ceruloplasmina	54
3.6. Haptoglobina.....	55
3.7. Transferrina.....	56
3.8. Imunoglobulina A	57
3.9. Imunoglobulina G total	58
3.10. Imunoglobulina G cadeia pesada	58
3.11. Imunoglobulina G cadeia leve	59
3.12. Proteína de peso molecular 23kDA.....	60
4. Conclusões.....	61
Referências	61
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1	Anatomia renal com destaque para o néfron, unidade funcional do rim..	02
FIGURA 2	Mecanismos de produção de proteínas de fase aguda (PFAs) pelos hepatócitos, indicando quatro componentes que podem ser diferenciados: fatores desencadeantes, reação local, mediadores e reação sistêmica.....	07
FIGURA 3	Estrutura esquemática de imunoglobulina.....	11
FIGURA 4	Esquema do traçado de imunoglobulinas em eletroforese.....	11
FIGURA 5	Algumas das principais proteínas encontradas em cada banda eletroforética.....	12
FIGURA 6	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) realizada em soro sanguíneo de cães com linfoma..	13

CAPÍTULO 2

FIGURA 1	Gráfico de dispersão da análise multivariada dos sinais clínicos nos diferentes estádios da DRC.....	29
FIGURA 2	Gráfico de vetores da análise multivariada dos sinais clínicos nos diferentes estádios da DRC em cães.....	31
FIGURA 3	Gráfico de vetores da análise multivariada das bioquímicas séricas nos diferentes estádios da DRC em cães.....	33
FIGURA 4	Gráfico de vetores da análise multivariada dos dados hematológicos em relação à creatinina nos diferentes estádios da DRC em cães.....	35
FIGURA 5	Gráfico de vetores da análise multivariada de hemogasometria em relação à creatinina nos diferentes estádios da DRC em cães.....	36
FIGURA 6	Gráfico de vetores da análise multivariada de variáveis urinárias e pressão arterial em relação à creatinina nos diferentes estádios da DRC em cães.....	37

CAPÍTULO 3

FIGURA 1	Escaneamento do gel de poliacrilamida para quantificação das proteínas por densitometria computadorizada.....	48
----------	---	----

FIGURA 2	Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1- antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37 KD). Ao final (F) do gel estão as proteínas IgG (cadeia leve) (25 KD) e proteína de 23 KD.....	49
FIGURA 3	Traçado eletroforético de um cão com DRC mostrando os picos das diferentes PFAs.....	49
FIGURA 4	Valores de Proteína Total nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	51
FIGURA 5	Valores de albumina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	52
FIGURA 6	Valores de α -1-antitripsina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	53
FIGURA 7	Valores de α -1-glicoproteína ácida nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	54
FIGURA 8	Valores de ceruloplasmina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	55
FIGURA 9	Valores de haptoglobina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	56
FIGURA 10	Valores de transferrina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	57

FIGURA 11	Valores de IgA nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	57
FIGURA 12	Valores de IgG nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	58
FIGURA 13	Valores de IgG cadeia pesada nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	59
FIGURA 14	Valores de IgG cadeia leve nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	59
FIGURA 15	Valores de proteína não identificada nominalmente com peso molecular 23kDA nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios: IRIS1, 2, 3 e 4.....	60

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1	Médias e desvios-padrões de análises laboratoriais e de pressão arterial sistólica (PAS) avaliados em 142 cães com DRC nos diferentes estádios da doença.....	32
----------	---	----

CAPÍTULO 3

TABELA 1	Médias das concentrações séricas das frações proteicas (g/dL), verificadas na eletroforese SDS-PAGE, em cães com DRC nos diferentes estádios da IRIS.....	50
TABELA 2	Médias das concentrações séricas de proteína total e das frações proteicas (g/dL), verificadas na eletroforese SDS-PAGE, em cães com DRC nos diferentes estádios da IRIS e nos diferentes momentos: primeira avaliação (1AV), segunda avaliação (2AV) e terceira avaliação (3AV).....	50

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

QUADRO 1	Causas potenciais de DRC em cães.....	04
QUADRO 2	Estadiamento da DRC em cães com base na creatinina.....	05
QUADRO 3	Subestadiamento da DRC em cães com base na proteinúria.....	05
QUADRO 4	Subestadiamento da DRC em cães com base na pressão arterial.....	06

CAPÍTULO 2

QUADRO 1	Quantitativo de animais obtidos em cada amostragem e em cada estágio IRIS para DRC.....	27
----------	--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AG – *Ânions Gap*

BE – *Base excess*

Ca - Cálcio

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

[HCO₃] – Concentração de bicarbonato de sódio

DRC – Doença renal crônica

EVZ – Escola de Veterinária e Zootecnia

IgA – Imunoglobulina A

IgG – Imunoglobulina G

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IFN γ – Interferon gama

IRIS – Sociedade Internacional de Interesse Renal

H – Hidrogênio

HV – Hospital Veterinário

K – Potássio

kDa - Kilodáltons

Mg - Magnésio

NaCl – Cloreto de sódio

PAS – Pressão arterial sistólica

PFA – Proteínas de fase aguda

RPCU – Razão proteína/creatinina urinárias

SDMA – Dimetilarginina simétrica

TEMED - Tetrametiletlenodiamina

TFG – Taxa de filtração glomerular

TNF α – Fator de necrose tumoral alfa

TPC – Tempo de preenchimento capilar

UFG – Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma condição progressiva e irreversível que acomete grande parcela da população de cães. Diante da importância dessa doença, objetivou-se fazer uma análise estatística multivariada de resultados de avaliações clínicas e exames laboratoriais de 142 cães nos diferentes estádios da doença para obtenção de uma nova forma de avaliar esses dados. Os resultados demonstraram alta relação entre a ocorrência de doenças nos dois últimos anos com o início da DRC. Os principais sinais clínicos da doença foram poliúria, polidipsia, vômito e diarreia. Fósforo, ureia e creatinina apresentaram alta correlação positiva. E esses apresentaram alta correlação negativa com o cálcio. Albumina e globulinas apresentaram correlação forte e negativa. Houve correlação forte e negativa entre proteinúria e densidade urinária. A acidose metabólica foi uma alteração importante a partir do estágio IRIS 3. Em um segundo momento do estudo foram realizados proteinogramas séricos com gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para avaliação das proteínas de fase aguda (PFAs) de 63 cães com DRC em diferentes estádios e diferentes momentos. Com os resultados obtidos concluiu-se que haptoglobina e a PFA com peso molecular de 23kDa são PFAs positivas para DRC, não discriminando os diferentes estádios da doença. A α -1 antitripsina tem comportamento de PFA negativa e discrimina o estágio mais grave, IRIS 4, podendo ser utilizada como indicador de prognóstico na DRC em cães. A IgG cadeia pesada é uma PFA positiva, que apresenta elevação gradual e maiores valores em IRIS 3.

Palavras-chave: análise multivariada, caninos, eletroforese, nefropatia, proteinograma.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a progressive and irreversible disease that affects a large number of dogs. Considering the importance of this disease, it was aimed to perform a multivariate statistical analysis of the results of clinical evaluations and laboratory tests of 142 dogs at different stages of the disease to establish a new way to evaluate these data. The results showed a high relation between the occurrence of diseases within the last two years and the onset of CKD. The disease's main clinical signs were polyuria, polydipsia, vomiting and diarrhea. Phosphorus, urea and creatinine showed a high positive correlation and they showed a high negative correlation with calcium. Albumin and globulins showed a strong negative correlation. There was a strong negative correlation between proteinuria and urinary density. Metabolic acidosis was an important abnormality present on IRIS 3 stage onwards. Serum proteinograms with polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) were used to evaluate the acute phase proteins (APPs) of 63 dogs with CKD at different stages and at different times. With the results it was concluded that haptoglobin and the APP with molecular weight of 23kDa are positive APPs in CKD, not differentiating between the different stages of the disease. α -1 antitrypsin behaves as a negative APP and differentiates the most severe stage, IRIS 4, and can be used as an indicator of prognosis in CKD in dogs. The heavy chain IgG is a positive APP, presenting gradual elevation and higher values in IRIS 3.

Keywords: canines, eletrophoresis, multivariate analysis, nephropathy, proteinogram.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Considerando que os cães estão entre os principais animais de companhia do ser humano e que é importante a busca pela melhoria da saúde desses animais, a clínica médica de pequenos animais tem evoluído, proporcionando mais saúde, qualidade e tempo de vida para eles. A longevidade tem aumentado e, com a velhice, o aumento da ocorrência de doenças degenerativas.

A doença renal crônica (DRC) é uma das principais doenças degenerativas que acometem os cães, e uma importante causa de mortalidade na espécie. A DRC caracteriza-se por falha permanente nas funções ou estruturas dos rins, e pode acometer cães de qualquer idade, mas é diagnosticada principalmente nos idosos, devido a perdas de células renais ao longo da vida do animal.

O diagnóstico da DRC, na maioria das vezes, é feito tardiamente quando ocorre o aumento sérico dos marcadores tradicionais: creatinina e ureia, momento em que mais de 75% dos néfrons já foram acometidos. Os sinais clínicos somente são evidenciados quando a doença já está em grau avançado, o que dificulta o estabelecimento do tratamento adequado.

Apesar da DRC ser, como o próprio nome diz, uma doença crônica, esta cursa com um estado de inflamação renal. Muitas vezes a piora no quadro clínico do paciente é o resultado de novas agressões ou de reagudizações da DRC.

No ser humano, tem-se estudado o papel da inflamação e do estresse oxidativo no desenvolvimento e na progressão da DRC. Apesar de ser uma doença bastante estudada em cães, pouco se fala sobre o estado inflamatório, sobre as causas de agudização/reagudização, ou sobre a piora progressiva ou repentina dos pacientes.

A análise de dados de doenças em grupos populacionais acometidos é uma importante ferramenta para compreender como se dá sua evolução, bem como estudar associações entre sinais clínicos, exames laboratoriais e prognóstico dos pacientes.

Diante disso, com este estudo propôs-se a utilização da ferramenta estatística análise multivariada utilizando dados obtidos de exames laboratoriais e os sinais clínicos de cães com DRC. Também foi objetivo avaliar a resposta de fase aguda (RFA) em cães nos diferentes estádios da DRC, por meio da identificação e quantificação das proteínas séricas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Os rins

Os rins são órgãos essenciais em todos os animais. Nos cães possuem formato de grão de feijão, sendo o rim direito anatomicamente mais cranial que o esquerdo, sendo esse último mais pesado. Estão localizados na região retroperitoneal sublombar¹.

Internamente são divididos em córtex, medula e pelve renal. São revestidos por uma cápsula fibrosa com pouca elasticidade². A irrigação sanguínea ocorre pela artéria renal, que emerge da aorta, e a drenagem pela veia renal que drena para a veia cava³ (Figura 1).

A unidade funcional do rim é o néfron, o qual se divide em glomérulo, cápsula glomerular, espaço glomerular, túbulo contornado proximal, alça de Henle e túbulo contornado distal, que segue para o túbulo coletor⁴.

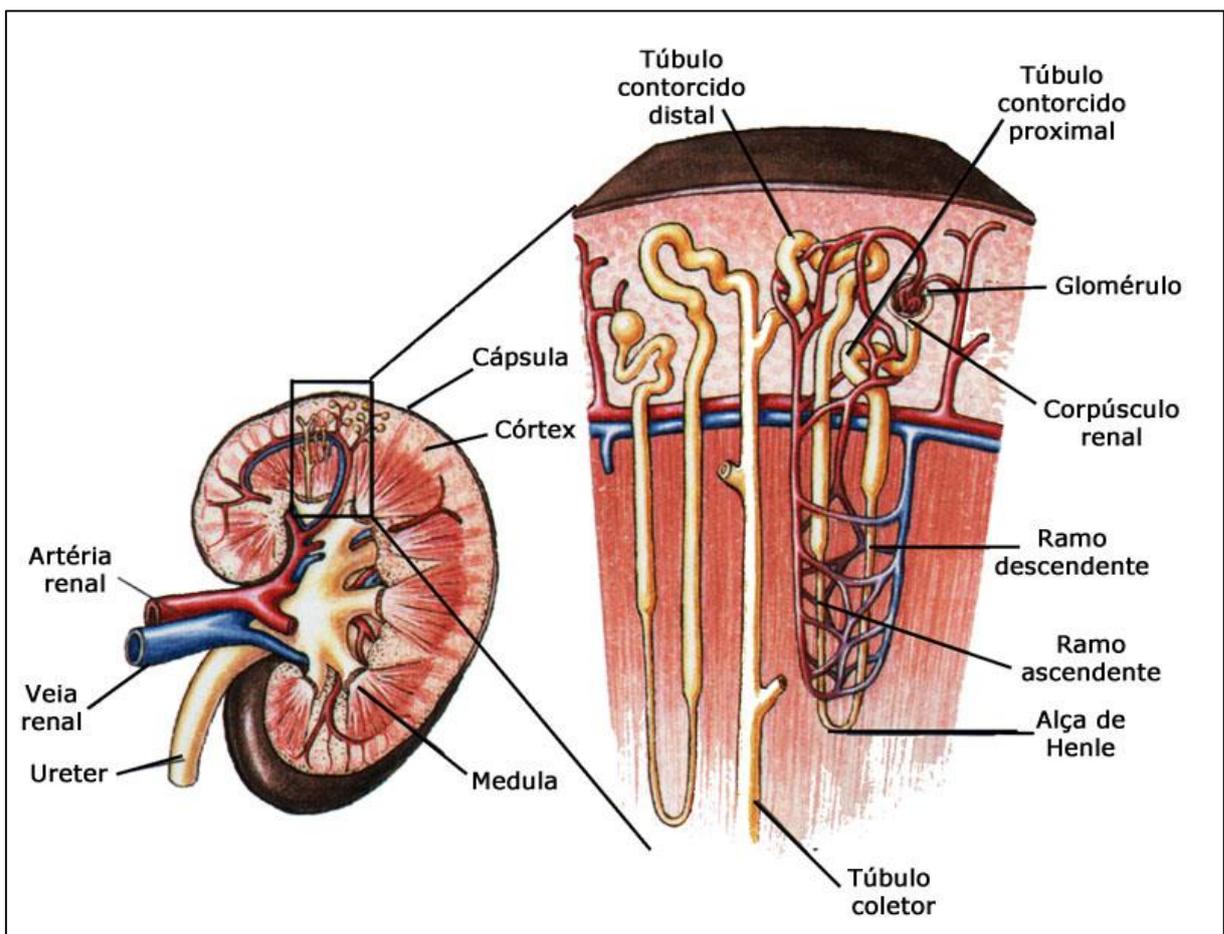


FIGURA 1 – Anatomia renal com destaque para o néfron, unidade funcional do rim.

Fonte: [http://1.bp.blogspot.com/-rBnF-kpMP5U/UV4-](http://1.bp.blogspot.com/-rBnF-kpMP5U/UV4-YauGxEI/AAAAAAAAAACK/DTZNZ8Z9Sv/s1600/glo.jpg)

[YauGxEI/AAAAAAAAAACK/DTZNZ8Z9Sv/s1600/glo.jpg](http://1.bp.blogspot.com/-rBnF-kpMP5U/UV4-YauGxEI/AAAAAAAAAACK/DTZNZ8Z9Sv/s1600/glo.jpg)

2.2. Fisiologia renal

Os rins exercem inúmeras funções essenciais à homeostase do organismo. Entre elas destacam-se: excreção de metabólitos, manutenção do equilíbrio hídrico e eletrolítico, regulação da pressão arterial e do pH sanguíneo, síntese e secreção de hormônios como renina, eritropoietina e 1,25 dihidrocolecalciferol⁵.

Os rins recebem aproximadamente 25% do débito cardíaco e a partir da filtração glomerular inicia-se o processo de formação da urina. A filtração glomerular depende das pressões hidrostáticas e coloidosmóticas, com regulação da pressão arterial, sistema renina-angiotensina-aldosterona, aparelho justaglomerular, reflexo miogênico e fatores extra-renais³.

O glomérulo exerce a função de filtração e os túbulos de reabsorção e secreção. Nos túbulos contornados proximais ocorre a reabsorção de aproximadamente 70% da água filtrada, além de cloreto de sódio (NaCl), bicarbonato (HCO_3^-), potássio (K^+), fosfato (HPO_4), cálcio (Ca^{++}), magnésio (Mg^{++}), ureia e uratos. Na alça de Henle ocorre a reabsorção de 15% a 25% do NaCl filtrado e o controle da excreção de Mg^{++} . Nos túbulos contornados distais há excreção de Ca e nos ductos coletores o principal controle do K^+ e íons H^+ ⁶.

2.3. Doença renal crônica

A DRC pode ser definida como uma condição irreversível de perda de função e/ou estrutura renal. Trata-se de uma doença progressiva com evolução maior que três meses, na qual observa-se uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG) ^{7,8}.

As causas da DRC (Quadro 1) em cães, na maioria das vezes, não são estabelecidas, mas entre as principais, estão as glomerulonefrites. Frequentemente, quando o diagnóstico é realizado, a causa inicial não está mais presente, sendo observada destruição de tecido renal com substituição por fibrose cicatricial ^{9,10}.

Os sinais clínicos são totalmente inespecíficos e geralmente observados nas fases mais adiantadas da doença¹³. Os mais comumente observados são: poliúria, polidipsia, perda de peso, halitose, estomatite, gastroenterite e desidratação ⁷.

Diante da inespecificidade e demora no aparecimento dos sinais clínicos, apenas avaliação física não é suficiente para estabelecer o diagnóstico da DRC. Este, portanto, deve ser realizado por meio de exames laboratoriais. Tradicionalmente, na rotina utiliza-se ureia e creatinina séricas para o diagnóstico, no entanto, essas moléculas somente se encontrarão alteradas quando o comprometimento renal for extenso⁷.

QUADRO 1 – Causas potenciais de DRC em cães

Doenças imunológicas
Lúpus eritematoso sistêmico, glomerulonefrite, vasculite
Amiloidose
Neoplasia
Primária, secundária
Agentes nefrotóxicos
Isquemia renal
Causas inflamatórias ou infecciosas
Pielonefrite, leptospirose, leishmaniose
Doenças congênitas ou hereditárias
Hipoplasia ou displasia renal, rins policísticos, nefropatias familiares
Obstrução do fluxo urinário
Idiopática

Fonte: Adaptado de Elliot e Lefebvre¹¹; Fernandez Del Palacio¹²

Outros exames que devem ser utilizados no diagnóstico são o exame de urina, razão proteína/creatinina urinárias (RPCU) e ultrassonografia abdominal. No exame de urina do doente renal crônico observa-se redução da densidade urinária, proteinúria e ocasional cilindrúria. A RPCU indica a perda de proteínas pelos glomérulos, no entanto deve ser considerada apenas se for persistente e na ausência de sedimento urinário ativo¹⁴. A ultrassonografia renal pode mostrar alterações no formato, tamanho e presença de mineralização renal. No entanto, a ausência de alterações ultrassonográficas não descarta a DRC¹⁵.

Mais recentemente, a quantificação da dimetilarginina simétrica (SDMA) tem sido utilizada como um novo marcador, mais precoce, para o diagnóstico da DRC. Trata-se de um aminoácido excretado pela urina que demonstra ter alta correlação com a TFG, mostrando alterações de doença renal antes dos outros marcadores convencionais¹⁶⁻¹⁸. No entanto, esse biomarcador não é capaz de diferenciar quadros agudos dos crônicos¹⁹.

A Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS), criou um método de classificação e estadiamento para DRC em cães e gatos com base nos valores séricos de creatinina (Quadro 2). O objetivo dessa separação em categorias é padronizar a nomenclatura, facilitar o diagnóstico e reconhecimento da doença, bem como fornecer diretrizes para o tratamento em cada momento e auxiliar no prognóstico. Esse sistema de classificação é reconhecido no mundo todo, incluindo as Sociedades Americana e Europeia de Nefrologia e Urologia Veterinária²⁰.

QUADRO 2 - Estadiamento da doença renal crônica em cães com base na creatinina

ESTÁDIO	CREATININA SÉRICA	ASPECTOS CLÍNICOS
Em Risco	<1,4mg/dL	A história sugere que o animal corre maior risco de desenvolver DRC no futuro devido a um número de fatores, como por exemplo, exposição a fármacos nefrotóxicos, raça, idade avançada, alta prevalência de doenças infecciosas na área
1	<1,4mg/dL	Não-azotêmico. Alguma outra anormalidade renal presente, como por exemplo, incapacidade em concentrar urina sem causa não-renal identificável, palpação renal ou achados de imagem renal anormais, proteinúria de origem renal, resultados de biópsia renal anormais, aumento das concentrações de creatinina sérica em amostras seriadas
2	1,4-2,0mg/dL	Azotemia renal discreta. Sinais clínicos geralmente ausentes
3	2,1-5,0mg/dL	Azotemia renal moderada. Muitos sinais clínicos extrarrenais podem estar presentes
4	>5,0mg/dL	Aumento do risco de sinais clínicos sistêmicos e crise urêmica

Fonte: Adaptado de <http://www.iris-kidney.com>²¹

A IRIS sugere que o SDMA também possa ser utilizado para adequação do estadiamento dos pacientes. Sendo que, um aumento persistente do SDMA acima de 14µg/dL em cães com creatinina sérica menor que 1,4mg/dL já podem ser considerados doentes renais no estágio 1. Pacientes classificados pela creatinina com estágio 2, mas com escore de condição corporal baixo e SDMA maior que 25µg/dL, devem ser tratados como cães do estágio IRIS 3. E para os animais em estágio 3 pela creatinina, com SDMA maior que 45µg/dL deve-se considerar as propostas de tratamento recomendadas para o estágio IRIS 4²¹.

Após o estadiamento da DRC, a IRIS recomenda o subestadiamento da doença com base nas avaliações da proteinúria pela razão proteína/creatinina urinária (Quadro 3) e pressão arterial sistólica (Quadro 4). Para avaliação da proteinúria é importante que se confirme a origem renal da perda de proteínas, excluindo infecções e inflamações do trato urinário. Para a mensuração da pressão arterial sistólica recomenda-se que o animal esteja tranquilo e que sejam realizadas várias mensurações e em dias distintos ⁷.

QUADRO 3 - Subestadiamento da doença renal crônica em cães com base na proteinúria.

VALORES RPCU	SUBESTADIAMENTO
<0,2	Não proteinúrico
0,2 a 0,5	Limítrofe
>0,5	Proteinúrico

Fonte: Adaptado de <http://www.iris-kidney.com>²¹

QUADRO 4- Subestadiamento da doença renal crônica em cães com base na pressão arterial

PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (mmHg)	SUBESTÁDIO PELA PRESSÃO ARTERIAL	RISCO DE LESÃO EM ÓRGÃOS-ALVO
<150	Normotenso	Mínimo
150-159	Pré-hipertenso	Baixo
160-169	Hipertenso	Moderado
>170	Hipertenso severo	Alto

Fonte: Adaptado de <http://www.iris-kidney.com>²¹

Após o diagnóstico e estadiamento da DRC deve-se instituir o tratamento individualizado para cada paciente. A IRIS faz as recomendações para direcionar o tratamento de acordo com cada estágio da doença. No entanto, deixa bem claro que adaptações na terapia devem acompanhar a resposta clínica de cada um. O tratamento tem dois objetivos principais: retardar a progressão da doença, preservando os néfrons funcionais, e reduzir os sinais clínicos, melhorando a qualidade de vida do paciente. Dentre as principais diretrizes para o tratamento estão: descontinuar o uso de fármacos nefrotóxicos, identificar e tratar anormalidades pré e pós renais, utilização de dietas específicas, manter a hidratação do animal, tratar as infecções do trato urinário, a hipertensão, a proteinúria, a hiperfosfatemia, a acidose metabólica e anemia, caso estejam presentes²¹.

O prognóstico da DRC é de reservado a desfavorável. Caso o diagnóstico seja realizado nas fases iniciais da doença, é possível que o animal conviva muitos anos com essa condição. No entanto, em caso de diagnóstico tardio, a expectativa de vida do paciente é pequena²².

2.4. Biomarcadores de inflamação na DRC

Marcadores biológicos, ou biomarcadores, são elementos orgânicos que podem ser quantificados de modo preciso, que tenham reprodutibilidade, e que estejam relacionados à processos biológicos normais, de doença ou de respostas ao tratamento farmacológico. Eles podem auxiliar no diagnóstico, na conduta de tratamento e na projeção do prognóstico de diversas condições patológicas²³.

A DRC, apesar de ser uma doença crônica, provoca um constante estado inflamatório no paciente que, em conjunto com o estresse oxidativo, leva a várias consequências graves da doença como anemia, alterações nutricionais, disfunções endoteliais e alterações no sistema imune^{24, 25}. Para os seres humanos está bem estabelecido que os processos de

inflamação nos doentes renais crônicos são responsáveis pelo aumento da morbidade e mortalidade nesses pacientes^{26,27}.

Os biomarcadores de inflamação na DRC em cães ainda não estão bem estabelecidos, mas já foi observada a relação da doença com citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF α ²⁸. Os estudos de diferentes marcadores biológicos inflamatórios podem auxiliar na classificação de grupos com maior e menor risco, indicação de evolução da doença, estabelecimento de prognóstico e avaliação da resposta ao tratamento empregado²⁹.

Estudos médicos demonstram que as proteínas de fase aguda, biomarcadores de inflamação na DRC, relacionam-se com a piora clínica dos pacientes, progressão da doença e podem prever a mortalidade³⁰⁻³³.

2.5. Proteínas de fase aguda

A resposta de fase aguda (RFA) é um tipo de reação inflamatória inata e inespecífica dos animais, que ocorre mediante a algum evento danoso ao organismo, como infecções, inflamações ou traumas^{34,35}. Ela ocorre com o objetivo de proteger o estado de saúde, evitar crescimento microbiano e reestabelecer a homeostase³⁶.

A RFA pode se manifestar por meio de sinais como febre, leucocitose, aumento do cortisol, diminuição de tiroxina, ferro e zinco, além de lipólise, gliconeogênese e catabolismo muscular. No entanto, a principal forma de expressão da RFA é por meio das proteínas de fase aguda (PFAs) como pode ser visto na figura 2³⁷.

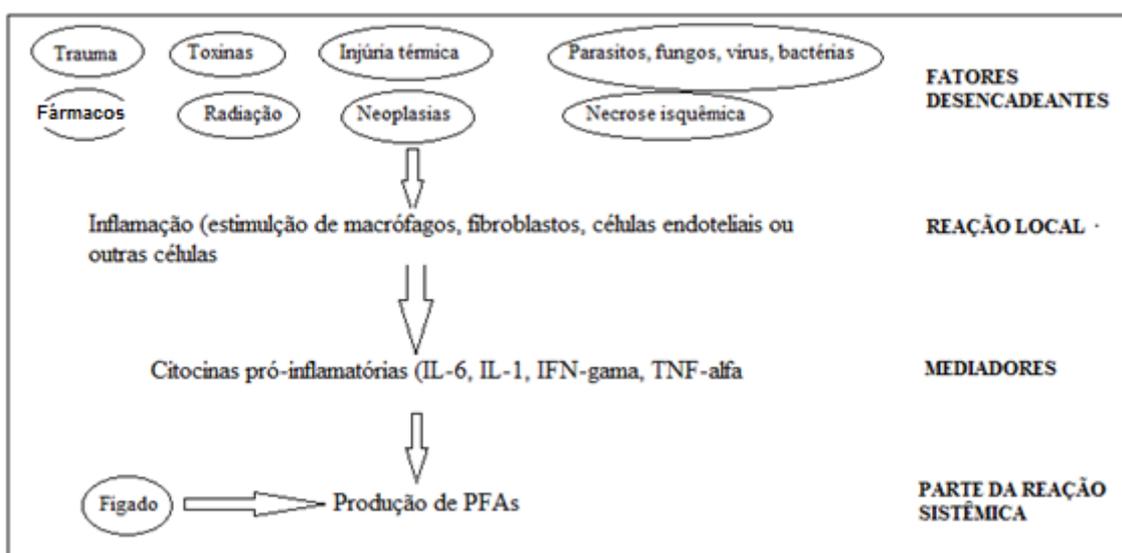


FIGURA 2 – Mecanismos de produção de proteínas de fase aguda (PFAs) pelos hepatócitos de cães, indicando quatro componentes que podem ser diferenciados: fatores desencadeantes, reação local, mediadores e reação sistêmica

Fonte: Adaptado de Ceron³⁷

As PFAs são biomarcadores sensíveis de inflamação, precoces e inespecíficos, que auxiliam no diagnóstico e prognóstico de diversas doenças. Possuem funções de defesa do organismo como ação antioxidante, ativação do complemento, opsonização e sequestro de microorganismos e seus metabólitos, eliminação de radicais livres, neutralização de enzimas, modulação de resposta imune, dentre outras funções ainda não completamente esclarecidas^{36, 38}.

Podem ser classificadas em positivas ou negativas e imediatas ou tardias. As PFAs positivas tem suas concentrações séricas aumentadas em caso de RFA, já as negativas apresentam concentrações reduzidas. As imediatas se alteram imediatamente ou em até 24 horas, enquanto as tardias demoram alguns dias para responder após o início da inflamação³⁷.

Haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina, proteína C-reativa e amiloide A-séica são exemplos de PFAs positivas. A transferrina e albumina são as principais PFAs negativas que podem ser quantificadas na rotina^{36, 37}.

2.5.1. Albumina

A albumina é a proteína presente em maior quantidade e a mais importante nos cães e maioria das espécies animais, correspondendo a cerca de 60% das proteínas totais. É produzida pelos hepatócitos e pode ter suas concentrações séricas reduzidas em caso de diminuição na produção, redução da absorção exógena ou perdas, principalmente pela urina. A albumina é uma PFA negativa³⁶.

As principais funções da albumina são manutenção da pressão coloidosmótica e transporte de substâncias como ácidos graxos, colesterol, óxido nítrico, bilirrubina e íons^{39, 40}.

O aumento das concentrações séricas de albumina geralmente não ocorre, quando presente, na grande maioria das vezes, indica desidratação. Sua redução pode indicar inflamação, anorexia, fome e desnutrição⁴¹.

A maior parte da albumina (60% a 70%) está no espaço intersticial e somente 30% a 40% encontra-se no sangue. Os principais responsáveis pelo metabolismo da albumina são os músculos, rins e fígado³⁹. O controle da síntese de albumina é feito pela pressão coloidosmótica e influenciada pela ação de hormônios como insulina, tiroxina e cortisol⁴².

A hipoalbuminemia também é observada em inúmeras condições patológicas como erliquiose, parvovirose⁴³, espirocercose⁴⁴, neoplasias mamárias⁴⁵ e esofágicas⁴⁴, arterites, meningites⁴⁵, hiperadrenocorticism⁴⁶ e DRC⁴⁷.

2.5.2. Haptoglobina

A haptoglobina é uma PFA positiva moderada e tardia, alcançando seu pico cerca de cinco dias após o início da inflamação^{35, 48}. Por possuir peso molecular de 81kDa, é considerada uma α -2 globulina, considerada uma proteína constitutiva⁴⁶, sendo dividida em duas subunidades: 2-alfa (peso molecular 16 a 23kDa) e 1-beta (35 a 40kDa). Esta proteína se une à hemoglobina livre no plasma, formando um complexo proteico que posteriormente é removido por fagocitose. Portanto, sua redução pode indicar hemólise⁴⁸.

Sua função no sistema imune do organismo é transportar a hemoglobina para as células do sistema mononuclear fagocitário a fim de promover a recuperação do íon ferro. Atua também como bacteriostática, imunomoduladora e estimulante na formação de novos vasos sanguíneos⁴⁹.

São observadas alterações de haptoglobina em casos de hiperadrenocorticism⁴⁶, leishmaniose⁵⁰, aspergilose, rinite, neoplasia nasal⁵¹, parvovirose⁴³ e neoplasias mamárias⁴⁵.

Para cães, os valores de referência da haptoglobina são de 0,1 a 0,2g/dL. Em doenças inflamatórias pode atingir 0,5g/dL ou valores mais elevados⁵².

2.5.3. Alfa-1 glicoproteína ácida

A alfa-1 glicoproteína ácida é uma alfa-1 globulina com peso molecular de 43kDa, sintetizada no fígado pelos hepatócitos. É uma PFA positiva moderada e tardia, com elevação após cinco dias do início da inflamação alcançando o pico após sete dias³⁷. Tem como funções principais a ligação a fármacos e imunomodulação⁵³.

Apresenta maiores concentrações nas formas agudas das hepatopatias e filariose quando comparadas as formas crônicas⁵³. Foram descritas elevação em: hepatite⁵⁴, parvovirose, cinomose, insuficiência renal, urolitíase, anemia imunomediada, trauma, hepatite, pancreatite, hiperadrenocorticism⁵³ e piometra⁵⁵.

2.5.4. Alfa-1 antitripsina

A alfa-1 antitripsina é uma PFA positiva com peso molecular de 60kDa e tem por função inibir proteases durante processos inflamatórios. É observada sua elevação em doença pulmonar crônica⁵⁶ e nas hepatopatias crônicas e agudas. Na cirrose sua concentração tende a ser reduzida⁴⁸.

2.5.5. Transferrina

Conhecida por transferrina ou siderofilina, essa PFA negativa é uma betaglobulina e é sintetizada pelos hepatócitos. Possui meia-vida de oito a dez dias e tem suas concentrações aumentadas na gestação e nas deficiências de ferro⁵⁷.

Atua no metabolismo do ferro, controlando seu transporte, absorção intestinal e distribuição. Observa-se que cães adultos possuem valores mais altos que filhotes. Ocorre redução de transferrina sérica em casos de DRC, leucemias, hepatopatias, cardiopatias⁵⁸ e anemias hemolíticas⁵⁹.

A transferrina, juntamente com a haptoglobina, atua na proteção do organismo contra infecções bacterianas. Elas promovem o aumento da incorporação do ferro dentro do fígado por estimulação da interleucina 1, reduzindo a disponibilidade do ferro e retardando a multiplicação bacteriana⁵⁹.

2.5.6. Ceruloplasmina

A ceruloplasmina é uma PFA positiva e moderada³⁵. Sua elevação geralmente ocorre em 24 horas ou até quatro dias após o início do fator desencadeante, na magnitude de duas a três vezes da normalidade³⁷. Valores de referência relatados para cães são de $4,93 \pm 0,62\text{mg/dL}$ ⁵⁰.

Suas funções são: antioxidante, proteção celular de compostos gerados da fagocitose de microorganismos e debris celulares, transporte de cobre e auxilia na produção de células vermelhas³⁶. Foi observada a elevação na leishmaniose sintomática e assintomática⁵⁰ e na parvovirose⁴³.

2.5.7. Imunoglobulina G

As imunoglobulinas G (IgG) são gamaglobulinas com peso molecular total em torno de 180kDa ⁶⁰, constituídas por duas cadeias leves e duas cadeias pesadas (Figura 3). São produzidas pelos plasmócitos localizados no baço, linfonodos e medula óssea. Possuem importante papel nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos⁵⁹.

As imunoglobulinas aumentam suas concentrações diante de estimulação antigênica, principalmente por infecções crônicas e doenças autoimunes⁶². As IgGs apresentam várias atividades imunológicas como opsonização, aglutinação e fixação do complemento, protegendo o indivíduo contra infecções virais e bacterianas⁵⁷.

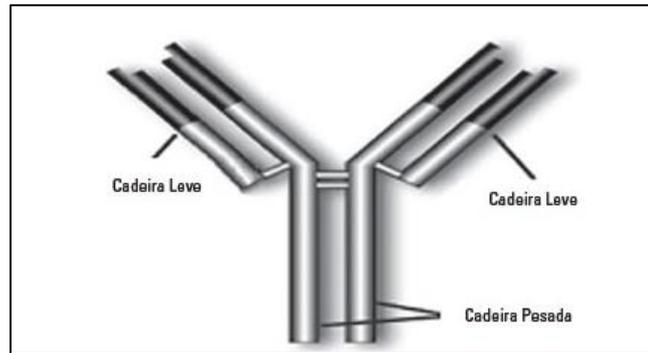


FIGURA 3 – Estrutura esquemática de imunoglobulina.
Fonte: Adaptado de Silva et al.⁶¹

2.5.8. Imunoglobulina A

A imunoglobulina A (IgA) é uma gamaglobulina que se encontra na área de junção com a fração betaglobulina (Figura 4). Pode ser encontrada na forma secretória como um dímero, com 390kDa ou no sangue como um monômero, pesando 160kDa⁶⁰. Representa importante mecanismo de defesa de superfícies e mucosas. É produzida principalmente na derme, glândulas mamárias, tratos respiratório, intestinal e urinário⁵⁹.

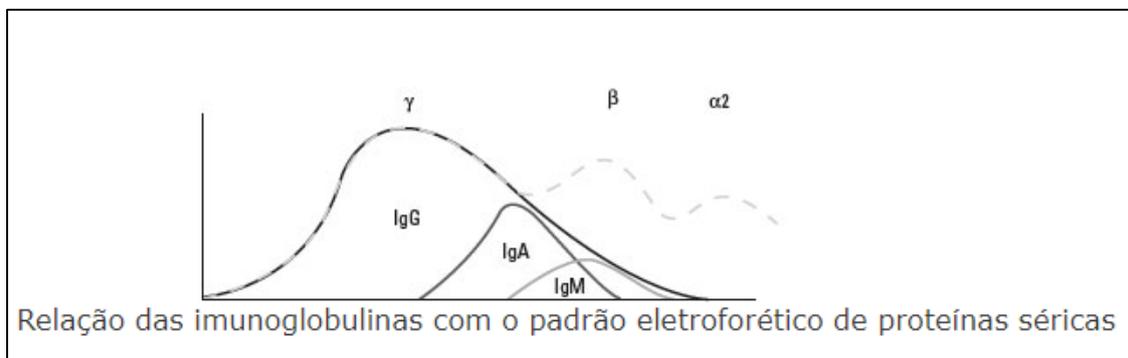


FIGURA 4 – Representação gráfica da eletroforese de imunoglobulinas em gel de agarose.
Fonte: Silva et al.⁶¹

A IgA é um importante anticorpo de defesa local, sendo encontrada em altas concentrações nas doenças infecciosas, hepáticas e de tecido conjuntivo. Estão presentes em secreções respiratórias, genitourinárias, gastrintestinais e na saliva⁵⁷.

2.6. Eletroforese SDS-PAGE

Para quantificar as PFAs a técnica padrão é a eletroforese, que pode ser realizada em diferentes géis como agarose e poliacrilamina. O SDS-PAGE é o tipo de eletroforese usando gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio em um sistema vertical^{45, 63}.

Para realização da eletroforese SDS-PAGE utiliza-se soro sanguíneo, fresco, refrigerado ou congelado. O método utiliza corrente elétrica para separação das moléculas por diferença de carga e peso molecular. Sendo que as proteínas de maior peso molecular se deslocam mais lentamente do que as de menor. A corrida ocorre do polo negativo (cátodo) para o positivo (ânodo)^{64, 65}. Para estimar os pesos moleculares e quantificação das concentrações das proteínas utiliza-se densitometria computadorizada para o escaneamento do gel⁴⁵.

O SDS-PAGE permite separar proteínas com concentrações extremamente baixas. As principais proteínas evidenciadas são: albumina, antitripsina, alfa-1 glicoproteína ácida, alfa-2 globulina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, imunoglobulinas G e A (Figuras 5 e 6)⁶¹. Mais de 20 proteínas podem ser visualizadas nessa técnica⁶⁶.

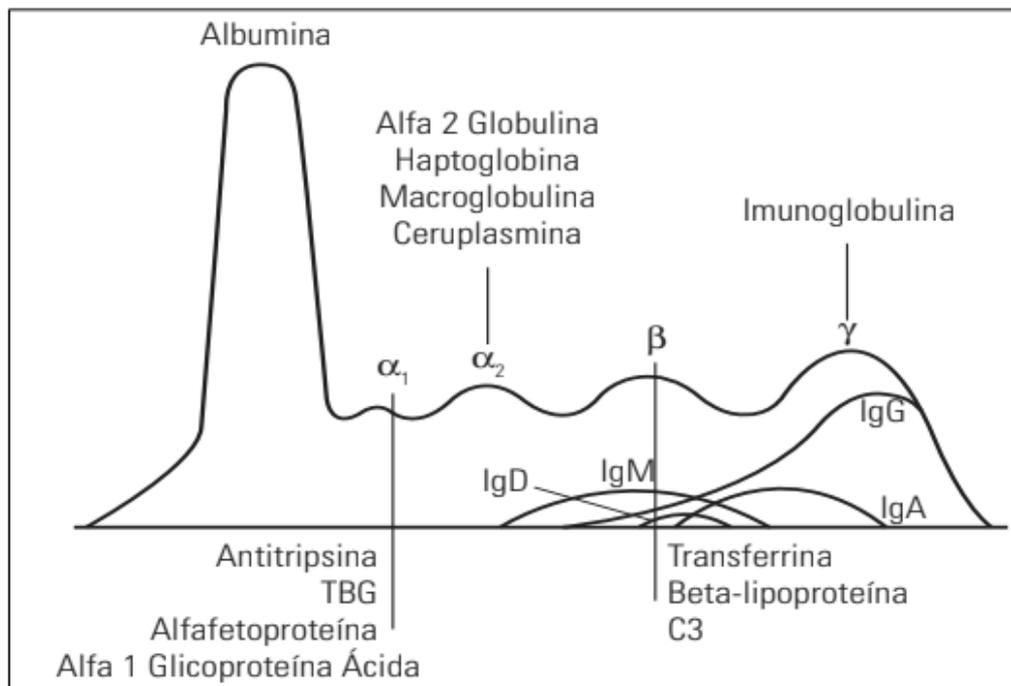


FIGURA 5 – Algumas das principais proteínas encontradas em cada banda eletroforética em gel de agarose.

Fonte: Silva et al.⁶¹

A albumina é a proteína que produz maior pico, geralmente localizada à esquerda na corrida eletroforética. Em seguida há os picos de alfa, beta e gama globulinas. O traçado sofre alterações de acordo com o estado de saúde do paciente⁵².

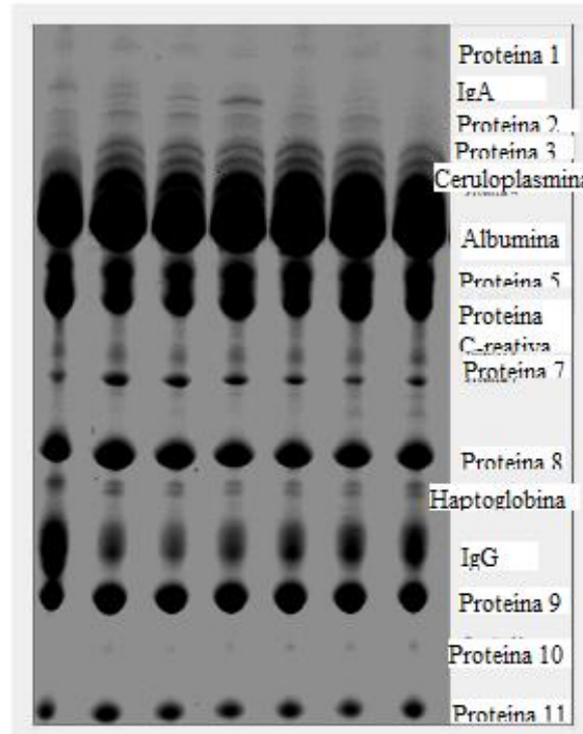


FIGURA 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) realizada em soro sanguíneo de cães com linfoma.
Fonte: Calazans⁶⁷

2.7. Avaliação clínica e laboratorial de cães com DRC

Os pacientes com DRC, após o diagnóstico e o estadiamento, necessitam de acompanhamento por toda vida. Esse acompanhamento deverá compreender a conscientização do tutor do animal, anamnese detalhada, avaliação física completa e inúmeros exames laboratoriais⁶⁸.

A anamnese deve elencar perguntas quanto à ingestão de alimentos e água, presença de vômitos e diarreia, doenças e tratamentos recentes, presença de ectoparasitos e vacinação, estado geral do animal. A avaliação física compreende o estado geral do animal (hidratação, comportamento, avaliação de mucosas, linfonodos), parâmetros vitais (frequências cardíaca e respiratória, temperatura), inspeção, palpação⁶⁹ e pressão arterial sistólica⁷⁰.

Os exames laboratoriais incluem o hemograma (hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, plaquetas, leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes, monócitos, linfócitos e basófilos), o exame de urina (densidade urinária, exame químico, sedimentoscopia), as bioquímicas séricas (ureia, creatinina, fósforo, cálcio, proteínas séricas totais, albumina, globulinas, colesterol, sódio, potássio), as bioquímicas urinárias

(proteína, creatinina, sódio, potássio, GGT, fosfatase alcalina) e a hemogasometria (acidemia, bicarbonato, excesso ou déficit de bases)^{71, 72}.

Uma grande quantidade de resultados são gerados desses exames, sendo necessário avaliar um a um e correlacionar todos os dados para promover os ajustes adequados do tratamento⁶⁸. A análise multivariada surge como uma ferramenta para correlacionar grande quantidade de informações, obtendo, a partir de múltiplos dados, informações relevantes, com mínima perda de informação⁷³

2.8. Análise multivariada de dados

A estatística é uma importante ferramenta para auxiliar pesquisas científicas na interpretação de dados e confirmação de hipóteses. As análises estatísticas são empregadas num contexto hipotético-dedutivo para confirmar ou excluir proposições⁷⁴.

Análise multivariada de dados surgiu por volta de 1901, mas apenas com o advento da informática e programas computacionais específicos ela foi difundida para o uso em trabalhos científicos, tal como é utilizada atualmente e sempre apresentada em congressos e revistas especializadas em estatística⁷⁵.

Para se conhecer o comportamento das variáveis pode-se recorrer aos estudos descritivos, seguidos de análises multivariadas. Essas últimas objetivam reduzir e simplificar os dados, facilitando a compreensão, agrupar dados similares estudar relações de dependência entre variáveis, prever resultados e construir hipóteses⁷⁶.

A aplicação das análises multivariadas é muito abrangente, tendo sido amplamente utilizada em estudos de medicina, sociologia e biologia. Na medicina utiliza-se muito para classificação de fases de uma doença, medidas de diagnóstico e tratamento⁷⁶.

2.9. Justificativa e objetivos

Aproximadamente 50% dos pacientes humanos com DRC apresentam, mesmo nas fases iniciais da doença, aumento PFAs positivas, diretamente relacionadas com a severidade da doença⁷⁷. Não foram encontrados, na literatura consultada, estudos semelhantes em cães.

Uma importante contribuição das PFAs está relacionada à habilidade dessas proteínas em auxiliar no estabelecimento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Espera-se que no futuro as PFAs sejam incluídas como exames de rotina para diagnóstico precoce de enfermidades e avaliação da eficácia de tratamentos e medicamentos em cães e gatos⁷⁸.

A literatura é muito controversa quanto aos valores de referência para a maioria das PFAs nos cães saudáveis⁵¹ e, devido à isso e ao fato de existirem diversas técnicas para

determinação dessas proteínas, é importante que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência para cada PFA analisada⁷⁸.

Diante de todas essas considerações fica clara a importância de determinar as concentrações das diferentes PFAs e das globulinas em cães saudáveis e nos pacientes com DRC em diferentes estádios da doença, de modo a estabelecer a possível relação entre a gravidade da DRC e a concentração sérica das PFAs.

A DRC leva à alterações em um grande número de exames laboratoriais, incluindo hematológicos, bioquímicas séricas e urinárias, eletrólitos e hemogasometria. Avaliar todos esses resultados de forma concomitante é uma tarefa complexa e que exige o auxílio de ferramentas específicas da estatística.

A análise multivariada de dados é uma importante ferramenta estatística para agrupar variáveis de acordo com suas correlações, avaliando inúmeros dados simultaneamente, maximizando o poder de exploração de informações. Reunir um grande número de dados de cães com DRC e realizar a análise multivariada desses dados pode permitir fazer novas interpretações acerca de consequências da doença, bem como a indicação de associações entre sinais clínicos e resultados de exames.

REFERÊNCIAS

1. Sisson S, Grossman JD. Anatomia dos animais domésticos. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1986. 1134p.
2. Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. Tratado de anatomia veterinária. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. 840p.
3. Swenson MJ, reece WO. Dukes: Fisiologia dos animais domésticos. 12 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. 926p.
4. Moe SM, Radcliffe JS, White KE, Gattone Ii VH, Seifert MF, Chen X, et al. The pathophysiology of early-stage chronic kidney disease-mineral bone disorder (CKD-MBD) and response to phosphate binders in the rat. *J Bone Miner Res.* 2011;26(11):2672-81.
5. Bartges J, Polzin DJ. Nephrology and urology of small animals. Ames: Willey-Blackwell. 2011. 904p.
6. DiBartola PS. Anormalidades de fluídos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico. In: *Clínica de Pequenos Animais.* São Paulo: Roca; 2007. 680 p.
7. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41(1):15-30.

8. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42(4):669-92.
9. Grauer GF. Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2005;35(3):581-96.
10. Lees GE. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004;34(4):867-85.
11. Pibot P, Biourge V, Elliot D. *Encyclopedia of canine clinical nutrition.* Paris: Royal Canin; 2006. 486p.
12. Roura X. Risk factors in dogs and cats for development of chronic kidney disease (2016): International Renal Interest Society; [acesso 28 de fevereiro de 2019]. Disponível em: <http://www.iriskidney.com/education/risk-factors.shtml>].
13. Cowgill LD, Polzin DJ, Elliott J, Nabity MB, Segev G, Grauer GF, et al. Is progressive chronic kidney disease a slow acute kidney injury? *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2016;46(6):995-1013.
14. Grauer GF. Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2007;37(2):283-95, vi-vii.
15. Polzin DJ. Diagnosing & staging of chronic kidney disease. *Proceedings of the 34th World Small Animal Veterinary Congress WSAVA 2009 [Internet].* 2009.
16. Ernst R, Ogeer J, McCrann D, Cross J, Strong-Townsend M, Friis H, et al. Comparative performance of IDEXX SDMA Test and the DLD SDMA ELISA for the measurement of SDMA in canine and feline serum. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205030.
17. Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Jewell DE. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2014;28(6):1676-83.
18. Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Rakitin A, et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 2015;29(4):1036-44.
19. Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, et al. Plasma symmetric dimethylarginine concentration in dogs with acute kidney injury and chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):799-804.
20. Paepe D, Daminet S. Feline CKD: Diagnosis, staging and screening – what is recommended? *J Feline Med Surg.* 2013;15(1_suppl):15-27.
21. IRIS Staging of CKD 2017:[1-5 pp.]. International renal interest society; [acesso 28 de fevereiro de 2019]. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf
22. Rudinsky AJ, Harjes LM, Byron J, Chew DJ, Toribio RE, Langston C, et al. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2018.

23. Mayeux R. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx*. 2004;1(2):182-8.
24. Javard R, Grimes C, Bau-Gaudreault L, Dunn M. Acute-phase proteins and iron status in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2017;31(2):457-64.
25. Kogika MM, Lustoza MD, Hagiwara MK, Caragelasco DS, Martorelli CR, Mori CS. Evaluation of oxidative stress in the anemia of dogs with chronic kidney disease. *Vet Clin Pathol*. 2015;44(1):70-8.
26. Carrero JJ, Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal disease--what have we learned in 10 years? *Semin Dial*. 2010;23(5):498-509.
27. Galli F. Protein damage and inflammation in uraemia and dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22 Suppl 5:v20-36.
28. Nentwig A, Schweighauser A, Maissen-Villiger C, Bruckmaier RM, Zurbriggen A, van Dorland HA, et al. Assessment of the expression of biomarkers of uremic inflammation in dogs with renal disease. *Am J Vet Res*. 2016;77(2):218-24.
29. Meuwese CL, Snaedal S, Halbesma N, Stenvinkel P, Dekker FW, Qureshi AR, et al. Trimestral variations of C-reactive protein, interleukin-6 and tumour necrosis factor- α are similarly associated with survival in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(4):1313-8.
30. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Qureshi AR, Hayashi SY, Manfro RC, Pachaly MA, et al. The prognostic impact of fluctuating levels of C-reactive protein in Brazilian haemodialysis patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(11):2803-9.
31. Friedman AN, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(2):223-30.
32. Stenvinkel P. Inflammation in end-stage renal failure: could it be treated? *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17 Suppl 8:33-8.
33. Pecoits-Filho R, Heimbürger O, Barany P, Suliman M, Fehrman-Ekholm I, Lindholm B, et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. *Am J Kidney Dis*. 2003;41(6):1212-8.
34. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*. 2004;168(1):28-40.
35. Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*. 2009;59(6):517-26.
36. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science B*. 2005;6(11):1045-56.
37. Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005;34(2):85-99.

38. Tvarijonavičiute A, Ceron JJ, Holden SL, Biourge V, Morris PJ, German AJ. Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. *J Vet Intern Med.* 2013;27(1):31-8.
39. Evans TW. Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16 Suppl 5:6-11.
40. Eckersall PD. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. 6 ed. Kaneko JJ, Harvey JW, editors. Burlington: Academic Press; 2008.
41. Bathen-Noethen A, Carlson R, Menzel D, Mischke R, Tipold A. Concentrations of acute-phase proteins in dogs with steroid responsive meningitis-arthritis. *J Vet Intern Med.* 2008;22(5):1149-56.
42. Prinsen BH, de Sain-van der Velden MG. Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clin Chim Acta.* 2004;347(1-2):1-14.
43. Kocaturk M, Martinez S, Eralp O, Tvarijonavičiute A, Ceron J, Yilmaz Z. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *J Small Anim Pract.* 2010;51(9):478-83.
44. Nivy R, Caldin M, Lavy E, Shaabon K, Segev G, Aroch I. Serum acute phase protein concentrations in dogs with spirocercosis and their association with esophageal neoplasia - a prospective cohort study. *Vet Parasitol.* 2014;203(1-2):153-9.
45. Battisti MKB, Silva DMd, Reusing MSdO, Beltrame OC, Schmidt EMdS, Fagliari JJ, et al. Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. *Cienc Rural.* 2013;43:902-7.
46. Caldin M, Tasca S, Carli E, Bianchini S, Furlanello T, Martinez-Subiela S, et al. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Vet Clin Pathol.* 2009;38(1):63-8.
47. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41(1):15-30.
48. PC N. Eletroforese – técnicas e diagnósticos. 2 ed. CR NPC, CR D, editors. São Paulo: Santos Livraria e Editora; 1999.
49. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res.* 2004;35(2):163-87.
50. Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2002;150(8):241-4.
51. Sheahan D, Bell R, Mellanby RJ, Gow AG, Friend E, Heller J, et al. Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Vet Rec.* 2010;167(23):895-9.
52. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-7.
53. Yuki M, Itoh H, Takase K. Serum α -1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. 2009. 65-71 p.

54. Sevelius E, Andersson M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. 1995. 663-7 p.
55. Hagman R. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. *Vet Clin Pathol*. 2011;40(1):52-9.
56. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry os Domestic Animals*. 6ed. Elsevier; 2008. 928p.
57. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. Pennsylvania: Lea & Febiger; 1993. p. 417.
58. Pires LSA, Dittrich RL, Souza AC, Bertol MAF, Patricio LFL. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. *Ciência Rural* [Internet]. 2011; 41:[272-7 pp.].
59. Tizard IR. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 5 ed. São Paulo: Roca; 1998. p. 545.
60. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5 ed. San Diego. 1997. p. 117-38.
61. Silva ROP, Lopes AF, Faria RMD. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. *Rev Méd Minas Gerais*. 2008:116-22.
62. Bush BM. *Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais*. Bush BM, editor. São Paulo: Roca; 2004.
63. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
64. O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. *Am Fam Physician*. 2005;71(1):105-12.
65. McPherson RA, MR P. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 22 ed. RA M, editor. Philadelphia: Saunders; 2011.
66. Anderson SC, S C. *Clinical chemistry: concepts and applications*. J. R, editor. New York: McGraw Hill; 2003.
67. Calazans SG, Daleck CR, Fagliari JJ, Repetti CF, De Nardi AB, Castro JHT, et al. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;61:1044-8.
68. Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2013.
69. Feitosa FLF. *Semiologia Veterinária - A arte do diagnóstico*. ed, editor. São Paulo: Roca; 2014. 644 p.
70. Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, Jepson RE, Papich M, Stepien RL, et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2018;32(6):1803-22.

71. Foster J. Canine Chronic Kidney Disease Current Diagnostics & Goals for Long-Term Management. 2013. 21-6 p.
72. O'Neill DG, Elliott J, Church DB, McGreevy PD, Thomson PC, Brodbelt DC. Chronic Kidney Disease in Dogs in UK Veterinary Practices: Prevalence, Risk Factors, and Survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2013;27(4):814-21.
73. Ferraudo A. *Análise Multivariada*. São Paulo: StatSoft South América; 2005.
74. Bock RD. *Multivariate statistical methods in behavioral research*. New York: McGraw-Hill; 1975.
75. Vinici L, Souza AM. *Análise Multivariada da teoria à prática*. Santa Maria. 2005. 215p.
76. Ferreira DF. *Análise multivariada*. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 1996. 400 p.
77. Romao JE, Jr., Haiashi AR, Elias RM, Luders C, Ferraboli R, Castro MC, et al. Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2006;26(1):59-66.
78. Santos IFC, Alberto DS. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. *Arq Cienc Vet Zool*. 2014; 17.1:55-62.

CAPÍTULO 2 – ESTADIAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES: UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA

RESUMO

A análise multivariada é uma ferramenta estatística que permite fazer associações de grande número de dados, reconhecendo os mais importantes e discriminantes em determinadas situações. A doença renal crônica (DRC) é uma enfermidade degenerativa que provoca inúmeras alterações clínicas e laboratoriais em cães, fazendo com que o número de exames realizados e dados a serem analisados seja muito grande. O estudo foi desenvolvido compilando e avaliando dados clínicos e laboratoriais de 142 cães com DRC nos diferentes estádios da doença para promover uma análise multivariada em relação aos sinais clínicos, concentrações de bioquímicas séricas, bem como avaliação das alterações hematológicas, urinárias e de hemogasometria. A análise objetivou verificar associações entre variáveis e discutir o que pode interferir nessas associações. Nos resultados foram observadas associações entre a progressão da doença com a intensidade dos sinais clínicos e alta relação entre a ocorrência de doenças sistêmicas nos dois últimos anos anteriores à consulta com o início da DRC. Os principais sinais clínicos observados foram poliúria, polidipsia, vômito e diarreia. A hipertensão foi um agravo importante relacionado à DRC, principalmente nos estádios mais graves. Creatinina, ureia, fósforo, cálcio total e iônico e albumina discriminaram os estádios da DRC e observou-se que o aumento da creatinina ocorreu concomitantemente à elevação da ureia e do fósforo e à redução do cálcio. Albumina e globulinas apresentaram forte correlação negativa. A acidose metabólica foi uma alteração muito comum a partir do estágio IRIS 3. Os elementos que mais se destacaram no exame de urina foram a densidade e a proteinúria.

Palavras-chave: análise de dados, caninos, estatística, nefropatia

CHAPTER 2 – STAGING OF CHRONIC RENAL DISEASE IN DOGS: A MULTIVARIATE APPROACH

ABSTRACT

Multivariate analysis is a statistical tool that allows the association of large numbers of data, recognizing the most important and determinant in certain conditions. Chronic kidney disease (CKD) is a degenerative disease that causes numerous clinical and laboratory changes in dogs, therefore, there are many exams and data to be analyzed. The study was developed by compiling and evaluating clinical and laboratory data from 142 dogs with CKD at different stages to perform a multivariate analysis including the clinical signs, serum biochemical concentrations, as well as evaluating the hematological, urinary and hemogasometric variations. The analysis aimed to find associations between variables and to discuss what could interfere in these associations. The results showed association between the progression of the disease and intensity of the clinical signs. They also showed a high ratio between the occurrence of systemic diseases during the two years prior to the clinical appointment with the onset of CKD. The most common clinical signs were polyuria, polydipsia, vomiting and diarrhea. Hypertension was an important deteriorating factor of CKD, especially in the more severe stages. Creatinine, urea, phosphorus, total and ionic calcium and albumin differentiated the stages of CKD and it was observed that the increase in creatinine occurred concomitantly with elevated urea and phosphorus and reduced calcium. Albumin and globulins showed a strong negative correlation. Metabolic acidosis was commonly found from stage IRIS 3 onwards. Proteinuria and urinary density were the most significant elements at urinalysis.

Keywords: canines, data analysis, nephropathy, statistic.

1. Introdução

A análise multivariada se propõe a reunir múltiplas variáveis em um único relacionamento ou conjunto de relações de modo a avaliar a significância prática dos resultados, ou seja, baseado em descobertas substanciais em vez de significância estatística. Isto significa avaliar na prática a utilidade e o grau de relação dos resultados e se são substanciais o bastante para converter os dados obtidos em conhecimento prático e melhorar a tomada de decisões¹.

O propósito desse tipo de análise é detectar fatores ocultos ou inobserváveis nas variáveis dentro de suas correlações. Pode auxiliar a resumir um grande número de dados em uma quantidade menor e de maior relevância. Ajuda principalmente a explicar um conjunto inteiro de variáveis¹.

Exatamente pelas características acima relatadas, buscou-se com esse estudo avaliar as associações entre as variáveis clínicas, urinárias, hematológicas, bioquímicas e de hemogasometria de cães nos diferentes estádios da DRC, por meio de análise multivariada dos dados, buscando uma nova forma de interpretar resultados laboratoriais e clínicos.

A doença renal crônica (DRC) trata-se do dano irreversível aos néfrons por degeneração celular. A enfermidade acomete principalmente cães e gatos idosos e é progressiva com o passar do tempo². Pode-se afirmar que a doença renal é crônica quando sua evolução ultrapassa três meses³.

As causas da DRC na maioria das vezes não são determinadas, visto que o diagnóstico quase sempre é realizado quando a causa iniciadora já não se encontra presente. Por possuir uma reserva funcional muito grande, os rins só demonstram sinais de comprometimento quando mais de 75% de suas unidades funcionais deixam de realizar suas atividades³.

Não existem sinais clínicos patognomônicos da DRC. É possível observar sinais relacionados ao estado geral do animal (apatia, prostração), sinais gastroentéricos (halitose, êmese e diarreia), relacionados ao apetite (hiporexia, anorexia e emagrecimento), além da poliúria, polidipsia e desidratação. No entanto, esses sinais geralmente não são observados no início do curso da doença⁴.

Diante da impossibilidade do diagnóstico somente pela avaliação clínica, é imprescindível a realização de exames laboratoriais para seja possível afirmar a presença de DRC. Em animais assintomáticos, para estabelecer o diagnóstico recomenda-se a ultrassonografia, para avaliação do tamanho e forma dos rins, urinálise, razão

proteína/creatinina urinárias (RPCU), hemograma e bioquímicas séricas como creatinina, ureia e fósforo⁵.

Após a análise conjunta dos resultados e diagnóstico da DRC deve-se promover o estadiamento da doença conforme indicação da Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS⁶), que classifica os pacientes em quatro estádios da doença: estágio I: não-azotêmico; estágio II: azotemia renal discreta; estágio III: azotemia renal moderada e estágio IV: azotemia renal severa.

Conhecer os diferentes estádios da DRC vai além de classificar o paciente de acordo com suas concentrações séricas de creatinina. É preciso associar as variáveis hematológicas, urinárias, bioquímicas e de hemogasometria com os sinais clínicos observados, bem como com o prognóstico e a expectativa de estabilização da doença e qualidade de vida do paciente.

Com esta pesquisa objetivou-se realizar uma análise multivariada dos resultados de exames clínicos e laboratoriais de cães com DRC nos diferentes estádios da doença, a fim de observar quais as variáveis que mais discriminam os diferentes grupos.

2. Material e métodos

2.1. Amostragem

Os cães utilizados nessa avaliação foram o somatório da amostragem de três diferentes estudos realizados no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV-UFG), Goiânia.

A primeira amostragem, composta pelos resultados de 12 pacientes com DRC foi obtida no período de agosto 2009 a junho 2011 (dissertação⁷), em estudo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEUA/UFG) e registrado sob o número 007/10. A segunda amostragem incluiu o resultado de 65 pacientes com DRC acompanhados entre os anos de 2013 a 2015 (dissertação⁸/tese⁹), também aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEUA/UFG) e registrado sob o número 072/2013.

Para completar essa amostragem, foram avaliados, entre os anos de 2016 e 2018, 65 cães machos e fêmeas com idades variadas, pertencentes a tutores (domiciliados), encaminhados por veterinários do HV-UFG e de outras clínicas da cidade de Goiânia. Essa etapa também foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEUA/UFG) e registrado sob o número 007/16.

Os pacientes foram ordenados de acordo com o estadiamento IRIS⁶. O tratamento para DRC foi prescrito a todos os pacientes de acordo com as recomendações da IRIS⁶ e foram marcados retornos mensais. Como forma de estimular o retorno, o tutor foi informado que os exames seriam gratuitos para os pacientes que ingressassem no estudo.

2.2. Anamnese e exame clínico

Em cada atendimento os tutores dos cães foram submetidos à anamnese, com objetivo de obter informações sobre o estado geral do animal, comportamento, alimentação, ingestão de água, micção, medicações em uso e doenças anteriores.

O exame clínico constituiu da avaliação de pele e pelos, turgor cutâneo, linfonodos, tempo de preenchimento capilar (TPC), avaliação das mucosas, cavidade oral, olhos, auscultação cardíaca e pulmonar, frequências cardíaca e respiratória, tipo de movimento respiratório, pulso, palpação renal e abdominal, temperatura retal e escore de condição corporal.

A avaliação dos animais ainda contou com mensuração da pressão arterial, colheita de sangue e urina para realização dos seguintes exames laboratoriais: hemograma, exame de urina, quantificação de creatinina, ureia, proteína total, albumina, colesterol, cálcio, fósforo, sódio e potássio, determinação da razão proteína/creatinina na urina e hemogasometria.

2.3. Critérios de inclusão

Foram utilizados como critérios de inclusão a presença de proteinúria persistente (razão proteína/creatinina urinária $>0,5$) ou hipertensão persistente sem outra causa diagnosticada (pressão arterial sistólica >150 mmHg), alteração renal ultrassonográfica compatível com DRC ou azotemia persistente (creatinina sérica $>1,4$ mg/dL). Para os pacientes do estágio 1, os quais não apresentam azotemia, foi realizada a confirmação da proteinúria por meio de três avaliações consecutivas da razão PU/CU com intervalo de uma semana. A proteinúria foi considerada apenas na ausência de sedimento urinário ativo. Pacientes nos estágios 2, 3 e 4, foram encaminhados para o estudo com diagnóstico prévio, sendo incluídos no estudo somente com uma avaliação, porém após estáveis clinicamente.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam quadro de injúria renal aguda e/ou alguma doença infecciosa.

2.4. Avaliações laboratoriais

As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG.

Para o hemograma foram obtidos 2 mL de sangue por venopunção jugular ou cefálica em tubo com etilenodiaminotetracetato (EDTA). A contagem das células sanguíneas foi determinada pelo método automático utilizando-se o analisador hematológico por metodologia de impedância. A contagem diferencial de leucócitos foi determinada por meio da leitura de esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido e avaliados em microscopia de luz.

Para as análises de bioquímicas séricas foram obtidos 5,0 mL de sangue por venopunção jugular em tubo sem anticoagulante, que foi centrifugado após retração do coágulo. Em seguida, o soro foi dividido em alíquotas, armazenadas em microtubos de polipropileno de 1,5 mL (Eppendorf®, Alemanha) e submetidas ao congelamento (-20° C) até o momento da realização dos exames.

Para cada metabólito analisado foram utilizados reagentes comerciais padronizados (Labtest® - Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa-MG), com metodologias cinéticas, enzimáticas ou colorimétricas, em temperatura de 37°C, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro analisador bioquímico automático CM 200® (Wiener Lab Group, Rosário, Argentina).

A quantidade de ureia foi determinada por meio de método enzimático colorimétrico, por reação com a urease. A creatinina sérica e urinária foi determinada por método colorimétrico, por reação com o picrato alcalino. Para a mensuração da creatinina urinária utilizou-se diluição da urina nas proporções de 1:25 sendo os resultados da leitura multiplicados por 25.

A proteína sérica total foi determinada por método colorimétrico, por reação com o biureto. A albumina foi avaliada por meio de método colorimétrico, por reação com o verde de bromocresol. As globulinas foram calculadas pela diferença entre o valor de proteína total e albumina. A determinação da concentração de proteína urinária foi realizada utilizando-se método colorimétrico, por reação com o vermelho de pirogalol.

O fósforo e o cálcio sérico total foram analisados pelo método colorimétrico, por reações com o molibdênio e a púrpura de ftaleína, respectivamente.

As amostras de 10 mL de urina foram obtidas por cistocentese ou cateterismo vesical. A análise da urina foi realizada logo após a colheita e compreendeu exame físico, químico e microscópico. O exame físico avaliou volume, cor, aspecto, odor e densidade. O

exame químico consistiu na avaliação do pH, de proteína, glicose, cetonas, bilirrubina, hemácias, hemoglobina, urobilinogênio, nitrito e leucócitos empregando tiras reagentes (Biocolor, Bioeasy Diagnóstica Ltda, Belo Horizonte-MG). A densidade urinária foi determinada em refratômetro portátil. O exame microscópico avaliou o sedimento quanto aos componentes: hemácias, leucócitos, cilindros, bactérias, leveduras, parasitos, cristais, células renais, células pélvicas, células de transição, células de descamação, filamentos de muco e artefatos.

Para a obtenção da RPCU, os valores obtidos nas mensurações de proteína e creatinina na urina foram aplicados na seguinte fórmula:

$$\text{RPCU} = \frac{\text{Proteína urinária (mg/dL)}}{\text{Creatinina urinária (mg/dL)}}$$

2.5. Hemogasometria venosa

Para a gasometria venosa foram obtidos 2,0 mL de sangue por venopunção da jugular em seringas heparinizadas (Blood Gas Monovette® - Sarstedt, Alemanha). As amostras foram processadas imediatamente após a colheita, em tempo inferior a 10 minutos.

A temperatura das amostras foi levada em consideração para a programação e calibração do hemogasômetro Cobas 221 (Roche®, Estados Unidos) e foram avaliados os seguintes parâmetros: pH, pO₂, pCO₂, HCO₃, *anions gap*, déficit ou excesso de bases, cálcio iônico, sódio, potássio e cloro.

2.6. Mensuração da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica foi mensurada com o cão em decúbito lateral direito nas artérias da região do metacarpo por meio de esfigmomanômetro e aparelho de Doppler (Doppler Vascular Portátil Veterinário Modelo DV 610®, Medmega Indústria de Equipamentos Médicos Ltda, Franca, Brasil). Os manguitos utilizados compreenderam larguras de aproximadamente 40% da circunferência do membro no sítio de colocação dos mesmos. A aferição da pressão arterial foi realizada após ambientação do paciente e antes do exame físico, a fim de evitar o estresse do paciente. Para cada cão foram realizadas cinco determinações, onde os valores extremos foram descartados e foi registrada a média das três intermediárias. Os exames foram realizados após treinamento e padronização prévios.

2.7. Divisão em grupos

Após a realização das consultas e exames laboratoriais, os animais foram divididos em quatro grupos conforme o estadiamento IRIS pelas concentrações séricas de creatinina. No quadro 1 está detalhado o quantitativo da amostragem.

QUADRO 1 – Quantitativo do número de cães obtidos em cada amostragem e em cada estágio IRIS para DRC.

	Amostragem 1	Amostragem 2	Amostragem 3	Total
IRIS 1	1	4	15	20
IRIS 2	0	9	16	25
IRIS 3	5	25	15	45
IRIS 4	6	27	19	52
TOTAL	12	65	65	142

2.8. Tratamento

Por se tratarem de cães domiciliados e com DRC naturalmente adquirida, o tratamento foi prescrito de forma individualizada para cada paciente de acordo com as recomendações da IRIS conforme os sinais clínicos apresentados por cada um.

2.9. Análise estatística

Os registros de avaliações clínicas e laboratoriais de cada animal foram dispostos em tabela e submetidos à análise multivariada de componentes para o estudo das associações entre as variáveis. Os resultados foram graficamente expressos, sem testes de inferências. A representação gráfica das variáveis, após o cálculo dos eixos fatoriais, foi expressa no espaço por meio de coordenadas e apresentam valor que varia de 0 a 1, que corresponde à sua associação com cada coordenada.

Os dados utilizados para análise de parâmetros clínicos foram a presença de hiporexia, polidipsia, poliúria, vômito, diarreia, doenças sistêmicas apresentadas pelos animais nos dois últimos anos anteriores à consulta, desidratação, palidez de mucosas e se o animal encontrava-se alerta durante a consulta. Outra análise multivariada realizada comparou as relações entre a creatinina e pressão arterial sistólica, hematócrito, hemácias, hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais, bastonetes, neutrófilos, linfócitos, monócitos, albumina, globulinas, ureia, cálcio, fósforo, sódio, potássio, densidade urinária, RPCU, pH sanguíneo, concentração de bicarbonato de sódio, excesso de bases, ânions gap, cloro e cálcio iônico.

3. Resultados e discussão

Os dados clínicos comparados entre os grupos IRIS 1 (I-1), IRIS 2 (I-2), IRIS 3 (I-3) e IRIS 4 (I-4) foram hiporexia, polidipsia, poliúria, vômito, diarreia, doença nos dois últimos anos, grau de atividade (alerta), desidratação e coloração de mucosas.

Conforme pode ser observado na figura 1, os animais nos estádios I-1 e I-2 encontravam-se mais alertas. No estágio IRIS 1 não é comum a ocorrência de sinais clínicos¹⁰. No entanto, grande parte desses animais apresentou alguma doença nos dois últimos anos, podendo ser essa enfermidade a possível causa que levou ao surgimento da DRC. Geralmente o surgimento da doença está ligado à idade ou como consequência de outras enfermidades como como pielonefrite, diabetes melitus, nefrolitíase, glomeruloesclerose, ureterolitíase, entre outras³.

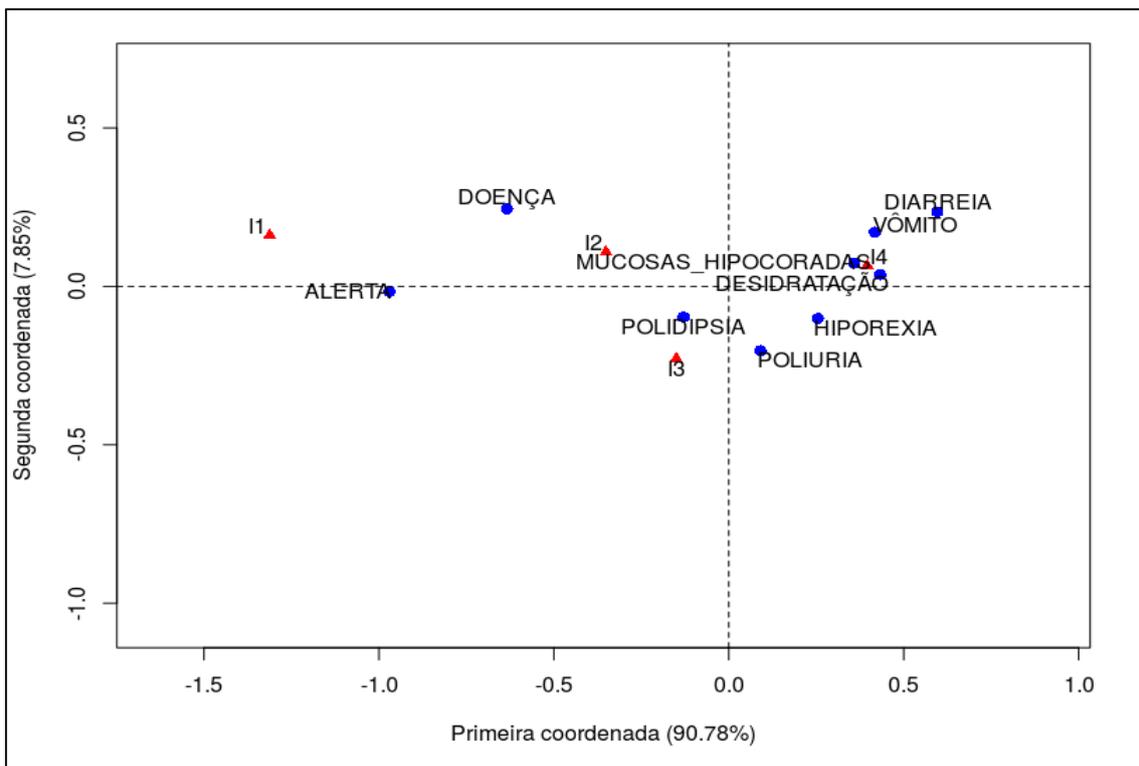


FIGURA 1 – Gráfico de dispersão da análise multivariada dos sinais clínicos nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães. Doença = doenças sistêmicas observadas nos dois últimos anos que antecederam a consulta, I1= IRIS 1, I2= IRIS 2, I3= IRIS 3. I4= IRIS 4.

Polidipsia e poliúria estão mais relacionadas com os grupos I-3 e I-4. Geralmente no estágio 2 esses são os únicos sinais de alteração renal observados¹⁰.

No estágio IRIS 3 pode-se observar hiporexia. Nesse estágio é que os sinais clínicos tendem a ficar mais evidentes e o tratamento deve ser instituído o mais rápido possível¹⁰.

No grupo I-4 é evidente o aumento do número de sinais clínicos como vômito, diarreia, desidratação e anemia (representada por mucosas hipocoradas). A desidratação observada é uma consequência da poliúria mais intensa que a polidipsia e das perdas gastrintestinais¹⁰.

Alterações gastrintestinais são os sinais clínicos mais frequentes e evidentes em caso de uremia. Como causas de vômito na DRC pode-se citar a diminuição da excreção de gastrina (resultando no aumento da secreção de ácido gástrico) e irritação gastrintestinal secundária à vasculite urêmica. Como a gastroenterite urêmica pode ser ulcerativa, por vezes pode ocorrer hematêmese e melena³.

Nessa última fase da doença o risco de morte é iminente, pois o rim se encontra em quadro de falência, apresentando síndrome urêmica. Indica-se tratamento hospitalar, mas o prognóstico nessa fase é desfavorável¹⁰. A síndrome urêmica é o quadro sintomático mais grave do doente renal crônico que resulta da falha de todas as funções exercidas pelos rins, tratando-se de uma síndrome multissistêmica com sinais clínicos avançados de vômito, diarreia, inapetência, depressão, letargia, fraqueza, falta de interação social e perda de peso¹¹. Este termo foi criado pois acreditava-se que a ureia era o único responsável pelos sinais clínicos. No entanto hoje sabe-se que além da ureia, o fósforo e o PTH, têm sido considerados importantes compostos que contribuem para a morbidade e mortalidade dos pacientes, além das demais falhas em funções metabólicas e endócrinas dos rins^{12, 13}.

Na análise multivariada, com o gráfico de vetores (Figura 2), é possível observar estatisticamente, que quanto mais sinais clínicos o animal apresenta, mais distante ele fica de ter um comportamento “alerta”. Os sinais clínicos de vômito, diarreia e desidratação avançam em mesma proporção, próximos da redução do apetite. Também fica evidente pelo gráfico que os sinais de poliúria e polidipsia seguem lado a lado, sendo mais evidentes nos estádios I3 e I4.

Houve forte correlação entre poliúria e polidipsia e entre vômito e diarreia, sendo esses sinais os principais causadores de desidratação nesses pacientes. A poliúria ocorre principalmente pela deficiente reabsorção de água pelos túbulos renais, sendo a polidipsia um sinal compensatório, na tentativa de evitar ou reduzir a desidratação¹⁰.

Também pode-se correlacionar de forma importante os sinais gastrintestinais com mucosas hipocoradas e desidratação. O vômito e a diarreia ocasionam grande perda de líquidos,

gerando a desidratação. A anemia da DRC é multifatorial, incluindo, além da deficiência de eritropoietina, a perda de vitaminas do complexo B e hemorragias gastrintestinais^{2, 14}.

A pressão arterial sistólica (PAS) e exames laboratoriais obtidos desses pacientes foram avaliados e selecionados para a análise multivariada, como dados hematológicos (hematócrito, hemácias, hemoglobina, plaquetas, leucócitos totais, bastonetes, neutrófilos, linfócitos e monócitos), bioquímicas séricas (proteínas totais, albumina, globulinas, creatinina, ureia, fósforo e cálcio total), parâmetros urinários (densidade urinária, pH urinário e razão proteína/creatinina urinárias) e dados de hemogasometria e eletrólitos (pH sanguíneo, bicarbonato de sódio, excesso de bases, ânions gap, sódio, potássio, cloro e cálcio iônico). As médias e desvios-padrões estão apresentadas na Tabela 1.

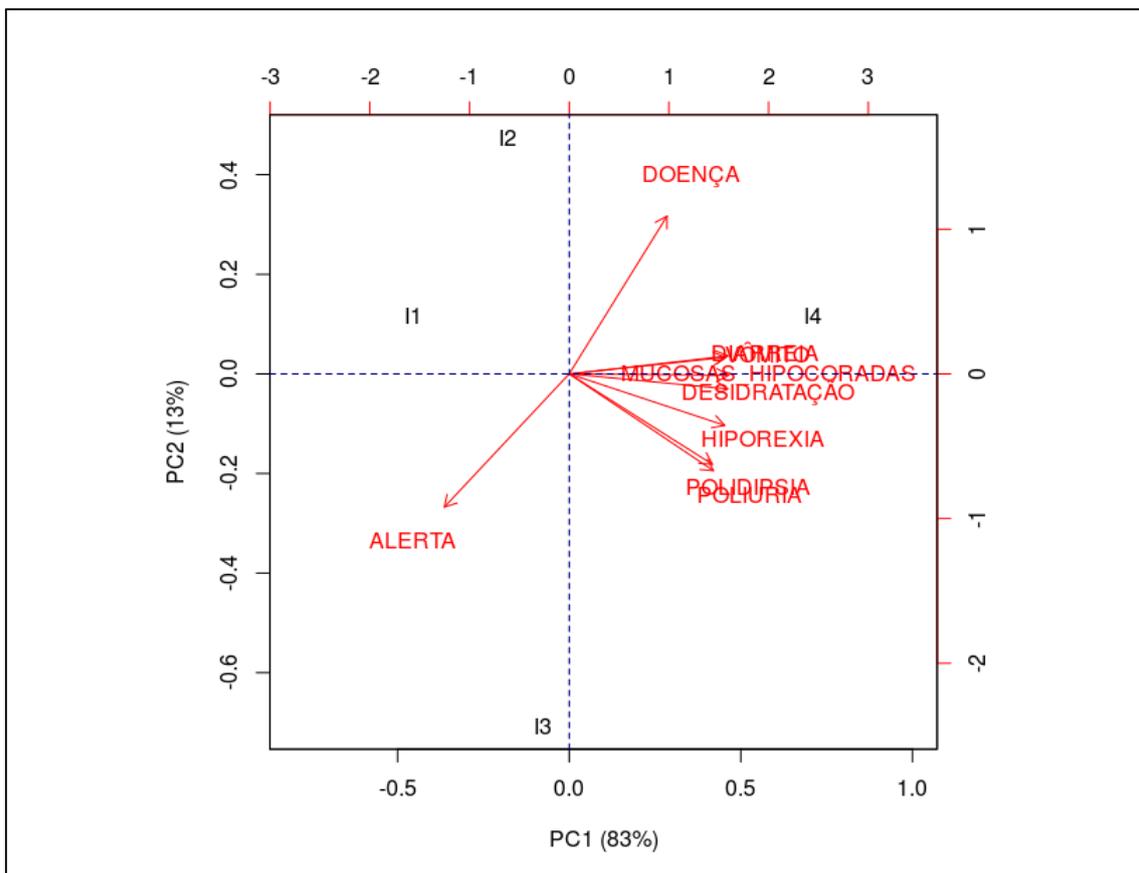


FIGURA 2 – Gráfico de vetores da análise multivariada dos sinais clínicos nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães

Na análise multivariada da bioquímica sérica (Figura 3), foi possível observar que o aumento de ureia e creatinina ocorreram em conjunto e foram proporcionais, seguidos do fósforo, todos com as maiores elevações no estágio IRIS 4. Esse resultado reforça a importância da quantificação do fósforo no prognóstico do paciente, pois esse composto tem se mostrado um dos principais fatores para a progressão da DRC, associada diretamente à morbidade e mortalidade dos pacientes nos estágios finais da doença¹⁵. O fósforo sérico está estreitamente relacionado com o surgimento do hiperparatireoidismo secundário renal, com a calcificação vascular e afetando a qualidade óssea^{16, 17}. Geralmente, os aumentos significativos das concentrações de fósforo acontecem a partir do estágio 3 da DRC¹⁸.

TABELA 1 – Médias e desvios-padrões de análises laboratoriais e de pressão arterial sistólica (PAS) avaliados em 142 cães com doença renal crônica nos diferentes estádios da doença

	IRIS 1	IRIS 2	IRIS 3	IRIS 4
PAS (mmHg)	143 ± 18	164 ± 39	170 ± 29	160 ± 37
Hematócrito (%)	44,29 ± 7,64	39,99 ± 9,43	34,04 ± 12,11	28,51 ± 11,35
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	6,17 ± 1,08	5,82 ± 1,36	5,00 ± 1,74	4,17 ± 1,75
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	423 ± 173	511 ± 191	417 ± 211	356 ± 185
Leucócitos totais (/mm ³)	8323 ± 2303	8598 ± 4505	8354 ± 3450	10909 ± 5322
Bastonetes (/mm ³)	42 ± 48	53 ± 65	37 ± 70	61 ± 78
Neutrófilos segmentados (/mm ³)	5819 ± 2413	2899 ± 4472	5546 ± 2479	6686 ± 3860
Linfócitos (/mm ³)	1859 ± 1199	2488 ± 2518	1543 ± 1706	1275 ± 1834
Monócitos (/mm ³)	416 ± 305	794 ± 689	680 ± 625	718 ± 643
Proteínas Séricas Totais (g/dL)	8,70 ± 1,57	7,93 ± 1,91	7,98 ± 1,95	7,12 ± 1,83
Albumina (mg/dL)	3,59 ± 0,65	2,82 ± 0,78	2,38 ± 0,83	2,34 ± 0,67
Globulina (mg/dL)	5,11 ± 1,42	5,11 ± 1,89	5,61 ± 1,72	4,78 ± 1,81
Creatinina (mg/dL)	0,78 ± 0,29	1,91 ± 0,63	3,74 ± 4,59	10,31 ± 4,67
Ureia (mg/dL)	50,13 ± 22,46	106,04 ± 51,92	140,27 ± 82,05	371,02 ± 64,48
Cálcio total (mg/dL)	10,42 ± 1,26	10,36 ± 1,13	9,92 ± 1,78	8,97 ± 2,22
Fósforo (mg/dL)	4,45 ± 2,18	4,42 ± 1,53	6,20 ± 3,02	16,67 ± 8,58
Colesterol (mg/dL)	269,45 ± 54,21	205,35 ± 89,13	195,57 ± 99,52	213,72 ± 10,12
Sódio (mg/dL)	141,39 ± 12,29	137,72 ± 14	142,98 ± 17,99	142,55 ± 32,16
Potássio (mg/dL)	4,34 ± 0,75	4,54 ± 0,65	4,60 ± 0,72	4,59 ± 1,1
DU	1,026 ± 0,01	1,019 ± 0,01	1,015 ± 0,01	1,013 ± 0
PhUri	6,01 ± 0,81	5,51 ± 0,62	5,61 ± 0,83	5,49 ± 0,76
RPCU	1,18 ± 0,84	1,62 ± 1,6	1,83 ± 2,58	2,20 ± 2,02
phSang	7,27 ± 0,48	7,19 ± 0,74	7,37 ± 0,05	7,29 ± 0,09
[HCO ₃] (mmol/dL)	22,50 ± 1,85	20,58 ± 3,45	20,04 ± 3,99	16,33 ± 4,17
Be	-1,78 ± 2,25	-3,75 ± 3,81	-4,58 ± 3,94	-9,31 ± 5,12
Ag	17,51 ± 3,69	18,18 ± 4,03	19,41 ± 3,91	20,92 ± 8,96
Na ⁺ (mg/dL)	148,45 ± 12,21	145,33 ± 8,7	146,59 ± 40,2	147,08 ± 4,8
K ⁺ (mg/dL)	4,18 ± 0,27	4,66 ± 0,49	4,61 ± 0,64	4,87 ± 0,91
Cl ⁻ (mg/dL)	110,90 ± 3,25	113,10 ± 5,31	111,69 ± 3,46	112,71 ± 8,24
iCa (mg/dL)	1,33 ± 0,11	1,34 ± 0,09	1,30 ± 0,11	0,99 ± 0,21

PAS: pressão arterial sistólica; DU: densidade urinária; RPCU: razão proteína/creatinina urinárias; [HCO₃]: concentração de bicarbonato de sódio; Be: *base excess*; Ag: *ânions gap*, Na⁺: sódio; K⁺: potássio; Cl⁻: cloro; iCa: cálcio iônico.

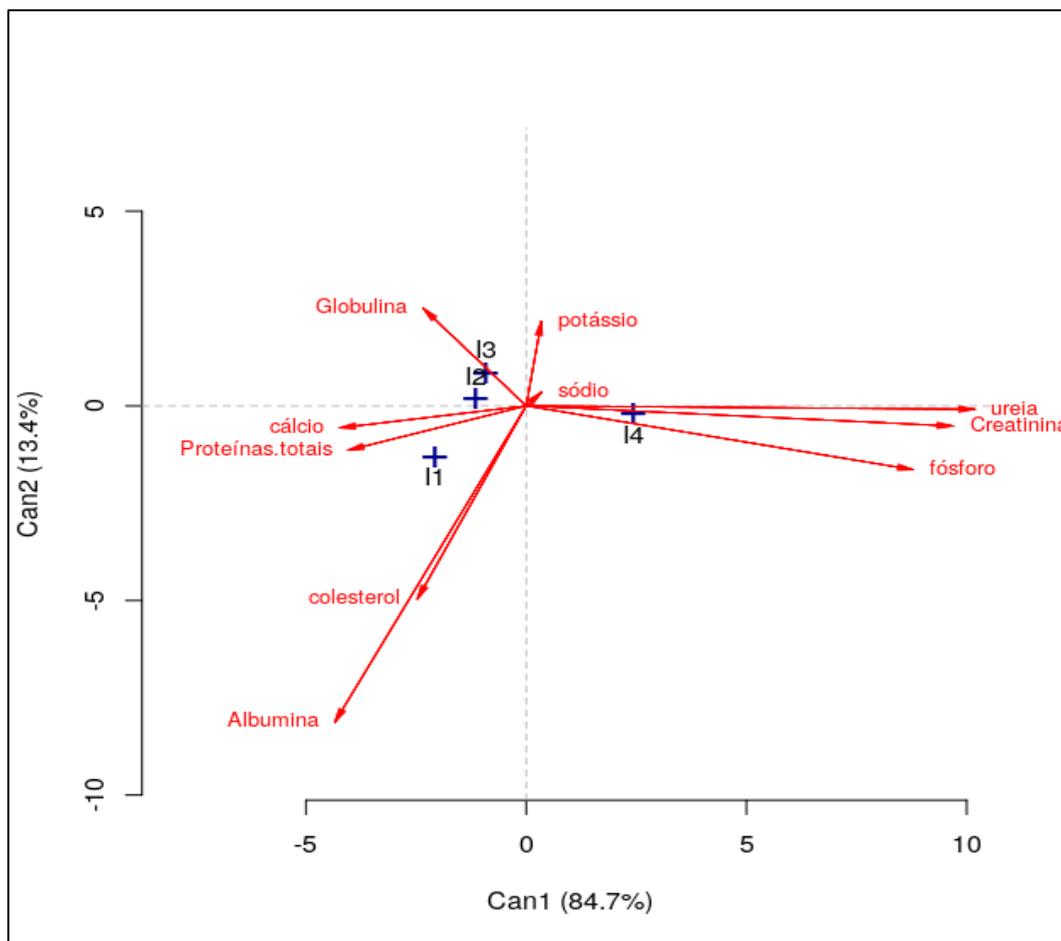


FIGURA 3 – Gráfico de vetores da análise multivariada das bioquímicas séricas nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães

Creatinina, ureia e fósforo possuem alta correlação positiva. Assim como mostraram outros estudos^{7, 19-21}. E são as variáveis mais importantes na definição dos grupos. À medida que a TFG diminui, as concentrações desses metabólitos aumentam¹⁸. A creatinina é o marcador principal pois ela estima a redução da TFG e é altamente específica²². Já a ureia pode estar alterada pela redução de função renal ou por outros fatores como fome, febre, queimaduras e também no uso de medicamentos como glicocorticoides e azatioprina²³.

O cálcio total possui correlação negativa com ureia, creatinina e fósforo, estando dentro da normalidade nos estádios IRIS 1, 2 e 3 e mais baixo no estágio IRIS 4. Na literatura não há um consenso sobre o comportamento do cálcio na DRC, sendo em alguns casos observada normocalcemia, e em outros hipo ou hipercalcemia^{19, 20}. Desse modo, o cálcio total não se mostra um bom componente de avaliação, sendo mais interessante a quantificação da forma iônica.

A albumina também é uma importante variável na discriminação dos grupos IRIS. Ainda na figura 3 observa-se correlação negativa entre albumina e globulinas e que os valores

de albumina estão maiores nos animais no estágio IRIS 1, enquanto a globulina segue em direção oposta, sendo mais acentuada em IRIS 2 e 3, indicando presença de inflamação sistêmica nesses indivíduos²⁴.

Proteínas totais séricas apresentam correlação negativa com ureia, creatinina e fósforo, sendo os valores de proteínas mais baixos no grupo IRIS 4. Isto se deve principalmente à redução da albumina. A diminuição da albumina sérica a partir do estágio 2 se justifica pela proteinúria, que culmina com perda desta proteína pelos glomérulos²⁵, e pela redução da ingestão calórico-proteica, o que ocorre com pacientes que apresentaram hiporexia/anorexia e perda de peso²⁶.

Albumina e colesterol apresentaram forte correlação positiva e com valores normais em IRIS 1, mais elevados que os demais grupos, demonstrando que a síndrome nefrótica não foi um diagnóstico importante nesse estudo, pois nessa síndrome albumina e colesterol apresentam concentrações séricas inversamente proporcionais²⁷.

Sódio e potássio são variáveis inertes que não discriminam os grupos. Isto porque os valores de sódio podem estar normais, levemente aumentados ou diminuídos na DRC²⁸. A literatura também é divergente quanto ao comportamento do potássio na DRC em cães. É relatado que pode ocorrer hipercalemia nos estádios mais graves e também que não há diferenças entre animais saudáveis e doentes renais^{7, 21}.

Na figura 4 observa-se que a creatinina é a variável canônica, ou seja, a variável que mais se diferencia entre os grupos. Por isso ela é considerada o principal marcador de função renal¹⁸ e também o principal critério para o estadiamento IRIS⁶.

A correlação entre creatinina e hematócrito e hemoglobina é negativa, Sendo os maiores valores de hematócrito, hemoglobina e hemácias observadas nos estádios IRIS 1 e 2. Na DRC é comum a ocorrência de anemia não regenerativa normocítica e normocrômica, que ocorre por causa da deficiência de eritropoietina, agravada pela supressão da eritropoiese e/ou aumento da hemólise devido ao excesso de toxinas urêmicas circulantes²⁹, além deficiência de ferro, perdas gastrintestinais e falhas nutricionais³⁰. A gravidade da anemia na DRC é proporcional à diminuição da função renal³¹, sendo observado que nos estádios mais avançados da DRC a anemia tende a ser mais intensa, comprometendo a qualidade de vida principalmente nos estádios 3 e 4, podendo ocorrer em mais de 90% dos animais nessas fases¹⁰.

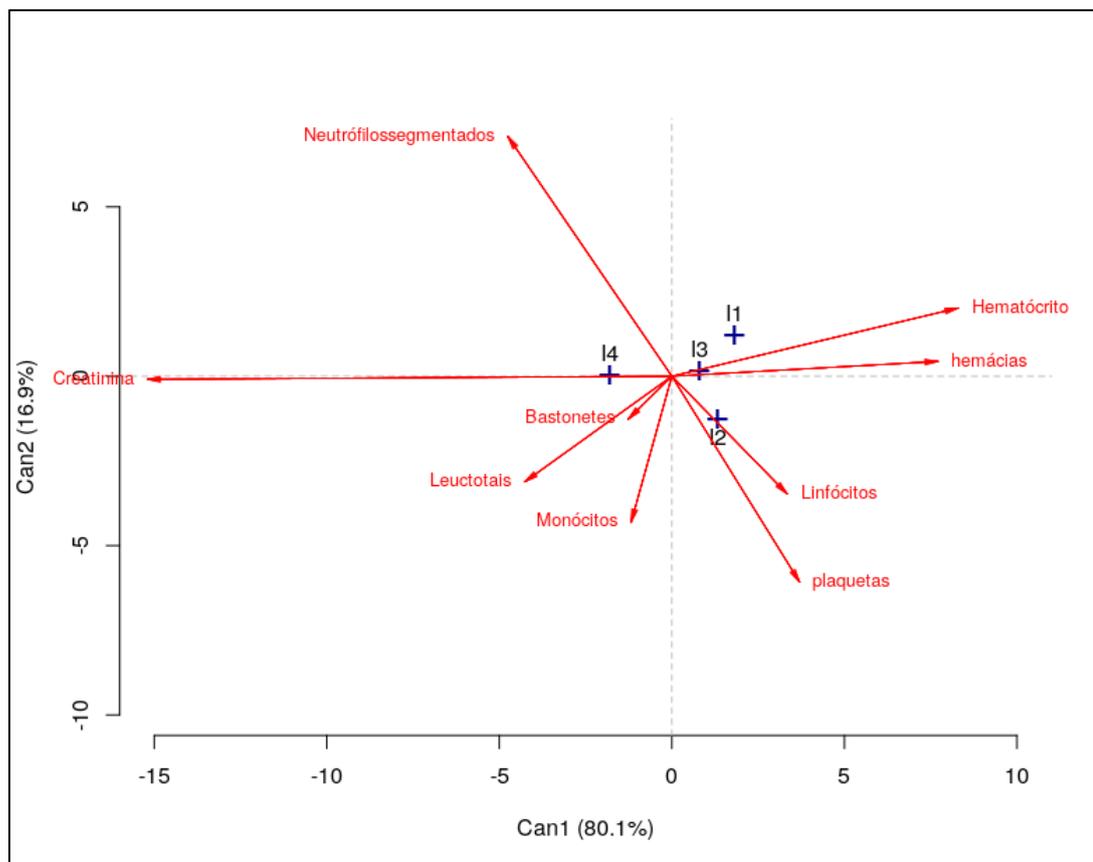


FIGURA 4 – Gráfico de vetores da análise multivariada dos dados hematológicos em relação à creatinina nos diferentes estádios da DRC em cães

Observa-se valores mais elevados de plaquetas no estágio IRIS 2. No entanto, a produção de plaquetas e fatores de coagulação geralmente é normal em pacientes com DRC³². Embora possa haver um defeito qualitativo e a função plaquetária possa estar alterada na uremia³³.

Leucócitos totais, bastonetes, monócitos e linfócitos são variáveis de pouca interferência entre os estádios da DRC. Os neutrófilos segmentados apresentaram-se mais elevados no estágio IRIS 4. No entanto, é relatado que as toxinas urêmicas podem tornar os leucócitos mais suscetíveis à apoptose, principalmente neutrófilos³⁴.

A figura 5 aponta que há forte correlação positiva entre pH sanguíneo CHCO_3 e BE, sendo esses valores mais altos nos cães em IRIS 1, indicando normalidade na função de equilíbrio ácido-base desses pacientes. Nos estádios mais avançados acontece a queda do bicarbonato e das bases, causando acidose metabólica, com consequente redução do pH sanguíneo³⁵. A acidose metabólica surge na progressão da DRC pela perda da capacidade renal de excreção de íons H^+ e, juntamente com a dificuldade de reabsorção tubular do bicarbonato filtrado³⁶. Os principais sinais relacionados são: anorexia, náuseas, vômito, letargia, debilidade, atrofia muscular, perda de peso e desnutrição³⁵.

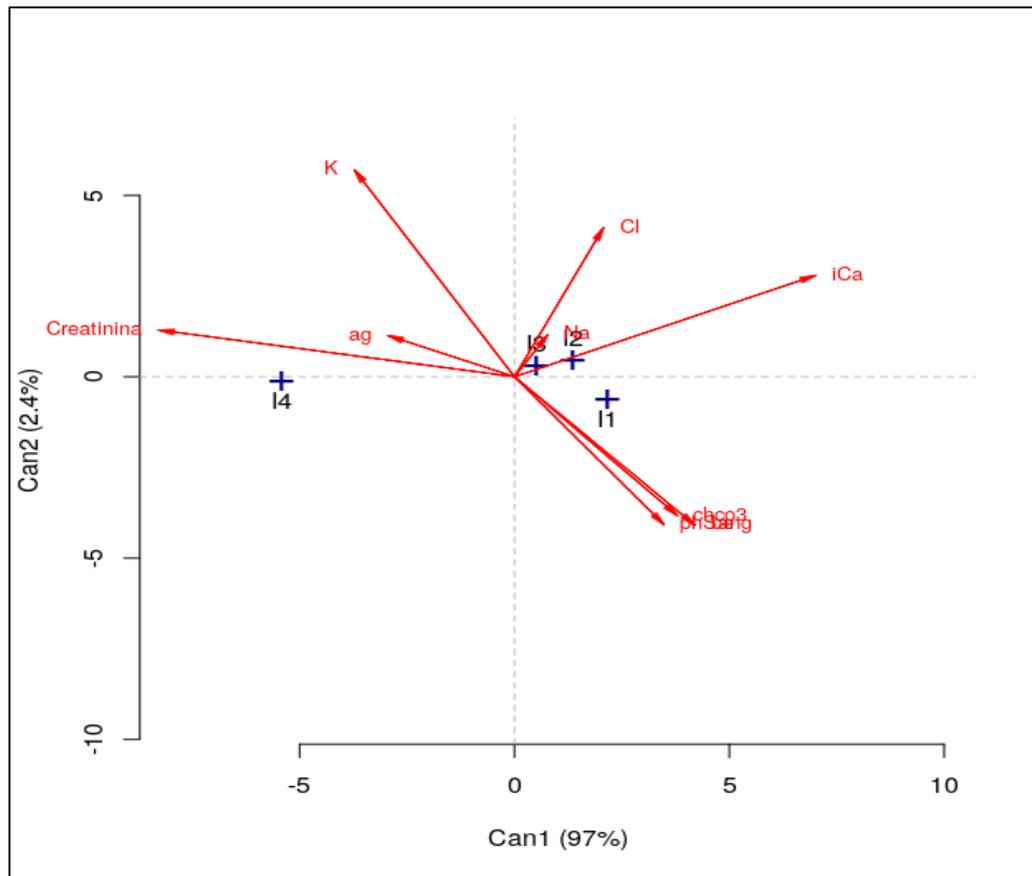


FIGURA 5 – Gráfico de vetores da análise multivariada de variáveis hemogasometria em relação à creatinina nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães

A correlação entre HCO₃ e BE com AG é forte e negativa. Assim como a correlação dos dois primeiros com a creatinina. Para diagnosticar acidose metabólica é necessário avaliar o pH sanguíneo juntamente com HCO₃, BE e AG. O termo *anions gap* (AG) é utilizado para mensurar a diferença entre cátions e ânions no plasma sanguíneo, sendo possível por sua mensuração diferenciar o tipo de acidose: normoclorêmica ou hiperclorêmica³⁷. Quando o HCO₃ está reduzido e o AG aumentado sugere-se acidose normoclorêmica primária (acúmulo de ácidos orgânicos³⁶). O grupo IRIS 4, com os valores mais altos de creatinina, também apresenta os maiores valores de AG.

O cálcio iônico (iCa) apresenta-se mais elevado nos estádios iniciais da DRC em cães e reduzido nos estádios avançados, nos quais a hiperfosfatemia está presente. O decréscimo do iCa ocorre pela tentativa do organismo em manter estável o produto cálcio x fósforo³⁸, mesmo diante da hiperfosfatemia, a fim de evitar calcificações ectópicas ou mesmo renal³⁹. A redução do cálcio iônico também está relacionada com a redução da sobrevivência¹².

A pressão arterial sistólica (PAS) e a densidade urinária (DU), se destacaram, juntamente com a creatinina, como fatores discriminantes dos grupos e são correlacionados negativamente (figura 6). A hipertensão ocorre na maioria dos cães com DRC e possui como causas a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, alteração da função endotelial, retenção de sódio, cicatrização de arteríolas e redução da produção renal de vasodilatadores. E pode ter como consequências graves lesões nos próprios rins, cérebro, olhos e sistema cardiovascular⁴⁰.

A DU reduz conforme a progressão da DRC, devido à incapacidade dos rins para concentrar adequadamente a urina e refletindo o sinal clínico de poliúria⁴¹.

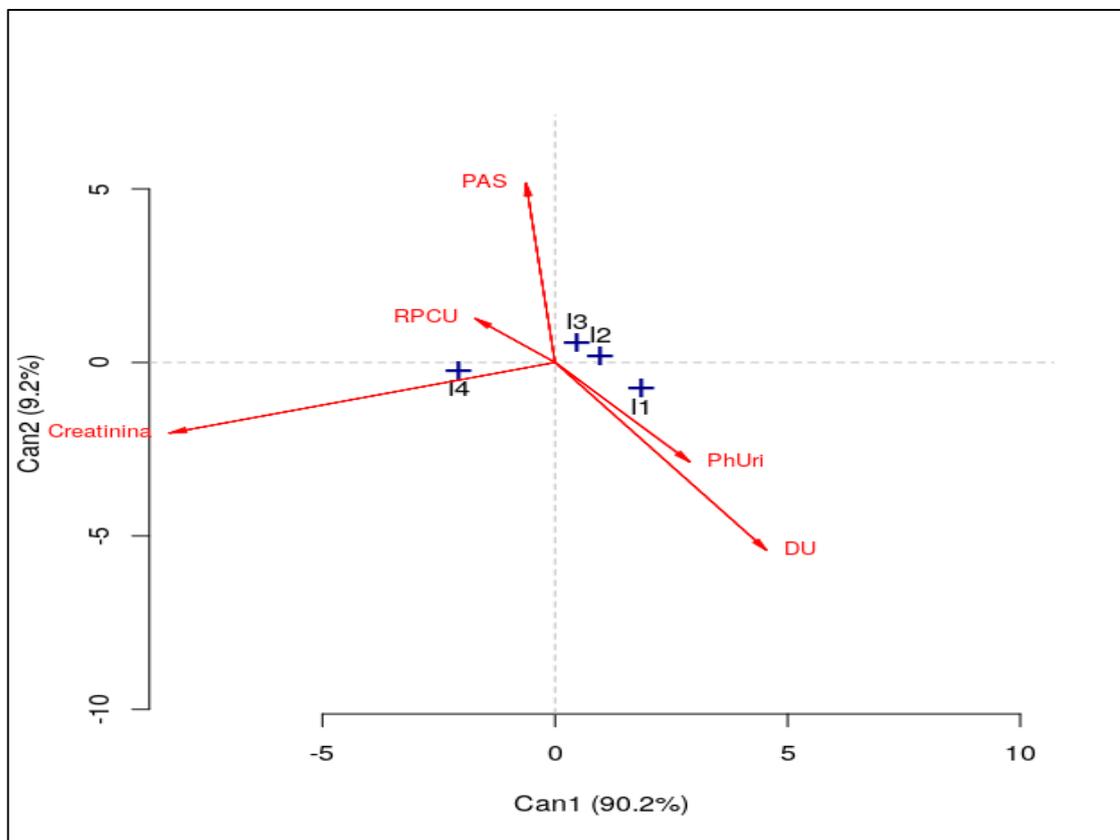


FIGURA 6 – Gráfico de vetores da análise multivariada de variáveis urinárias e de pressão arterial em relação à creatinina nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães

A proteinúria (RPCU) foi pouco discriminante entre os estádios. Esta alteração, quando persistente, permite a avaliação da perda de proteínas pela urina, podendo ocorrer em qualquer estágio, mas pode indicar progressão e gravidade da doença^{6, 25}.

A correlação entre densidade urinária e proteinúria é forte e negativa. A proteinúria além de poder ser utilizada no diagnóstico, também é um importante fator perpetuante da

doença, causando progressão de lesões glomerulares e túbulo-intersticiais, ocasionando perda de néfrons²⁵. Animais proteinúricos tem pior prognóstico do que os não-proteinúricos¹⁵.

A proteinúria também possui correlação positiva com a hipertensão arterial. Em outros estudos esta correlação também foi observada, e a associação entre proteinúria e hipertensão demonstram pior prognóstico para o paciente⁴².

Neste estudo o pH urinário se mostrou pouco discriminante entre os grupos. No entanto, outros estudos comparando animais com DRC e saudáveis, observaram menor média de pH dos animais doentes^{7, 19}.

No Brasil, são escassos os estudos que analisam os sinais clínicos e alterações em exames laboratoriais nos diferentes estádios da DRC, principalmente correlacionando-os e evidenciando os fatores de maior importância para discriminação dos estádios.

4. Conclusão

Existe alta relação entre a ocorrência de doenças sistêmicas nos dois últimos anos anteriores à consulta com o início da DRC em cães. Os principais sinais clínicos da DRC são poliúria, polidipsia, vômito e diarreia, sendo todos eles correlacionados positivamente. A hipertensão é um agravo importante na DRC, principalmente nos estádios mais graves.

Creatinina, ureia, fósforo, cálcio e albumina discriminam os estádios da DRC e devem ser quantificados em todos os pacientes. O aumento da creatinina ocorre concomitantemente à elevação da ureia e do fósforo e à redução do cálcio. Albumina e globulinas possuem forte correlação negativa. Sódio, potássio e leucócitos não discriminam os estádios da DRC em cães.

A hemogasometria deve ser realizada nos pacientes com DRC pois a acidose metabólica é uma alteração muito comum a partir do estágio IRIS 3.

Os elementos mais importantes do exame de urina são a densidade urinária e a RPCU, com forte correlação negativa entre densidade urinária e proteinúria.

Referências

1. Hair JF, Black WC, Babin BaJ, Anderson RE, L. TR. Análise multivariada de dados. 6 ed. 6, editor. São Paulo: Bookman; 2009. 688 p.
2. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2012;42(4):669-92.

3. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41(1):15-30.
4. Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2013. 23(2):205-15.
5. Cowgill LD, Polzin DJ, Elliott J, Nabity MB, Segev G, Grauer GF, et al. Is progressive chronic kidney disease a slow acute kidney injury? *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2016;46(6):995-1013.
6. IRIS Staging of CKD 2017:[1-5 pp.]. International Renal Interest Society; [acesso 28 de fevereiro de 2019]. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf
7. Souza SN. Aplicação dos exames complementares no diagnóstico da insuficiência renal crônica em cães. [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal De Goiás; 2011.
8. Queiroz LL. Abordagem diagnóstica e terapêutica de cães com doença renal crônica com ênfase na hiperfosfatemia. [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2015.
9. Souza SN. Biomarcadores no diagnóstico da doença renal em cães. [tese] Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2017.
10. Waki MF, Martorelli CR, Mosko PE, Kogika MM. Classificação em estágios da doença renal crônica em cães e gatos: abordagem clínica, laboratorial e terapêutica. *Ciênc Rural.* 2010;40:2226-34.
11. Lippi I, Perondi F, Ross S, Marchetti V, Guidi G. Assisted feeding through esophagostomy tube in patients affected by CKD and uremic syndrome: impact on BCS, renal function and survival. *Veterinaria (Cremona).* 2016;30(4):215-21.
12. Rudinsky AJ, Harjes LM, Byron J, Chew DJ, Toribio RE, Langston C, et al. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2018. 32(6):1977-1982.
13. Burke SK. Phosphate is a uremic toxin. *J Ren Nutr.* 2008;18(1):27-32.
14. Saraniya H, Chhabra S. Morphological and cellular changes occurring in anemia associated with chronic renal failure in dogs. *J Vet Sci Med Diagn.* 2015; 4(5):1-3.
15. Rudinsky AJ, Harjes LM, Byron J, Chew DJ, Toribio RE, Langston C, et al. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2018;32(6):1977-82.
16. Shipov A, Shahar R, Sugar N, Segev G. The influence of chronic kidney disease on the structural and mechanical properties of canine bone. *J Vet Intern Med.* 2018;32(1):280-7.
17. Foster JD. Update on Mineral and Bone Disorders in chronic kidney disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice.* 2016;46(6):1131-49.
18. Elliott J, Brown S. Pocket guide to renal disease in the dog and cat. Oxford: Nova Professional Media Limited; 2004. 121p.

19. Notomi MK, Kogika MM, Ikesaki JYH, Monteiro PRG, Marquesi ML. Estudo retrospectivo de casos de insuficiência renal crônica em cães no período de 1999 a 2002. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 2006;43(suppl):12-22.
20. Lazaretti P, Kogika MM, Hagiwara MK, Lustoza MD, Mirandola RMS. Concentração sérica de paratormônio intacto em cães com insuficiência renal crônica. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2006;58(4):489-94.
21. Martínez PP, Carvalho MB. Participação da excreção renal de cálcio, fósforo, sódio e potássio na homeostase em cães saudáveis e cães com doença renal crônica. *Pesq Vet Bras.* 2010;30:868-76.
22. Levey AS, Eckfeldt JH. Estimating Glomerular Filtration Rate Using Serum Creatinine. *Clin Chem.* 2017;63(6):1161.
23. Polzin D, Osborne C, Jacob F, Ross S. Chronic renal failure. *Textbook of veterinary internal medicine.* 4 ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2000. p. 1634-62.
24. Nentwig A, Schweighauser A, Maissen-Villiger C, Bruckmaier RM, Zurbriggen A, van Dorland HA, et al. Assessment of the expression of biomarkers of uremic inflammation in dogs with renal disease. *Am J Vet Res.* 2016;77(2):218-24.
25. Vaden SL, Elliott J. Management of proteinuria in dogs and cats with chronic kidney disease. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice.* 2016;46(6):1115-30.
26. Feldman BF, Jain NC. Schalm's veterinary hematology. 5 ed. Thomas JS, editor. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2000. 891-8 p.
27. Klosterman ES, Pressler BM. Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Top Companion Anim Med.* 2011;26(3):135-42.
28. Paller MS. Chapter 31 - Sodium metabolism in chronic kidney disease. In: Kimmel PL, Rosenberg ME, editors. *In: Chronic Renal Disease.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 375-80.
29. Buranakarl C, Ankanaporn K, Thammacharoen S, Trisiriroj M, Maleeratmongkol T, Thongchai P, et al. Relationships between degree of azotaemia and blood pressure, urinary protein:creatinine ratio and fractional excretion of electrolytes in dogs with renal azotaemia. *Vet Res Commun.* 2007;31(3):245-57.
30. Hall JA, Fritsch DA, Yerramilli M, Obare E, Jewell DE. A longitudinal study on the acceptance and effects of a therapeutic renal food in pet dogs with IRIS-Stage 1 chronic kidney disease. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018;102(1):297-307.
31. Polzin DJ. Chronic kidney disease in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2011;41(1):15-30.
32. Gonçalves DS. Avaliação das alterações hemorrágicas e tromboembólicas em cães com doença renal crônica. [dissertação]. Botucatu - SP: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2016.

33. Kaw D, Malhotra D. Platelet dysfunction and end-stage renal disease. *Semin Dial.* 2006;19(4):317-22.
34. Jaber BL, Cendoroglo M, Balakrishnan VS, Perianayagam MC, King AJ, Pereira BJ. Apoptosis of leukocytes: basic concepts and implications in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:S197-205.
35. Cortadellas O, Fernández del Palacio MJ, Talavera J, Bayón A. Calcium and phosphorus homeostasis in dogs with spontaneous chronic kidney disease at different stages of severity. *J Vet Intern Med.* 2010;24(1):73-9.
36. DiBartola, P S. Anormalidades de fluídos, eletrólitos e equilíbrio ácido-básico. In: *Clínica de Pequenos Animais.* São Paulo: Roca; 2007. 680 p.
37. Emmett M. Chapter 34 - Acid–base metabolism in chronic kidney disease. In: Kimmel PL, Rosenberg ME, editors. *Chronic Renal Disease.* San Diego: Academic Press; 2015. p. 406-17.
38. Galvao JFB, Nagode LA, Schenck PA, Chew DJ. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2013;23(2):134-62.
39. Parker VJ, Harjes LM, Dembek K, Young GS, Chew DJ, Toribio RE. Association of vitamin d metabolites with parathyroid hormone, fibroblast growth factor-23, calcium, and phosphorus in dogs with various stages of chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2017;31(3):791-8.
40. Acierno MJ, Brown S, Coleman AE, Jepson RE, Papich M, Stepien RL, et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med.* 2018;32(6):1803-22.
41. Hokamp JA, Cianciolo RE, Boggess M, Lees GE, Benali SL, Kovarsky M, et al. Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2016;30(2):591-601.
42. Wehner A, Hartmann K, Hirschberger J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Vet Rec.* 2008;162(5):141-7.

CAPÍTULO 3 – PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CÃES NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA EM CÃES

RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma importante enfermidade degenerativa que acomete os cães e possui alta letalidade nesses animais. Existe a constante necessidade de buscar novos biomarcadores para esta doença e as proteínas de fase aguda (PFAs) são marcadores biológicos de inflamação que já foram estudadas para diversas afecções, demonstrando sua utilidade como métodos de acompanhamento de tratamento e preditivos de prognóstico. Este estudo objetivou correlacionar as PFAs e a DRC em cães nos diferentes estádios da doença. Foram utilizadas amostras sanguíneas de 63 cães com DRC e 11 animais saudáveis, e foi realizado o proteinograma por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados foram analisados estatisticamente por teste de Tukey com 5% de significância. Com os resultados obtidos concluiu-se que haptoglobina e a PFA com peso molecular de 23kDa são PFAs positivas para DRC, não discriminando os diferentes estádios da doença. A α -1 antitripsina tem comportamento de PFA negativa e discrimina o estágio mais grave, IRIS 4, podendo ser utilizada como indicador de prognóstico na DRC em cães. A IgG cadeia pesada é uma PFA positiva, que apresenta elevação gradual e maiores valores em IRIS 3. Ceruloplasmina, transferrina, α -1 glicoproteína ácida, IgA e IgG cadeia leve não discriminam cães saudáveis daqueles portadores de DRC. O uso da albumina como PFA negativa na DRC em cães é de pouca aplicabilidade devido a proteinúria característica dessa enfermidade.

Palavras-chave: caninos, eletroforese, nefropatia, proteínas séricas.

CHAPTER 3 – SERUM PROTEINOGRAM IN DIFFERENT STAGES OF CHRONIC KIDNEY DISEASE IN DOGS

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is an important degenerative disease that affects dogs and has a high lethality in these animals. There is a need to seek out new biomarkers for the disease and the acute phase proteins (APPs) are biological markers of inflammation that have been studied for several diseases, showing their usefulness as treatment follow-up methods and prognostic predictors. This study aimed to correlate APPs and CKD in dogs at different stages of the disease. Blood samples from 63 dogs with CKD and 11 healthy animals were used and the proteinogram was performed by using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The results were analyzed by Tukey's test at 5% significance. It was concluded that haptoglobin and APP with molecular weight of 23kDa are positive APPs in CKD, not differentiating the stages of the disease. α -1 has a negative APP behavior and identifies the most severe stage, IRIS 4, and can be used as an indicator of prognosis in CKD in dogs. The heavy chain IgG is a positive APP, which presents gradual elevation and higher values in IRIS 3. Ceruloplasmin, transferrin, α -1 acid glycoprotein, IgA and light chain IgG are unable to differentiate healthy dogs from those with CKD. The use of albumin as a negative APP in CKD in dogs is of little applicability due to the proteinuria of the disease.

Keywords: canines, electrophoresis, nephropathy, serum proteins.

1. Introdução

A doença renal crônica (DRC), uma deficiência estrutural ou funcional de um ou ambos os rins que permanece por período prolongado, representando a principal doença degenerativa que acomete os animais de companhia, com altas taxas de mortalidade. De ocorrência comum em cães idosos, resulta na perda irreversível da função renal¹.

O diagnóstico da DRC, na maioria das vezes, é realizado nos estádios finais da doença, no qual o tratamento é pouco eficaz e o tempo de sobrevivência do animal muito curto². Mecanismos eficazes de diagnóstico precoce e de acompanhamento da evolução da doença precisam ser desenvolvidos para que o controle da enfermidade seja mais eficiente.

A busca por novos biomarcadores para detecção da lesão renal está se desenvolvendo rapidamente com o avanço da tecnologia. Biomarcadores mais específicos, provavelmente permitirão a detecção mais precoce da lesão renal, a identificação de lesões subclínicas, o fornecimento de informação quanto ao prognóstico, a identificação dos segmentos mais afetados, a avaliação da resposta para determinados tratamentos e a classificação do risco para insuficiência renal dos pacientes³.

Marcadores biológicos ou biomarcadores podem ser definidos como elementos relacionados as alterações celulares, bioquímicas ou moleculares, mensuráveis em componentes biológicos, tais como tecidos, células ou fluidos. Mais recentemente, a definição foi ampliada para incluir características biológicas que podem ser objetivamente medidas e avaliadas como indicador de processos biológicos normais, patogênicos ou de respostas farmacológicas a intervenções terapêuticas⁴.

Na prática, os biomarcadores incluem ferramentas e tecnologias que podem auxiliar na compreensão da previsão, causa, diagnóstico, progressão, regressão ou o resultado do tratamento de uma doença⁵. As proteínas de fase aguda são biomarcadores relacionados a presença de reação inflamatória⁶ e têm sido utilizadas em pequenos animais principalmente como indicadores de prognóstico⁷.

A resposta de fase aguda (RFA) é uma reação inflamatória inespecífica, que ocorre após qualquer lesão tecidual e inclui mudanças na concentração das proteínas de fase aguda (PFA)⁸. A RFA é um processo rápido, que geralmente precede quaisquer alterações do sistema imunológico específico, podendo surgir antes da manifestação de sinais clínicos⁹.

As PFAs atuam como mediadores da inflamação. Sempre que ocorre um dano tecidual ocorre a ativação do sistema complemento, opsoninas e agregação plaquetária que geram resposta local imediata e inespecífica; como a atuação dos linfócitos TH2, macrófagos,

fibroblastos e células endoteliais que liberam as interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) interleucina 8 (IL-8) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) que estimulam o sistema imunológico, o cérebro (eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) e os hepatócitos, os quais passam a sintetizar e liberar as PFAs que seguem para o local do dano tecidual¹⁰⁻¹²

Algumas reações ocorrem com diminuição da concentração de componentes específicos como a albumina e a transferrina, que são conhecidas como PFAs negativas. Outras ocorrem com aumento da concentração dos componentes como a proteína C reativa, haptoglobina, glicoproteína ácida alfa-1 e ceruplasmina; sendo conhecidas como PFAs positivas⁹. As PFAs positivas ainda podem ser classificadas quanto à sua magnitude, sendo as principais que aumentam suas concentrações de dez até mil vezes em poucas horas, as moderadas que seus níveis aumentam em duas a dez vezes em um período mais longo e as menores, cujas concentrações aumentam até o dobro do valor de normalidade¹³.

A maioria das PFAs positivas são glicoproteínas sintetizadas principalmente pelos hepatócitos em resposta ao estímulo das citocinas pró-inflamatórias liberadas na corrente sanguínea. Estas reações fazem parte do sistema imunológico, produzindo resposta logo após o dano tecidual, com o propósito de desencadear hemostasia⁹. As concentrações séricas das PFAs estão relacionadas com a severidade e extensão da lesão tecidual⁸. Podendo auxiliar no diagnóstico e prognóstico dos pacientes¹⁰. É importante salientar que nem todas as espécies animais respondem a inflamação com as mesmas PFAs⁹.

Para a quantificação das PFAs, a eletroforese representa a técnica mais importante¹⁴. Pode ser realizada em diferentes tipos de géis, sendo os mais importantes agarose e poli(acrilamida). A eletroforese em gel de poli(acrilamida) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) apresenta os melhores resultados, pois identifica mais de 20 proteínas, mesmo as de baixa concentração sérica¹⁵.

Aproximadamente 50% dos pacientes humanos com DRC apresentam, mesmo nas fases iniciais da doença, aumento PFAs positivas, diretamente relacionadas com a gravidade da doença¹⁶. Não foram encontrados, na literatura consultada, estudos semelhantes em cães.

Uma importante contribuição das PFAs está relacionada à habilidade dessas proteínas em auxiliar no estabelecimento da morbidade e mortalidade dos pacientes. Elas podem ser utilizadas como indicativos de estado de saúde dos animais¹⁷. Espera-se que no futuro as PFAs sejam incluídas como exames de rotina para diagnóstico precoce de enfermidades e avaliação da eficácia de tratamentos e medicamentos¹⁸.

A literatura é controversa quanto aos valores de referência para a maioria das PFAs nos cães saudáveis¹⁹ e, adicionalmente, existem diversas técnicas para determinação dessas

proteínas. Esses fatores dificultam o estabelecimento de valores precisos de normalidade, portanto é recomendável que cada laboratório estabeleça seus próprios intervalos de referência para cada PFA analisada¹⁸.

Com este estudo objetivou-se determinar as concentrações das diferentes PFAs e das globulinas em cães saudáveis e nos pacientes com DRC em diferentes estádios da doença, de modo a estabelecer a possível relação entre a gravidade da DRC e a concentração dessas proteínas.

2. Material e métodos

2.1. Planejamento do estudo

O estudo foi desenvolvido no Hospital Veterinário da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás (HV-UFG), Goiânia - Goiás, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFG (CEUA/UFG) e registrado sob número 007/16. Foram avaliados 74 cães machos e fêmeas com idades variadas, pertencentes a tutores (domiciliados), encaminhados por veterinários do HV-UFG e de outras clínicas da cidade de Goiânia.

Os pacientes foram atendidos no ambulatório do HV-UFG e foram distribuídos em grupo controle e em grupos de doentes renais de acordo com o estadiamento IRIS. O tratamento para DRC foi prescrito a todos os pacientes de acordo com as recomendações da IRIS²⁰ e foram definidos três retornos mensais. Como forma de estimular o retorno, o tutor foi informado que os exames seriam gratuitos para os pacientes que ingressassem no estudo.

2.2. Anamnese e exame clínico

Foram realizadas três avaliações com intervalos de 30 dias. Durante o atendimento os tutores dos pacientes foram submetidos à anamnese, com objetivo de obter informações sobre o estado geral do animal, comportamento, alimentação, ingestão de água, micção, medicações em uso e doenças anteriores.

O exame clínico constituiu da avaliação de pele e pelos, turgor cutâneo, linfonodos, tempo de preenchimento capilar (TPC), avaliação das mucosas, cavidade oral, olhos, auscultação cardíaca e pulmonar, frequências cardíaca e respiratória, tipo de movimento respiratório, pulso, palpação renal e abdominal e temperatura retal.

A avaliação dos animais incluiu ultrassonografia abdominal, mensuração da pressão arterial, colheita de sangue e urina para realização dos seguintes exames laboratoriais: hemograma, exame de urina, bioquímica sérica (creatinina, ureia, proteína total, albumina, colesterol, cálcio, fósforo, sódio e potássio), determinação da razão proteína/creatinina na urina e eletroforese de proteínas séricas.

A avaliação clínica e laboratorial completa foi realizada com o objetivo de estabelecer o estadiamento dos pacientes e indicar o tipo de tratamento e acompanhamento adequados, visto que eram pacientes provenientes da rotina clínica do Hospital Veterinário.

2.3. Critérios de inclusão

Foram utilizados como critérios de inclusão nos grupos de cães com DRC, a presença de proteinúria persistente (razão proteína/creatinina urinária $>0,5$) ou hipertensão persistente sem outra causa diagnosticada (pressão arterial sistólica >150 mmHg), alteração renal ultrassonográfica compatível com DRC ou azotemia persistente (creatinina sérica $>1,4$ mg/dL). Para os pacientes do estágio 1, os quais não apresentam azotemia, foi necessária a confirmação da proteinúria por meio de três avaliações consecutivas da razão PU/CU com intervalo de uma semana. A proteinúria foi considerada apenas na ausência de sedimento urinário ativo. Pacientes nos estádios 2, 3 e 4 foram encaminhados para o estudo com diagnóstico prévio, sendo incluídos no estudo somente com uma avaliação laboratorial. Foram excluídos cães que apresentaram injúria renal aguda e doenças infecciosas.

Para os cães do grupo controle foram descartadas quaisquer enfermidades sistêmicas por meio de exames físicos e laboratoriais.

2.4. Distribuição em grupos

Após a realização das consultas e exames laboratoriais, os animais foram distribuídos em cinco grupos, sendo um grupo de animais saudáveis (controle, $n=11$) e quatro grupos de animais doentes conforme o estadiamento IRIS, determinado pela concentração sérica de creatinina, sendo eles: IRIS 1 ($n=18$), IRIS 2 ($n=16$), IRIS 3 ($n=14$) e 4 ($n=15$).

2.5. Avaliações laboratoriais

A avaliação hematológica e bioquímica de rotina de pacientes com DRC foram realizadas no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, utilizando o analisador hematológico Celltac MEK 6550® (Nihoh Kohden, Japão) e analisador bioquímico automático CM 250 (Wiener® Lab

Group, Rosário, Argentina), respectivamente. A proteína total sérica foi determinada por método colorimétrico, por reação com o biureto.

O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por Laemmli²¹ modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (Protean II XI-Vertical Electrophoresis CELLS®- BIO-RAD).

A polimerização do gel foi possível pela adição de 15µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,3µL de persulfato de amônia a 10%. A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que continha o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10µL de soro sanguíneo diluídos em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5µL das referidas amostras era depositada no fosso do gel.

A placa era colocada em suporte apropriado, em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel era corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Shimadzu CS-9301) por meio do escaneamento das amostras (Figura 1). Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores (Sigma Marker™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD, além das proteínas purificadas albumina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

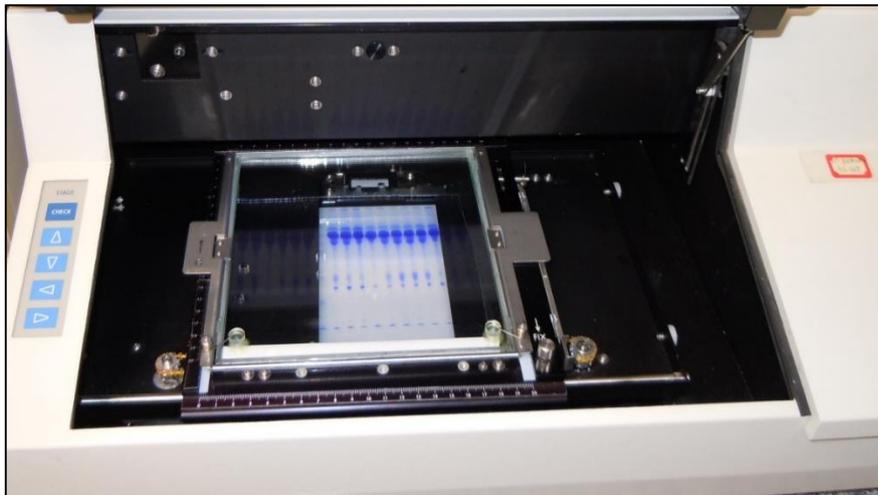


FIGURA 1 – Escaneamento do gel de poliacrilamida para quantificação das proteínas por densitometria computadorizada

2.6. Análise estatística

Para verificar se as proteínas séricas e seu fracionamento eletroforético diferiram entre os cães saudáveis e doentes renais crônicos nos diferentes estádios da doença e nos diferentes momentos de avaliação, utilizou-se a análise de variância pelo teste F. O teste de Tukey foi utilizado para comparação das médias entre os cães saudáveis e doentes renais nos diferentes estádios, e entre os cães com DRC nos diferentes momentos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

3. Resultados e discussão

A separação das frações de proteínas séricas feita em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) incluiu albumina, alfa globulinas, beta globulinas e gama globulinas (figuras 2 e 3).

Os valores de peso molecular e das médias das proteínas totais e PFAs dos cães saudáveis (grupo controle) e dos cães com DRC nos diferentes estádios da IRIS estão representados na tabela 1, juntamente com as letras que representam as diferenças estatísticas observadas entre os grupos.

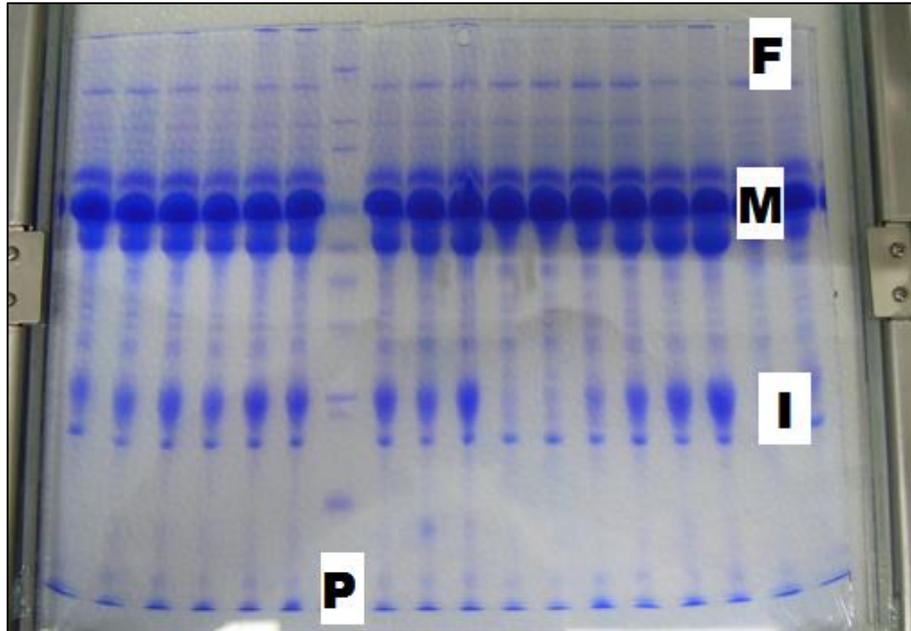


FIGURA 2 - Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliácridamida mostrando a separação das frações protéicas em cães com doença renal crônica. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) ocupando o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), albumina (125 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), alfa-1- antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37 KD). Ao final (F) do gel estão as proteínas IgG (cadeia leve) (25 KD) e proteína de 23 KD.

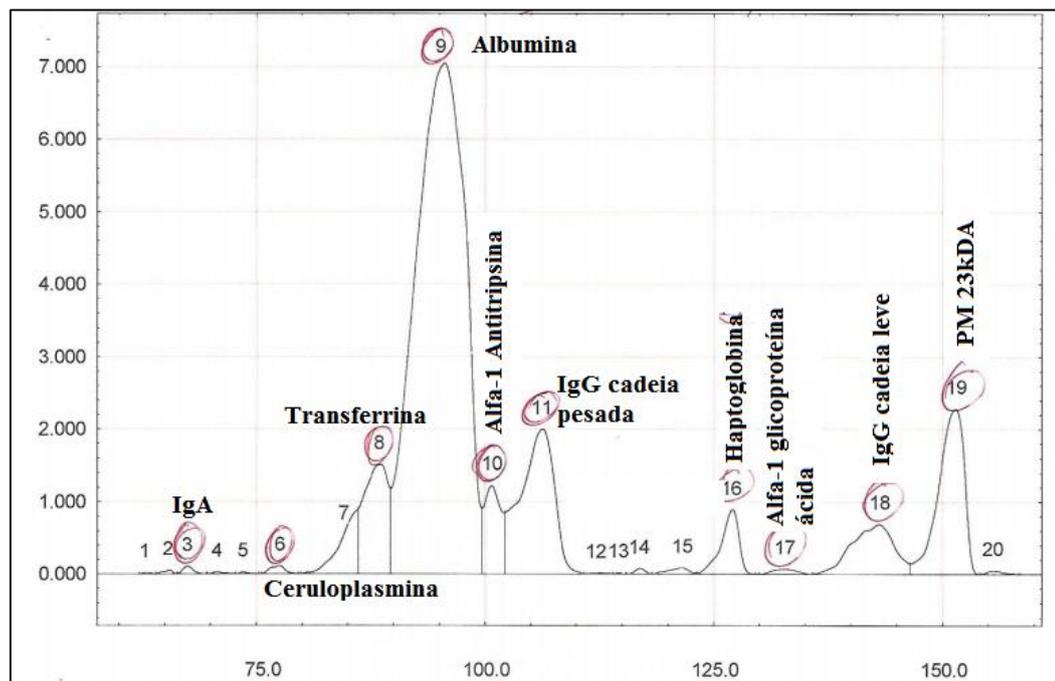


FIGURA 3 – Traçado eletroforético de um cão com doença renal crônica estágio IRIS 3 mostrando os picos das diferentes proteínas séricas.

TABELA 1 – Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das frações proteicas (g/dL), verificadas na eletroforese SDS-PAGE, em 74 cães com DRC nos diferentes estádios da IRIS

Proteína (g/dL)	Controle (N=11)	IRIS 1 (N=18)	IRIS 2 (N=16)	IRIS 3 (N=14)	IRIS 4 (N=15)
Proteína total	8,18 ^{ab} ± 1,72	9,25 ^a ± 1,56	8,70 ^{ab} ± 1,25	8,16 ^{ab} ± 0,72	7,47 ^b ± 1,49
Albumina	4,96 ^a ± 0,88	5,30 ^a ± 1,01	4,65 ^{ab} ± 0,74	4,14 ^{bc} ± 2,59	3,47 ^c ± 0,57
α1 antitripsina	0,22 ^a ± 0,06	0,22 ^a ± 0,09	0,23 ^a ± 0,07	0,18 ^{ab} ± 0,06	0,17 ^b ± 0,04
α1 glicoproteína ácida	0,02 ^a ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,03	0,04 ^a ± 0,04	0,02 ^a ± 0,01
Ceruplasmina	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,04 ^a ± 0,02	0,03 ^a ± 0,01
Haptoglobina	0,12 ^b ± 0,17	0,17 ^a ± 0,08	0,18 ^a ± 0,12	0,22 ^a ± 0,17	0,28 ^a ± 0,23
Transferina	0,36 ^b ± 0,08	0,52 ^a ± 0,15	0,41 ^{ab} ± 0,11	0,41 ^{ab} ± 0,18	0,32 ^b ± 0,10
IgA	0,02 ^a ± 0,01	0,03 ^a ± 0,01	0,02 ^a ± 0,01	0,04 ^a ± 0,04	0,02 ^a ± 0,02
IgG total	1,54 ^c ± 1,24	1,68 ^{bc} ± 1,27	1,94 ^{ab} ± 0,99	2,14 ^a ± 0,82	2,03 ^{ac} ± 1,13
IgG cadeia pesada	1,06 ^c ± 0,86	1,08 ^{bc} ± 0,62	1,25 ^{ac} ± 0,60	1,49 ^{ab} ± 0,56	1,37 ^a ± 0,59
IgG cadeia leve	0,48 ^a ± 0,53	0,60 ^a ± 0,69	0,69 ^a ± 0,43	0,65 ^a ± 0,30	0,66 ^a ± 0,60
PM 23.000 (g/dL)	0,68 ^b ± 0,21	1,00 ^a ± 0,26	0,90 ^a ± 0,33	0,81 ^a ± 0,36	0,81 ^a ± 0,25

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si (p<0,05) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. IgA: imunoglobulina A; IgG: imunoglobulina G; PM: peso molecular

Na Tabela 2 estão demonstradas as médias das concentrações séricas de proteína total e das PFAs nos cães com DRC nos diferentes estádios da doença e em diferentes momentos, sendo realizada uma avaliação por mês. No decorrer do tempo não houve diferença estatística entre animais do mesmo grupo IRIS.

TABELA 2 – Médias das concentrações séricas de proteína total e das frações proteicas (g/dL), verificadas na eletroforese SDS-PAGE, em cães com DRC nos diferentes estádios da IRIS e em diferentes momentos (M): primeira avaliação (1), segunda avaliação (2) e terceira avaliação (3), com intervalos de 30 dias entre as avaliações

IRIS	M	PT	Alb.	α1 A.	α1 G. A.	Cer.	Hap.	Tr.	IgA	IgG T.	IgG C. P.	IgG C. L.	PM 23
1	1	9,25	5,30	0,22	0,02	0,03	0,17	0,52	0,03	1,68	1,08	0,60	1,00
	2	8,85	5,32	0,23	0,03	0,03	0,18	0,45	0,02	1,63	1,11	0,51	0,66
	3	8,76	5,19	0,19	0,03	0,04	0,16	0,48	0,03	1,46	1,07	0,4	0,84
2	1	8,70	4,65	0,23	0,03	0,03	0,18	0,41	0,02	1,94	1,25	0,69	0,90
	2	9,26	4,8	0,27	0,03	0,03	0,17	0,39	0,02	2,32	1,47	0,86	0,94
	3	9,16	4,46	0,23	0,03	0,03	0,24	0,4	0,02	2,46	1,53	0,94	0,98
3	1	8,16	4,14	0,18	0,04	0,04	0,22	0,41	0,04	2,14	1,49	0,65	0,81
	2	9,21	4,76	0,2	0,03	0,03	0,12	0,42	0,02	2,24	1,48	0,76	1,08
	3	7,66	4,29	0,17	0,02	0,03	0,14	0,35	0,02	1,59	1,13	0,46	0,83
4	1	7,47	3,47	0,17	0,02	0,03	0,28	0,32	0,02	2,03	1,37	0,66	0,81
	2	8,32	3,92	0,18	0,02	0,03	0,31	0,35	0,03	2,27	1,62	0,65	0,86
	3	7,69	3,38	0,17	0,02	0,03	0,3	0,34	0,03	2,11	1,44	0,68	0,93

PT: proteínas totais; Alb: albumina; α1 A.: α-1 antitripsina; α1 G. A.: α-1 glicoproteína ácida; IgA: Cer: ceruloplasmina; Hap: haptoglobina; Tr: transferrina; imunoglobulina A; IgG T.: imunoglobulina G total; IgG C.P.: imunoglobulina G cadeia pesada; IgG C.L.: imunoglobulina g cadeia leve; PM 23: proteína de peso molecular 23kDa.

3.1. Proteína total

As concentrações de proteínas totais apresentaram redução progressiva considerando os quatro estádios da DRC. Em IRIS 4 a média foi significativamente inferior a IRIS 1 (Figura 4).

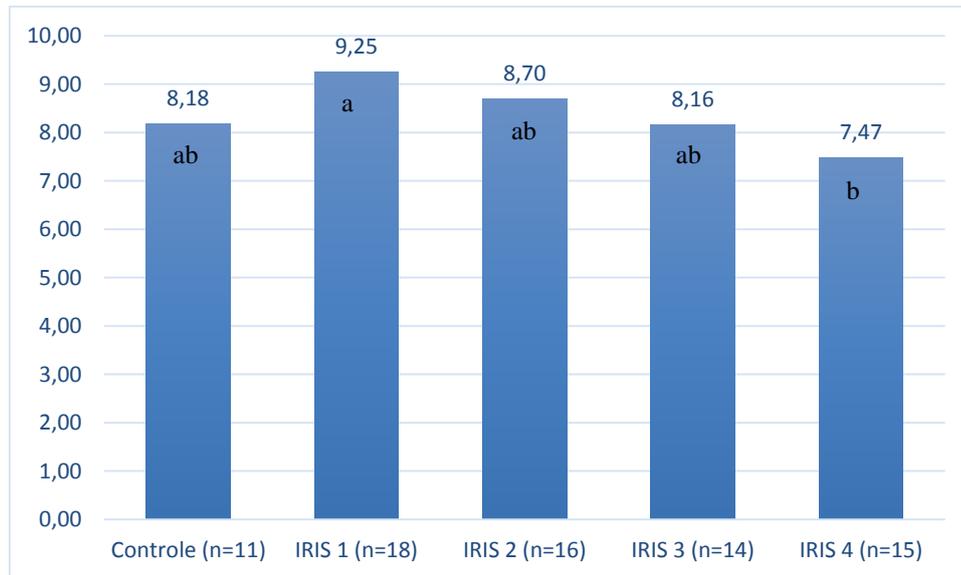


FIGURA 4 – Valores de médias proteína total nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Os dois grupos que apresentaram os valores mais baixos de proteínas totais foram os extremos, os saudáveis e os mais doentes, por diferentes razões. No grupo controle as proteínas totais encontraram-se dentro da normalidade, com concentrações de albumina e globulinas adequadas. Já o grupo IRIS 4 teve as proteínas totais reduzidas pela perda de albumina. Os DRC nos estádios 1, 2 e 3 apresentam redução gradual de albumina com aumento concomitante das globulinas, indicando presença de inflamação.

Não houve diferença estatística nas concentrações de proteína total nos diferentes grupos nas avaliações mensais.

3.2. Albumina

As concentrações séricas de albumina foram semelhantes para os grupos Controle e IRIS 1, sendo estatisticamente superiores aos grupos IRIS 3 e 4. Houve redução progressiva com o agravamento da DRC (Figura 5).

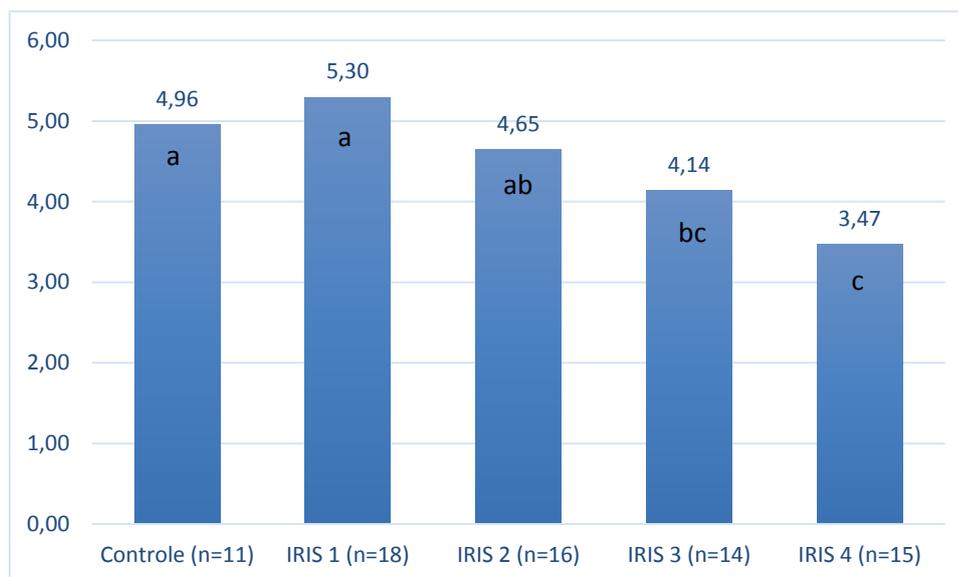


FIGURA 5 – Valores de médias de albumina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Nesse estudo as concentrações séricas de albumina reduziram conforme a progressão da DRC. Isto pode ter ocorrido por diferentes razões, sendo que uma delas é que a albumina é uma PFA negativa, sua expressão pode ser bloqueada em estados inflamatórios^{22, 23} e sua redução conforme ocorre o avanço da doença, indica pior prognóstico²⁴.

Outro motivo é que com o avanço da doença, começa-se a observar hiporexia e anorexia nos pacientes, o que pode levar à hipoalbuminemia. No entanto, relata-se que a redução dos valores de albumina é fator mais indicativo de RFA do que de desnutrição⁹. Sua diminuição ocorre pela combinação de fatores como supressão da produção, aumento da permeabilidade vascular e aumento do catabolismo^{22, 23}.

Uma terceira e importante causa para a redução da albumina sérica nos pacientes com DRC é a perda de proteínas pela urina (proteinúria) muito presente nesses pacientes, pois é a principal proteína extravasada diante de lesões glomerulares²⁵. Sua redução sérica está relacionada com a redução da sobrevida dos pacientes²⁶.

Não houve diferença estatística nos valores de albumina para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.3. Alfa-1-antitripsina

As médias de α -1 antitripsina foram estatisticamente semelhantes entre os grupos controle e IRIS 1 e 2 e significativamente superiores ao grupo IRIS 4. Esta proteína se apresentou como uma PFA negativa, demonstrando nos animais saudáveis e nas fases iniciais

da DRC, valores maiores do que nas fases mais avançadas (Figura 6). No entanto, essa PFA é considerada na literatura como uma PFA positiva em cães²⁷. Embora outros autores também a tenham descrito como PFA negativa no linfoma²⁸, na erliquiose²⁹, doença hepática e doença pulmonar crônica³⁰. Em outro estudo não foi observada diferença nas concentrações dessa proteína entre cães hospitalizados e cães saudáveis³¹.

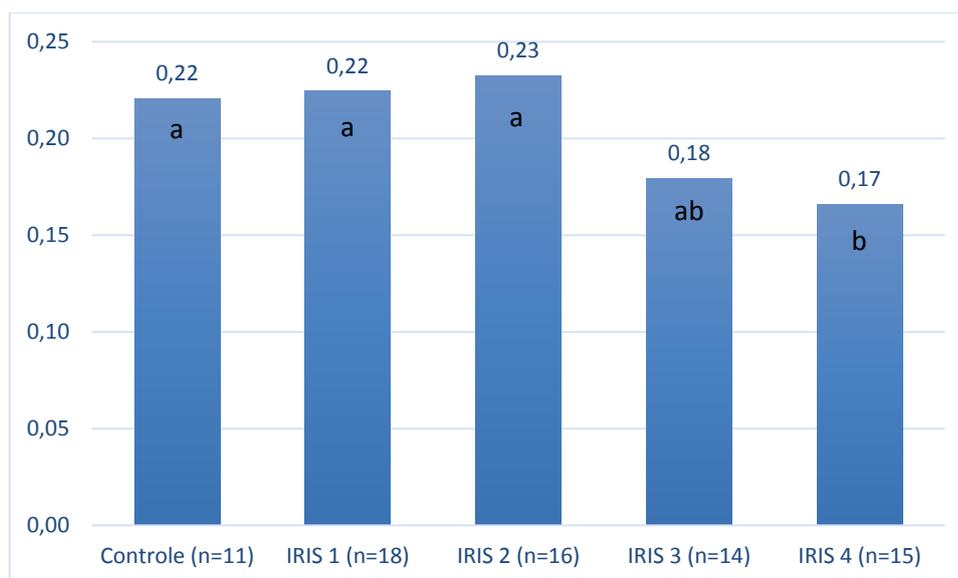


FIGURA 6 – Valores de médias de α -1-antitripsina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

A α -1 antitripsina é considerada uma PFA imediata nas inflamações ou infecções³², aumentando suas concentrações rapidamente após a lesão tecidual e normalizam-se após o término do estímulo⁹. Possivelmente por essa razão, na DRC ela não se comportou como uma PFA positiva. Essa PFA apresenta valores menores quando há menor intensidade de inflamação³³.

Não houve diferença estatística quanto aos valores de α -1 antitripsina para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.4. Alfa-1-glicoproteína ácida

A α -1 glicoproteína ácida não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 7), embora seja relatada sua associação com doenças crônicas³⁴. É descrita a produção dessa proteína pelos rins em pacientes humanos, apesar da biossíntese ser realizada principalmente pelos hepatócitos⁹.

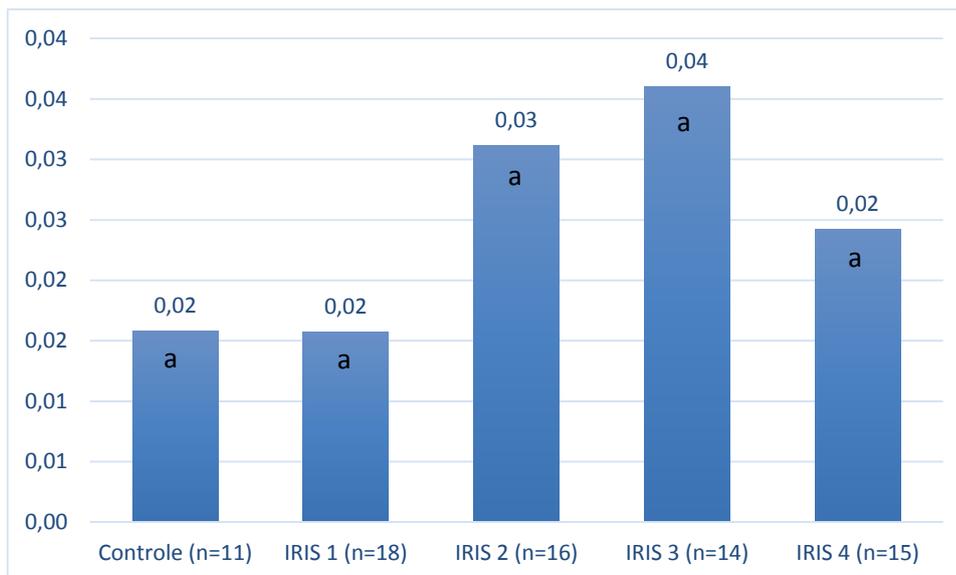


FIGURA 7 – Valores de médias de α -1-glicoproteína ácida nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Na DRC não foram observadas alterações significativas dessa proteína, provavelmente por se tratar de uma PFA imediata e positiva, sendo induzida principalmente pela interleucina-1 (IL-1) e sua tendência é aumentar e normalizar rapidamente após o início da lesão tecidual^{9, 33}. Também não foi relatada alteração dessa proteína em cães com neoplasias mamárias⁹. Mas é uma PFA muito útil em outras doenças como linfoma^{35, 36}, carcinomas, sarcomas⁹ e na peritonite³⁷. É considerada um agente imunomodulador e antiinflamatório natural³⁴.

Não houve diferença estatística nos valores de α -1 glicoproteína ácida para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.5. Ceruloplasmina

Não houve diferença estatística entre os grupos para ceruloplasmina (Figura 8). Pode haver decréscimo de ceruloplasmina em casos de desnutrição e nefrose³⁸. É induzida por interleucina-6 (IL-6) e considerada uma PFA positiva e tardia^{9, 33}.

Como nesse estudo, não foi relatada alteração de ceruloplasmina em animais saudáveis após o uso de glicocorticoides³⁹. Em outras enfermidades como piometra⁴⁰, babesiose⁴¹ e gastroenterite hemorrágica⁴² foi relatada alta atividade dessa proteína.

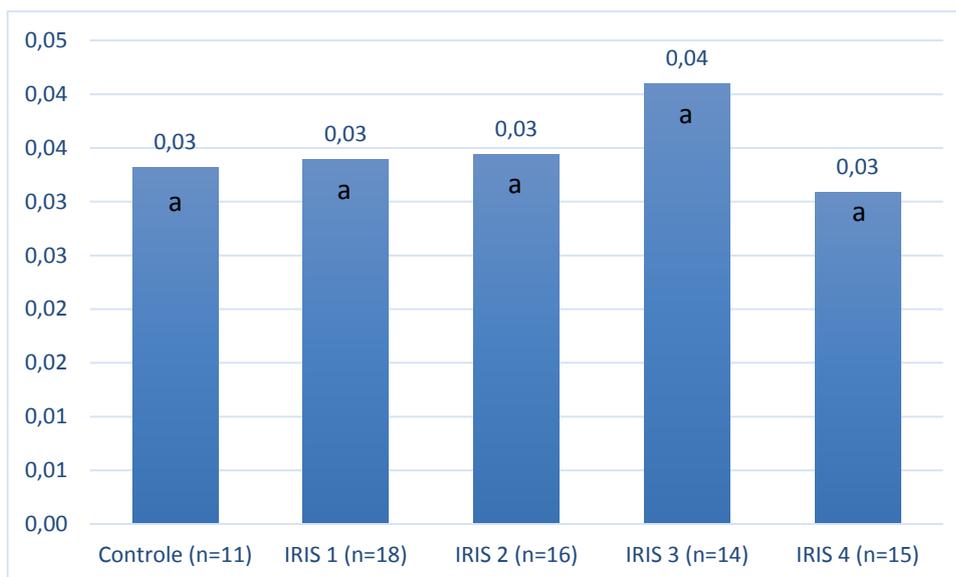


FIGURA 8 – Valores de médias de ceruloplasmina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Não houve diferença estatística nos valores de ceruloplasmina para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.6. Haptoglobina

A haptoglobina apresentou valores estatisticamente inferiores no grupo controle, com elevação gradual nos quatro estádios da DRC, tendo comportamento de PFA positiva (Figura 9). Essa proteína é uma PFA tardia, que eleva-se pela estimulação da IL-6, que demora um tempo para ter seus valores alterados, permanecendo dessa forma por várias semanas^{9,33}. É relatado que os rins, juntamente com os pulmões, tecido adiposo e baço, também podem auxiliar os hepatócitos na produção dessa proteína⁹. Outros estudos também demonstraram o uso da haptoglobina como indicador de diagnóstico e prognóstico de inflamações⁴³. Também tem suas concentrações elevadas na infecção por *Dioctophyma renale*⁴⁴, erliquiose²⁹, babesiose⁴⁵, piometra⁴⁶, gastrites⁴⁷, meningites⁴⁸, leishmaniose,⁴⁹ no estresse e processos neoplásicos recentes⁴².

Foram relatados no Reino Unido valores de referência para haptoglobina em cães de 0,1 a 0,2g/dL³⁰, estando compatíveis com o grupo controle nesse estudo, e os grupos IRIS 1 e 2 apresentaram-se próximos ao controle e apenas os grupos IRIS 3 e 4 com valor médio maior que 0,2g/dL.

Não houve diferença estatística nos valores de haptoglobina para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

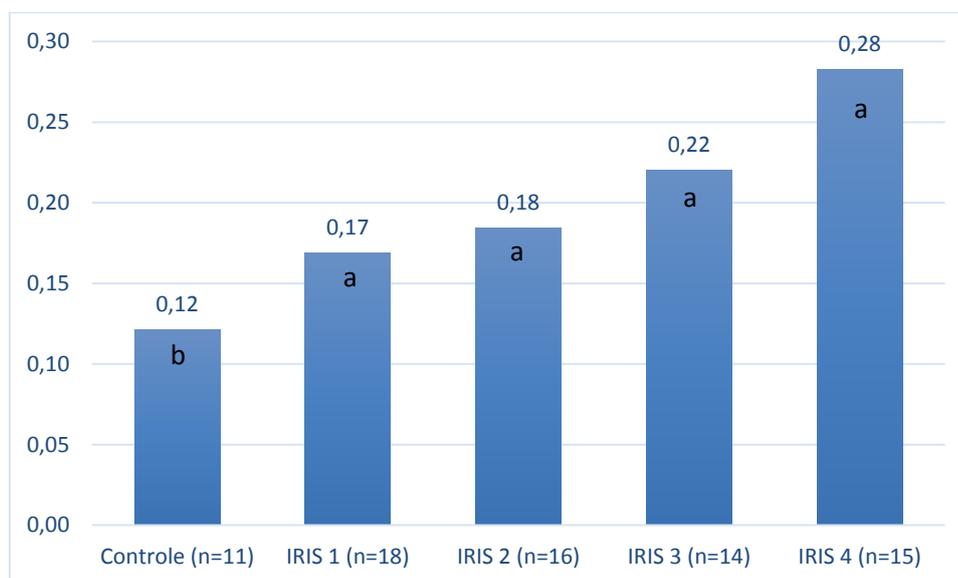


FIGURA 9 – Valores de médias de haptoglobina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

3.7. Transferrina

Os valores de transferrina foram estatisticamente inferiores nos grupos controle e IRIS 4 (Figura 10). A transferrina é uma PFA negativa que atua limitando o crescimento de vários microorganismos em decorrência da sua ligação com o ferro ⁶, mas nesse estudo não se apresentou como uma proteína de importância para a DRC em cães, assim como já foi descrito para o ser humano, a qual permanece inalterada na doença renal⁵⁰. Foi relatada importância da transferrina como PFA em deficiências de ferro²⁷, doenças hepáticas, anemia hemolítica, síndrome nefrótica^{30, 51} e leishmaniose⁵².

Não houve diferença estatística nos valores de transferrina para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

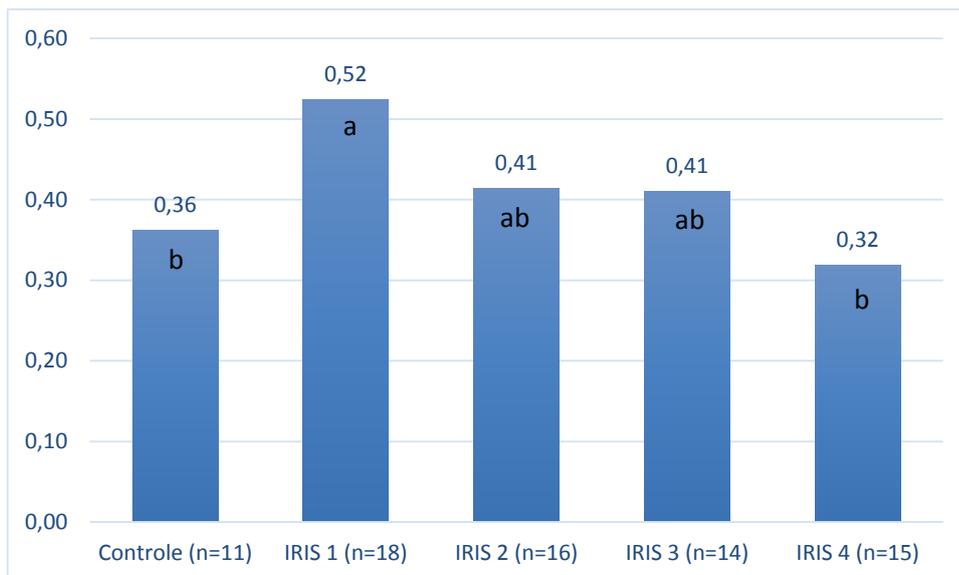


FIGURA 10 – Valores de médias de transferrina nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

3.8. Imunoglobulina A

Não houve diferença estatística entre o controle os grupos de animais doentes para IgA (Figura 11). As IgAs são comumente encontradas em secreções externas³⁸, podendo ser essa a causa da normalidade nas suas concentrações séricas nesse estudo. O aumento dessas imunoglobulinas foi relatado em casos de doença hepática, doenças infecciosas, mielomas e linfomas⁶.

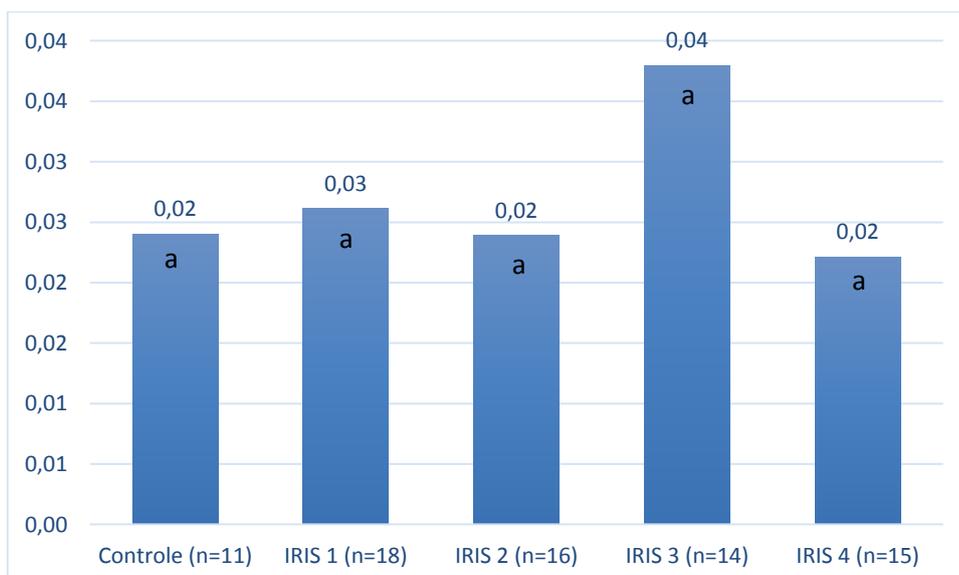


FIGURA 11 – Valores de médias de IgA nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Não houve diferença estatística nos valores de IgA para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.9. Imunoglobulina G total

A imunoglobulina G total (IgG) apresentou valores médios mais elevados nos grupos IRIS 3 e 4 (Figura 12), sendo significativamente superior em IRIS 3.

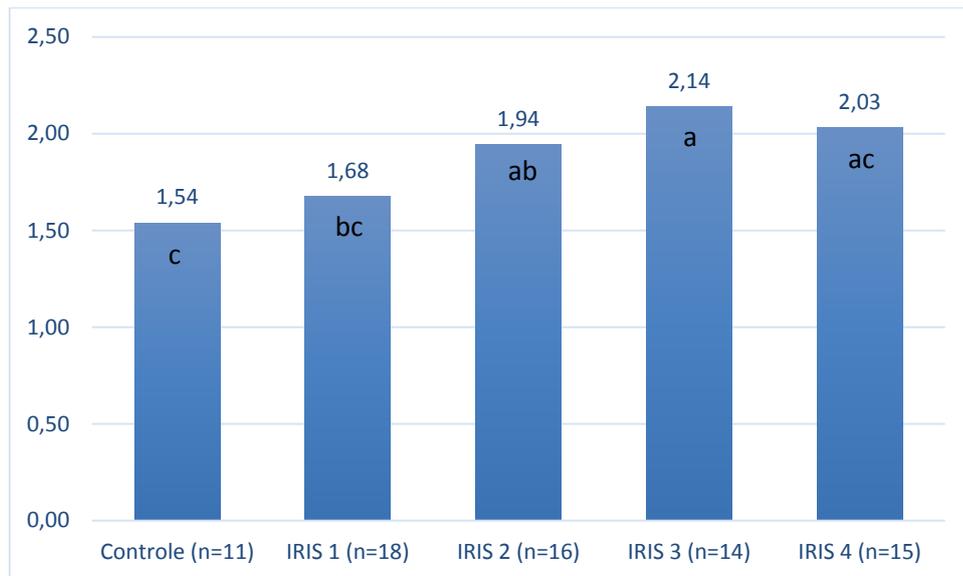


FIGURA 12 – Valores de médias de IgG nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Não houve diferença estatística nos valores de IgG total para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.10. Imunoglobulina G cadeia pesada

As médias de IgG cadeia pesada apresentaram valores crescentes, comportando-se como uma PFA positiva (Figura 13). Os valores em IRIS 4 foram significativamente superiores quando comparados ao grupo controle. É relatada maior produção dessas proteínas em doenças inflamatórias e neoplásicas^{6, 35, 38}.

Não houve diferença estatística nos valores de IgG cadeia pesada para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

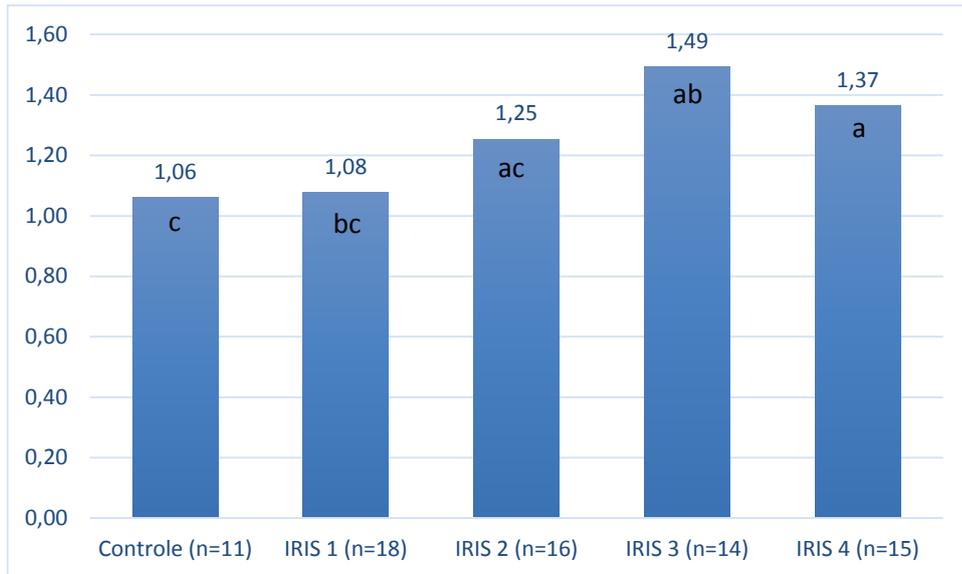


FIGURA 13 – Valores de médias de IgG cadeia pesada nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

3.11. Imunoglobulina G cadeia leve

Não houve diferença estatística entre os grupos para IgG cadeia leve (Figura 14). Essa imunoglobulina é conhecida como IgG colostrar, transferida da mãe para o filhote no aleitamento, portanto não é esperado seu aumento nos casos de DRC.

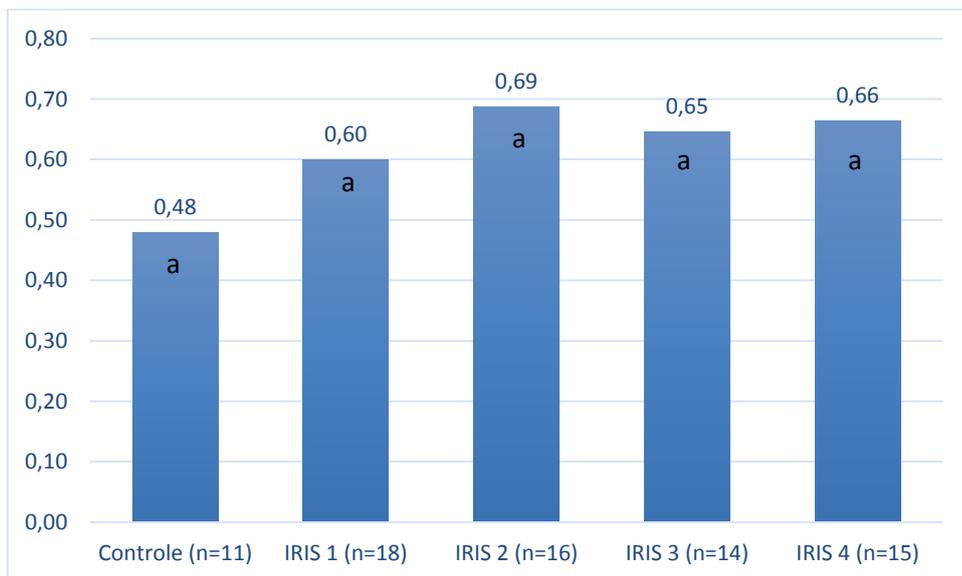


FIGURA 14 – Valores de médias de IgG cadeia leve nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Não houve diferença estatística nos valores de IgG cadeia leve para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

3.12. Proteína de peso molecular 23kDa

A proteína com peso molecular 23kDa, não identificada nominalmente, apresentou os menores valores nos animais saudáveis (controle), diferindo estatisticamente dos grupos com DRC (Figura 15), se comportando como PFA positiva na DRC. Essa proteína já foi relatada como PFA positiva importante para cães com linfoma³⁵ e como PFA negativa para cães com erliquiose⁵³. Uma vez que há importante redução nas proteínas séricas totais no grupo IRIS 4, é bastante relevante o fato de esta proteína se manter elevada nesse grupo.

É possível que esta proteína seja a proteína C reativa, pois é relatado que esta última no ser humano possui 23kDa⁵⁴, e em cães foi descrita com duas subunidades diferentes de 19,4kDa e 23,5kDa⁵⁵, e em outro estudo com 23,21kDa por análise de espectrometria de massa⁵⁶. No entanto, para realizar esta afirmação seria necessária a realização de outros testes diagnósticos.

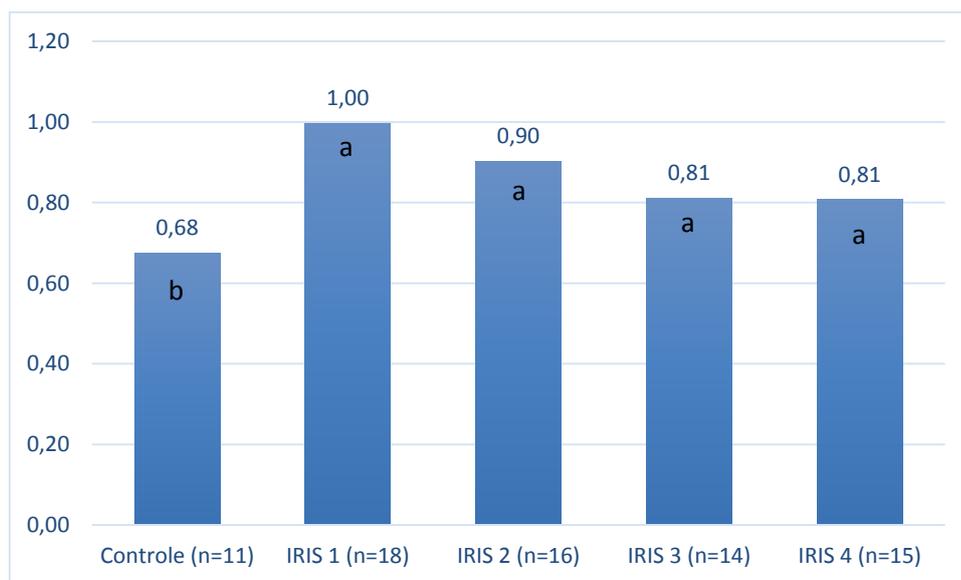


FIGURA 15 – Valores de médias de proteína não identificada nominalmente com peso molecular 23kDa nos diferentes grupos de animais saudáveis (Controle n=11) e doentes renais crônicos nos diferentes estádios IRIS1 (n=18), 2 (n=16), 3 (n=14), e 4 (n=15).

Não houve diferença estatística nos valores da proteína com PM 23kDa para nenhum dos grupos nas avaliações mensais.

4. Conclusões

A haptoglobina e a PFA com peso molecular de 23kDa são PFAs positivas para DRC, não discriminando os diferentes estádios da doença.

A α -1 antitripsina tem comportamento de PFA negativa e discrimina o estágio mais grave, IRIS 4, podendo ser utilizada como indicador de prognóstico na DRC em cães.

A IgG cadeia pesada é uma PFA positiva, que apresenta elevação gradual e maiores valores em IRIS 3.

Ceruloplasmina, transferrina, α -1 glicoproteína ácida, IgA e IgG cadeia leve não discriminam cães saudáveis daqueles portadores de DRC.

O uso da albumina como PFA negativa na DRC em cães é de pouca aplicabilidade devido a proteinúria característica dessa enfermidade.

Referências

1. Bartges JW. Chronic kidney disease in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42(4):669-92.
2. Polzin DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2013; 23(2):205-15.
3. Han WK, Bonventre JV. Biologic markers for the early detection of acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care.* 2004;10(6):476-82.
4. Myers MJ, Smith ER, Turfle PG. Biomarkers in Veterinary Medicine. *Annu Rev Anim Biosci.* 2017;5(1):65-87.
5. Group F-NBW. BEST (Biomarkers, EndpointS, and other Tools) Resource. Silver Spring (MD): Food and Drug Administration (US); 2016.
6. Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-7.
7. Schrödl W, Büchler R, Wendler S, Reinhold P, Muckova P, Reindl J, et al. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteom Clin Appl.* 2016;10(11):1077-92.
8. Alves AE, Ribeiro APC, Di Filippo PA, Apparicio MF, Fagliari JJ, Vicente WRR. Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62:86-91.

9. Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 2005;34(2):85-99.
10. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 2004;35(2):163-87.
11. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6(11):1045-56.
12. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. *J Pharm Bioallied Sci*. 2011;3(1):118-27.
13. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5 ed. San Diego. 1997. p. 117-38.
14. Bellei E, Vilella A, Monari E, Bergamini S, Tomasi A, Cuoghi A, et al. Serum protein changes in a rat model of chronic pain show a correlation between animal and humans. *Sci Rep*. 2017;7:41723.
15. Wu Q, Zhang X, Zhong M, Han H, Liu S, Liu T, et al. Effects of Bariatric Surgery on Serum Bile Acid Composition and Conjugation in a Diabetic Rat Model. *Obes Surg*. 2016;26(10):2384-92.
16. Romao JE, Jr., Haiashi AR, Elias RM, Luders C, Ferraboli R, Castro MC, et al. Positive acute-phase inflammatory markers in different stages of chronic kidney disease. *Am J Nephrol*. 2006;26(1):59-66.
17. Bhat I, Bashir S, W R, Iqbal Z, Kawa M, Quadir A, et al. Acute Phase Proteins and their Clinical Significance in Veterinary Medicine: An Overview. *Pharma Innovation*. 2018;7(1):104-8.
18. Santos IFC, Alberto DS. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. *Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR*. 2014; 17(1):55-62.
19. Sheahan D, Bell R, Mellanby RJ, Gow AG, Friend E, Heller J, et al. Acute phase protein concentrations in dogs with nasal disease. *Vet Rec*. 2010;167(23):895-9.
20. IRIS Staging of CKD 2017:[1-5 pp.]. International Renal Interest Society; [acesso 28 de fevereiro de 2019]. Disponível em: http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_2017_Staging_of_CKD_09May18.pdf
21. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
22. Friedman AN, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(2):223-30.
23. Kaysen GA, Dubin JA, Muller HG, Rosales L, Levin NW, Mitch WE. Inflammation and reduced albumin synthesis associated with stable decline in serum albumin in hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2004;65(4):1408-15.

24. Nascimento MM, Pecoits-Filho R, Qureshi AR, Hayashi SY, Manfro RC, Pachaly MA, et al. The prognostic impact of fluctuating levels of C-reactive protein in Brazilian haemodialysis patients: a prospective study. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19(11):2803-9.
25. Maniaki E, Finch N. Chronic kidney disease in cats and dogs: managing proteinuria. In *Practice*. 2018;40(7):266.
26. Rudinsky AJ, Harjes LM, Byron J, Chew DJ, Toribio RE, Langston C, et al. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2018.
27. Feldman BF, Jain NC. *Schalm's veterinary hematology*. 5 ed. Thomas JS, editor. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2000. 891-8 p.
28. Vieira MC. Eletroforetograma de proteínas séricas em cães linfomatosos, submetidos ao protocolo quimioterápico de madison-wisconsin. [dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2009.
29. Escribano D, Cihan H, Martínez-Subiela S, Levent P, Kocaturk M, Aytug N, et al. Changes in serum proteins in dogs with *Ehrlichia canis* infection. *Microb Pathog*. 2017;113:34-9.
30. Eckersall PD. *Proteins, proteomics and the dysproteinemias*. 6 ed. Kaneko JJ, Harvey JW, editors. Burlington: Academic Press; 2008.
31. Hughes D, Elliott DA, Washabau RJ, Kueppers F. Effects of age, sex, reproductive status, and hospitalization on serum alpha 1-antitrypsin concentration in dogs. *Am J Vet Res*. 1995;56(5):568-72.
32. Carapeto MV, Barrera R, Mañe MC. Serum -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. *J Eq Vet Sci*. 2006;26:120-7.
33. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*. 2004;168(1):28-40.
34. Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):157-71.
35. Calazans SG, Daleck CR, Fagliari JJ, Repetti CF, De Nardi AB, Castro JHT, et al. Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009;61:1044-8.
36. Zandvliet M. Canine lymphoma: a review. *Vet Q*. 2016;36(2):76-104.
37. Bence LM, Addie DD, Eckersall PD. An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol*. 2005;34(4):335-41.
38. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology*. Pennsylvania: Lea & Febiger; 1993. p. 417.
39. Martínez-Subiela S, Ginel PJ, Ceron JJ. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec*. 2004;154(26):814-7.

40. Faria Jr. D. Caracterização citológica e bioquímica do sangue e do lavado peritoneal em cadelas com piometra. [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2004.
41. Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(2):144-7.
42. Márcia Mery K, Daionety Aparecida P, Elias F, Márcia Kikuyo N, Ericka Homann D, Kawahara R, et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e a-glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. *Cienc Rural.*2003;33(3):513-517.
43. Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec.* 2002;150(8):241-4.
44. Schmidt EMS, Kjelgaard-Hansen M, Thomas F, Tvarijonaviciute A, Cerón JJ, Eckersall PD. Acute phase proteins in dogs naturally infected with the Giant Kidney Worm (*Dioctophyme renale*). *Vet Clin Pathol.* 2016;45(4):657-64.
45. Matijatko V, Mrljak V, Kis I, Kucer N, Forsek J, Zivicnjak T, et al. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol.* 2007;144(3-4):242-50.
46. Dabrowski R, Wawron W, Kostro K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology.* 2007;67(2):321-7.
47. Bayramli G, Ulutas B. Acute phase protein response in dogs with experimentally induced gastric mucosal injury. *Vet Clin Pathol.* 2008;37(3):312-6.
48. Lowrie M, Penderis J, Eckersall PD, McLaughlin M, Mellor D, Anderson TJ. The role of acute phase proteins in diagnosis and management of steroid-responsive meningitis arteritis in dogs. *Vet J.* 2009;182(1):125-30.
49. Daza González MA, Fragío Arnold C, Fermín Rodríguez M, Checa R, Montoya A, Portero Fuentes M, et al. Effect of two treatments on changes in serum acute phase protein concentrations in dogs with clinical leishmaniosis. *Vet J.* 2019;245:22-8.
50. Das Gupta A, Abbi A. High serum transferrin receptor level in anemia of chronic disorders indicates coexistent iron deficiency. *Am J Hematol.* 2003;72(3):158-61.
51. Tizard IR. *Imunologia veterinária: uma introdução.* 5 ed. São Paulo: Roca; 1998. p. 545.
52. Ribeiro CR. Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no Distrito Federal – DF – Brasil. [tese]. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. 2007.
53. Munhoz TD. Concentrações séricas de proteínas de fase aguda e igg na infecção experimental por *Ehrlichia canis*. [dissertação] Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2009.
54. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure.* 1999;7(2):169-77.

55. Caspi D, Baltz ML, Snel F, Gruys E, Niv D, Batt RM, et al. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*. 1984;53(2):307-13.
56. Jasensky AK, Bondzio A, Murugaiyan J, Siebert U, Roesler U, Kohn B, et al. Characterization of the native C-reactive protein (cCRP) and the corresponding liver mRNA in dogs. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(3):462-7.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos sobre doença renal crônica (DRC) em cães são constantemente realizados, diante da alta prevalência da doença, sua gravidade, irreversibilidade e dificuldades no tratamento. A grande maioria dos estudos dedica-se a investigar biomarcadores de diagnóstico precoce e indicadores de prognóstico. Visto que o tratamento efetivo para esta doença é muito limitado, devido à não regeneração dos néfrons.

Nesse estudo foi possível realizar uma análise estatística pouco utilizada em Medicina Veterinária, avaliando um grande número de animais nos diferentes estádios da DRC, obtendo-se por meio da análise multivariada de dados associações entre diferentes parâmetros clínicos e laboratoriais.

Resultados relevantes observados incluíram a necessidade de avaliação laboratorial completa nesses pacientes, principalmente à mensuração do fósforo, cálcio, albumina e o exame de urina com RPCU. Na rotina clínica generalista, muitas vezes esses exames são subutilizados, dificultando o acompanhamento e tratamento adequado desses pacientes.

Outro exame de destaque na DRC e que precisa ser cada vez mais utilizado e compreendido é a hemogasometria, sendo a acidose uma consequência muito grave da DRC, que na maioria das vezes possível de ser revertida quando adequadamente diagnosticada. A realização da hemogasometria depende de equipamento específico, de alto custo e próximo ao local de colheita do material, visto que o exame deve ser realizado imediatamente após a colheita. Isto dificulta sua realização em muitos locais onde não há casuística suficiente que justifique a aquisição do aparelho, o que pode impedir a instituição do tratamento correto e do acompanhamento dos pacientes.

Alguns dos resultados obtidos nesse estudo já foram descritos em literatura, no entanto nenhuma pesquisa avalia todos os dados simultaneamente em análise multivariada. Como existe escassez de estudos com essas características no Brasil, foi possível realizar nesse estudo uma abordagem inédita.

O desenvolvimento do presente estudo também possibilitou a análise do proteinograma sérico de cães nos diferentes estádios da DRC e em diferentes momentos. Essas análises foram realizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Na medicina, o uso do proteinograma já é uma realidade na rotina, sendo que na medicina veterinária ainda há muito o que evoluir. É preciso aumentar o número de estudos com essa ferramenta a fim de divulgar sua utilização e reduzir os custos.

Dentre as dificuldades enfrentadas no decorrer do experimento, a principal foi a realização da eletroforese SDS-PAGE, por se tratar de uma técnica de custo elevado e dependente de conhecimento da técnica pelo operador, sendo este um procedimento complexo e que requer experiência.

O trabalho com animais de rotina também é um grande desafio na realização de estudos científicos, pois é necessário considerar a heterogeneidade dos pacientes, a dependência da colaboração dos tutores para a realização do tratamento e para os retornos dos animais, bem como a casuística do hospital veterinário. Especialmente nesse estudo, outro fator dificultador foi a necessidade da realização de alguns exames imediatamente após a colheita, sendo necessário a mobilização de uma equipe para efetivação dos mesmos.

Sugere-se, após a concretização desse estudo, a realização de novas pesquisas visando:

- a formação de um banco de dados clínicos e laboratoriais de cães e gatos com DRC atendidos no HV-UFG para posteriores avaliações estatísticas e de casuística;
- a mensuração de outras PFAs que não são especificadas em eletroforese SDS-PAGE para animais com DRC como a proteína C reativa e amiloide a sérica;
- a realização de estudo semelhante à esse em gatos, espécie com alta prevalência de DRC;
- a realização de um estudo semelhante acompanhando os animais por um tempo mais longo;
- a realização de um estudo para identificar adequadamente a proteína de peso molecular 23kDa.

A pós-graduação *strictu sensu* é uma oportunidade única de se pesquisar profundamente sobre temas de grande relevância na rotina clínica de pequenos animais e contribuir com a evolução da medicina veterinária. A trajetória de pesquisas é desafiadora, mas muito importante para a evolução da medicina veterinária.

A realização desses estudos possibilitou um grande crescimento como profissional, ser humano e principalmente na avaliação crítica do significado da pesquisa e da ciência para os animais e para o ser humano.

ANEXO 1**Ficha de anamnese e exame clínico**

Identificação do tutor

Nome do tutor: _____

Endereço: _____

Cidade: _____

Telefone: _____

Identificação do animal

Nome: _____

Sexo: _____

Idade: _____

Raça: _____

Porte: _____

Peso: _____

Aspectos gerais

Qual o motivo da consulta/queixa principal? Em caso de retorno, quais alterações apresentadas desde a última avaliação?

O animal passa por algum tipo de tratamento/ Quais medicamentos em uso?

O animal apresentou algum tipo de doença nos dois últimos anos?

O animal apresenta alterações de comportamento?

O animal aumentou a ingestão de água?

O animal alimenta-se normalmente? Qual o tipo de alimentação?

Houve alteração na frequência de micção?

Houve alteração no volume de urina produzido?

O animal sente dor ao urinar?

Qual a coloração da urina?

Como está o aspecto e coloração das fezes?

O animal apresenta vômito?

Exame físico

Pele e pêlos: _____

Turgor cutâneo: _____

Linfonodos:

Sub-mandibulares: _____

Pré-escapulares: _____

Poplíteos: _____

Mucosas: _____

TPC: _____

Cavidade oral: _____

Olhos: _____

Frequência respiratória: _____

Tipo de movimento respiratório: _____

Auscultação pulmonar: _____

Frequência cardíaca: _____

Auscultação cardíaca: _____

Pulso: _____

Palpação abdominal: _____

Palpação renal: _____

Temperatura: _____

ANEXO 2

Parâmetros de referência das variáveis hematológicas em cães saudáveis

Variáveis		Unidade	Caninos
Hematócrito		%	37-55
Eritrócitos		$10^6/\mu\text{L}$	5,5-8,5
Hemoglobina		g/dL	12-18
VCM		fL	60-77
HCM		g/dL	19,5-24,5
CHCM		%	32-36
Reticulócitos		%	0-1,5
Plaquetas		$10^3/\mu\text{L}$	170-500
Leucócitos		$10^3/\mu\text{L}$	6-17
Bastonetes	Relativo	%	0-3
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	0-300
Segmentados	Relativo	%	60 - 77
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	3000 - 11500
Linfócitos	Relativo	%	12-30
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	1000 - 4800
Monócitos	Relativo	%	3-10
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	150 - 1350
Eosinófilos	Relativo	%	2-10
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	100 - 1250
Basófilos	Relativo	%	Raros
	Absoluto	$/\mu\text{L}$	Raros

Fonte: Jain (1993)

ANEXO 3

Parâmetros de referência do perfil bioquímico sanguíneo em cães saudáveis

Variáveis	Valores de referência
Proteínas totais (g/dl)	5,8– 7,1
Albumina (g/dl)	2,6 – 3,3
Globulina (g/dl)	2,7 – 4,4
Creatinina (mg/dL)	0,5 – 1,5
Uréia (mg/dL)	20 – 60
Cálcio (mg/dL)	9 – 11,3
Fósforo (mg/dL)	2,6 – 6,2
Colesterol (mg/dl)	135 – 270
Sódio (mEq/L)	128,8- 145,6*
Potássio (mEq/L)	4,37 – 5,65

Fonte: Kaneco et al. (1997);

ANEXO 4

Termo de consentimento livre e esclarecido ao tutor do animal

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO AO TUTOR DO ANIMAL

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário, de uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir e, caso aceite participar do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra do pesquisador responsável. Se recusar não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você pode procurar o Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

Título da Pesquisa: Proteínas de fase aguda na doença renal crônica em cães

Pesquisadores: LaylaLivia de Queiroz – CRMV 5946 e Prof^a. Dr^a. Maria Clorinda Soares Fioravanti; telefones: (62) 81610347

Esta pesquisa tem como principal objetivo avaliar o comportamento de proteínas de fase aguda cães com doença renal crônica, sem custos aos proprietários dos cães selecionados. O exame clínico consistirá no exame físico completo, em que todos os dados serão anotados em ficha clínica específica ao experimento. Para realização dos exames laboratoriais, há necessidade de jejum alimentar de 12 horas. Serão realizadas colheitas de sangue, pela punção da veia jugular e cefálica, e de urina, por cistocentese (punção da bexiga através do abdome). No laboratório serão realizados os seguintes exames: hemograma, exame de urina bioquímica sérica, bioquímica urinária e hemogasometria. Para a ultrassonografia abdominal, os cães serão tricotomizados (raspagem dos pelos) no abdome. Será verificada a pressão arterial com o aparelho de Doppler. O acompanhamento dos cães selecionados será realizado mensalmente. Nesses dias, pré-determinados, o proprietário deverá colaborar e levar seu cão à clínica veterinária estipulada pelo pesquisador. Como o cão doente renal crônico deve ser monitorado periodicamente, independente da pesquisa, a grande vantagem para o proprietário e também para seu animal em participar desse experimento é que estes cães serão constantemente avaliados, podendo-se fazer ajustes na terapia ou também detectar precocemente complicações que poderão ser reversíveis, caso tratadas a tempo. **A pesquisa não gerará dor ou riscos ao animal, pelo contrário contribuirá para o seu bem-estar. O proprietário tem a garantia de sigilo nas informações obtidas, bem como o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer problema ou retaliações de qualquer natureza.**

Assinatura da Pesquisadora: _____.

Eu, _____, RG _____ CPF _____, abaixo assinado e proprietário do cão de nome _____, raça, _____, e idade _____, concordo que o mesmo participe do estudo “Proteínas de fase aguda na doença renal crônica em cães”, como sujeito. Estou ciente e fui devidamente informado e esclarecido, pela pesquisadora Layla Livia de Queiroz, sobre a pesquisa, os procedimentos envolvidos, assim como os riscos e benefícios decorrentes da participação de meu animal. Também me foi garantida a retirada de meu consentimento a qualquer momento, sem que isso resulte em qualquer penalidade ou retaliação.

Local e data

Assinatura do responsável

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do proprietário do animal em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores)

1) Nome	2) Nome
Assinatura	Assinatura

ANEXO 5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 07 março de 2016.

PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 007/16

I - Finalidade do projeto de pesquisa: doutorado

II - Identificação:

- Título do projeto:** Proteína de fase aguda nos diferentes estádios da doença renal crônica
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Layla Livia de Queiroz – EVZ/UFG
- Pesquisadores Participantes:** Profa Dra Maria Clorinda Soares Fioravanti – EVZ/UFG (orientadora)
Profa Dra Aline Maria Vasconcelos Lima - EVZ/UFG (co-orientadora)
Profa Dra Naida Cristina Borges - EVZ/UFG (co-orientadora)
- Unidade onde será realizado:** EVZ/UFG
- Data de apresentação a CEUA:** 17/02/16

III - Objetivos e justificativa do projeto:

As PFAs são biomarcadores de inflamação que já foram estudadas para diversas doenças, demonstrando sua utilidade como métodos de acompanhamento de tratamento e preditivos de prognóstico. Existem poucos estudos na medicina e não foi encontrado nenhum em medicina veterinária relacionando as PFAs e a DRC. Diante dessa lacuna, objetiva-se com este projeto estabelecer a relevância clínica da determinação das proteínas de fase aguda nos diferentes estádios da doença renal crônica em cães, de modo a estabelecer a possível relação entre a gravidade da DRC e a concentração das PFAs.

IV - Sumário do projeto:

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**
Não há possibilidade ou necessidade de métodos alternativos, visto que se trata de um estudo que vai beneficiar os animais doentes, sem lhes trazer nenhum dano.
- Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**
Serão utilizados 65 cães, machos ou fêmeas, de qualquer raça e que tenham doença renal crônica.
- Espécie e número total de animais utilizados:**
Número total de 65 cães.
- Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**
Os animais permanecerão em suas residências com todo manejo de responsabilidade do proprietário.
- Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:**
Não será utilizado agente infeccioso.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com

Parecer do comitê de ética (continuação)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Riscos de acidentes durante a colheita de amostras serão evitados por meio do uso da focinheira e contenção pelo proprietário, ainda assim toda equipe está habituada à manipulação segura da espécie em questão e serão utilizados EPIs.

Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:

O experimento é de grau de invasividade I, causando pouco desconforto ou estresse. Os animais passarão por exames de rotina para diagnóstico da doença renal crônica, serão contidos pelos próprios donos e após a colheita das amostras e dos dados necessários para o projeto retornarão para suas casas de posse do proprietário.

Método de eutanásia: Não serão submetidos à eutanásia

Destino do animal: Permanecerão em suas residências.

V – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:

Quanto a documentos: Os pesquisadores submeteram todos os documentos necessários para análise do projeto, inclusive o termo de consentimento livre esclarecido adequadamente preenchido.

Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:

O experimento possui baixo grau de invasividade e os animais permanecerão com seus proprietários durante todo experimento. Os riscos de acidentes foram previstos e serão evitados de forma apropriada.

VI - Parecer da CEUA:

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **APROVADO**. Lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFV o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 03/2018.

VII - Data da reunião: 07/03/16.

Dra. Renata Mázaro e Costa

Coordenadora da CEUA/PRPI/UFV