



GLOBAL JOURNAL OF MEDICAL RESEARCH: G
VETERINARY SCIENCE AND VETERINARY MEDICINE
Volume 18 Issue 1 Version 1.0 Year 2018
Type: Double Blind Peer Reviewed International Research Journal
Publisher: Global Journals
Online ISSN: 2249-4618 & Print ISSN: 0975-5888

Oxidative Stress in Dogs in Different Stages of Chronic Kidney Disease

By André B. Galvão, Marileda B. Carvalho, Luciane G. Batalhão, Juliana C.B. Silva, Marcelo Batalhão & Evelin C. Carnio

Abstract- The objective of this study to quantify oxidative stress in dogs with naturally acquired chronic kidney disease (CKD), considering the four stages of disease progression, using as markers reactive substances to thiobarbituric acid. Five groups of dogs, all aged between four to 18 years old. Were studied the control group was composed of healthy animals (CG, n = 17), CKD stage 1 group (CKD-1, n = 12), CKD stage 2 group (CKD-2, n = 10), CKD stage 3 group (CKD-3, n = 13) and CKD stage 4 group (CKD-4, n = 10). Oxidative stress was measured by antioxidant power, using as markers reactive substances to thiobarbituric acid. Data (means of duplicates) were submitted to analysis of variance (One-way ANOVA) nonparametric (Kruskal-Wallis) ($\alpha = 0.05$). The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The serumcreatinine values guided the classification of patients as CG, CKD-1, CKD-2, CKD-3 and CKD-4 and were 1.02 ± 0.02 mg/dL, 1.06 ± 0.05 mg/dL, 1.80 ± 0.03 mg/dL, 3.39 ± 0.21 mg/dL and 6.00 ± 0.28 mg/dL, respectively. The results related to antioxidant power (GC) 0.032 ± 0.002 mmol/ μ L, (CKD-1) 0.030 ± 0.002 nmol/ μ L, (CKD-2) 0.028 ± 0.003 nmol/ μ L, (CKD-3) 0.027 ± 0.003 nmol/ μ L and (CKD-4) 0.025 ± 0.002 nmol/ μ L.

Keywords: creatinine, hypertension, proteinuria.

GJMR-G Classification: NLMC Code: WA 360



Strictly as per the compliance and regulations of:



© 2018. André B. Galvão, Marileda B. Carvalho, Luciane G. Batalhão, Juliana C.B. Silva, Marcelo Batalhão & Evelin C. Carnio. This is a research/review paper, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial 3.0 Unported License <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), permitting all non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Oxidative Stress in Dogs in Different Stages of Chronic Kidney Disease

André B. Galvão ^α, Marileda B. Carvalho ^ο, Luciane G. Batalhão ^ρ, Juliana C.B. Silva ^ω, Marcelo Batalhão [¥] & Evelin C. Carnio [§]

Abstract- The objective of this study to quantify oxidative stress in dogs with naturally acquired chronic kidney disease (CKD), considering the four stages of disease progression, using as markers reactive substances to thiobarbituric acid. Five groups of dogs, all aged between four to 18 years old. Were studied the control group was composed of healthy animals (CG, n = 17), CKD stage 1 group (CKD-1, n = 12), CKD stage 2 group (CKD-2, n = 10), CKD stage 3 group (CKD-3, n = 13) and CKD stage 4 group (CKD-4, n = 10). Oxidative stress was measured by antioxidant power, using as markers reactive substances to thiobarbituric acid. Data (means of duplicates) were submitted to analysis of variance (One-way ANOVA) nonparametric (Kruskal-Wallis) ($\alpha = 0.05$). The results were expressed as mean \pm standard error of the mean. The serum creatinine values guided the classification of patients as CG, CKD-1, CKD-2, CKD-3 and CKD-4 and were 1.02 \pm 0.02 mg/dL, 1.06 \pm 0.05 mg/dL, 1.80 \pm 0.03 mg/dL, 3.39 \pm 0.21 mg/dL and 6.00 \pm 0.28 mg/dL, respectively. The results related to antioxidant power (GC) 0.032 \pm 0.002 mmol/ μ L, (CKD-1) 0.030 \pm 0.002 nmol/ μ L, (CKD-2) 0.028 \pm 0.003 nmol/ μ L, (CKD-3) 0.027 \pm 0.003 nmol/ μ L and (CKD-4) 0.025 \pm 0.002 nmol/ μ L. In conclusion dogs with naturally acquired CKD, clinically stable, without therapeutic intervention, presented an increased lipid peroxidation, the intensity is independent of the stage of the disease.

Keywords: creatinine, hypertension, proteinuria.

Estresse oxidativo em cães nos diferentes estádios da doença renal crônica

Resumo- Objetiva- se com este estudo quantificar o estresse oxidativo em cães com doença renal crônica (DRC) naturalmente adquirida, considerando os quatro estágios de progressão da doença, utilizando como marcadores as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Foram estudados cinco grupos de cães, com idade variando entre quatro a 18 anos, compreendendo o grupo controle, composto por animais sadios (controle, n=17), grupo com DRC estágio 1 (DRC-1, n=12), grupo com DRC estágio 2 (DRC-2, n=10), grupo com DRC estágio 3 (DRC-3, n=13) e grupo com DRC estágio 4 (DRC-4, n=10). Os cães com DRC estavam com

Author α σ : Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, Brazil. e-mail: andrebgalvao@gmail.com

Author ρ : Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, FCAV/Unesp, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, Jaboticabal, Brazil.

Author ω : Embrapa Pantanal, Rua Vinte e Um de Setembro, Nossa Senhora de Fatima, Corumbá, Brazil.

Author $\¥$ \S : Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP), Avenida dos Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, Brazil.

o quadro clínico estável e sem receber qualquer tipo de tratamento. O estresse oxidativo foi avaliado pelo poder antioxidante, estimado pelo delta, por meio da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Os dados obtidos (médias das duplicatas) foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis) ($\alpha = 0.05$). Os resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de creatinina sérica, que definiram a classificação dos pacientes do grupo controle, DRC-1, DRC-2, DRC-3 e DRC-4 foram 1,02 \pm 0,02 mg/dL; 1,06 \pm 0,05 mg/dL; 1,80 \pm 0,03 mg/dL; 3,39 \pm 0,21 mg/dL e 6,00 \pm 0,28 mg/dL, respectivamente. Os resultados relativos ao delta foram (Controle) 0,032 \pm 0,002 nmol/ μ L, (DRC-1) 0,030 \pm 0,002 nmol/ μ L, (DRC-2) 0,028 \pm 0,003 nmol/ μ L, (DRC-3) 0,027 \pm 0,001 nmol/ μ L e (DRC-4) 0,025 \pm 0,002 nmol/ μ L. Concluiu-se que cães com DRC naturalmente adquirida que se encontram clinicamente estáveis e sem intervenção terapêutica tende diminuir o poder antioxidante.

Palavras-Chave: creatinina, hipertensão, proteinúria.

I. INTRODUÇÃO

O desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidante compreende na instalação do estresse oxidativo. Com este desequilíbrio, favorece a geração e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Barbosa et al., 2010).

O paciente com transtornos renais, geralmente, apresenta-se mal nutrido, com carências em reservas de vitaminas e minerais, o que diminui os mecanismos de defesa antioxidante e favorece a instalação do estresse oxidativo (Locatelli et al., 2003). Estas condições facilitam a instalação do estresse oxidativo no paciente com doença renal crônica (DRC), bem como estão diretamente com as consequências no comprometimento de outros sistemas (Urso e Caimi, 2011).

Ao longo do curso da DRC em cães, o paciente pode passar por diferentes estádios em função do grau de comprometimento e severidade da enfermidade. De acordo com a classificação estabelecida pela "International Renal Interest Society" (Iris, 2013), no que concerne à condição renal, cães podem ser classificados como em pacientes sob risco de desenvolver DRC; e pacientes com diagnóstico estabelecido de DRC que podem ser categorizados em quatro estádios distintos de acordo com dados clínicos e laboratoriais. No estágio 1, o paciente não é azotêmico (creatinina sérica < 1,4 mg/dL); o estágio 2 é

caracterizado por azotemia renal leve (creatinina sérica $1,4 \geq 2,0$ mg/dL) e os sinais clínicos geralmente são leves ou ausentes; no estágio 3 existe azotemia renal moderada (creatinina sérica $2,1 \geq 5,0$ mg/dL) e os sinais clínicos podem estar presentes; e no estágio 4, o paciente apresenta azotemia renal severa (creatinina sérica $> 5,0$ mg/dL) e os sinais clínicos geralmente estão presentes.

Em condições de comprometimento da função renal associada com o estresse oxidativo, ocorre a elevação de biomarcadores no sangue, tal como o malondialdeído MDA (Cachoeiro et al., 2008). O MDA é um produto secundário da peroxidação lipídica, sendo considerado um candidato potencial para ser escolhido como um biomarcador geral do dano oxidativo no soro e no plasma (Vasconcelos et al., 2007).

O MDA foi o foco de atenção da peroxidação lipídica durante muitos anos, pelo fato de poder ser medido livre, utilizando-se o ácido tiobarbitúrico (TBA) (Vasconcelos et al., 2007). Assim, objetiva-se com este estudo quantificar o estresse oxidativo em cães com DRC considerando os quatro estágios de progressão da DRC, utilizando como marcadores as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

II. MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados cinco grupos de cães, compreendendo o grupo controle, composto por animais saudáveis (controle, $n=17$), grupo com DRC estágio 1 (DRC-1, $n=12$), grupo com DRC estágio 2 (DRC-2, $n=10$), grupo com DRC estágio 3 (DRC-3, $n=13$) e grupo com DRC estágio 4 (DRC-4, $n=10$). Os cães com DRC estavam com o quadro clínico estável e sem receber qualquer tipo de tratamento. Os cães avaliados foram provenientes do canil do GPNUV e do atendimento do Serviço de Nefrologia e Urologia Veterinária (SNUV) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-Unesp-Câmpus de Jaboticabal-SP.

Para a formação dos grupos, os cães foram avaliados clínica e laboratorialmente, de acordo com a abordagem semiológica descrita por Carvalho (2014). Para compor o grupo controle os cães deviam ser adultos saudáveis, sem restrição de sexo ou raça. Para compor os grupos de animais doentes os cães deveriam ser adultos, sem restrição de sexo ou raça e apresentar sinais clínicos e laboratoriais de DRC, nos estágios 1, 2, 3 ou 4, em condição clínica estável. Os motivos de exclusão compreenderam existência de urolitíase, obstrução urinária, infecção ou neoplasia de trato urinário, crise urêmica, comorbidades, necessidade de tratamento imediato, pacientes já em tratamento farmacológico, alimentar ou de reposição.

A inclusão de pacientes do SNUV foi feita sob anuência dos proprietários que se dispuseram a trazer o seu cão para duas avaliações respeitando o intervalo de 24 horas de acordo com o preconizado pela Iris

(2013). Para tanto, os proprietários foram devidamente esclarecidos sobre o desenho experimental.

Todos os animais doentes foram devidamente assistidos e foram iniciadas as intervenções terapêuticas, recomendadas para cada caso, após a segunda coleta de amostras.

O protocolo experimental do presente trabalho foi previamente aprovado, pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) conforme processo n.º 013690/11.

Sendo elegíveis para compor os grupos, os pacientes saudáveis ou com DRC, foram submetidos a duas sessões de avaliação (exame clínico de rotina e coletas de amostras de sangue e urina) com intervalo de 24 horas.

A avaliação dos animais incluiu exame físico de rotina, mensuração da pressão arterial sistólica, hemograma, urinálise, avaliação da excreção urinária de proteína, análise do perfil bioquímico e eletrolítico sérico (ureia, creatinina, proteína total, albumina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, sódio, potássio, fósforo, cálcio total e cálcio iônico), e os ensaios para mensuração de indicadores de estresse oxidativo (concentrações das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Para a determinação da pressão arterial sistólica, foi utilizado o aparelho doppler vascular¹, dotado de módulo de coleta não-invasiva. Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito e o manguito² foi colocado no membro torácico esquerdo, entre o olecrano e o carpo. Os manguitos utilizados apresentaram aproximadamente 40% da circunferência do local em que foram colocados no membro torácico. Foram realizadas sete determinações e os valores limítrofes superiores e inferiores descartados para a obtenção de uma média mais acurada (Carvalho, 2014). Depois de estabelecida as médias os valores foram classificados utilizando os critérios estabelecidos pela Iris (2013).

As contagens globais de eritrócitos, leucócitos, e plaquetas, bem como a taxa de hemoglobina e hematócrito, VGM e CHGM foram obtidas com o auxílio de um contador automático³. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços sanguíneos corados com mistura de Metanol, May-Gruwald e Giemsa. As amostras foram processadas no período máximo de uma hora após a coleta.

A proteinúria foi avaliada por meio da determinação da razão proteína/creatinina da urina (U-P/C), a partir dos valores de concentração de creatinina e de proteína obtidas na mesma amostra de urina. Para a urinálise e avaliação da proteinúria, as amostras de urina foram obtidas por meio de cateterização

¹ Doppler Vascular DV10 Pastilha Microem – Ribeirão Preto – SP.

² Manguito Neonatal dois tubos.

³ COULTER modelo ABC T8.

transmural e analisadas no máximo 30 minutos após a coleta. Para os testes químicos foram utilizadas fitas reagentes⁴.

As amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método Jaffé modificado), ureia (método enzimático), proteína total (método biureto), albumina (método verde de bromocresol), cálcio total (método da cresoltaleína complexona), e fósforo (método do fosfomolibdato). Nas amostras de urina foram dosadas creatinina (método Jaffé modificado) e proteína total (método do vermelho de pirogalol). Todas as análises bioquímicas foram feitas com os conjuntos de reagentes do sistema Labtest⁵ para diagnóstico. Para as leituras foi empregado espectrofotômetro⁶ semi-automático.

As concentrações séricas de sódio, potássio e cálcio iônico foram feitas pelo método de eletrodo íon-seletivo⁷.

Para analisar os indicadores de estresse oxidativo, os ensaios foram conduzidos em duplicata das amostras. Para determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foram realizados ensaios únicos, para evitar erros entre ensaios.

A extensão da degradação da desoxirribose por radicais hidróxi (OH⁻) gerados neste sistema foi mensurada pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) descrito por Payá et al., (1992). Alíquotas das amostras foram diluídas em solução tampão Tris-ácido cítrico mantendo-se o padrão 100 µL de soro. Das duas alíquotas de soro a primeira foi adicionada a 2mL da solução de TBA (15% de Ácido Tricloroacético, 0,275% de Ácido Tiobarbitúrico e 0,25 M de Ácido Clorídrico) para a obtenção da peroxidação lipídica espontânea. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 100°C por 15 minutos e, então, foram resfriados e centrifugados por 15 minutos a 1200g para formação de precipitado. O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro. O cromógeno desenvolvido foi identificado por meio de leituras de absorvância em um comprimento de onda fixo de 532nm. A segunda alíquota foi adicionada a 2mL de solução de TBA-SG (15% de Ácido Tricloroacético, 0,375% de Ácido Tiobarbitúrico, 0,25M de Ácido Clorídrico, 0,24mM de Cloreto de Ferro e 50 µM de Hidroxitoluenobutilado) para obtenção da peroxidação lipídica induzida. Esse procedimento, denominado sistema gerador, tem a mesma função do sistema gerador para os radicais O₂⁻ e H₂O₂. Os resultados da mensuração de peroxidação lipídica foram expressos em nmol/µL.

A solução de TBA quantifica a peroxidação lipídica espontânea, enquanto a solução TBA-SG

quantifica a peroxidação lipídica induzida ou catalizada. Na diferença entre TBA-SG e TBA, se obtém o delta, que indica o poder antioxidante (Buege e Aust, 1978).

O experimento seguiu delineamento em blocos casualizados com distribuição dos animais de acordo com o diagnóstico. Os resultados foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) não paramétrica (Kruskal-Wallis), considerando o fator grupo, seguida de teste de Dunn de comparação múltipla das médias ($\alpha = 0,05$).

As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prisma version 6.02 for Windows, GraphPad Software, La JollaCalifornia USA.

III. RESULTADOS

O perfil renal dos 17 cães saudáveis e dos 45 cães com DRC que foram distribuídos em quatro grupos em função do estágio da doença encontram-se na Tabela 1 os resultados (média±erro padrão da média e comparação múltipla das médias) das concentrações séricas de creatinina (Scr), densidade urinária (DU), razão proteína/creatinina urinária (U-P/C) e pressão arterial sistólica (PAS) alicerçam a classificação.

As médias de Scr não diferiram significativamente entre si quando comparados os grupos Controle e DRC-1, mas houve diferença significativa entre estes e os grupos DRC-2, DRC-3 e DRC-4. Também foi constatado aumento significativo progressivo das médias de Scr relacionado com os estágios da doença. O comprometimento da capacidade de concentrar a urina, estimada pela DU, foi evidenciado por diminuição gradativa das médias, que diferiram significativamente nos grupos DRC-2, DRC-3 e DRC-4 em relação à do Controle (Tabela 1).

Os dados relativos à U-P/C resultaram em médias significativamente maiores que a do Controle, nos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4, mas não no grupo DRC-2. O mesmo quadro foi observado em relação à PAS, cuja média do grupo DRC-2 não diferiu significativamente das do Controle e DRC-1, embora as médias dos grupos DRC-1, DRC-3 e DRC-4 tenham sido significativamente maiores que a do Controle (Tabela 1).

⁴ COMBUR 10 Test UX® - Boehringer Mannheim S.A. – Buenos Aires – Argentina.

⁵ LABTEST – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

⁶ LABQUEST-LABTEST – Labest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa – MG.

⁷ ISELAB – Drake – São José do Rio Preto, SP, Brasil.

Tabela 1: Resultados (média \pm erro padrão) referentes aos parâmetros considerados como critérios para inclusão dos animais no grupo de cães saudáveis (Controle; n=17) ou nos grupos de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13), e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas

Variável	Grupos avaliados				
	Controle	DRC-1	DRC-2	DRC-3	DRC-4
Scr (mg/dL)	1,02 \pm 0,02c	1,07 \pm 0,04c	1,81 \pm 0,03b	3,40 \pm 0,15ab	6,00 \pm 0,20a
DU	1,034 \pm 0,00a	1,023 \pm 0,00ac	1,017 \pm 0,00bc	1,013 \pm 0,00b	1,012 \pm 0,00b
U-P/C	0,13 \pm 0,01c	1,14 \pm 0,12b	0,59 \pm 0,16c	1,96 \pm 0,25ab	1,53 \pm 0,25ab
PAS (mmHg)	137,9 \pm 1,9b	181,3 \pm 6,1a	159,0 \pm 6,1ab	186,9 \pm 6,1a	180,0 \pm 7,3a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn $\alpha=0,05$). Scr = Creatinina Sérica; DU = Densidade Urinária; U-P/C = Razão Proteína/Creatinina Da Urina, PAS = Pressão Arterial Sistólica.

Além da Scr, utilizada como critério para composição dos grupos, foram avaliados diversos outros parâmetros da bioquímica sérica dos cães estudados (Tabela 2). A média de concentração sérica de ureia (Sureia) do grupo DRC-2 foi significativamente maior do que a do Controle e as médias dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente maiores em relação às dos demais. Um quadro semelhante foi observado com as médias de concentração sérica de fósforo (SP).

As médias de concentrações séricas de cálcio total (SCat) dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente maiores que a do Controle e somente a média do DRC-4 foi significativamente maior que as dos grupos DRC-1 e DRC-2. Contudo, as concentrações séricas de cálcio ionizados (SCai) não variaram significativamente entre os grupos.

Quanto às concentrações séricas de sódio (SNa) e de potássio (SK), as diferenças mais marcantes foram observadas no grupo DRC-2 que apresentou média de SNa significativamente maior que as dos grupos DRC-1 e DRC-4 e a média de SK significativamente menor que as observadas nos outros quatro grupos.

As médias de concentrações séricas de proteína total (SPT) e de albumina (SAIb) dos grupos DRC-3 e DRC-4 foram significativamente menores que as respectivas médias do grupo Controle.

Tabela 2: Resultados (média \pm erro padrão) do perfil bioquímico sérico de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13), e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas.

Variável	Grupos avaliados				
	Controle	DRC-1	DRC-2	DRC-3	DRC-4
Sureia (mg/dL)	31,18 \pm 1,73c	51,85 \pm 5,33cd	80,17 \pm 11,22bd	177,30 \pm 14,73a	223,10 \pm 11,23a
SP (mg/dL)	4,16 \pm 0,16c	3,90 \pm 0,30c	5,28 \pm 0,36bc	6,41 \pm 0,46ab	8,26 \pm 0,73a
SCat (mg/dL)	10,17 \pm 0,19c	10,37 \pm 0,18bc	10,28 \pm 0,15bc	10,97 \pm 0,20ab	11,52 \pm 0,30a
SCai (mg/dL)	1,07 \pm 0,03a	1,16 \pm 0,02a	1,10 \pm 0,05a	1,03 \pm 0,05a	1,08 \pm 0,06a
SNa (mEq/L)	148,10 \pm 0,42ab	146,30 \pm 1,00b	150,60 \pm 0,71a	148,26 \pm 1,14ab	146,70 \pm 0,87b
SK (mEq/L)	4,70 \pm 0,07ab	4,60 \pm 0,10b	4,20 \pm 0,09c	5,15 \pm 0,11a	5,02 \pm 0,16ab

Spt (g/dL)	7,60 ± 0,09a	7,29±0,11ab	7,43 ± 0,17ab	6,99 ± 0,16b	6,88 ± 0,26b
SAIb (g/dL)	3,33 ± 0,08a	3,18 ± 0,11ab	3,28 ± 0,09ac	2,75 ± 0,13b	2,86 ± 0,12bc
SALT (mg/dL)	55,39 ± 3,22a	51,67±4,44a	52,28 ± 4,33a	61,04 ± 3,37a	44,43 ± 4,02a
SFA (mg/dL)	63,23±6,66a	57,34±5,47a	71,20 ± 8,54a	70,31 ± 7,50a	49,40 ± 4,36a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$). Sureia = Ureia Sérica; SP = Fósforo Sérico; SCat = Cálcio Total Sérico; SCai = Cálcio Ionizado Sérico; SNa = Sódio Sérico; SK = Potássio Sérico; Spt = Proteína Total Sérica; SAlb = Albumina Sérica; SALT = Alanina Aminotransferase Sérica; SFA = Fosfatase Alcalina Sérica;

Tabela 3: Resultados (média ± erro padrão) do perfil eritrocitário, plaquetário e leucocitário de cães saudáveis (Controle; n=17) e de cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13) e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas

Variável	Grupos Avaliados				
	Controle	DRC-1	DRC-2	DRC-3	DRC-4
He (x10 ⁶ /μL)	7,31 ± 0,16a	6,93 ± 0,33a	6,17 ± 0,22ab	4,87 ± 0,29bc	4,35 ± 0,24c
Hb (g/dL)	17,59 ± 0,39a	15,54 ± 0,75a	14,97 ± 0,56ab	11,98 ± 0,80bc	10,54 ± 0,63c
Ht (%)	53,66 ± 1,24a	48,21 ± 2,30ab	43,85 ± 1,65bc	36,54 ± 1,97cd	31,88 ± 1,81d
VGM (fL)	73,18 ± 0,57a	71,79 ± 0,78a	73,50 ± 0,67a	73,85 ± 0,46a	72,00 ± 0,77a
CHGM (g/dL)	32,56 ± 0,42a	31,83 ± 0,62a	33,40 ± 0,54a	33,74 ± 0,47a	32,19 ± 0,89a
Plaq (x10 ³ /μL)	328,41±12,71a	315,33±18,55a	324,60±23,71a	385,30±24,81a	336,10±17,19a
Le (x10 ³ /μL)	8,57 ± 0,36b	8,36 ± 0,49b	11,82 ± 0,80a	8,98 ± 0,64ab	10,48 ± 1,00ab
Ns (x10 ³ /μL)	6,11 ± 0,30b	6,02 ± 0,41b	9,06 ± 0,70a	6,26 ± 0,45b	7,30 ± 0,69ab
Linf (x10 ³ /μL)	1,60 ± 0,12a	1,49 ± 0,17a	1,90 ± 0,21a	1,85 ± 0,22a	1,46 ± 0,10a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$). He = Hemácias; Hb = Hemoglobina; Ht = Hematócrito; VGM = volume globular médio; CHGM = concentração de hemoglobina globular média; Plaq = Plaquetas; Le = Leucócitos totais; Ns = Neutrófilos segmentados; Linf = Linfócitos.

Quanto a avaliação do estresse oxidativo, a média da lipoperoxidação espontânea (TBA) do grupo DRC-3 foi significativamente maior do que a do grupo Controle. As demais médias (DRC-1, DRC-2 e DRC-4) não diferiram significativamente entre si ou em relação

às médias do Controle e do DRC-3 (Tabela 4). As médias da lipoperoxidação induzida (TBASG) não diferiram significativamente entre si (Tabela 4). As médias do poder antioxidante (Delta TBASG-TBA) não diferiram significativamente entre si (Tabela 4).

Tabela 4: Dados (média ± erro padrão da média) das concentrações séricas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, referente à lipoperoxidação induzida TBASG, lipoperoxidação espontânea – TBA, delta TBASG-TBA de cães saudáveis (Controle; n=17), e cães com doença renal crônica nos estágios 1 (DRC-1; n=12), 2 (DRC-2; n=10), 3 (DRC-3; n=13) e 4 (DRC-4; n=10). Os dados foram obtidos em dois momentos (repetição) com intervalo de 24 horas

Variável	Grupos Avaliados				
	Controle	DRC-1	DRC-2	DRC-3	DRC-4
TBASG (nmol/μL)	0,057±0,003a	0,060±0,002a	0,053±0,002a	0,057±0,003a	0,055±0,003a
TBA (nmol/μL)	0,025±0,001b	0,030±0,001ab	0,030±0,001ab	0,031±0,001a	0,030±0,002ab
Delta (nmol/μL)	0,032±0,002a	0,030±0,002a	0,028±0,003a	0,027±0,003a	0,025±0,002a

Médias, na mesma linha, seguidas de pelo menos uma letra em comum não diferem estatisticamente entre si (Teste de Dunn; $\alpha=0,05$). TBASG = lipoperoxidação induzida; TBA = lipoperoxidação espontânea; Delta = poder antioxidante (diferença entre TBASG e TBA).

IV. DISCUSSÃO

Depois de estabelecida a DRC, a magnitude da disfunção renal geralmente permanece estável por meses ou declina vagarosamente no decorrer de meses

a anos (Zatz et al., 2012). Segundo Galvão et al. (2013) após a instalação do dano renal no cão ocorrem mudanças estruturais e adaptativas dos néfrons remanescentes, a adaptação inicial decorre em hipertrofia e hipertensão glomerular, na tentativa de

manter a taxa de filtração glomerular (TFG), que promove alterações funcionais.

A disfunção renal é frequentemente associada à condições de desequilíbrio oxidativo. Os diferentes marcadores de tal processo, como o MDA estimado pelo TBA, podem se mostrar elevados em graus variados conforme o grau de progressão da enfermidade e condição clínica do paciente humano (Cachoeiro et al., 2008; Karamouzis et al., 2008). No entanto, Small et al., (2012) descreveram que o TBA para o estudo do estresse oxidativo em amostras séricas de pacientes humanos consiste de uma metodologia inespecífica por ser muito sensível a artefatos. No presente estudo buscou-se estimar a atividade do estresse oxidativo em cães com DRC estágios 1 a 4, utilizando como parte desta avaliação a concentração sérica de TBA e o delta, sendo observado apenas a média do DRC-3 em relação ao TBA significativamente maior quando comparada aos demais grupos estudados. Entretanto, os valores das médias de TBA observados nos grupos Controle, DRC-1, DRC-2 e DRC-4 não diferiram significativamente entre si, mesmo em condições de estadiamento diferente da enfermidade, porém, em se tratando de animais clinicamente estáveis, mesmo com graus variados de disfunção renal, o sistema de defesa antioxidante enzimático, desses pacientes, poderia estar satisfatório, o que pode ter contribuído para que a concentração sérica de TBA não elevasse conforme o estágio da doença. Em relação ao delta as medias dos grupos não diferiram entre si, entretanto, observamos que ocorre uma tendência de diminuição do poder antioxidante conforme o estagiamento da DRC, segundo Scoot (2008) o paciente paciente doente renal crônico apresenta-se mal nutrido, com carências em reserva de vitaminas e minerais, o que diminui os mecanismos de defesa antioxidante, e favorece a instalação do estresse oxidativo.

Segundo Schmid e Schiffel (2010) anemia é um dos achados mais comuns em pacientes com DRC, que predispõe ao estresse oxidativo, pois as hemácias representam o principal componente de defesa antioxidante, por possuírem altas concentrações de enzimas (glutathione), capazes de metabolizar as ERO. A hipóxia tecidual aumenta consideravelmente a produção das ERO e o componente lipídico da membrana eritrocitária está também sujeito à agressão oxidativa. Os produtos desta lipoperoxidação podem induzir o estresse oxidativo intracelular e, na ocorrência de deficiência da defesa do sistema antioxidante, ocorrerá a hemólise. Lustoza (2004) descreveu que o aumento da produção das ERO que ocorre em estados anêmicos crônicos, é seguida da diminuição das defesas antioxidantes do sangue, no presente estudo foi observado uma tendência de diminuição do delta conforme o estagiamento da DRC, adicionalmente, notamos a

diminuição dos parâmetros do perfil eritrocitário conforme o grau de estagiamento da DRC, conforme o valor da média observado de cada grupo com DRC em relação ao grupo Controle. Embora, os pacientes com DRC do presente estudo não apresentassem graus de anemia severa, os achados dos autores supracitados, são semelhantes aos nossos achados. Adicionalmente, quanto ao perfil eritrocitários dos nossos cães, observamos que o VGM e CHGM dos pacientes com DRC, independente do estágio, encontravam-se em valores de normalidade para espécie, mesmo na presença de anemia, segundo Navarro-Garcia (2005) a anemia normocítica normocromica não regenerativa é comum em pacientes com DRC.

V. CONCLUSÃO

As avaliações relativas às concentrações séricas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico revelaram resultados pouco conclusivos, que podem indicar inespecificidade dos métodos empregados ou amostragem insuficiente. Contudo, os resultados sugerem tendência a aumento da peroxidação lipídica espontânea e diminuição do poder antioxidante nos pacientes com DRC.

AGRADECIMENTO

Estes estudo apresentou o apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Proc. No 2011 / 08767-3).

REFERÊNCIA

1. BARBOSA, K. B. R.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
2. BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, New York, v. 52, p. 302-10, 1978.
3. CACHOFEIRO, V.; GOICOCHEA, M.; VINUESA, S. G.; OUBINA, P.; LAHERA, V.; LUNÓ, J. Oxidative stress and inflammation, a link between chronic kidney disease and cardiovascular disease. *Kidney International*, New York, v. 111, n. 74, p. 54-59, 2008.
4. CARVALHO, M. B. Semiologia do sistema urinário. In: FEITOSA, L. *Semiologia Veterinária: A arte do Diagnóstico*, 3º ed. São Paulo: Roca, 2014, Cap. 10, p. 389-409.
5. IRIS. International Renal Interest Society. *Staging Chronic Kidney Disease (CKD) 2013*. Disponível em: <<http://www.iriskidney.com/pdf/IRIS%20A4%20Poster.pdf>>. Acesso em 14/04/2016.
6. GALVÃO, J. F. B.; NAGODE, L. A.; SCHENCK, P. A.; CHEW, D. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *Journal of*

- Veterinary Emergency and Critical Care*, San Antonio, v. 23, n. 2, p. 134-162, 2013.
7. KARAMOUZIS, I.; SARAFIDIS, P. A.; KARAMOUZIS, M.; ILLIADIS, S.; HAIDICH, A.; SIOULIS, A.; TRIANTOS, A.; CHRISTAKI, N.; GREKAS, D. M. Increase in oxidative stress but not in antioxidant capacity with advancing stages of chronic kidney disease. *American Journal Nephrology*, New York, v. 28, n. 1, p. 397-404, 2008.
 8. LOCATELLI, F.; CANAUD, B.; ECKARDT, K. U.; STENVINKEL, P.; WANNER, C.; ZOCCATLI, C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrology Dialysis Transplantation*, Oxford, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.
 9. LUSTOZA, M. D. Avaliação do estresse oxidativo em cães com insuficiência renal crônica e anemia. 2004. 96 f. Dissertação de mestrado em medicina veterinária—Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2004.
 10. NAVARRO-GARCIA, C. E. K. *Manual de hematologia veterinária*. 2. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2005, 206 p.
 11. PAYÁ, M.; HALLIWEL, B.; HOULT, J.R. Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochemical Pharmacology*, Oxford, v. 44, n. 2, p. 205-214, 1992.
 12. SCHMID, H.; SCHIFFL, H. Erythropoiesis stimulating agents and anaemia of end-stage renal disease. *Cardiovascular Hematology Agents*, San Francisco, v.8, n.4, p. 164-172, 2010.
 13. SCOOT, A. N. D. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*, New York, v. 38, n. 1, p. 157-166, 2008.
 14. SMALL, D. M.; COOMBES, J. S.; BENNETT, N.; JOHNSON, D. W.; GOBE, G. C. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease. *Nephrology*, Carlton, v. 17, n. 4, p. 311-321, 2012.
 15. VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas do oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
 16. URSO, C.; CAIMI, G. Oxidative stress and endothelial dysfunction. *Minerva Medicina*, Torino, v. 102, n. 1, p. 59-77, 2011.
 17. ZATZ, R.; SEGURO, A. C.; MALNIC, G. *Bases Fisiológicas da Nefrologia*. São Paulo: Atheneu, 2012. p. 333-362.