



**Universidad Michoacana de San Nicolás de  
Hidalgo**

**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas**

**"Dr. Ignacio Chávez"**

**"DETERMINACIÓN DE PROTEINURIA EN ORINA DE PERROS SANOS Y  
CON ENFERMEDAD RENAL POR TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS"**

## **TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**Maestra en Ciencias de la Salud**

QUE PRESENTA:

**MVZ. Angélica Gutiérrez Cancino**

ASESOR DE TESIS:

**D. en C. Virgina A. Robinson Fuentes**

COASESOR DE TESIS:

**MC. Salvador Padilla Arellanes**



MORELIA, MICHOACÁN, JULIO 2013

## **GRACIAS:**

*A Dios, que sin importar nombre o religión, me dio la fuerza para seguir ante toda adversidad y el albedrío para dar el valor a lo que valor merece.*

*A mis padres, en especial a mi papá, por mostrarme que el valor de una persona no está en su riqueza ni en un título, se encuentra en sus ganas por vivir y su coraje para seguir adelante, siempre en busca de la felicidad.*

*A mis hermanas: a Lupita, por no soltar mi mano nunca, a pesar del tiempo y la distancia; a Teresa, porque sin importar los años, sigue enseñándome el significado de la nobleza.*

*A Jesús Sánchez, por su tiempo, su apoyo incondicional, su comprensión y por enseñarme que aquel que no sufre, no aprende y el que no aprende no cambia...todo error es una oportunidad de aprender y cambiar para bien.*

*A mis amigos, que fueron pilares en este trabajo, por estar conmigo en los peores momentos y no permitir que renunciara.*

*A Salvador Padilla, por escucharme con comprensión y cariño, por todos estos años de amistad incondicional.*

*A la D. en C. Virginia A. Robinson, por su apoyo en el camino que me llevó a concluir este proyecto.*

## *DEDICATORIA*

*Para los hombres de mi vida, Francisco Gutiérrez Cisneros y Jesús Sánchez González, que con su fortaleza y coraje me enseñaron a enfrentar cada día, siempre con la mirada en el cielo, con las alas al viento y con la pies firmes en la tierra...*

*... "no tenía miedo a las dificultades: lo que la asustaba era la obligación de tener que escoger un camino. Escoger un camino significaba abandonar otros"...*

*Paulo Coelho.*



# ***ÍNDICE GENERAL***

LISTA DE ABREVIATURAS .....	1
I. INTRODUCCIÓN .....	2
II. MARCO TEORICO .....	4
II.1 FISIOLÓGÍA RENAL .....	4
I.1.1 - La Nefrona .....	4
1.2 Fisiología del Filtrado.....	7
II.2 INSUFICIENCIA RENAL.....	8
II.2.1 Etiología .....	9
II.2.2 Fisiopatología.....	9
II.3 PROTEINURIA.....	10
II.3.1 Proteína urinaria normal en el perro.....	10
II.3.2 Fisiopatología y Clasificación de la Proteinuria .....	11
II.3.3 Implicaciones de la Proteinuria .....	15
II.3.4 Detección de Proteinuria.....	16
II.4 BIOMARCADORES URINARIOS DE DAÑO RENAL EN PERROS.....	19
II.4.1 Fibrinógeno.....	23
II.4.2 $\alpha$ -1 antitripsina .....	24
II.5 ELECTROFORESIS.....	26
II.5.1 Electroforesis en Gel.....	26
II.5.1 Electroforesis Capilar .....	28
III. JUSTIFICACIÓN .....	31
IV. HIPÓTESIS .....	32
V. OBJETIVOS .....	32
V.1 OBJETIVO GENERAL.....	32
V.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	32

VI.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
VI.1	MATERIALES .....	33
VI.2	TIPO DE ESTUDIO.....	33
VI.3	GRUPOS DE ANIMALES.....	33
VI.3.1	Criterios de Inclusión.....	33
VI.4	MÉTODO GENERAL EMPLEADO EN CADA ANIMAL.....	34
VI.5	CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS CLÍNICAS.....	35
VI.5.1	Determinación de concentración proteica en muestras .....	35
VI.5.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE).....	35
VI.6	MÉTODO DE ECZ PARA FIBRINÓGENO Y $\alpha$ 1- ANTITRIPSINA.....	39
VI.6.1	Preparación del stock de fibrinógeno y $\alpha$ 1-antitripsina.....	39
VI.6.2	Selección del buffer de corrimiento.....	39
VI.6.3	Análisis electroforético en ECZ.....	41
VI.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	41
VII.	RESULTADOS.....	42
VII.1	PACIENTES INCLUIDOS .....	42
VII.2	CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LA MUESTRAS.....	44
VII.3	ELECTROFORESIS EN GEL: SDS-PAGE .....	45
VII.4	ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.....	48
VIII.	DISCUSIÓN .....	52
IX.	CONCLUSIONES.....	60
X.	BIBLIOGRAFÍA .....	61

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteinurias específicas. ....	13
Tabla 2 Métodos de detección de Proteinuria. ....	17
Tabla 3. Técnicas de separación para determinar proteínas. ....	18
Tabla 4. Modalidades de EC para el análisis de diferentes moléculas. ....	29
Tabla 5. Cantidades de reactivos para geles de poliacrilamida. ....	36
Tabla 6. Composición del Buffer de corrida Laemmli 10X. ....	37
Tabla 7. Composición del Buffer de carga. ....	37
Tabla 8. Protocolo de tinción de plata para SDS-PAGE. ....	38
Tabla 9. Condiciones probadas para fibrinógeno en ECZ. ....	40
Tabla 10. Condiciones probadas para AA1 en ECZ. ....	40
Tabla 11. Secuencia del método para AA1 y fibrinógeno en ECZ. ....	41
Tabla 12. Reseña de los pacientes incluidos en los diferentes grupos. ....	42
Tabla 13. Diagnóstico y resultados de laboratorio de los pacientes incluidos. ....	43
Tabla 14. Concentración de proteína en las muestras urinarias. ....	45
Tabla 15. Pesos moleculares de las bandas observadas de los cuatro grupos. ....	48
Tabla 16. Proteínas relacionadas a las bandas observadas de acuerdo a su PM. ....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. La nefrona y sus túbulos colectores (Banks, 1993). .....	5
Figura 2. Clasificación de la proteinuria glomerular y tubular (Portillo <i>et al</i> , 1997).12	
Figura 3. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras del Grupo 1 y 2. ....	46
Figura 4. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras urinarias del Grupo 3. ....	46
Figura 5. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras urinarias del Grupo 4. ....	47
Figura 6. Electroferograma de fibrinógeno en concentración de 200µg/mL en buffer Tricina 25mM pH 8. ....	48
Figura 7. Electroferograma de fibrinógeno en concentración de 200µg/mL en buffer Fosfato de Sodio 20mM pH 6.2, MOPS 100mM con CaCl <sub>2</sub> pH 7.0 y en Tricina 25mM pH 8. ....	49
Figura 8. Movilidad electroforética del fibrinógeno en buffer. ....	50
Figura 9. Movilidad electroforética del fibrinógeno en buffer. ....	50
Figura 10. Electroferograma de AA1 en concentración de 200µg/mL en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5 .....	51
Figura 11. Electroferograma de AA1 en concentración de 200µg/mL en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5 .....	51



## **RESUMEN**

La enfermedad renal representa la onceava causa de mortalidad en la población mexicana hasta el 2008, con 11 202 muertes registradas. En medicina veterinaria, la IRC es una patología de frecuente presentación en perros, identificando como factores de riesgo a las enfermedades gastrointestinales, cardíacas y el uso de agentes terapéuticos nefrotóxicos. Los métodos utilizados en veterinaria para valorar la función renal, muestran alteraciones cuando sólo resta el 25 a 30% de la función renal. La presencia en orina de proteínas de alto o bajo peso molecular, como AA1 y el fibrinógeno respectivamente, refleja la localización del daño renal en etapas tempranas. La electroforesis, en sus diferentes variantes, es utilizada como un método de separación analítica de proteínas urinarias en la localización de lesión renal. Se determinó el patrón electroforético de proteínas en orina mediante SDS-PAGE de perros clasificados en 4 grupos: perros jóvenes y geriátricos clínicamente sanos, perros con antecedentes de uso de agentes nefrotóxicos y perros con diagnóstico de IRC. También fue desarrollado un método para el análisis de AA1 y Fibrinógeno mediante ECZ, para su uso como marcadores de daño renal. El uso de SDS-PAGE permitió la detección de proteinuria y localización de la lesión, cuando las pruebas rutinarias no presentaron alteraciones y ofreció la posibilidad de detectar daño renal subclínico. La ECZ mostró ser una técnica altamente eficiente, capaz de obtener resultados en poco tiempo y prometedora en el análisis de proteínas propuestas como marcadores de daño renal. Su utilidad real en la detección de IR, se demostrará al aplicar los métodos establecidos en el análisis de muestras clínicas.

Palabras Clave: Insuficiencia Renal, Proteinuria, Electroforesis Capilar, SDS-PAGE, AA1, Fibrinógeno.

## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

aa	Aminoácido	KDa	Kilodaltones
AA1	$\alpha$ 1 Antitripsina	KV	Kilovoltios
BUN	Nitrógeno Ureico en Sangre	KIM-1	Molécula de daño renal-1
BH	Biometría Hemática	LMW	Peso Molecular Bajo
CRP	Proteína C Reactiva	LL	Leucemia Linfoblástica
CS	Clínicamente Sano	MPM	Marcador de Peso Molecular
d. i.	Diametro interno	NAG	N acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa
Dx	Diagnóstico	NGAL	Lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo
EC	Electroforesis Capilar	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
ECZ	Electroforesis Capilar de Zona	QS	Química Sanguínea
EGO	Examen General de Orina	RBP	Proteína de Unión a Retinol
FEO	Flujo Electrosmótico	sCr	Creatinina sérica
GGT	$\gamma$ Glutamyl-transferasa	SSA	Ácido Sulfosalicílico
IMW	Peso Molecular Intermedio	SDS	Dodecil sulfato sódico
IR	Insuficiencia Renal	TFG	Tasa de Filtrado Glomerular
IRA	Insuficiencia Renal Aguda	TVT	Tumor Venéreo Transmisible
IRC	Insuficiencia Renal Crónica		

## ***I. INTRODUCCIÓN***

La enfermedad renal representa la onceava causa de mortalidad en México; en el año 2009 se registraron 11 202 muertes (SINAIS, 2010). Según *The American Society of Nephrology* (ASN, 2009), la enfermedad renal es un problema en crecimiento tanto para la salud pública como para la economía, ya que se calcula que aproximadamente 20 millones de americanos tienen alguna evidencia de enfermedad renal crónica y están en riesgo de desarrollar insuficiencia renal, y cerca de 485 000 han sido diagnosticados con insuficiencia renal y requieren de diálisis o trasplante renal para mantenerse con vida, siendo un problema para la economía al representar un 27.6% de gastos médicos anuales en EUA.

La insuficiencia renal crónica (IRC) no solo afecta a los humanos pues en el perro y en el gato es la forma más común de enfermedad renal, ya que se ha considerado que uno de cada tres gatos y uno de cada cinco perros geriátricos en los Estados Unidos padecen esta enfermedad que se considera progresiva e irreversible (Sanderson, 2005); sin embargo, no se cuenta con estudios epidemiológicos en nuestro país de esta enfermedad en dichas especies. Las afecciones del sistema genitourinario han sido reportadas como la cuarta causa de presentación a consulta de perros en una clínica veterinaria de la Ciudad de Morelia, Michoacán (Maldonado, 2003).

Se ha observado que en nuestro medio no se cuenta con bases de datos de expedientes clínicos que permitan el análisis y la evaluación oportuna de los problemas que aquejan a las mascotas en una ciudad, región o a nivel país. Sin embargo, a la IRC se le ha reconocido como una patología que frecuentemente afecta a los perros, y se han identificado como factores de riesgo a las enfermedades gastrointestinales, cardíacas y tratamientos medicamentosos previos (Moreno *et al*, 2007).

Los veterinarios comúnmente utilizan el nitrógeno uréico en sangre (BUN) y las concentraciones de Creatinina sérica (sCr), en conjunto con la gravedad específica de orina para valorar la función renal. Desafortunadamente, estos valores de laboratorio, llegan a ser anormales cuando aproximadamente sólo restan el 25 a 30% de la función renal. Para entonces, la enfermedad renal se encuentra demasiado avanzada para realizar una intervención médica que ayude a mejorar la condición del paciente (Fricks *et al*, 2005). En consecuencia, la valoración de la función renal es difícil debido a la baja sensibilidad diagnóstica de los parámetros tradicionales de laboratorio ya que la creatinina sérica, solamente se incrementa después la pérdida de más del 75% de la masa renal y la urea es afectada por condiciones no renales como la dieta, función hepática y flora bacteriana intestinal (Reyers, 2003). Usualmente las pruebas clínicas usadas en veterinaria para la valoración de la función renal sólo permiten el

diagnóstico de la enfermedad cuando se alcanza un estado de insuficiencia progresivo e irreversible (Polzin *et al*, 2007).

Debido a la problemática en el diagnóstico temprano mediante las pruebas convencionales o medición de la TFG, en los últimos años las investigaciones, tanto en medicina humana como veterinaria, se han enfocado en la búsqueda de biomarcadores urinarios y séricos que reflejen la disfunción renal desde su inicio, con alta sensibilidad y especificidad. Para lo cual se echa mano de la proteómica aplicada a la medicina. La proteómica permite identificar, categorizar y clasificar las proteínas con respecto a su función, permitiendo la caracterización de redes funcionales y su dinámica durante procesos fisiológicos y patológicos. La proteómica se está aplicando en la identificación de nuevos marcadores para el diagnóstico de enfermedades muy diversas (Medicina Molecular de FIBAO, 2007).

Una técnica comúnmente utilizada en la identificación de proteínas es la electroforesis. La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, determinado principalmente por su forma y tamaño. La electroforesis, en sus diferentes variantes, comúnmente ha sido utilizada como un método de separación analítico para la visualización e identificación de proteínas. La electroforesis de proteínas se realiza generalmente sobre matrices tipo gel, la más común es la poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida poseen propiedades tales como transparencia, elasticidad, porosidad controlable y compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos que los hace un excelente medio de soporte para separaciones electroforéticas (Schultze y Jensen, 1989). Otra variante es la Electroforesis Capilar (EC), la cual representa una familia de técnicas relacionadas, altamente eficientes en la identificación, tanto de pequeñas como de grandes moléculas, como es el caso de las proteínas (Beckman Coulter, s/f). Esta técnica se ha usado, rutinariamente, para la identificación y separación de proteínas en la orina de perros sanos y enfermos. Se ha demostrado, que las diferentes localizaciones de las lesiones renales se caracterizan por distintas distribuciones de las proteínas urinarias según su peso molecular, por lo que la electroforesis de proteínas urinarias puede ayudar no solo a determinar la presencia de una lesión sino también a localizarla (Zaragoza, 2001).

Aproximadamente el 70% de las proteínas urinarias en individuos sanos, tienen origen en el riñón y tracto urinario. Las muestras de orina pueden ser utilizadas para la identificación de nuevos biomarcadores y la cuantificación de conocidos en el diagnóstico temprano de enfermedad renal (Kim *et al*, 2011).

## ***II. MARCO TEORICO***

### ***II.1 FISIOLÓGÍA RENAL***

Los riñones reciben alrededor del 25% del gasto cardiaco, filtran el plasma y los constituyentes plasmáticos de la sangre, y de este modo reabsorben de manera selectiva el agua y las sustancias útiles del filtrado y excretan finalmente el exceso y los productos de desecho del plasma (Frandsen y Spurgeon, 1995). Además producen y liberan hormonas de gran importancia en el control de la presión sanguínea sistémica y en la producción de glóbulos rojos, siendo órganos vitales en la homeostasis corporal. La unidad anatómica y funcional del riñón es la nefrona. Las diferencias en el tamaño de los riñones en las diferentes especies están relacionadas al número de nefronas que contienen. Existen aproximadamente 400,000 nefronas por riñón en el perro y aproximadamente 1 000 000 en el humano. La nefrona está compuesta del corpúsculo renal y de túbulos corticales y medulares (Cunningham, 2005).

#### ***I.1.1 - La Nefrona***

La unidad anatómica y funcional del riñón es la nefrona. Las diferencias en el tamaño de los riñones en las diferentes especies están relacionadas al número de nefrones que contienen. Existen aproximadamente 190,000 nefrones por riñón en el gato y 400,000 en el perro. El nefrón está compuesto del corpúsculo renal y de túbulos corticales y medulares (Alanís, 1988).

La nefrona ha sido dividida en varios componentes, sobre la base de ciertos componentes histológicos y características funcionales (Alanís, 1988), identificándose al glomérulo, espacio de Bowman, cápsula de Bowman (los cuales forman el corpúsculo renal), túbulo contorneado proximal, asa de Henle y túbulo contorneado distal, continuado por el túbulo colector (Figura 1) (Frandsen y Spurgeon, 1995).

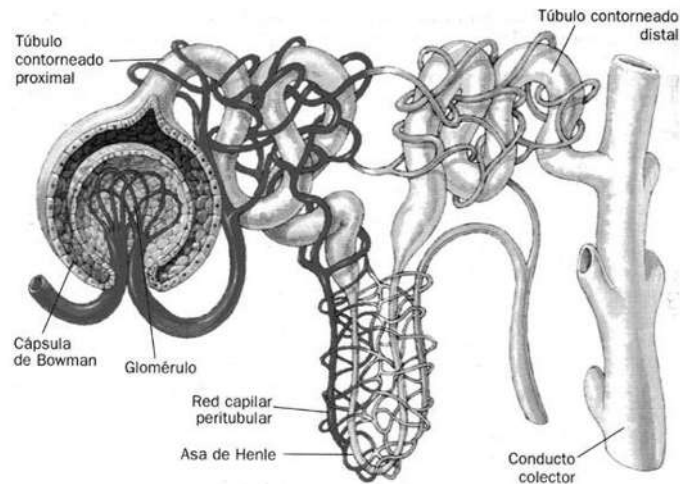


Figura 1. La nefrona y sus túbulos colectores (Banks, 1993).

El glomérulo es una red de capilares anastomosados que invaginan en la cápsula de Bowman, en donde se lleva a cabo el filtrado sanguíneo para la obtención del ultrafiltrado glomerular (Dennis, 1999). El túbulo contorneado proximal (TCP) es la parte más larga del nefrón. Formado por células simples cuboidales con microvellosidades en el lumen, reabsorbe de forma activa glucosa, proteínas, aminoácidos, ácido úrico, Na, K, Ca, fosfatos, sulfato y bicarbonato, de forma pasiva de cloro, agua y urea, además de secretar activamente ión hidrógeno (Cunningham, 2005). En el asa de Henle se reabsorbe sodio y una parte del agua que no fue reabsorbida por el TCP resultando un contenido tubular hipoosmótico respecto al plasma (Chew, 1996). El túbulo contorneado distal (TCD) desempeña un rol importante en el equilibrio ácido-básico, en él se secreta potasio e hidrogeniones, se reabsorben fracciones de agua y sodio, pasando el resto hacia el túbulo colector (Banks, 1993).

### **II.1.1.1 Glomérulo**

El glomérulo es una red de capilares anastomosados que invaginan en la cápsula de Bowman, en donde se lleva a cabo el filtrado sanguíneo para la obtención del filtrado glomerular (Dennis, 1999). A excepción de algunos glomérulos ectópicos, todos los glomérulos son localizados en la parte cortical del riñón (Burkitt *et al.*, 1993).

La sangre llega en el glomérulo por la arteriola aferente. El glomérulo es una red de capilares anastomosados quienes se encuentran así suspendidos en el espacio de Bowman. La ultrafiltración de la sangre se realiza al nivel de la red capilar glomerular y la ultrafiltración atraviesa el espacio de Bowman antes de ingresar al sistema tubular.

La sangre abandona posteriormente el glomérulo por la arteriola eferente para irrigar el sistema tubular (Banks, 1993; Burkitt *et al.*, 1993).

La arteriola eferente es de un diámetro más pequeño que la arteriola aferente. Así permite el mantenimiento de un gradiente de presión quién interviene en la filtración del plasma (Burkitt *et al.*, 1993).

### ***II.1.1.2 Estructura y Función Tubular***

#### **- Túbulo contorneado proximal**

El túbulo contorneado proximal (TCP) es la parte más larga del nefrón. Toma nacimiento al nivel del polo urinario del corpúsculo renal. El TCP se encuentra esencialmente en el parénquima cortical. Está formado por células simples cuboidales con microvellosidades en el lumen, las cuales aumentan la superficie de contacto durante la reabsorción de solutos. Es el encargado de importantes fenómenos de reabsorción y de secreción (Banks, 1993).

El túbulo proximal es el responsable de la reabsorción del ultrafiltrado en un porcentaje mayor que el resto del túbulo, ya que al menos el 66% del sodio y el cloro filtrados son reabsorbidos en forma activa, arrastrando de forma pasiva el agua. También existe reabsorción de glucosa, potasio, fosfato, bicarbonato y aminoácidos, antes de que el contenido intratubular pase al asa de Henle (Michell *et al.*, 1991; Cunningham, 2005).

#### **- Asa de Henle**

El asa de Henle posee una porción ancha y una porción estrecha. Esta es el alargamiento del TCP. Cada asa nace de la corteza renal. Se prolonga en la médula por su rama descendente y remonta a la corteza por su rama ascendente. En esta porción se reabsorbe sodio y una parte del agua que no fue reabsorbida por el TCP resultando un contenido tubular hipoosmótico respecto al plasma (Chew, 1996).

#### **- Túbulo contorneado distal**

El túbulo contorneado distal (TCD) es el alargamiento de la rama descendente del asa de Henle. Se encuentra esencialmente en la corteza. En el TCD se secreta potasio e hidrogeniones y se reabsorben fracciones de agua y sodio, pasando el resto hacia el túbulo colector. De tal forma que el TCD desempeña un rol importante en el equilibrio ácido-base (Banks, 1993).

## ***1.2 Fisiología del Filtrado***

La formación y producción de orina es una de las funciones principales del riñón. Este proceso necesita de tres fases interrelacionadas:

- Filtrado glomerular: consiste en la formación de grandes cantidades de ultrafiltrado de plasma y libre de proteínas a través del glomérulo; es un proceso pasivo y la energía para realizarse se deriva de la presión sanguínea generada por la contracción del ventrículo izquierdo y la elasticidad de las paredes vasculares, la velocidad a la cual los riñones forman el filtrado glomerular del plasma se llama tasa de filtrado glomerular (1-2mL/kg/min).
- Reabsorción tubular: casi el 75% del agua es pasivamente reabsorbida, por los túbulos proximales, siguiendo una reabsorción activa de sodio, calcio y fósforo, principalmente.
- Secreción tubular: de diferentes compuestos, en los distintos niveles, desde túbulo proximal, hasta los ductos colectores.

La filtración glomerular depende en gran medida de la pared capilar glomerular y su permeabilidad selectiva. Posee tres componentes principales: las células endoteliales que se alinean en la luz capilar, la membrana basal, y las células epiteliales que forman la superficie visceral de la pared capilar. Las células endoteliales están muy fenestradas y proporcionan parte de la barrera electrostática (carga negativa). La membrana basal está compuesta por colágeno de tipo IV hidratado y muy cruzado, laminina y proteoglicanos. Las células epiteliales glomerulares, o podocitos, extienden prolongaciones que se interdigitan en la superficie visceral de la membrana basal y están cubiertas por una estructura proteínica conocida como el diafragma de hendidura. Los podocitos se cubren por una estructura proteínica conocida como el diafragma de hendidura. Se cree que la membrana basal glomerular y el diafragma de hendidura son los principales responsables de seleccionar, en función del tamaño y la carga, las sustancias que atraviesan la pared capilar glomerular (Grauer, 2007).

Las características propias de una sustancia, que aumentan la posibilidad de que ésta traspase la pared del capilar glomerular hacia el ultrafiltrado, son:

- Un tamaño molecular, con radio  $<2.5$  nm facilita el paso a través de pared capilar, mientras que casi ninguna molécula con radio  $>3.4$  nm la atravesará.
- Las sustancias cargadas positivamente y eléctricamente neutras atraviesan la barrera con mayor facilidad que las sustancias con cargas negativas (Stockham y Scott, 2008).

Todas las láminas de la pared glomerular contienen glucoproteínas que son el origen de la carga negativa fija del glomérulo. Así se explica la facilidad para el paso de cationes y la limitación del paso de aniones (Hurley y Vaden, 1995)



## **II.2 INSUFICIENCIA RENAL**

Numerosas enfermedades pueden producir un deterioro morfológico y funcional de los riñones, resultando en incapacidad de llevar a cabo procesos de excreción y regulación, así como la mayoría de las funciones renales.

La enfermedad renal crónica se define como el daño renal mantenido durante al menos 3 meses, de carácter progresivo, manifestado por alteraciones en la composición sanguínea y disminución en el filtrado glomerular. Se considera un estado de insuficiencia renal cuando más del 75% de las nefronas son dañadas (Foyer, 2006). La enfermedad renal crónica permanece latente por meses o años antes de ser clínicamente aparente.

De acuerdo a las manifestaciones clínicas, los trastornos metabólicos que ocurren y la función renal remanente, en medicina humana la insuficiencia renal crónica se puede clasificar en cuatro etapas:

- Etapa I. Pérdida silente de la tasa de filtrado glomerular (TFG) hasta 50%, sin manifestaciones clínicas. Disminución de la absorción de Ca y excreción de P.
- Etapa II. Pérdida del 70% de la TFG, azotemia leve, incapacidad de concentrar orina, anemia normocítica normocrómica y pérdida de peso.
- Etapa III. Función renal remanente de 5 a 20%, azotemia sostenida, anemia normocítica normocrómica, síndrome urémico con alteraciones neurológicas, hiperfosfatemia e hiperparatiroidismo.
- Etapa IV. Insuficiencia renal crónica terminal. Función renal remanente <5%, síndrome urémico con alteraciones neurológicas, acidosis metabólica, hipercalemia, hipercalcemia, oliguria/anuria.

(The National Kidney Foundation, 2012).

La insuficiencia renal crónica en el perro es clasificada en cuatro fases, según la International Renal Interest Society (IRIS), basados en resultados de laboratorio y signos clínicos:

- Fase I. El proceso de daño se encuentra latente, pero la azotemia y los signos clínicos no se han desarrollado.
- Fase II. La enfermedad ha progresado, la Tasa de Filtrado Glomerular (TFG) ha declinado a <25% de lo normal, se encuentra un estado azotémico, aun no se observan signos clínicos, se puede observar disminución en la capacidad para concentrar orina y un incremento en el volumen urinario.

- Fase III. La TFG ha declinado, se encuentra un estado azotémico acompañado de signos clínicos.
- Fase IV. Se observa un estado de hiperazotemia acompañada de signología correspondiente a síndrome urémico.

(IRIS, 2009).

### **II.2.1 Etiología**

Existen enfermedades y factores que potencialmente ocasionan daño estructural al riñón en forma irreversible, tales como diabetes mellitus, hipertensión arterial o uropatía obstructiva, así como el uso de nefrotóxicos. Cuando la insuficiencia renal finalmente se ha establecido, la velocidad del deterioro de la función renal es variable para cada paciente, aun cuando la causa del daño renal sea la misma.

En el perro se han identificado como causas primarias de insuficiencia renal a la hipertensión sistémica, hipertensión glomerular, coagulopatías, hipoperfusión crónica, glomerulonefritis, enfermedades del desarrollo, defectos congénitos del colágeno, amiloidosis, enfermedades inflamatorias o infecciosas, neoplasias, uropatía obstructiva, enfermedades inmunomediadas, uso crónico de agentes nefrotóxicos, entre otras (The Merck Veterinary Manual, 2011).

### **II.2.2 Fisiopatología**

En un individuo humano con función renal normal, la TFG es de aprox. 125mL/min y de 2mL/min en el perro, siendo reabsorbidos más del 99% del filtrado en distintas regiones de la nefrona, hasta configurar el volumen urinario, cuyo contenido en agua y solutos depende de la ingesta diaria de líquidos y de alimentos. Estas funciones tienden a conservarse cuando se reduce la TFG, aunque la progresión de la IRC produce deterioro en la capacidad de regular líquidos, electrolitos e hidrogeniones, retención de solutos urémicos y alteración de la función renal endócrina (Revert *et al*, 2011).

La disminución del número de nefronas funcionales, determina el aumento en el filtrado, excreción y reabsorción individual de las nefronas restantes con el fin de compensar el déficit estructural. Al suprimir el 75-90% de la masa renal inicial, la reducción del número de nefronas funcionales provoca un incremento de la TFG en las restantes de hasta 2.5 veces al valor normal. La pérdida de masa renal produce una hipertrofia renal compensatoria que se caracteriza por un incremento del tamaño glomerular, resultado de la hipertrofia de las células endoteliales y mesangiales, y

también por un aumento del tamaño tubular, correspondiendo el mayor crecimiento a los segmentos proximales y el menor a los túbulos colectores. El aumento del túbulo proximal se asocia a un incremento proporcional de la reabsorción del ultrafiltrado para preservar el balance glomerular (Polzin *et al*, 2007).

## ***II.3 PROTEINURIA***

El capilar glomerular limita el filtrado de macromoléculas por su tamaño y su carga eléctrica. En condiciones normales, las proteínas de gran tamaño aparecen en cantidades muy pequeñas en la orina glomerular. Las de menor peso molecular son parcialmente filtradas, pudiendo alcanzar hasta el 50 % de la concentración plasmática (Govantes y Sánchez, 2008).

Además del tamaño y carga de la proteína, existen otros factores que, en menor medida intervienen en el paso de moléculas a través del glomérulo. Uno de ellos es la forma de la proteína: moléculas con forma alargada atraviesan mejor la pared del glomérulo que las que tienen forma esférica. Esto es lo que se conoce como “impedimento estérico”.

El filtrado glomerular de los perros sanos contiene de manera normal una pequeña cantidad de proteína. Se estima que la pérdida diaria normal de proteína urinaria en perros es menor a 1 g/día. El término proteinuria se define como una concentración anormalmente alta de proteína en la orina, que en la mayoría de los casos es debida a infecciones del tracto urinario.

Entre las proteínas presentes en la orina de perros sanos, filtradas por el glomérulo y no reabsorbidas en el túbulo, se encuentran: proteínas de Tamm-Horsfall, globulinas secretoras procedentes del tracto urinario, células epiteliales de túbulos y vías urinarias bajas, enzimas, pequeñas cantidades de albúmina y proteínas de peso molecular alto (Zaragoza, 2001).

### ***II.3.1 Proteína urinaria normal en el perro***

La cantidad de proteína urinaria depende en gran medida de su concentración en el plasma, peso molecular, forma y carga. De igual forma, el grado de reabsorción tubular influye en la proporción de proteínas plasmáticas presentes en orina; proteínas de bajo peso molecular son reabsorbidas activamente desde el filtrado tubular, catabolizadas

por enzimas del endotelio tubular proximal, y retornadas a la sangre como aminoácidos.

El tamaño de la proteína parece ser el factor más determinante a la hora de atravesar la membrana basal del glomérulo. El paso de proteínas disminuye a medida que aumenta el peso molecular, por eso, proteínas de alto peso molecular no aparecen en el filtrado glomerular en cantidades apreciables. En general, proteínas con un peso molecular mayor o igual a 70 kDa y un diámetro superior a 34 nm no atraviesan la barrera. El endotelio capilar y la lámina interna de la membrana basal del glomérulo son el obstáculo más grande a la circulación de polianiones. En caso de daño glomerular, al reducir la carga negativa fija de la pared glomerular, aumenta la filtración de polianiones (Zaragoza, 2001)

Las proteínas de bajo peso molecular, son filtradas libremente por el glomérulo renal. La concentración de estas proteínas en la orina, como lisozima, mioglobina y amilasa, depende de sus niveles en plasma. Así, proteínas plasmáticas de peso molecular comprendido entre 1,5 y 45 kDa se filtran fácilmente pero aparecen en menor cantidad en la orina porque su concentración también es menor en el plasma. Aunque la hemoglobina tiene un peso molecular pequeño, raramente aparece en el filtrado ya que, normalmente, se encuentra unida a la haptoglobina, cuyo peso molecular es muy grande y que utiliza como sistema de transporte (Lulich y Osborne, 1990).

Una proporción de la proteína urinaria procede de las células epiteliales de los túbulos renales. Éstas secretan pequeñas cantidades de proteínas a la luz tubular, como la proteína de Tamm-Horsfall o uromucoide, una mucoproteína sintetizada por las células epiteliales, es una alfa-globulina que procede del asa ascendente de Henle, túbulos distales y túbulos colectores y se encuentra presente en la orina del perro en una concentración de 0,5 a 1 mg/dL. Los túbulos renales secretan también una uroquinasa e IgA secretora.

En condiciones normales, además de las proteínas filtradas por el glomérulo y las secretadas por los túbulos renales, puede también encontrarse pequeñas cantidades de proteína procedente de los tractos genital y urinario inferior (Zaragoza, 2001).

### ***II.3.2 Fisiopatología y Clasificación de la Proteinuria***

Desde el punto de vista fisiopatológico, la proteinuria se clasifica en proteinuria funcional o no patológica y proteinuria patológica. Esta última, se divide según su origen en proteinuria glomerular, proteinuria por sobrecarga filtrada y en proteinuria tubular (Pérez, 2011).

Por otro lado, desde el punto de vista anatómico, y de gran interés clínico, las proteinurias se pueden clasificar en dos grandes grupos: proteinurias renales y posrenales. Dentro de las renales se distinguen dos grupos: glomerulares y tubulares (Figura 2). La proteinuria glomerular se debe al aumento de la cantidad de proteínas filtradas en el glomérulo y se puede subdividir en proteinuria selectiva, compuesta en un 80 a 100% de albúmina, y en proteinuria no selectiva, compuesta de albúmina y globulinas de alto peso molecular. La proteinuria tubular está compuesta por proteínas de bajo peso molecular, pudiendo ser completa, con proteínas desde 10kDa hasta albúmina, o de tipo incompleta, con presencia de proteínas de 40kDa hasta albúmina (Portillo *et al*, 1997).

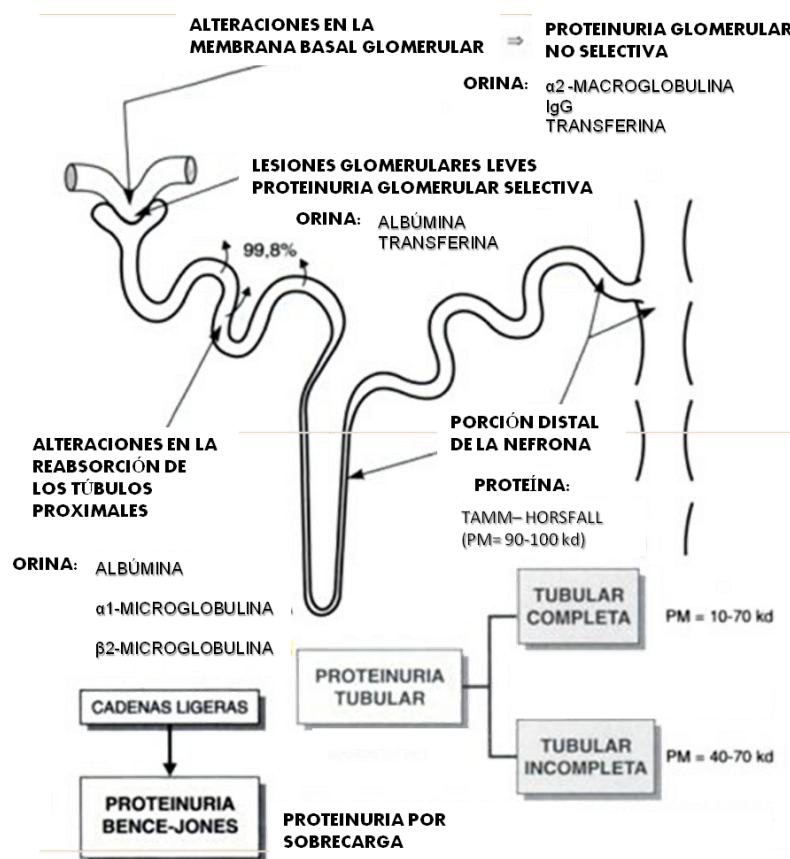


Figura 2. Clasificación de la proteinuria glomerular y tubular (Portillo *et al*, 1997).

La proteinuria puede originarse como un mecanismo funcional, caracterizado por un aumento en la excreción de proteína urinaria en ausencia de enfermedad renal, es temporal, reversible, normalmente moderada y no patológica. Aparece en situaciones caracterizadas por un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático y consiste fundamentalmente en la pérdida de albúmina. Su mecanismo de producción se relaciona con una vasoconstricción renal o con cambios en la permeabilidad capilar del glomérulo que fuerzan el paso de proteínas a la orina (Zaragoza, 2001). El ejercicio

intenso, las convulsiones, la fiebre o la exposición a calor o frío extremos y al estrés son ejemplos de situaciones que pueden originar proteinuria fisiológica (Grauer, 2007).

Por el contrario, la proteinuria patológica es persistente y puede estar causada por anomalías urinarias y extraurinarias (Tabla 1) (Nadal *et al*, 2008). Un ejemplo de proceso extraurinario es la producción de proteínas de pequeño peso molecular que se filtran en los glomérulos y superan la capacidad reabsortiva del túbulo proximal, como las cadenas ligeras de inmunoglobulina producidas por células plasmáticas neoplásicas o proteínas de Bence-Jones (Grauer, 2007). La proteinuria urinaria puede ser de origen renal o extrarrenal. Los procesos infecciosos e inflamatorios del tracto urinario bajo, son la causa más común de proteinuria urinaria extrarrenal (Hurley y Vaden, 1995). La proteinuria renal puede ser de origen: glomerular, por el aumento del filtrado de proteínas; tubular, por la disminución de la reabsorción o aumento de la secreción de proteínas; por inflamación del parénquima (Zaragoza, 2001).

Tabla 1. Proteinurias específicas.

Proteína	Tipo Proteinuria	PM	Enfermedad Asociada
Cadenas ligeras monoclonales	Sobrecarga Filtrada	22 000 44 000	Gammapatía monoclonal, mieloma, linfoma
Lisozimas	Sobrecarga Filtrada	17 000	Leucemia mielocítica
N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa	Tubular	42 000	Transtorno tubuloproximal
Mioglobina	Sobrecarga Filtrada	17 000	Rabdomiólisis
Hemoglobina	Filtrada	68 000	Hemólisis
Amilasa	Filtrada	45 000	Pancreatitis
Fibrinopéptido A	Filtrada	2 000	Trombosis vena renal
$\beta_2$ -microglobulina	Tubular Sobrecarga filtrada	11 800	Nefritis tubulointersticial
Productos de Degradación de Fibrinógeno	Glomerular		Glomerulonefritis aguda, extracapilar y membranoproliferativa
Complejo C5b-C9	Glomerular		Glomerulonefritis membranosa
Albúmina	Glomerular	69 000	Glomerulonefritis Diabetes Hipertensión arterial

(Parra y Rodríguez, 1998)

La proteinuria glomerular es debida a un aumento de la filtración de macromoléculas, por pérdida de electronegatividad de la membrana basal glomerular o por alteraciones estructurales como neoplasias, enfermedad por autoanticuerpos de la membrana basal o inflamación, depósito de inmunocomplejos, amiloidosis, entre otras. Las tres principales causas glomerulares de pérdida notable de proteínas son glomerulonefritis, amiloidosis y gomeruloesclerosis, al alterar la permeabilidad

selectiva de los capilares glomerulares y con frecuencia cursan con proteinurias mayores de 50mg/kg/24hrs (Hurley y Vaden, 1995).

Las proteínas de alto peso molecular (HMW), como la IgM (900 kDa) y la Proteína C reactiva (185kDa), no aparecen en el filtrado glomerular en cantidades apreciables. La disfunción glomerular implica un aumento en la filtración de proteínas de peso molecular intermedio (IMW), como la albúmina y en estados más avanzados, la presencia de proteínas de alto peso molecular en el ultrafiltrado.

Se consideran proteínas de bajo peso molecular (LMW) aquellas con un peso molecular inferior a 45 kDa. Éstas son filtradas libremente por el glomérulo renal. La concentración de estas proteínas en la orina, como lisozima, mioglobina y amilasa, depende de sus niveles en plasma. Las proteínas con peso molecular entre 1.5 y 45 kDa se filtran fácilmente pero aparecen en menor cantidad en la orina al ser reabsorbidas en el túbulo proximal, además de que su concentración también es menor en el plasma (Lulich y Osborne, 1990). La disfunción tubular es reflejada por la pérdida de proteínas LMW y por un incremento en las cantidades de enzimas urinarias (Smets *et al*, 2010).

Por otro lado, el glomérulo se puede ver afectado por procesos inflamatorios asépticos, observándose la aparición de sangre, proteínas y cilindros en la orina, a lo que se conoce como glomerulonefritis. Se trata de un proceso inmunomediado, asociado a estímulos antigénicos crónicos, enfermedades infecciosas, inflamatorias y neoplásicas, desordenes metabólicos y a la administración de fármacos y vacunas.

La glomerulonefritis por depósito de complejos inmunes, tiene su origen en la formación de inmunocomplejos con antígenos y anticuerpos circulantes, su depósito en la membrana glomerular con la consecuente reacción inflamatoria, activación del complemento y una reacción de hipersensibilidad de tipo III. Los complejos inmunes pueden quedar atrapados en el glomérulo cuando existe un exceso o un número equivalente de antígenos con sus anticuerpos en la circulación. También pueden formarse en el glomérulo y quedar atrapados en su membrana, interaccionando eléctricamente o por afinidad bioquímica con la membrana basal.

El aumento de producción de tromboxano por las células glomerulares y las plaquetas residentes conduce a la inflamación glomerular, lo cual conlleva al engrosamiento de las paredes capilares (glomerulonefritis membranosa), hiperplasia celular (glomerulonefritis proliferativa o ambas (glomerulonefritis membranoproliferativa) (Morgan *et al*, 2004).

La proteinuria característica de la anomalía se produce como resultado de la disminución de la permeabilidad selectiva de las paredes capilares y desaparición de la carga negativa otorgada por los glucosaminoglucanos y proteoglicanos asociados a la membrana basal (Morgan *et al*, 2004).

La producción temporal de anticuerpos contra la membrana basal de glomérulo puede darse de forma espontánea posterior a un daño a ésta. El depósito de inmunoglobulinas de tipo G, M o A puede ser intramesangial, subepitelial o subendotelial en la membrana basal. Los antígenos que pueden inducir daño glomerular inmunomediado pueden ser agentes químicos, bacterianos, parasitarios o virales, antígenos asociados a tumores o del epitelio tubular renal. Algunos procesos patológicos que han sido relacionados con glomerulonefritis tales como piometra, neoplasias, lupus eritematoso sistémico, dirofilariosis, adenovirus canino tipo I, pancreatitis, diabetes mellitus y leishmaniasis.

Cuando los complejos inmunes se forman o depositan cercanos a la luz capilar, a nivel subendotelial, la inflamación provocada desencadena la proliferación celular del mesangio, engrosamiento de la membrana basal y la hialinización glomerular y esclerosis, proceso conocido como glomeruloesclerosis (Praga, 2005).

### ***II.3.3 Implicaciones de la Proteinuria***

La magnitud de la proteinuria ha sido asociada con la progresión de la enfermedad renal, tanto en humanos como en animales. Existe evidencia de que la proteinuria puede causar daño a las células mesangiales y las células del túbulo contorneado proximal. El daño a células mesangiales ha sido atribuido a componentes de lipoproteínas o productos de su oxidación, los cuales causan incremento en la producción de matriz, actuando como quimiotrayentes para monocitos e incrementando la generación de factores de crecimiento que estimulan la esclerosis (Finco *et al*, 1999).

Las proteínas plasmáticas que han atravesado la pared capilar glomerular pueden acumularse en la zona glomerular y estimular la proliferación celular mesangial y la producción aumentada de la matriz mesangial. Además, cantidades excesivas de proteína en el filtrado glomerular pueden ser tóxicas para las células epiteliales tubulares, y pueden conducir a inflamación intersticial, fibrosis y muerte celular por mecanismos diferentes. Estos mecanismos incluyen la obstrucción tubular, la rotura lisosomal y la lesión mediada por complemento y peroxidativa, además de la producción aumentada de citocinas y factores de crecimiento (Revert *et al*, 2011).



A medida que el proceso avanza y se dañan más nefronas, la filtración glomerular va disminuyendo. Las nefronas que aún son funcionales compensan la pérdida de tejido renal no funcional, incrementando la tasa de filtración glomerular por nefrona. La hiperfiltración de las nefronas aún funcionales puede exacerbar la proteinuria, aumentar la hialinización, la esclerosis glomerular y la necrosis de células epiteliales tubulares, lo que propicia la progresión del daño renal (Grauer, 2007)

Hallazgos relacionados con la retención de sodio y la presentación de edema y ascitis en pacientes con Síndrome Nefrótico, sugieren que el incremento de albúmina en el ultrafiltrado ocasiona la disociación del receptor NHE3 de la megalina en el túbulo contorneado proximal, activándolo e incrementando así la retención de sodio y el consecuente incremento del líquido intersticial (Besse *et al*, 2002).

### ***II.3.4 Detección de Proteinuria***

En medicina veterinaria, la proteinuria se detecta rutinariamente por métodos semicuantitativos, como la prueba colorimétrica de la tira convencional y la prueba turbidimétrica del ácido sulfosalicílico (SSA) (Tabla 2). La prueba de la tira de orina es barata y fácil de usar, mide principalmente la albúmina que, al reaccionar con azul tetrabromofenol es la principal responsable de la reacción colorimétrica. Los resultados falsos negativos pueden producirse en el contexto de la proteinuria de Bence-Jones, bajas concentraciones de albúmina en orina, orina ácida o diluida. Los resultados falsos positivos pueden originarse con orina alcalina o altamente concentrada, el sedimento urinario activo o exceso en el tiempo de contacto con la orina. Tiene un nivel de sensibilidad > 30 mg/dL (Grauer, 2007).

Otro método semicuantitativo, es el turbidimétrico basado en el principio de insolubilidad de las proteínas a pH ácido, utilizando la propiedad de las proteínas de unirse a sustancias del tipo del ácido tricloroacético o cloruro de bencetonio. Los resultados falsos negativos son menos frecuentes comparando con la tira convencional Detecta también otras proteínas séricas y sus falsos positivos son principalmente secundarios a orinas con contrastes radiológicos y fármacos. Su sensibilidad es mayor a 5mg/dL. Sin embargo, la interpretación es subjetiva (Montañés *et al*, 2011).

Tabla 2 Métodos de detección de Proteinuria.

	Tiras colorimétricas, indicadores colorimétricos de pH	Precipitación y turbidimetría; SSA o Ac. Tricloroacético	ELISA o radioinmunoanálisis (microalbuminuria)
<b>Sensibilidad</b>	10-20 mg/dl	5-10 mg/dl	< 10mg/l
<b>Proteínas detectadas</b>	Albúmina	Todas	Albúmina
<b>Falsos positivos</b>	Orina concentrada pH >7.0 Clorhexidina Detergentes Tiempo prolongado de contacto de la tira con la orina Contrastes yodados	Orina concentrada Contrastes yodados Penicilinas Cefalosporinas Sulfamidas	
<b>Falsos negativos</b>	Proteinuria sin albuminuria Cadenas ligeras de inmunoglobulinas Orina diluida	Orina muy diluida Orina alcalina	
<b>Propiedades</b>	Barato Resultado inmediato	Más sensible que tiras reactivas Permite cuantificación más exacta	Permite detectar albuminuria de 20- 30mg/ día

(Parra y Rodríguez, 1998)

En los últimos 50 años, la electroforesis en papel, acetato de celulosa, geles de agarosa o poliacrilamida, ha sido utilizada en la separación de proteínas, representando una herramienta fundamental en la medicina diagnóstica. Sin embargo, la realidad es que estos métodos son laboriosos, dependen de la habilidad que posea quien los aplica y son relativamente lentos (Chen *et al*, 1991).

Los primeros trabajos en identificación de proteinuria en perros usaron ultracentrifugación o filtración en gel sobre Sephadex, obteniendo resultados de gran interés y valor clínico, pero eran métodos que consumían mucho tiempo para su uso rutinario en el laboratorio. El método electroforético usado habitualmente para la caracterización de las proteínas urinarias, es sobre geles de agarosa o poliacrilamida, basado fundamentalmente en la carga molecular más que en el tamaño (Zaragoza, 2001).

Zaragoza, en 2001, realizó la caracterización de la proteinuria de perros con piometra, leptospirosis y leishmaniosis, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, demostrando la utilidad de electroforesis en la identificación de lesiones renales en el perro.

Las técnicas de separación para proteínas han cambiando con los años, algunos ejemplos se enlistan en la Tabla 3. Una de éstas técnicas novedosas, la EC, surgió en la

década de los 60's y revolucionó el análisis de proteínas, tanto en suero como en orina (Chen, 1991). Fuentes en 2011, realizó la búsqueda de condiciones ideales en ECZ para la caracterización de 11 proteínas en orina de perros en etapa temprana de enfermedad renal, demostrando la utilidad y versatilidad de esta técnica.

Tabla 3. Técnicas de separación para determinar proteínas.

Proteína	Peso molecular kDa	Técnica de determinación	Condiciones	Ventajas/ desventajas
α-1 antitripsina	54	Nefelometría <i>Ferrer y Aznar, 1996</i>	Medición de AA1 en sangre	✓ Alta especificidad ✗ Técnicas previas para su identificación
		Inmunolectroforesis <i>Biogenex, 2004</i>	Anti AA1 policlonal	✗ Sesgo en el análisis global de estudio.
		Electroforesis en gel con enfoque isoelectrico <i>Menéndez et al, 1995</i>	Bajo gradientes de pH	✗ Método específico vías respiratorias. ✗ Requiere anfolitos para gradientes de pH.
		Electroforesis capilar con enfoque isoelectrico <i>Gorini et al, 2005.</i>	Enfoque isoelectrico Fosfato de Na y K 0.2 M con CaCl <sub>2</sub> 2mM Anfolitos pH 3.5 a 5	✗ Sensibilidad, rapidez, micro y macromoléculas. ✗ Requiere anfolitos para gradientes de pH.
α-2 macroglobulina	820	ELISA <i>KBC, 1994.</i>	Test	✓ Especificidad del 80%
		Electroforesis en gel <i>Benitez et al, 2010</i>	Agarosa	✓ Precisión
Fibrinógeno	340	Medición inmunológica <i>Revert y La Huerta, 1998.</i>	Fibrinógeno Clauss Tampón QFA MOPS 7	✗ Sistemas de coagulación electra.
		Electroforesis en gel <i>Cortelazzo y Cardona, 2010</i>	Poliacrilamida bidimensional	✗ Alta especificidad, poca sensibilidad
Transferrina	79	Test inmunturbidimétrico Transferrina <i>FS, 2005</i>	Medición fotométrica de la reacción antígeno-anticuerpo	✗ Límite inferior 3 mg/dL.
		Electroforesis capilar <i>Landers y Prasad, 1997.</i>	Buffer polimérico	✗ Sensibilidad, rapidez.

(Fuentes, 2011)

## **II.4 BIOMARCADORES URINARIOS DE DAÑO RENAL EN PERROS**

El término biomarcador, fue introducido en 1989 y la definición fue estandarizada en 2001, como: “una característica que es objetivamente medida y evaluada, como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica”. Para que un biomarcador sea considerado clínicamente útil, debe ser altamente sensible y específico en la detección de una enfermedad (Wang y Lai, 2008).

La identificación de biomarcadores se ha incrementado en los últimos años, ya que proporciona una oportunidad única para el diagnóstico, pronóstico y terapia de diversas enfermedades. En teoría, cualquier cambio o modificación en una proteína que esté fuertemente asociada con una enfermedad o con el estadio de una enfermedad tiene el potencial de ser un biomarcador (Lanz, 2007).

Aproximadamente el 70% del proteoma urinario en individuos sanos se origina en el riñón y el tracto urinario, por lo que las muestras de orina son un recurso invaluable en la identificación de biomarcadores en pacientes con enfermedad renal. Durante la última década, se han realizado estudios sobre el proteoma urinario en pacientes con diferentes categorías de enfermedad renal, pero la aplicación clínica de todos los posibles biomarcadores identificados aun es limitada (Kim *et al*, 2011).

A diferencia de las pruebas convencionales, las proteínas utilizadas como biomarcadores urinarios, prometen ser indicadores sensibles al daño renal temprano, con el potencial de reflejar el sitio y la severidad de éste. Estas incluyen proteínas categorizadas de acuerdo a su peso, como proteínas de bajo peso molecular, de peso molecular intermedio y de alto peso molecular, que sirven de referencia del correcto desempeño en los procesos de filtración y reabsorción en la nefrona (Smets *et al*, 2010).

En trabajos recientes, se han analizado proteínas de alto y bajo peso molecular, con el objetivo de monitorear la integridad de la pared del capilar glomerular y del epitelio tubular, respectivamente. Las proteínas menores a 70 kDa de peso molecular, con un tamaño menor a 34nm y de carga positiva o neutra, atraviesan fácilmente la pared del capilar con permeabilidad selectiva. Las proteínas de bajo peso molecular (< 45 kDa), que son filtradas libremente por el glomérulo, deben su concentración urinaria a la cantidad presente en plasma y a la reabsorción por las células epiteliales del túbulo contorneado proximal, la cual comienza cuando éstas son degradadas parcialmente por enzimas de la superficie de las células epiteliales y son captadas por la célula mediante endocitosis (Smets *et al*, 2010). A pesar de la permeabilidad selectiva del glomérulo y la reabsorción tubular, en la orina de perros sanos se encuentran

cantidades inferiores a 30mg/kg/día de proteína, incluyendo proteínas de Tamm-Horsfall, globulinas secretoras procedentes del tracto urinario, células epiteliales de túbulos y vías urinarias bajas, enzimas, pequeñas cantidades de albúmina (DiBartola *et al*, 1980).

En teoría, cuando se pierde la integridad de la pared del capilar glomerular, proteínas de alto peso molecular son encontradas en la orina. De igual forma, si existe daño del epitelio tubular, proteínas de bajo peso molecular no serán reabsorbidas y aparecerán en cantidades mayores en la orina.

Basados en esta suposición, se han realizado investigaciones con proteínas de bajo y alto peso molecular como biomarcadores de daño renal. En 2010, Smets *et al* estudiaron a la Proteína C reactiva (CRP), proteína de alto peso molecular (aprox. 100kDa) y la Proteína de Unión a Retinol (RBP), proteína de bajo peso molecular (aprox. 21 kDa), como marcadores de daño renal en perros sanos y con IRC. Se observó un incremento significativo de RBP en perros con IRC, presentando como inconveniente la falta de métodos estandarizados para uso en perros y el desconocimiento del efecto de infecciones en tracto urinario sobre las concentraciones de ésta. CRP no fue detectada en ninguno de los perros sanos y solo en 3 del grupo con IRC, obteniendo resultados poco significativos. Sin embargo, los perros en los cuales se observó incremento de CRP fueron diagnosticados con enfermedad valvular degenerativa, lo cual se asocia con el incremento de CRP observado en humanos con cardiopatías. La ausencia de CRP en la mayoría de los pacientes se atribuye a la necesidad de daño grave en la pared el capilar glomerular para su libre filtración, demostrándose su ineficacia en la detección de daño renal temprano.

Los estudios recientes centran la búsqueda en enzimas, proteínas de alto y bajo peso molecular, péptidos, todos posibles biomarcadores, basados en los cambios fisiopatológicos observados en la enfermedad renal. Las enzimas urinarias N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidasa (NAG) y  $\gamma$ -glutamyl-transferasa (GGT), fueron consideradas como marcadores urinarios de daño renal en el perro. Detectan daño tubular de 12 h a 4 días antes que la creatinina sérica. Son liberadas en enfermedades glomerulares, lo cual limita su uso como marcador para daño tubular. La NAG es una glicosidasa lisosomal presenta en las células del túbulo proximal, cuya concentración es utilizada como marcador de daño tubular (Clemo, 1998). Para obtener una medición exacta de su concentración urinaria, es necesario un tratamiento previo de la muestra para la eliminación de inhibidores enzimáticos y su análisis dentro de las primeras 24 h almacenada a 4°C, posterior a este periodo incluso almacenada a -20°C, ocurre una degradación progresiva. Se observa un incremento de ésta en diferentes estadios de enfermedad renal, leishmaniasis y piometra (Smets *et al*, 2010). Sin embargo, debido a su fácil degradación y a alteraciones de origen metabólico que repercuten en su

excreción urinaria, imposibilitaron la validación de los ensayos, además de limitar la interpretación de resultados.

Las proteínas de fase aguda son consideradas marcadores útiles de la inflamación en diagnóstico clínico, pronóstico y monitoreo de tratamiento en diversas patologías tanto agudas como crónicas (Martínez *et al*, 2004). La Proteína C Reactiva (CRP) es una proteína de fase aguda predominantemente sintetizada por el hígado y regulada por citoquinas proinflamatorias, tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e Interleucina seis (IL-6). Su concentración sérica ha sido medida con ensayo turbidimétrico automático para CRP humana, validado para mediciones en caninos (Crossley *et al*, 2010). Su concentración sanguínea se eleva 10 a 1000 veces dentro de las primeras 24 a 48 horas posteriores a iniciado el proceso inflamatorio. La CRP ha sido estudiada como indicador del pronóstico en síndrome de abdomen agudo en el perro, así como en tumores mamarios y su disminución se ha relacionado con la obesidad canina. Ha sido utilizada como indicador para clasificar el estadio en la poliartritis y algunas cardiopatías. Es sabido que las concentraciones de CRP se elevan en pacientes caninos con infecciones por leptospirosis, babesiosis, parvovirus, trauma quirúrgico, tumores malignos, piometra, pancreatitis aguda, anemia hemolítica inmunomediada, artritis y glomerulonefritis (Smets *et al*, 2010). Ha sido reportada como indicador de la respuesta al tratamiento y pronóstico en la poliartritis idopática (Nakamura *et al*, 2008). Como se mencionó en párrafos anteriores, la CRP se ha estudiado como marcador de daño renal en el perro, sin embargo, debido a la amplia variedad de patologías en las que se ven elevadas las concentraciones de CRP, su uso como marcador diagnóstico para daño renal temprano se dificulta.

La Cistatina C es un inhibidor de proteinasa cisteína que ha sido utilizada en medicina humana y veterinaria en el cálculo de TFG mediante aclaramiento, con mayor precisión que el aclaramiento de sCr. Es producida por todas las células nucleadas y su producción es constante. Es libremente filtrada por el glomérulo y no tiene secreción tubular. Es reabsorbida por las células epiteliales tubulares y catabolizada, no regresa a la circulación. No se han encontrado alteraciones en sus concentraciones debidas a la edad, sexo, género o masa muscular, como las observadas en la sCr. En pacientes humanos, se ha reportado un 78% de sensibilidad y un 86% de especificidad para la predicción de IRA en pacientes de cirugía cardíaca y la detección hasta 2 días antes que la creatinina (Soni *et al*, 2011).

En medicina veterinaria, la Cistatina C muestra un 76% de sensibilidad para detección de disminuciones en la TFG en perros, lo cual se encuentra por debajo del 80% de sensibilidad requerido para considerarse prueba diagnóstica. Miyagawa y colaboradores (2009) encontraron que los valores de Cistatina C sérica son muy similares en perros sanos y en perros con disminución de TFG, midiendo ésta mediante

aclaramiento plasmático de ioexol. Otra observación, hecha por el mismo autor, es la relación que existe entre las concentraciones de Cistatina C y el peso corporal, además se encontró un incremento en perros menores de un año y mayores de 8 años, por lo que se hace difícil establecer valores de corte normales en perros, a diferencia de medicina humana donde su uso es cada vez más popular.

La lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilo (NGAL) y molécula de daño renal – 1 (KIM-1), son marcadores de daño renal de reciente auge en medicina humana. La NGAL es una proteína de 25 kDa unida covalentemente a la gelatinasa de neutrófilos, expresada en el pulmón, tráquea, glándulas salivales, próstata, útero, estómago, colon y riñón, en el humano (Soni *et al*, 2011). La NGAL fue utilizada en inicio como indicador de procesos inflamatorios, en particular para el diagnóstico en relación con la inflamación de origen bacteriano (Venge, 2001). Posteriormente se demostró su utilidad en el diagnóstico del daño renal posisquémico en el ratón y de Insuficiencia Renal Aguda (IRA) en pacientes pediátricos humanos (Mishra, 2006). La utilidad de NGAL en el diagnóstico de daño renal temprano en humanos resultó limitada, debido a su incremento en estados inflamatorios inespecíficos, además de haber sido estudiada en poblaciones infantiles homogéneas, requiriendo su estudio en poblaciones adultas heterogéneas (Trof *et al*, 2006). En medicina veterinaria NGAL no ha sido estudiada como marcador de daño renal, su estudio se encuentra relacionado con el área inmunológica en perros y gatos, y en ratones se ha estudiado como inhibidor de la replicación intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos (Johnson *et al*, 2010).

Por otro lado, KIM- 1 es una proteína transmembranal sobreexpresada en las células epiteliales del túbulo contorneado proximal en respuesta al daño isquémico o tóxico. Ha sido estudiada en poblaciones humanas con Insuficiencia Renal Aguda, observándose un incremento significativo y demostrando ser un mejor predictor para IRA que NGAL. Sin embargo, 24 a 48 h después de iniciado el daño la diferencia no es significativa (Soni *et al*, 2011). Su estudio en medicina animales se limita al uso de ratones, ratas y del perro como modelos de investigación para su aplicación en medicina humana.

En 2010, Good y colaboradores, identificaron 273 proteínas y péptidos como posibles biomarcadores específicos para la enfermedad renal. Los fragmentos de colágeno representaron una gran proporción de este grupo de biomarcadores. Este dato, indica que la degradación de colágeno es un factor clave en la insuficiencia renal, resultando en un incremento en las fibras de colágeno insoluble y la consecuente fibrosis (Mischak y Schanstra, 2011).

Como es sabido, la esclerosis glomerular y la hipertrofia tubular, representan consecuencias de la progresión del daño renal en estados crónicos de proteinuria. Estas anomalías están asociadas con la sobreproducción de proteínas de matriz extracelular, como el colágeno IV. En 2010, Araki y colaboradores., reportan que la excreción urinaria de Colágeno tipo IV se encuentra asociada con el deterioro de la función renal en pacientes diabéticos que aún no presentan microalbuminuria. A estos datos, se tiene el antecedente de 1992, donde Keller y colaboradores, observan una asociación entre concentraciones altas del Colágeno IV en orina y procesos de glomerulonefritis ya establecidos.

En medicina veterinaria, el Colágeno IV es objeto de estudio en patologías relacionadas con su producción defectuosa, como es el caso de la nefropatía hereditaria del Cocker Spaniel Inglés, la nefropatía hereditaria del Samoyedo y la nefropatía hereditaria ligada a X, afecciones donde la investigación se centra sobre las mutaciones genéticas que las originan (Davidson *et al*, 2007). Además, la producción de Colágeno IV defectuoso se ha relacionado con la incontinencia urinaria en perros esterilizados (Augsburger y Oswald, 2007). Sin embargo, en medicina veterinaria, el Colágeno IV no ha sido estudiado como marcador urinario de daño renal temprano, ni han sido establecidos métodos para su medición o valores de corte normales, abriendo la posibilidad de realizar investigación al respecto.

Dejando de lado las limitantes en los métodos de medición y validación, los marcadores urinarios son indicadores sensibles de daño renal y tienen el potencial de reflejar el sitio y la severidad del daño. Parte de la investigación actual continua sobre las bases de la dinámica de filtrado en la nefrona, centrando su atención en la medición e identificación de proteínas específicas de HMW y LWM como reflejo de la disfunción glomerular y tubular, respectivamente (Smets *et al*, 2010).

### **II.4.1 Fibrinógeno**

Es una proteína plasmática de peso molecular de 340 kDa que corresponde a unos 3000 aa. Está formado por 6 cadenas polipeptídicas:  $2\alpha$ ,  $2\beta$  y  $2\gamma$ . El peso molecular de la cadena  $\alpha$  es de 67kDa, el de la  $\beta$  56kDa y el de la  $\gamma$  47kDa. La molécula es un dímero, las cadenas están unidas por 29 puentes disulfuro, 13 de ellos en cada mitad del dímero y 3 estableciendo la conexión de las dos mitades. En las regiones N-terminales de la cadena  $\alpha$  y  $\beta$ , la zona central del dímero, hay unos pequeños péptidos, fibrinopéptidos A y B, respectivamente. La trombina rompe los enlaces peptídicos arginina-glicina para liberar el fibrinopéptido A de 18 residuos de la cadena  $\alpha$ , y el fibrinopéptido B de 20 residuos de la cadena  $\beta$ , transformando a la molécula de fibrinógeno en un monómero de fibrina.



Los fibrinopéptidos poseen una elevada carga neta negativa ya que en ellos abundan residuos de aspartato y glutamato, y en el fibrinopéptido B hay residuos de tirosin-O-sulfato que está cargado negativamente. La existencia de esta carga en los fibrinopéptidos es lo que hace que las moléculas de fibrinógeno se mantengan separadas. Cuando los fibrinopéptidos se liberan por acción de la trombina, la carga neta de la zona central cambia desde -8 a +5, y como cada uno de los dominios terminales posee una carga neta negativa de -4, se establecen interacciones electrostáticas entre el dominio central y uno terminal, con lo que durante la polimerización se solapan los monómeros de fibrina. La red de fibrina así formada se estabiliza mediante la formación de enlaces cruzados covalentes entre las cadenas laterales de diferentes moléculas en la fibra de fibrina. Se forman enlaces peptídicos entre cadenas laterales específicas de glutamina y lisina, reacción catalizada por el Factor XIIIa.

La determinación de concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, se realiza de forma rutinaria en medicina humana y veterinaria, como parte del perfil de coagulación. En el perfil de coagulación se miden los tiempos de protrombina, tromboplastina y la concentración de fibrinógeno plasmático, los cuales reflejan la actividad de la mayoría de los factores de la coagulación tanto de la vía intrínseca y extrínseca (Piccione *et al*, 2010).

El fibrinógeno ha sido estudiado como factor de riesgo cardiovascular y en conjunto con los fibrinopéptidos A y B, como marcadores en hepatopatías. Los fibrinopéptidos también han sido observados en orina, en estudios recientes de proteómica y se han relacionado con enfermedad coronaria e insuficiencia renal aguda (Mischak y Schanstra, 2011). El método comúnmente utilizado para la determinación del fibrinógeno plasmático es el método de Clauss, que mide el índice de conversión del fibrinógeno en fibrina en presencia de un exceso de trombina. En el caso de los fibrinopéptidos, se utilizan técnicas de inmunodetección, espectrometría de masas y se han desarrollado métodos para su detección mediante ECZ (Profumo *et al*, 2005). Sin embargo, no se tienen antecedentes de su estudio como marcador de daño renal precoz, ni se ha estudiado al fibrinógeno como proteína completa mediante técnicas analíticas.

#### **II.4.2 $\alpha$ -1 antitripsina**

La alfa-1 antitripsina (AA1) es la principal  $\alpha$ -1 globulina del suero. Inicialmente fue identificada por electroforesis en gel y aislada en 1962 por Schultze y colaboradores. Su nombre deriva de sus propiedades para inhibir la tripsina pancreática y es probablemente el miembro más ubicuo de la familia de inhibidores de serin proteasas

(SERPIN). Los SERPIN son una familia de proteínas de tamaño relativamente grande (330 a 500 aminoácidos), tienen una estructura conservada y emplean un mecanismo inhibidor único.

La AA1 o SERPINA1 se expresa principalmente en los hepatocitos, alcanzando una concentración sérica en el perro de 1.8 a 3 mg/mL, siendo más alta en las hembras (Kueppers *et al*, 1993) y de 1-2 mg/mL en el humano. Estos niveles se incrementan 2 a 5 veces en procesos inflamatorios, tumorales e infecciosos (Takahara *et al* 1983). La AAT presente en el suero representa en 40% del total de la proteína. Mientras que el otro 60% se encuentra en el espacio extracelular, incluyendo el tejido pulmonar, donde protege al alvéolo del daño proteolítico de la enzima neutrófilo elastasa y neutraliza las  $\alpha$  defensinas del neutrófilo, el leucotrieno B4 y la interleucina- 8, quimioatrayentes de neutrófilos.

Es una glicoproteína de 394 residuos aminoácidos, de cadena simple, conformada por tres hojas  $\beta$  y 9 hélices  $\alpha$ , con un peso molecular de 53 kDa y una vida media de 4-5 días (Mills *et al*, 2001). Posee un 12% de carbohidratos y se encuentra glicosilada en tres residuos de asparagina con una mezcla de glicanos complejos bi y triatenarios (Sarkar y Wintrode, 2011). El gen de AA1 se transmite de manera autosómica codominante. Se caracteriza por su gran polimorfismo. Se han identificado más de 70 variantes proteicas, atribuyéndose predominantemente a la presencia de diferentes cantidades de residuos de ácido siálico presentes sobre los glicanos (Falfán *et al* 2009).

Cuando el plasma se analiza por enfoque isoeléctrico, la  $\alpha$ 1-antitripsina muestra un patrón de ocho bandas (M1 a M8), de las cuales M4 y M6 son las isoformas más abundantes, representando arriba de 40% y 34%, respectivamente, de la  $\alpha$ 1-antitripsina total en plasma. Las múltiples isoformas de  $\alpha$ 1-antitripsina son predominantemente atribuibles a la presencia de diferentes números de residuos de ácido siálico presentes sobre los glicanos. Las isoformas que contienen más glicanos tricatenarios complejos y con ello, más residuos de ácido siálico, tienen pI menor. Unas de las isoformas, M7 y M8, resulta de la pérdida de 5 residuos aminoácidos del extremo N-terminal, por escisión postraduccional, lo que resulta en un desplazamiento catodal de estas (Mills *et al*, 2001)

La deficiencia de AA1 se estudia en humanos como factor predisponente a la presentación de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica, además de relacionarse con enfermedad hepática crónica, desordenes de la piel y vasculitis (Falfán-Valencia *et al*, 2009). La AA1 también ha sido utilizada para el seguimiento de pacientes humanos con trasplante renal, dentro de la evaluación del perfil de proteinuria obtenido mediante SDS-PAGE en una y dos dimensiones (Facio *et al*, 2010). La determinación de AA1 ha sido realizada mediante técnicas de genética molecular, inmunodetección,

turbidimetría y técnicas electroforéticas (Falfán-Valencia *et al*, 2009). De estas últimas, la electroforesis capilar se ha utilizado para la identificación de las isoformas de AA1 (Chang *et al*, 2000). Sin embargo, esta técnica no ha sido aplicada en el estudio de AA1 como marcador de daño renal.

## ***II.5 ELECTROFORESIS***

La electroforesis se define como el movimiento de partículas cargadas en un campo eléctrico, determinado principalmente por su forma y tamaño. La electroforesis, en sus diferentes variantes, comúnmente ha sido utilizada como un método de separación analítico para la visualización e identificación de proteínas (Voet, 2006).

Esta técnica se aplica comúnmente en la identificación y separación de proteínas en la orina de perros sanos y enfermos. Se ha demostrado que las diferentes localizaciones de las lesiones renales se caracterizan también por distintas distribuciones de las proteínas urinarias según su peso molecular. La alteración del glomérulo provoca un aumento en la filtración de proteínas de peso molecular medio y alto, no reabsorbidas el túbulo, que parecen en la orina. El sistema tubular sano reabsorbe proteínas de peso molecular bajo y, por tanto, no se encuentran en la orina. Una lesión tubular disminuye la reabsorción de proteínas de peso molecular bajo, y el glomérulo sano impide la filtración de proteínas de peso molecular mayor, predominando en la orina las primeras. Cuando existe daño tanto en glomérulo como en los túbulos, se observa en la orina de proteínas de alto y bajo peso molecular. Todo esto apoya el uso de método para separación proteica, según el tamaño molecular, para la caracterización de patrones de proteínas urinarias (Zaragoza, 2001).

### ***II.5.1 Electroforesis en Gel***

La electroforesis en gel incluye un grupo de técnicas empleadas con propósitos analíticos y preparativos para purificar moléculas parcialmente antes de aplicar otras técnicas, las cuales emplean una matriz de gel para la separación. El gel es un polímero entrelazado de porosidad controlable, la cual es ajustada de acuerdo al analito, ya sean proteínas o ácidos nucleicos. Para la formación de la matriz, la agarosa y poliacrilamida son los componentes comúnmente utilizados (Voet, 2006).

### ***II.5.1.1 SDS-PAGE***

La técnica de electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de Sodio Dodecil Sulfato bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), es un método rápido y reproducible, ampliamente utilizado para cuantificar, comparar y caracterizar proteínas. Se trata de una técnica analítica-semipreparativa en el que se separan biomoléculas según su peso molecular bajo la acción de un campo eléctrico (Laemmli, 1970).

La separación se realiza en un soporte de resina Bis-Acrilamida, agente entrecruzador que genera el polímero de poliacrilamida, la cual es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Los geles formados son transparentes y poseen estabilidad mecánica, son insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro.

En general, la separación mediante electroforesis en gel está basada en el tamaño, forma y carga neta de las macromoléculas. La separación electroforética se realiza en condiciones desnaturizantes, al añadir compuestos que alteran las condiciones nativas de las proteínas y que se agregan en el buffer de carga, tales como SDS, el cual al unirse a la proteína otorga una carga neta negativa al complejo resultante. El SDS desestabiliza las uniones no covalentes en la proteína, ocasionando el desdoblamiento de las macromoléculas. Aunado al SDS, el 2-mercaptoetanol, un agente disulfuro-reductor, desnaturiza a la proteína rompiéndola a sus subunidades. Las movilidades electroforéticas de los complejos polipéptido-detergente resultantes, asumen la misma relación funcional de acuerdo a sus pesos moleculares. La migración de estos complejos es hacia el ánodo a la velocidad inversamente proporcional a los logaritmos de sus pesos moleculares.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida y del monómero entrecruzador N,N'-metilen-bis-acrilamida. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por acción de los iones persulfato. Las aminas terciarias como el N,N,N,N'-tetrametilen-diamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Existen muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bis-acrilamida, etc.

La técnica comúnmente utilizada es la de sistema discontinuo de Laemmli, en la cual se hace uso de un gel dividido en dos regiones de características diferentes. La región

superior se denomina gel concentrador o *stacking*, y posee un pH ligeramente superior a 6, además de utilizar una concentración menor de acrilamida, comúnmente de 4%. El gel *stacking* propicia la formación de un frente uniforme y delgado con alta concentración de proteína, antes de que éstas migren dentro del gel de resolución o separación. Éste último posee un pH ligeramente superior a 8 y una concentración superior de acrilamida, de acuerdo a las características de la muestra. Una vez dentro del gel separador, las proteínas migran lentamente a través del tamizado de la matriz (Macarulla, 2008).

En este sistema, el buffer utilizado (buffer de Laemmli) contiene SDS y glicina que juegan un papel fundamental en la resolución de la técnica. Con el primero, y por tener afinidad por las partes hidrofóbicas de las proteínas, se consigue la desnaturalización de las mismas y dotarlas de carga negativa. Por otro lado, la glicina juega un papel muy importante en la concentración de la muestra a su paso por el gel de carga. El gel *stacking* tiene un pH de 6,8 que coincide con el punto isoeléctrico de la glicina y por tanto actúa frenando la migración. De esta forma, se consigue que la muestra llegue al gel separador marcando un frente muy estrecho, lo que aumenta la resolución de la técnica (García, 2000).

### ***II.5.1 Electroforesis Capilar***

La EC combina la separación selectiva de la electroforesis estándar con la precisión y control de instrumentación de la cromatografía de alta resolución (Stocking *et al*, 1998). La electroforesis se refiere a la migración de especies eléctricamente cargadas en solución o suspensión en un electrolito, cuando se les hace pasar una corriente. Los cationes migran hacia el electrodo cargado negativamente (ánodo) y los aniones son atraídos hacia el electrodo cargado positivamente (cátodo). Los solutos neutros no son atraídos a ninguno de los electrodos. La EC es una técnica innovadora que separa moléculas cargadas o no cargadas en un capilar delgado lleno de solución buffer por la aplicación de un voltaje muy alto. Las separaciones por EC son extremadamente rápidas: algunas son obtenidas en menos de 5 minutos, con estudios de reproducibilidad que comúnmente muestran una covarianza menor del 2% (Jenkins, 2000).

La separación en electroforesis está basada en las diferencias de velocidad de migración de los solutos en un campo eléctrico. La velocidad de un ión está en función de su movilidad electroforética y del voltaje aplicado en los capilares de diámetro interno reducido (20-200  $\mu\text{m}$ ) para realizar separaciones eficientes tanto de moléculas pequeñas como grandes (Robinson, 2006).

La movilidad de un ión en un medio particular es constante y característica de ese ión. La movilidad del ión es resultado de dos factores. El ión es atraído al electrodo de carga contraria, jalándolo a través del medio. Al mismo tiempo, las fuerzas friccionales tratan de prevenir el movimiento. El balance de ambas determina la movilidad total. Un ión pequeño tendrá menor fricción y por tanto, se moverá a través del capilar más rápido que uno más grande. De manera similar, un ión con carga múltiple experimentará más atracción al electrodo y se moverá más rápido.

La EC comprende una familia de técnicas que tienen diferentes características operativas y separativas. Las técnicas son: ECZ, CIEF, Electroforesis Capilar en Gel (ECG), Isotacoforesis (ITP) y Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética (MECC).

La selección del modo más apropiado de electroforesis capilar depende del tipo de moléculas que se desea analizar y de sus características. En la Tabla 4 se muestran las diferentes modalidades de acuerdo a las moléculas por analizar.

Tabla 4. Modalidades de EC para el análisis de diferentes moléculas.

Iones pequeños	Moléculas pequeñas	Péptidos	Proteínas	Oligonucleótidos	DNA
Electroforesis Capilar de Zona Isotacoforesis	Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética Electroforesis Capilar de Zona Isotacoforesis	Electroforesis Capilar de Zona Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética Enfoque Isoeléctrico Electroforesis Capilar en Gel Isotacoforesis	Electroforesis Capilar de Zona Electroforesis Capilar en Gel Enfoque Isoeléctrico Isotacoforesis	Electroforesis Capilar en Gel Cromatografía Capilar Micelar Electrocinética	Electroforesis Capilar en Gel

(Robinson, 2006)

Existen antecedentes de la aplicación de EC en identificación y validación de biomarcadores urinarios para enfermedades renales. Mischak y Schanstra (2011), describen a la EC, acoplada a otras técnicas, como una plataforma de descubrimiento y validación de biomarcadores urinarios.

La EC es considerada el principal método en el descubrimiento de nuevas moléculas de la proteomica urinaria. Existen otras técnicas, como los inmunoensayos, que se limitan al estudio de las proteínas ya conocidas, identificadas previamente con EC (Kim *et al*, 2011).

El análisis de proteínas en fluidos corporales por EC, se enfocó primeramente en sangre, orina y líquido cefaloraquídeo, aunque otros fluidos corporales han sido analizados, no son muy frecuentes. El análisis de proteínas séricas por EC se ha

convertido en un método rutinario en muchos laboratorios. En un acercamiento diferente de EC, un método CIEF fue desarrollado para cuantificar la alfa-1-antitripsina en suero humano. La EC también es usada para el análisis de proteínas urinarias y permite distinguir la proteinuria glomerular y tubular (Hutterer y Dolník, 2003). A través del análisis de proteínas séricas, la ECZ ha logrado identificar inflamación, síndrome nefrótico, bisalbuminemia y deficiencia de  $\alpha$ -1-antitripsina. La ECZ ha sido utilizada para inmunotipificación de proteínas monoclonales, cuantificación de insulina en suero, plasma y orina, así como en la cuantificación de albúmina sérica (Dolník, 2006).

La EC, también ha sido útil en la identificación de polipéptidos, que podrían ser característicos para una enfermedad específica, como es el caso de muestras de pacientes humanos con enfermedad renal, donde han sido encontrados polipéptidos exclusivos, simultáneamente ausentes en muestras control (Dolník, 2006).

### ***III. JUSTIFICACIÓN***

La Insuficiencia Renal (IR) constituye un problema de salud importante, tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Numerosas son las causas y factores que influyen en el desarrollo y progresión de la enfermedad. El diagnóstico y tratamiento temprano son fundamentales para el pronóstico, y de ellos dependerá la futura necesidad de tratamiento sustitutivo renal en estos pacientes.

Maldonado (2003) en un estudio realizado en una clínica veterinaria para pequeñas especies en la Ciudad de Morelia, Michoacán, observaron que el sistema genitourinario se presenta como el cuarto sistema afectado más comúnmente en perros.

En la práctica veterinaria, se han identificado como factores predisponentes de la IR, enfermedades gastrointestinales, cardíacas y tratamientos a lo largo de la vida del animal (Moreno *et al*, 2007), lo que resulta en animales en edad adulta con daño renal clínico o subclínico, producto de la suma de eventos adversos para el riñón.

La IR es una condición irreversible que amenaza la vida de los pacientes, su detección temprana facilita la intervención apropiada para detener o atenuar el daño celular tubular y estabilizar la función renal o al menos detener la progresión y así disminuir la morbilidad y mortalidad de esta enfermedad.

Las técnicas convencionales usadas en la valoración del funcionamiento renal son poco sensibles, y solo se ven alteraciones cuando más del 50% o hasta el 67% de las nefronas se han perdido funcionalmente y ya se encuentra establecido un daño renal avanzado, lo que se asocia con una alta morbilidad y mortalidad.

La posibilidad de estudiar las proteínas urinarias presentes en pacientes sanos, pacientes con historia clínica de uso de agentes terapéuticos nefrotóxicos y con diagnóstico de insuficiencia renal, ofrece la posibilidad de identificar y diferenciar patrones electroforéticos de proteínas urinarias en pacientes sanos, con daño renal subclínico y clínico, sin la necesidad de inducción experimental.



## ***IV. HIPÓTESIS***

Las proteínas que se detectan en orina de perros, ayudan a establecer la existencia de daño renal y, de acuerdo a sus características, a determinar la localización de éste.

## ***V. OBJETIVOS***

### ***V.1 OBJETIVO GENERAL***

Determinar el patrón electroforético de proteínas en orina de perros sanos y con enfermedad renal.

### ***V.2 OBJETIVOS PARTICULARES***

1. Optimizar condiciones en ECZ para estándares de  $\alpha$ -1 antitripsina y Fibrinógeno, para su uso como marcadores de daño renal.
2. Ajustar las condiciones para el análisis de proteínas mediante SDS-PAGE.
3. Determinar el patrón de bandeo para proteinuria en perros sanos y con enfermedad renal.
4. Determinar las concentraciones en plasma y orina de proteínas en las muestras de los pacientes en los diferentes grupos, mediante densitometría.
5. Correlacionar las concentraciones plasmáticas y urinarias de las proteínas presentes en las muestras de los pacientes en los diferentes grupos.

## **VI. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **VI.1 MATERIALES**

Se hizo uso de equipo para electroforesis de proteínas en minigeles de SDS-PAGE Mini PROTEAN® 3cell BIO-RAD y para electroforesis capilar marca Beckman P/ACE MDQ. Fueron utilizados únicamente reactivos de grado analítico para desarrollar ambas técnicas, los cuales se mencionan en la descripción de cada método de análisis.

### **VI.2 TIPO DE ESTUDIO**

Transversal y observacional (aplicación de la metodología al estudio de pacientes).

### **VI.3 GRUPOS DE ANIMALES**

Se realizó la revisión de los antecedentes e historia clínica de los pacientes ingresados al área de medicina de la Clínica Veterinaria para Perros y Gatos de la Universidad, en busca de aquellos que cumplieran con los criterios de inclusión para alguno de los grupos que a continuación se describen. Se realizó el análisis de las muestras sanguíneas y de orina de los candidatos a ser incluidos.

Se obtuvieron muestras de orina de los perros (*Canis familiaris*) que acudan a la Clínica citada y que se consideraron susceptibles de incluirse en alguno de los siguientes 3 grupos:

- Grupo 1: pacientes de entre 7 y 24 meses de edad, clínicamente sanos, sin antecedentes de enfermedad grave que comprometa la función renal.
- Grupo 2: pacientes mayores de 8 años, clínicamente sanos, sin antecedentes de enfermedad grave que comprometa la función renal.
- Grupo 3: pacientes entre 2 y 8 años de edad, con historia clínica de intoxicación por agentes terapéuticos nefrotóxicos.
- Grupo 4: pacientes con diagnóstico de enfermedad renal preestablecido.

#### **VI.3.1 Criterios de Inclusión**

Los pacientes incluidos en el Grupo 1 debieron cumplir los siguientes criterios:

-Edad entre 7 y 24 meses.

-Historia clínica con ausencia de antecedentes de enfermedades que comprometan la función renal y hepática.

-Parámetros medidos en hemograma, química sanguínea, examen general de orina, dentro de rangos normales.

Los pacientes incluidos en el Grupo 2 cumplieron los siguientes criterios:

- Edad mayor a 8 años, considerados pacientes geriátricos.
- Historia clínica con ausencia de antecedentes de enfermedades que comprometan la función renal y hepática.
- Parámetros medidos en hemograma, química sanguínea, examen general de orina, dentro de rango normales.

Los pacientes incluidos en el Grupo 3, cumplieron con los siguientes criterios:

- Edad entre 2 a 8 años.
- Historia clínica de intoxicación con agentes terapéuticos de nefrotoxicidad conocida, con ausencia de antecedentes en el uso de agentes hepatotóxicos o con enfermedad hepática diagnosticada.
- Hallazgos en hemograma, química sanguínea, examen general de orina correspondientes a intoxicación por agentes nefrotóxicos y enzimas hepáticas en valores normales.

Los pacientes incluidos en el Grupo 4, cumplieron con los siguientes criterios:

- Edad indefinida.
- Historia clínica correspondiente a insuficiencia renal crónica diagnosticada previamente y de origen indistinto, con ausencia de antecedentes en el uso de agentes hepatotóxicos o enfermedad hepática diagnosticada.
- Hallazgos en hemograma, química sanguínea y examen general de orina, correspondientes a insuficiencia renal crónica, con ausencia de alteraciones en enzimas hepáticas.

#### ***VI.4 MÉTODO GENERAL EMPLEADO EN CADA ANIMAL***

Se realizó anamnesis completa, determinando edad, raza, hábitat, alimentación, peso corporal del animal y tratamientos previos. Del mismo modo se investigó la historia clínica, en busca de patologías previas y de cualquier signo de enfermedad.

En todos los perros se extrajo la sangre por punción de la vena cefálica, previa desinfección de la zona, utilizando un tubo seco BD Vacutainer®Serum 6.0mL, uno con EDTA tripotásico BD Vacutainer®EDTA 2.0mL y un último con citrato de sodio BD Vacutainer®Buffered Sodium Citrate (9NC) 2.7mL para la obtención del plasma. La primera de las muestras se destinó al análisis bioquímico completo y el segundo al

análisis hematológico. La tercera muestra se centrifugó a 10 000 g durante 2 minutos . El plasma obtenido se congeló a -70°C en ultracongelador ThermoForma -86°C ULT Freezer y posteriormente se analizó mediante SDS-PAGE.

La extracción de orina se realizó mediante cistocentesis, en condiciones estériles, con jeringa de plástico desechable de 10mL y aguja 22G x 1 ¼" NIPRO. Una vez obtenida la orina se realizó su examen físico y químico del sedimento urinario. Una alícuota fue centrifugada a 10 000g durante 2 minutos en una microcentrífuga Eppendorf Centrifuge 5415D, se obtuvo el sobrenadante para su congelación a -70°C para la realización de la electroforesis en SDS-PAGE.

## ***VI.5 CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS EN LAS MUESTRAS CLÍNICAS***

### ***VI.5.1 Determinación de concentración proteica en muestras***

Las muestras almacenadas a -70°C fueron descongeladas a temperatura ambiente para determinar la concentración de proteína mediante espectrofotometría. Para ello, fue tomada una alícuota de 20µL de la muestra y llevada a un volumen total de 1mL con agua destilada. Una vez mezclada la dilución, el volumen total fue colocado en una celda de cuarzo de 1mL Fisher Scientific y se realizó la medición a una  $\lambda$  de 280nm en el espectrofotómetro 2802 UV/VIS Spectrophotometer UNICO® . La cantidad marcada por el equipo en µg/mL, fue multiplicado por el factor 50 para obtener la concentración total de proteína en la muestra. Posteriormente, la concentración fue ajustada a 3 µg/mL mediante regla de tres, con lo cual se aseguró la obtención de bandas de 10-100ng para la aplicación de la tinción con nitrato de plata. Este procedimiento fue aplicado con cada una de las muestras de orina y plasma.

### ***VI.5.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS-PAGE)***

La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) se utiliza para la separación de proteínas únicamente en función de su peso molecular. La concentración de acrilamida y bisacrilamida varía en función del tamaño de las proteínas que se pretenden separar. Cada gel fue fijado, teñido y revelado para estudiar las distintas bandas proteicas en el densitómetro.

### VI.5.2.1 Preparación de los geles

La técnica utilizada en el presente estudio, se denomina electroforesis discontinua de Laemmli (1970), caracterizada por el uso de geles divididos en dos regiones con características diferentes. La concentración de acrilamida es distinta para cada parte del gel: la inferior, tuvo una concentración del 15% y la superior, fue del 4%. El pH también difiere en cada una de ellas: la primera contó con un pH de 6.8 y la segunda con uno de 8.8

La composición de los geles en cada electroforesis, para muestras urinarias y plasmáticas, se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 5. Cantidades de reactivos para geles de poliacrilamida.

REACTIVO	15%	10%	
	<b>GEL SEPARADOR</b>		<b>GEL CONCENTRADOR 5%</b>
<b>Acrilamida/Bisacrilamida 30%</b>	3.7 mL	2.5 mL	423 µL
<b>Tris 1.5M pH8.8</b>	1.9 mL	1.9 mL	640 µL
<b>H<sub>2</sub>O dde</b>	1.85 mL	3.1 mL	1.44 mL
<b>SDS 10%</b>	76 µL	76 µL	25.4 µL
<b>TEMED</b>	6.7 µL	6.7 µL	2.7 µL
<b>Persulfato de Amonio 10%</b>	33.8 µL	33.8 µL	13.5 µL
<b>Vol. Total</b>		7.62 mL	2.55 mL

(Rosenberg, 2005)

Fueron mezclados los diferentes reactivos de los geles separador y concentrador. Sin agregar el TEMED y el persulfato de amonio, las mezclas fueron desgasificadas mediante vacío en un BüCHI Vac® V-500 durante 15 min. A continuación, se agregó TEMED y persulfato de amonio al gel separador para iniciar la polimerización y la mezcla fue vertida entre los cristales de electroforesis para un gel de 0.75mm de grosor, previamente montados. Después de aproximadamente 45 min de solidificación, se agregó TEMED y persulfato a la mezcla para el gel concentrador, se vertió en el espacio restante y se colocaron los peines para 10 pozos. Una vez solidado el segundo gel, se retiraron los peines y se lavaron los pozos con agua destilada para eliminar burbujas de aire. Se colocaron los cristales en el soporte del equipo Mini PROTEAN® 3cell BIO-RAD con los electrodos y se agregó buffer Laemmli, (cuya composición se muestra en la Tabla 6) en el espacio entre los dos cristales. A continuación se vertió por el exterior de los soportes hasta cubrir los electrodos y se procedió a depositar cada muestra en un pozo.

Tabla 6. Composición del Buffer de corrida Laemmli 10X.

REACTIVO	CANTIDAD
Trizma base	30.2 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
H <sub>2</sub> O	Aforado a 1000 mL

\*Se disolvieron 50mL del buffer 10X en 450mL de H<sub>2</sub>O dde.

### VI.5.2.2 Preparación de las muestras

En cada electroforesis se dispuso de 10 pozos por gel, en los cuales fueron depositados un marcador de peso molecular (MPM) Precision Plus Protein™ Standards All Blue marca BIO-RAD, preteñido en azul de bromofenol y con proteínas recombinantes con pesos moleculares entre 10 kDa y 250 kDa, el cual no necesitó de ningún tratamiento previo a su carga en el gel, y 3 diluciones de cada muestra de un solo grupo, teniendo en total 9 muestras por gel.

Una vez ajustada la concentración de cada muestra, se agregó a ésta buffer de carga, en proporción 4:1 (4 partes de muestra por una de buffer). Una vez mezclada la muestra con el buffer de carga, cuya composición de muestra en la Tabla 7, se introdujo en el termobloque Dry Bath Incubator Fisher Scientific durante 3min a 95°C para lograr la desnaturalización de las proteínas presentes. Del volumen total de muestra desnaturalizada, se cargó en cada pozo un volumen de 15µL, con el fin de evitar la mezcla entre pozos, el resto fue congelado a -20°C para posteriores repeticiones. Terminada la carga de las muestras y el MPM en los pozos, el sistema fue conectado a una fuente de voltaje, realizándose el corrimiento a 110 V hasta observar la completa separación de las bandas del MPM.

Tabla 7. Composición del Buffer de carga.

REACTIVO	CANTIDAD
Glicerol	40% (w/v)
2-Mercaptoetanol	156 mg
SDS	0.8 g
Tris-HCl 1M pH 8.8	2.5 mL
Azul de Bromofenol	0.001% (w/v)

(Rosenberg, 2005)

### VI.5.2.3 Tinción de los geles

Con el objetivo de detectar mínimas cantidades de proteína en orina, no detectadas por las técnicas comúnmente utilizadas, se eligió la tinción a base de nitrato de plata, debido a su gran sensibilidad en el orden de nanogramos.

Existen variaciones del protocolo de tinción, pero todas pueden ser divididas en 5 principales fases. En la primera fase, el gel es fijado para eliminar cualquier sustancia que interfiera y que ocasione un pobre contraste. En la segunda fase, el gel es sensibilizado al ser tratado con un agente que incremente la sensibilidad y el contraste. En la tercera fase, el gel es impregnado con un compuesto de plata. Durante la cuarta fase, la imagen es revelada, generalmente usando una solución diluida de formaldehído. En la última fase, la reacción es detenida para prevenir sobreexposición.

Tabla 8. Protocolo de tinción de plata para SDS-PAGE.

PROCEDIMIENTO	REACTIVOS
Incubación de 30 min en solución A.	Solución A: 30mL de Etanol, 10mL de Ácido acético y 60mL de H <sub>2</sub> O dde.
Incubación durante 30min en solución B.	Solución B: 10mL de Buffer de acetatos 2M pH 6.0, 15mL de Etanol absoluto, 250µL de Glutaraldehído, 0.05g de Tiosulfato de Sodio y 25mL de H <sub>2</sub> O dde.
Lavado con agitación toda la noche.	H <sub>2</sub> O dde.
Incubación durante 30min 3n solución C.	Solución C: 0.1 de Nitrato de Plata, 3mL de Metanol, 25µL de Formaldehído y 97mL de H <sub>2</sub> O dde.
Lavado con agitación.	H <sub>2</sub> O dde.
Incubar durante 1min en solución D.	Solución D. 2.5g de Carbonato de Sodio, 40µL de Formaldehído y 100mL de H <sub>2</sub> O dde.
Agregado de más solución D y agitado manual hasta aparición de las bandas.	
Detención de la reacción con Ácido Acético al 5%.	5mL de Ácido Acético y 95mL de H <sub>2</sub> O dde.

## **VI.6 MÉTODO DE ECZ PARA FIBRINÓGENO Y $\alpha$ 1- ANTITRIPSINA**

Se buscaron condiciones óptimas para el establecimiento de un método para el análisis de fibrinógeno y  $\alpha$ 1-antitripsina estándar (Sigma- Aldrich), para su posterior uso como indicadores de daño glomerular y tubuloproximal, respectivamente.

### **VI.6.1 Preparación del stock de fibrinógeno y $\alpha$ 1-antitripsina**

La concentración del stock de proteína estándar, fue establecido de acuerdo a los valores normalmente encontrados en plasma canino y se redujo en un valor 100 veces menor, utilizándose un stock de 200 $\mu$ g/mL, lo cual permitirá la detección de cantidades mínimas en muestras urinarias y evitará posibles alteraciones de la señal en concentraciones mayores.

La preparación del fibrinógeno se realizó de acuerdo a la hoja de especificaciones del fabricante (Sigma-Aldrich F3879). Fueron pesados 200 $\mu$ g de la proteína liofilizada en una balanza analítica Sartorius CP1245 y fueron disueltos en 1mL de solución NaCl 0.9% PISA a 37°C, sin dar vórtex y agitando gentilmente durante 2hr. Fueron utilizados únicamente recipientes de plástico, tanto para su disolución, como para su almacenamiento. La solución stock fue dividida en 5 alícuotas de 200  $\mu$ L, las cuales fueron congeladas a -20°C, para su posterior uso.

El stock de  $\alpha$ 1-antitripsina estándar fue preparado con una concentración de 400  $\mu$ g/mL, debido a su análisis con inyección electrocinética, variación en la cual una mayor concentración propicia un ingreso mayor de la muestra a la luz del capilar y no provoca alteraciones en la señal. La solución fue preparada de acuerdo a la hoja de especificaciones del fabricante (Sigma-Aldrich A6150). Fueron pesados 400  $\mu$ g de la proteína liofilizada y fueron disueltos en agua desionizada a temperatura ambiente dando vórtex en un MS1 Minishaker IKA® durante 3min. Posteriormente se dividió en alícuotas de 200  $\mu$ L, las cuales se almacenaron a -20°C para su estudio posterior.

### **VI.6.2 Selección del buffer de corrimiento**

Basados en trabajos anteriores (Profumo *et al*, 2005; Fuentes, 2009), fueron seleccionados dos buffer fisiológicos y uno inorgánico: Tricina, MOPS y Fosfato de Sodio, respectivamente. La molaridad del buffer fue seleccionada en base a las características de la proteína y a la modificación de diferentes factores, como el flujo electroforético, a fin de facilitar la movilidad de la proteína hacia el detector y de disminuir en lo posible el efecto *Joule*; se utilizaron molaridades de entre 15 y 100mM (Tablas 9 y 10).



Debido a que ambas proteínas, fibrinógeno y  $\alpha$ 1-antitripsina, son proteínas ácidas, con puntos isoeléctrico cercanos a 4, los pH fueron seleccionados con el fin de otorgar un alta carga neta negativa a la proteína y utilizar una polaridad inversa, facilitando con ello su migración hacia el detector. El pH utilizado para ambas proteínas, osciló entre 6.0 y 9.5 (Tablas 9 y 10). El tipo de inyección fue diferente para cada proteína: para el fibrinógeno se utilizó inyección por presión, debido a la labilidad que presenta; para  $\alpha$ 1-antitripsina fue utilizada inyección electrocinética en polaridad negativa, aprovechando su alta carga negativa en el buffer seleccionado (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Condiciones probadas para fibrinógeno en ECZ.

BUFFER	CONCENTRACIÓN	pH	VOLTAJE	TEMPERATURA	INYECCIÓN
<b>TRICINA</b>	15mM	7.5	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
	20mM	7.7	-20KV	25°C	0.5psi/5s
	25mM	8.0	17KV		
	30mM	8.3	20KV		
	35mM	8.5			
<b>MOPS</b>	100mM	6.7	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
		7.2	-20KV	25°C	0.5psi/5s
		7.7	17KV		
			20KV		
<b>FOSFATO DE SODIO</b>	20mM	6.0	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
	25mM	6.2	-20KV	25°C	0.5psi/5s
		6.5	17KV		
			20KV		

Tabla 10. Condiciones probadas para AA1 en ECZ

BUFFER	CONCENTRACIÓN	pH	VOLTAJE	TEMPERATURA	INYECCIÓN
<b>TRICINA</b>	25mM	7.4	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
	35mM	7.7	-20KV	25°C	0.5psi/5s
		8	17KV		
			20KV		
<b>MOPS</b>	100mM	6.7	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
		7.2	-20KV	25°C	0.5psi/5s
		7.7	17KV		
			20KV		
<b>BORATO DE SODIO</b>	55mM	7.5	-17KV	20°C	POR PRESIÓN
	60mM	7.7	-20KV	25°C	0.5psi/5s
	65mM	8.0	-25KV		ELECTROKINÉTICA
	70mM	8.3	17KV		-10KV/10s
	75mM	8.5	20KV		-10KV/20s
		9.0	25KV		-10KV/30s
		9.5			-10KV/40s
				-10KV/60s	

### **VI.6.3 Análisis electroforético en ECZ**

Para el análisis electroforético se utilizó capilar de sílice fundida PolymicroTechnologies® de 100µm de diámetro interno (d.i.), 48 cm de longitud total, en un equipo Beckman P/ACE MDQ, con detector de arreglo de diodos, realizando la detección a una  $\lambda=214\text{nm}$ . La secuencia del método para el análisis se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Secuencia del método para AA1 y fibrinógeno en ECZ.

<b>EVENTO</b>	<b>TIEMPO</b>
Lavado con NaOH 1N	5 min/20 psi
Lavado con agua desionizada	1 min/20 psi
Inyección por presión de buffer de corrimiento	3 min/20 psi
Inyección por presión (fibrinógeno) ó electrocinética (AA1) de la muestra	11 s/20 psi ó 20 s/ -10KV
Inyección de <i>plug</i> de buffer de corrimiento	5 s/20 psi
Cerrado del circuito y aplicación de voltaje en polaridad inversa	20 min/-20KV

### **VI.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó un análisis descriptivo de los resultados obtenidos. Las principales variables medidas en los diferentes análisis de laboratorio realizados, se describieron mediante la media, desviación estándar, valor máximo y valor mínimo. En el caso del análisis electroforético mediante SDS-PAGE, con la correspondiente determinación del peso molecular y la cantidad de proteína observada en cada banda, fueron descritos mediante la media y la desviación estándar.

## VII. RESULTADOS

### VII.1 PACIENTES INCLUIDOS

Fueron captados del servicio de consulta de la Clínica de Perros y Gatos de la FMVZ-UMSNH, un total de 17 pacientes, que cumplían en inicio los criterios de inclusión correspondientes a reseña, historia clínica y examen físico. Sin embargo, una vez que el Laboratorio Clínico de la institución mencionada, realizó hemograma, química sanguínea completa y examen general de orina, únicamente 10 individuos fueron incluidos y clasificados en los grupos propuestos. La reseña de los individuos incluidos en los 4 grupos de estudio se describe en la Tabla 12. Los resultados de laboratorio obtenidos en las muestras de los grupos 1 y 2, jóvenes y geriátricos clínicamente sanos (CS) se encontraron sin cambios significativos (SCS), a excepción de la hiperglobulinemia posvacunal presentada en el individuo número 100. En los grupos 3 y 4, tratados con agentes terapéuticos nefrotóxicos y diagnosticados con insuficiencia renal, se observaron alteraciones correspondientes con el diagnóstico de cada paciente (Tabla 13).

Tabla 12. Reseña de los pacientes incluidos en los diferentes grupos.

GRUPO	PACIENTE	EDAD	SEXO	RAZA
Jóvenes Clínicamente Sanos	100	2 años	Macho	Scottish terrier
	103	1 año	Hembra	Whippet
	104	1 año	Hembra	Beagle
Geriátricos Clínicamente Sanos	203	11 años	Macho	Poodle
	201	10 años	Hembra	Cruza Papillón
	202	10 años	Macho	Schnauzer
Agentes Terapéuticos Nefrotóxicos	628	3 años	Hembra	Criollo
	630	5 años	Hembra	Golden Retriever
Insuficiencia Renal	301	12 años	Hembra	Schnauzer
	302	7 años	Hembra	Golden Retriever

Tabla 13. Diagnóstico y resultados de laboratorio de los pacientes incluidos.

GRUPO	PACIENTE	DX	BH	QS	EGO
Jóvenes Clínicamente Sanos	100	CS	SCS	Hiperglobulinemia	SCS
	103	CS	SCS	SCS	SCS
	104	CS	SCS	SCS	SCS
Geriátricos Clínicamente Sanos	203	CS	SCS	SCS	SCS
	201	CS	SCS	SCS	SCS
	202	CS	SCS	SCS	SCS
Agentes Terapéuticos Nefrotóxicos	628	TVT	Hiperproteinemia Desviación a la izquierda Linfopenia	Hipercolesterolemia Hipoalbuminemia Hiperglobulinemia	SCS
	630	LL	Leucocitosis Desviación a la izquierda	Hipoalbuminemia	SCS
Insuficiencia Renal	301	IR	Anemia normocítica normocrómica	Azotemia	Proteinuria 2+ Hipostenuria
	302	IR	Anemia normocítica normocrómica Desviación a la izquierda	Azotemia Hiperglobulinemia Hiperfosfatemia	Proteinuria 2+ Isostenuria

En el grupo 3 se incluyeron 2 pacientes en tratamiento de quimioterapia. La paciente no. 638, fue diagnosticada con Tumor Venéreo Transmisible (TVT) dos meses antes de la toma de muestra para el estudio. Se le administró en primera instancia Vincristina, agente de conocida neurotoxicidad, sin obtener buenos resultados. Posteriormente se administró una vez por semana Doxorrubicina, agente nefrotóxico y cardiotóxico, observándose una respuesta favorable y remisión del tumor. Previo a cada sesión de quimioterapia, se realizaban química sanguínea completa y hemograma, en los cuales no mostraba indicios de daño renal. Debido a la presentación de signos de daño cardíaco y posterior diagnóstico de efusión pericárdica, la paciente fue sometida a eutanasia.

Por otro lado, la paciente no. 630 fue diagnosticada con Linfoma Linfoblástica (LL) cuatro meses antes de la toma de muestra para el estudio. Fue sometida al protocolo de quimioterapia CITOP, el cual consiste en la administración de Doxorrubicina en primer lugar, posteriormente Vincristina, Ciclofosfamida y por último, Prednisona. El quimioterapéutico Doxorrubicina posee toxicidad renal y cardíaca, la Vincristina

neurotoxicidad, como se menciono antes, y la Ciclofosfamida se sabe que puede ocasionar inflamación y hemorragia de tracto urinario. Cabe señalar, que en los estudios realizados previo a cada sesión de quimioterapia, no se encontraron hallazgos sugerentes de daño renal.

Los pacientes incluidos en el grupo 4, fueron incluidos 2 pacientes diagnosticado con Insuficiencia Renal (IR). La paciente no. 301 acudió a consulta por anorexia, postración y presencia de secreción vulvar fétida. De acuerdo a su historia clínica, hallazgos radiográficos y en estudios de laboratorio, fue diagnosticada con Piometra. Debido a que la signología era presuntiva de Piometra y a que es bien sabido que dicha patología predispone a daño renal, se tomaron muestras para el estudio antes de la obtención del diagnóstico y el inicio de la terapia de sostén. Una vez diagnosticada, se estabilizó y fue sometida a cirugía de Ovariohisterectomía. Los resultados de laboratorio fueron concordantes con insuficiencia renal.

En el grupo 4, también se incluyó la paciente no. 302, la cual acudió a consulta por hiporexia, halitosis, vómitos intermitentes, melena y pérdida ponderal. Se le realizaron pruebas de laboratorio y fue diagnosticada con Insuficiencia Renal Crónica de etiología desconocida. Le fue administrada terapia de líquidos para reducir en lo posible la azotemia que presentaba, y fue instaurada una terapia de sostén consistente en dieta reducida en proteínas y sodio, complejo B, protectores de la mucosa gástrica, eritropoyetina exógena, quelantes del fósforo e inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, con el fin de disminuir la pérdida progresiva de nefronas y mantener la calidad de vida de la paciente.

## ***VII.2 CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LA MUESTRAS***

La concentración de proteína en las muestras urinarias y plasmáticas fue determinada mediante espectrofotometría. Los valores obtenidos mostraron discrepancia respecto a los resultados observados en las pruebas rutinarias de laboratorio. En el caso de los grupos 1 y 2, el EGO reportó ausencia de proteinuria, mientras que el análisis mediante espectrofotometría mostró cantidades desde 22.5 µg/mL hasta 81.15 µg/mL (Tabla 14). Cabe señalar que las tiras reactivas utilizadas en el EGO, tienen un límite de detección de 30mg/dL, mientras que la espectrofotometría se basa en la detección de grupos prostéticos cromóforos en la proteína, tales como el triptófano y la tirosina, detectando concentraciones inferiores a 30m/dL.

Tabla 14. Concentración de proteína en las muestras urinarias.

GRUPO	JÓVENES CLINICAMENTE SANOS (Grupo 1)			GERIÁTRICOS CLINICAMENTE SANOS (Grupo 2)			AGENTES NEFROTÓXICOS (Grupo 3)		INSUFICIENCIA RENAL (Grupo 4)	
	MUESTRA	100	103	104	201	202	203	628	630	301
CPU(µg/mL)	37.15	43.65	56.9	22.5	81.15	66.0	36.1	50.15	38.25	16.1

### ***VII.3 ELECTROFORESIS EN GEL: SDS-PAGE***

De los 11 pacientes incluidos, se analizaron únicamente las muestras de 10 de ellos, debido a que la muestra no. 201 presentaba degradación, por lo cual fue descartada. Una vez ajustadas las condiciones, las muestras fueron descongeladas y se procedió a su preparación y análisis mediante SDS-PAGE con tinción de plata, en las condiciones antes descritas.

El porcentaje de los geles utilizados fue de 15%, debido a que las proteínas de origen tubular poseen pesos moleculares <45kDa, sacrificando la resolución de proteínas de mayor peso molecular (>70 KDa), correspondientes a un patrón de proteinuria glomerular.

En el grupo 1 y 2 se observaron patrones de bandeo similares, tanto en el número de bandas, como en los pesos moleculares calculados por el programa utilizado (Chemi Doc). Sin embargo, una de las muestras pertenecientes al grupo 1, mostró un patrón distinto, a pesar de que el paciente fue hallado como clínicamente sano, a excepción de la hiperglobulinemia observada en la QS, la cual fue relacionada a vacunación reciente. Por otro lado, la muestra 201 del grupo 2 presentó degradación, debido al tiempo de almacenamiento previo al análisis, por lo que fue descartada (Figura 3).

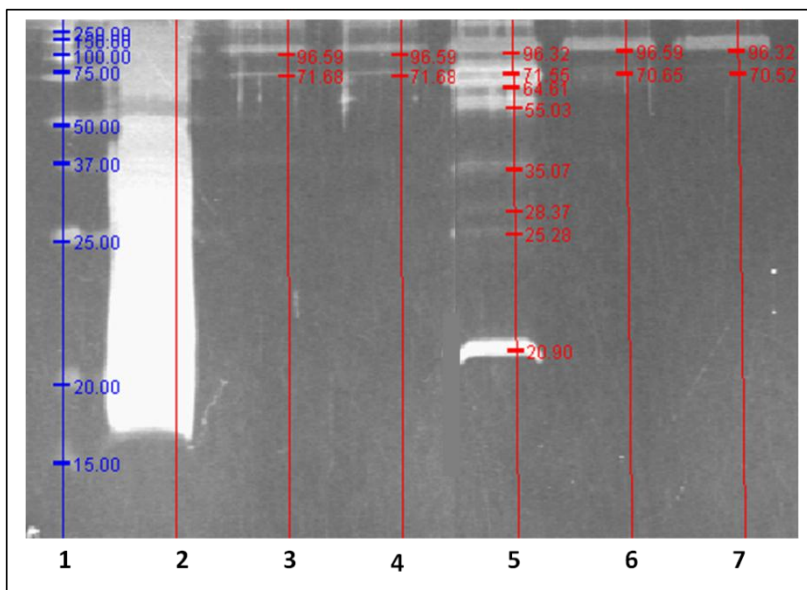


Figura 3. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras del Grupo 1 y 2. Carril 1: MPM; carril 2: paciente no. 201; carril 3: paciente no. 203; carril 4: paciente no. 204; carril 5: paciente no. 100; carril 6: paciente no. 103; carril 7: paciente no. 104.

El patrón de bandeo de las muestras pertenecientes al grupo 3 mostraron algunas bandas de pesos similares a las observadas en los grupos 1 y 2 (Figura 4). Cabe señalar que el paciente no. 630 mostró bandas pertenecientes a proteínas de bajo peso molecular, sin que se observara proteinuria en EGO.

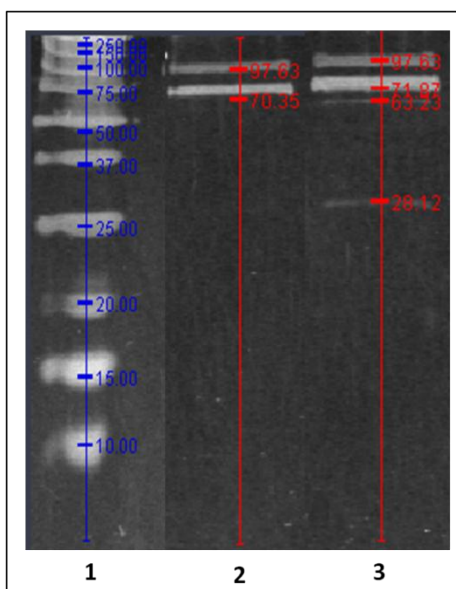


Figura 4. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras urinarias del Grupo 3. Carril 1: MPM; carril 2: paciente no. 628; carril 3: paciente no. 630.

En el grupo 4 se observó una gran cantidad de bandas en un amplio rango de peso molecular, un hallazgo esperado debido a la falla renal existente y a la proteinuria observada en EGO.

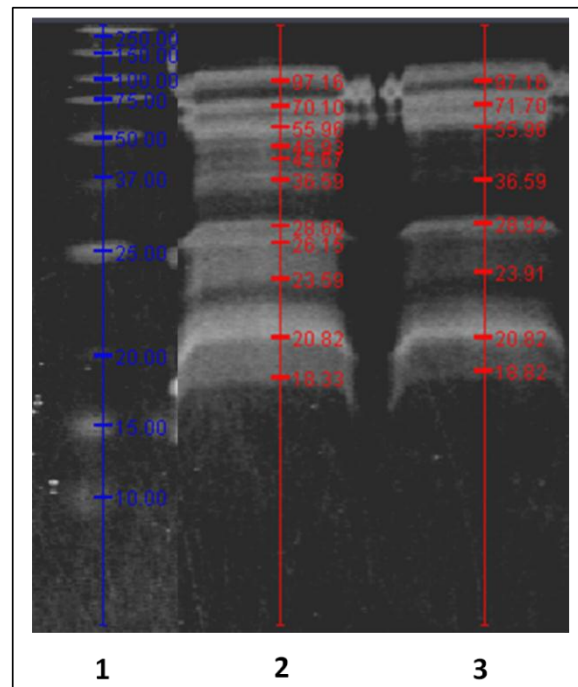


Figura 5. Bandas observadas en SDS-PAGE de muestras urinarias del Grupo 4. Carril 1: MPM; carril 2: paciente no. 301; carril 3: paciente no. 302.

Se compararon las bandas observadas en los diferentes grupos, registrándose el PM y si se encontraban en más de una muestra. De las bandas que se repetían, se obtuvo una media, DE y DER del PM calculado por el programa de análisis utilizado. Se observó un patrón constante de dos proteínas en todas las muestras de los 4 grupos, una de  $98.88 \pm 0.520$  KDa y otra de  $70.95 \pm 0.620$  KDa. En el grupo 1 y 2, no se observaron bandas adicionales a las ya mencionadas, a excepción de la muestra no. 100 con bandas de iguales pesos moleculares a algunas registradas en muestras del grupo 3 y 4. En los grupos 3 y 4, se observaron bandas de PM similares en las muestras no.630, no.301 y no.302. La muestra 628, mostró las mismas dos bandas registradas en las muestras de los pacientes sanos (Tabla 15). Las DER calculadas para los pesos moleculares, se encontraron por debajo del 3% establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004



Tabla 15. Pesos moleculares de las bandas observadas en las muestras de los cuatro grupos. Se muestra media, desviación estándar (DE) y desviación estándar relativa (DER) de los pesos moleculares calculados para cada banda.

MEDIA (KDa)	DE	DER (%)	NO. DE MUESTRA									
			100	103	104	202	203	628	630	301	302	
96.88	0.520	0.536	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
70.95	0.620	0.874	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
63.92	0.976	1.527	✓							✓		
55.49	0.658	1.185	✓								✓	✓
46.98	○	○									✓	
42.1	○	○									✓	
36.08	0.878	2.432	✓								✓	✓
28.50	0.340	1.194	✓						✓		✓	✓
25.71	0.615	2.392	✓								✓	
23.55	0.057	0.240									✓	✓
20.84	0.046	0.222	✓								✓	✓
18.57	0.346	1.865									✓	✓

✓ Banda presente

○ No calculados debido a que las bandas se observaron sólo en una muestra.

#### VII.4 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

Fueron probadas las condiciones antes mencionadas (Tabla 9) en estándar de Fibrinógeno a una concentración de 200µg/mL. Se obtuvieron señales con buena resolución y eficiencia para el Fibrinógeno en buffer Tricina 25mM pH 8, en capilar de 75µm de d.i., inyectando la proteína mediante presión a 0.5psi/5s, realizando el corrimiento aplicando voltaje en polaridad inversa a -20kV durante 20min a 20°C (Figura 6).

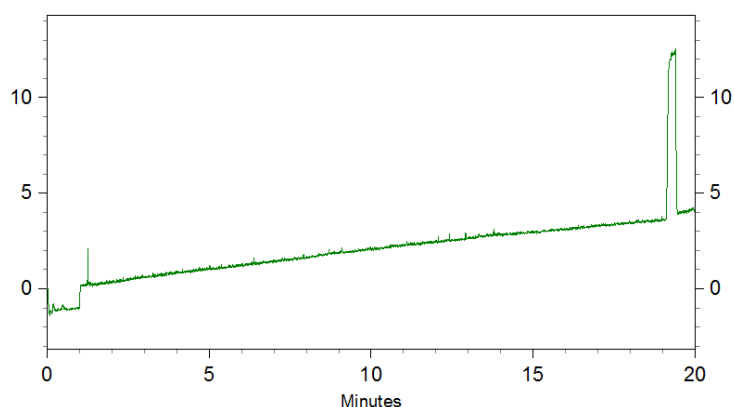


Figura 6. Electroferograma de fibrinógeno en concentración de 200µg/mL en buffer Tricina 25mM pH 8, en capilar de 75µm de d.i., inyección por presión 0.5psi/5s, con un voltaje -20kV durante 20min a 20°C.

Posteriormente, se realizaron ensayos en un capilar de 100 $\mu$ m d.i. con las condiciones encontradas como óptimas, obteniéndose señales con mejor resolución y eficiencia, respecto a las obtenidas en capilar de 75  $\mu$ m d.i. Estas condiciones fueron comparadas con las propuestas por Profumo (2005) para fibrinopéptidos y Fuentes (2009) para fibrinógeno, en las cuales no se observan señales que correspondan con fibrinógeno, a diferencia de la señal obtenida con las condiciones propuestas (Figura 7).

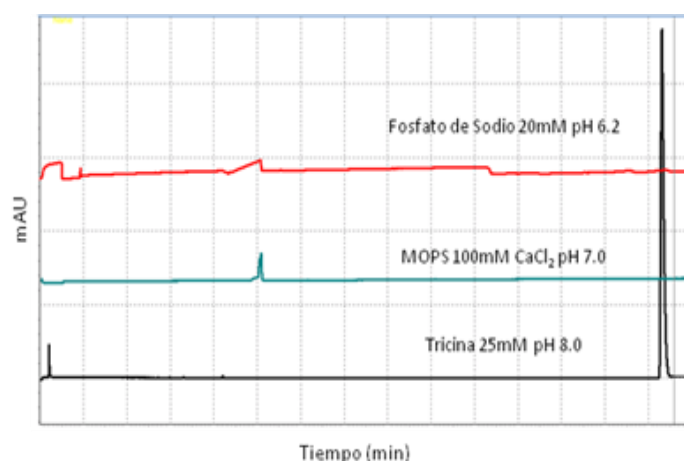


Figura 7. Electroferograma de fibrinógeno en concentración de 200 $\mu$ g/mL en buffer Fosfato de Sodio 20mM pH 6.2, MOPS 100mM con CaCl<sub>2</sub> pH 7.0 y en Tricina 25mM pH 8, en capilar de 100 $\mu$ m de d.i., inyección por presión 0.5psi/5s, con un voltaje -20kV durante 20min a 20°C.

Debido a la buena resolución y eficiencia de las señales obtenidas, los ensayos para obtener la reproducibilidad en el tiempo de migración para fibrinógeno, se realizaron en el capilar de 100 $\mu$ m d.i. Para dichos ensayos, se hicieron repeticiones variando la concentración y el pH, respecto a los encontrados como óptimos. Fueron realizados ensayos en buffer Tricina 25mM en pH de 7.5 a 8.5, calculando la movilidad electroforética ( $\mu ep$ ), para comprobar en que intervalo de pH existía menor variabilidad de ésta. Se observó que la  $\mu ep$  se mantiene estable en el intervalo de pH mencionado (Figura 9) De igual forma, se modificó la concentración del buffer en un intervalo de 15mM a 35mM, manteniendo un pH de 8. En este caso, se observó una  $\mu ep$  estable entre 15mM y 30mM, aumentando de forma marcada en 35mM (Figura 8).

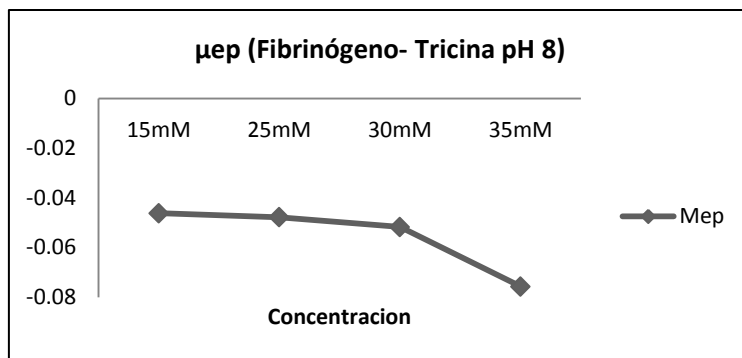


Figura 8. Movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) del fibrinógeno en buffer Tricina 25mM en pH 7.5, 7.7, 8, 8.3 y 8.5.

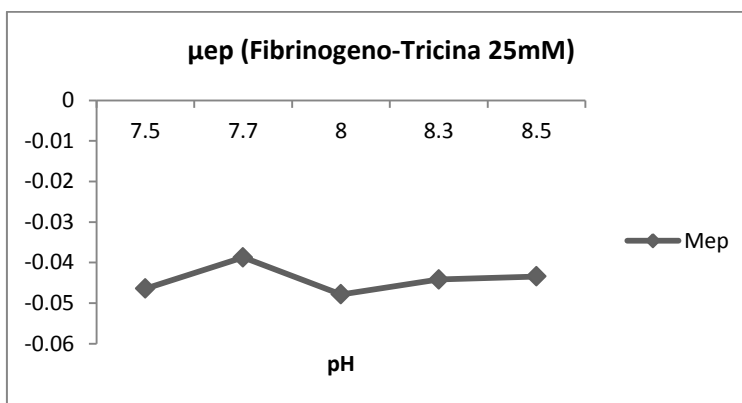


Figura 9. Movilidad electroforética ( $\mu_{ep}$ ) del fibrinógeno en buffer Tricina 15mM, 25mM, 30mM y 35mM en pH 8.

Se calculó la reproducibilidad en el tiempo de migración para los diferentes pH y concentraciones (M), obteniendo media, desviación estándar (DE) y desviación estándar relativa (DER) para cada concentración y pH. Posteriormente se realizaron los cálculos para todo el intervalo de pH y concentración utilizados, observándose una media para el tiempo de migración de 17.37min, con una DER del 1.9157% para el intervalo de pH probado y una media para el tiempo de migración de 21.604min, con una DER del 2.3322% para el intervalo de concentraciones utilizado; ambas DER se encontraron por debajo del 3% establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2004.

Se probaron las condiciones antes mencionadas (Tabla 10) en estándar de AA1 a una concentración de 400 $\mu$ g/mL. Se obtuvieron señales de buena resolución y eficiencia en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5, en capilar de 100 $\mu$ m de d.i., realizando la inyección de la proteína mediante inyección electrocinética a 10KV/20s y el corrimiento en polaridad inversa con un voltaje de -20kV durante 20min a 20°C (Figura 10).

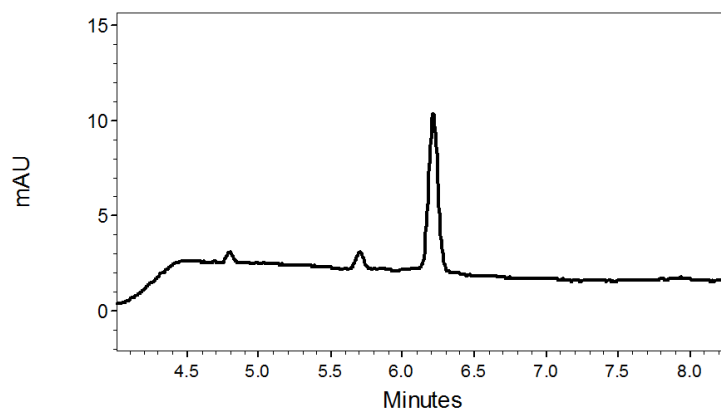


Figura 10. Electroferograma de AA1 en concentración de 200µg/mL en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5, en capilar de 100µm de d.i., Inyección electrocinética 10KV/20s, con un voltaje -20kV durante 20min a 20°C.

No fue posible realizar las repeticiones necesarias para el cálculo de la reproducibilidad en el tiempo de migración de AA1, debido a fallas técnicas. Sin embargo, se realizaron corrimientos en buffer Borato de Sodio a diferentes valores de pH (Figura 11) observándose un incremento del tiempo de migración al incrementarse el pH del buffer de corrimiento.

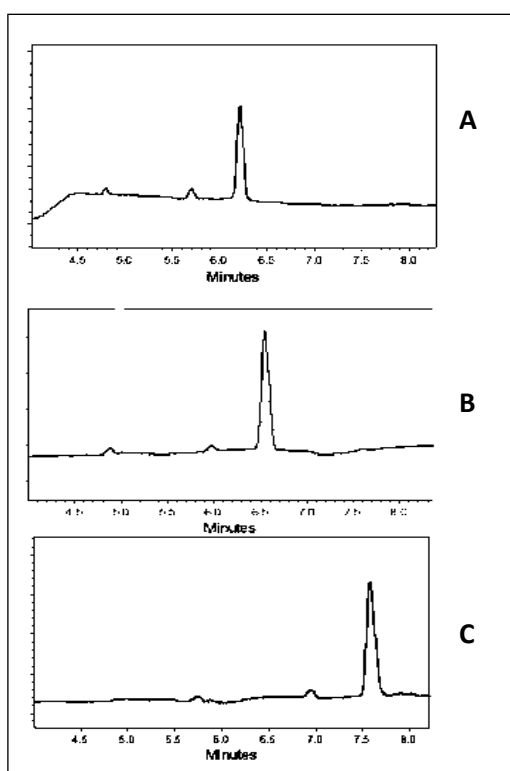


Figura 11. Electroferograma de AA1 en concentración de 200µg/mL en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5 (A), pH 9 (B) y pH 9.5 (C), en capilar de 100µm de d.i., Inyección electrocinética 10KV/20s, con un voltaje -20kV durante 20min a 20°C.

## ***VIII. DISCUSIÓN***

Se sabe que la pérdida de nefronas se inicia a temprana edad como un mecanismo fisiológico normal, debido a un sinnúmero de factores y como parte de un desgaste normal en todo organismo vivo. En el caso de los pacientes caninos, la gran variedad de razas hace que la velocidad en su metabolismo, desarrollo y envejecimiento, sea diferente en cada individuo y con ello, el desgaste orgánico. Sin embargo, la clasificación de las diferentes razas de acuerdo a su talla, hace grupos homogéneos con tasas metabólicas y de desarrollo similares (Davies, 1996). Debido a ello, en el presente estudio se determinó el uso de muestras de pacientes de tallas y pesos similares para los grupos 1 y 2, reclutando únicamente pacientes de talla mediana con pesos entre 10- 15kg.

De igual forma, se seleccionaron individuos entre 7 meses y 2 años, debido a que, en los cachorros, las constantes fisiológicas y metabolismo son diferentes a las observadas en un perro adulto, y en el periodo mencionado se consideran individuos adultos jóvenes con menor probabilidad de presentar patologías. En el caso de pacientes geriátricos, los mecanismos adaptativos ante el daño orgánico que pudieran sufrir durante toda su vida, hacen suponer la existencia de anomalías en sus constantes fisiológicas inherentes al proceso de envejecimiento (Davies, 1996). Por lo cual, fue necesaria la inclusión de pacientes geriátricos clínicamente sanos, de los cuales se conocía la historia clínica completa desde cachorros.

Lo anterior permitió conocer el patrón de proteinuria en pacientes adultos jóvenes y adultos geriátricos, clínicamente sanos y establecer diferencias con los patrones observados en pacientes con afección renal.

Como ya se mencionó, existe una pequeña cantidad de proteína presente en orina, menos de 1g/día, la cual es considerada fisiológicamente normal (Zaragoza, 2001). Ésta proteína puede ser de origen plasmático, proteínas que atraviesan el glomérulo hacia y escapan a la reabsorción tubular, o de origen tisular, procedente de las células epiteliales de los túbulos renales. Las proteínas urinarias de origen plasmático representan el 60% del total de proteínas urinarias, entre ellas está la albúmina, lisozima, mioglobina y amilasa, y su concentración urinaria es dependiente de sus niveles en plasma. Las proteínas urinarias de origen tisular representan un 40% de la totalidad de proteínas presentes en la orina, e incluye la proteína de Tamm-Horsfall o uromucoide, la uroquinasa e IgA secretora y NAG, las cuales son secretadas a la luz tubular por la células epiteliales del asa de Henle y túbulos renales, en concentraciones de 0,5 a 1 mg/dl (Portillo *et al*, 1997).

Los PM de las proteínas presentes de forma normal en orina, abarcan un amplio intervalo. Desde lisozima y mioglobina con 17kDa, cadenas ligeras producto de la

degradación de inmunoglobulinas secretoras con PM cercano a 20kDa, albúmina con PM alrededor de 70kDa, hasta IgA con 150 kDa (Parra y Rodríguez, 1998). En estudios anteriores, Zaragoza (2001) utilizó geles de SDS-PAGE al 10.4% para la identificación de IgA en muestras urinarias de perros con enfermedades causantes de daño renal, logrando la separación de proteínas de alto PM relacionadas a daño glomerular, dejando de lado la separación de proteínas de bajo peso molecular presentes en daño tubular. Debido a ello, el uso de geles al 15 % se hizo para lograr la separación y visualización de proteínas de pesos moleculares inferiores a los 45kDa (Bollag y Edelstein, 1994), relacionadas con daño tubular. Sin embargo, en el porcentaje elegido también es posible la separación de proteínas cercanas a los 70kDa, y como la mayoría de las proteínas urinarias encontradas comúnmente poseen pesos inferiores, dicho porcentaje se consideró adecuado para los objetivos establecidos.

Los métodos utilizado en veterinaria de forma rutinaria para la detección de proteinuria, tales como las tiras colorimétricas y pruebas turbidimétricas con SSA y Ac. Tricloroacético, poseen una sensibilidad de 30mg/dl y 10mg/dl, respectivamente (Parra y Rodríguez, 1998). En un paciente sano con una función renal adecuada, se espera la ausencia de proteinuria en las pruebas mencionadas. Sin embargo, la negatividad en éstas, no implica la ausencia total de proteínas en la orina de un individuo sano. Esperando una cantidad mínima de proteína urinaria en los pacientes sanos incluidos en el estudio, se decidió realizar la tinción de los geles con nitrato de plata. El protocolo de la tinción de plata, permite la detección de bandas con una concentración de hasta 10ng de proteína (Steinberg, 2009), y su uso permitió la detección de proteínas urinarias presentes en concentraciones mínimas, sin la aplicación de técnicas adicionales para la concentración de las muestras.

La tinción antes mencionada, permitió la visualización de bandas de proteína en las muestras catalogadas libres de proteína urinaria por las pruebas convencionales, como es el caso de las muestras pertenecientes a los grupos 1 y 2. En éstas se observó un patrón constante de dos bandas, correspondientes a proteínas comúnmente encontradas en orina y consideradas de presencia normal en pacientes sanos: proteína de Tamm-Horsfall con PM entre 90-100 kDa, y albúmina con 69-70 kDa. Dentro de la proteína urinaria normal, una proporción procede de las células epiteliales de los túbulos renales, denominada de origen tisular. Una de estas proteínas es la de Tamm-Horsfall o uromucoide con actividad antiviral, secretada en pequeñas cantidades a la luz tubular, sintetizada por las células epiteliales del asa ascendente de Henle, túbulos distales y colectores (Zaragoza, 2001). Por otro lado, en el filtrado glomerular es normal la presencia de pequeñas cantidades de albúmina. Esta proteína, con carga negativa y peso molecular que se aproxima al tamaño de los poros de la barrera de filtración, y constituye la principal proteína urinaria de origen plasmático,

representando del 40 al 60% de las proteínas urinarias normales (Hurley y Vaden, 1995).

Los patrones de bandeo en los cuatro grupos, presentaron similitudes en las bandas observadas, así como en sus PM, observándose bandas de igual PM al menos en dos muestras, a excepción de 2 bandas presentes en la muestra no. 301 del grupo 4, correspondientes a 46.98 kDa y 42.1 kDa. De acuerdo al PM de las bandas observadas, es posible relacionarlas con proteínas identificadas en orina como de presencia normal o relacionadas a patologías específicas. En la siguiente tabla (Tabla 16) se muestran las proteínas que presumiblemente corresponden a las bandas identificadas y sus PM calculados.

Tabla 16. Proteínas relacionadas a las bandas observadas de acuerdo a su PM.

BANDAS OBSERVADAS (PM en KDa)	PROTEÍNAS RELACIONADAS (PM en KDa)
<b>96.88 ± 0.520</b>	Proteína de Tamm-Horsfall (90- 100)
<b>70.95 ± 0.620</b>	Albúmina (69- 70)
<b>63.92 ± 0.976</b>	Hemoglobina (65)
<b>55.49 ± 0.658</b>	Cadenas $\gamma$ de inmunoglobulinas (~ 55)
<b>46.98 (presente sólo en no. 301)</b>	Dímeros de cadenas $\lambda$ de inmunoglobulinas (~ 45)
<b>42.1 (presente sólo en no. 301)</b>	N-acetil- $\beta$ -glucosaminidasa (42)
<b>36.08 ± 0.878</b>	$\alpha$ -1 Microglobulina (35)
<b>28.50 ± 0.340</b>	---
<b>25.71 ± 0.615</b>	Cadenas $\kappa$ de inmunoglobulinas (22- 25 KDa)
<b>23.55 ± 0.057</b>	Cadenas $\kappa$ de inmunoglobulinas (22- 25 KDa)
<b>20.84 ± 0.046</b>	RBP (21)
<b>18.57 ± 0.346</b>	Mioglobina (17), Lisozima(17)

Una vez relacionados los PM con las proteínas que han sido identificadas en orina y su complementación con los hallazgos de laboratorio, se estableció como patrón de proteinuria en perros sin daño renal la presentación de dos bandas, una de aprox. 90kDa (Tamm-Horsfall) y otra cercana a los 70kDa (Albúmina), patrón presente en las muestras no. 103, no. 104, no. 202, no. 203 y no. 628. Las bandas de proteína adicionales, fueron interpretadas como anormales.

En el caso de la muestra no. 100 del grupo 1, se presentaron 6 bandas adicionales (Tabla 15) relacionadas con la presencia de hemoglobina, cadenas  $\gamma$  de inmunoglobulinas,  $\alpha$ -1 Microglobulina, cadenas  $\kappa$  de inmunoglobulinas y RBP. Esta muestra presentó este particular patrón, debido al antecedente de vacunación previo a la toma de muestras, pues el único hallazgo que se observó fue hiperglobulinemia, mostrando valores normales en los parámetros restantes (Tabla 13). Este hallazgo, se relaciona con la presencia de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas, pues la técnica utilizada implica la eliminación de las estructuras terciaria y cuaternaria de las

proteínas, y por consecuencia la separación de los monómeros que las conforman, en caso de proteínas complejas como las inmunoglobulinas. Por esta razón, el incremento de globulinas presente en la muestra no. 100, aunado a la desnaturalización por el uso de SDS, resultó en la observación de bandas correspondientes a las subunidades de las inmunoglobulinas. Por otro lado, la observación de bandas que pudieran relacionarse a la presencia de hemoglobina y mioglobina, puede considerarse normal debido al tipo de muestreo y al trauma provocado por el mismo.

Dentro del grupo 2, la muestra no. 628 mostró únicamente las dos bandas consideradas como proteinuria normal. Sin embargo, los hallazgos de laboratorio mostraron hiperproteinemia, relacionada a hiperglobulinemia, e hipoalbuminemia (Tabla 13). Esta última podría estar relacionada con la presencia de la banda cercana a los 70kDa, indicando una pérdida renal, a pesar de que el EGO se mostró sin cambios significativos. Por lo que no se descarta un daño renal mínimo debido a la quimioterapia administrada a la paciente. Por otro lado, la muestra no. 630 presentó 2 bandas adicionales a las consideradas proteinuria normal, una de ~ 63kDa y otra de ~28kDa (Tabla 15). Haciendo una relación con los resultados de laboratorio, donde se observó hipoalbuminemia, con EGO sin cambios (Tabla 13), y tomando en cuenta la quimioterapia administrada, se puede suponer pérdida urinaria de albúmina y de proteínas de bajo peso molecular, lo cual se clasifica como proteinuria tubular completa (Portillo *et al*, 1997). Cabe señalar que, aun cuando no se reportó daño renal en los análisis previos a cada quimioterapia, los resultados obtenidos en SDS-PAGE fueron comunicados a los médicos tratantes, con el fin de instaurar medidas que frenaran y buscaran la reparación del daño renal diagnosticado antes de que la paciente presentara signología.

Las muestras no. 301 y no. 302 del grupo 3, mostraron un mayor número de bandas respecto al resto de las muestras. Ambos pacientes, fueron diagnosticados con IR por las pruebas de laboratorio convencionales. La paciente no. 301 presentó anemia normocítica normocrómica, azotemia, proteinuria e hipostenuria. En el caso de la paciente no. 302, presentó anemia de las mismas características que la anterior, desviación a la izquierda, azotemia, hiperglobulinemia, hiperfosfatemia, proteinuria e isostenuria. Éstos son hallazgos comunes en IRC, condición en la que se observa disminución de todas las funciones renales, incluyendo la producción de eritropoyetina, con la consecuente anemia, disminución en la TFG, disminución en la excreción de urea y compuestos nitrogenados, incapacidad para excretar fósforo creándose una hiperfosfatemia, incapacidad para la concentración de orina resultando en hipostenuria e isostenuria, además de evidencias de inflamación como desviación a la izquierda e hiperglobulinemia (Polzin *et al.*, 2007).



El patrón de bandeo en las pacientes diagnosticadas con IRC, mostró un gran número de bandas adicionales a las consideradas como proteinuria normal. La muestra no. 301, presentó 9 bandas adicionales, con PM desde ~55 kDa hasta ~18kDa, mientras que la muestra no. 302, presentó 6 bandas adicionales con similares PM (Tabla 15), la mayoría relacionadas con proteínas de bajo PM (Tabla 16) consideradas marcadores de daño tubular, como RBP y Lizosima (Pesce y Covolo, 1982). Debido al intervalo en los PM de las bandas observadas y a los hallazgos de laboratorio, el patrón de bandeo indica proteinuria glomerular selectiva, por la presencia de albúmina, y tubular completa, por encontrar bandas <40kDa hasta los 70kDa, clasificándose como lesión glomerulotubular en ambas pacientes (Portillo *et al*, 1997). Al no observarse bandas correspondientes a proteínas de alto PM, podría sospecharse de una lesión glomerular leve con pérdida de la electronegatividad en la membrana basal.

Una vez localizada la lesión renal, se dio tratamiento a una de las pacientes, la no. 301, para disminuir la progresión del daño renal y evitar se desarrollase una lesión glomerular grave con proteinuria no selectiva, logrando mantener estable la condición de la paciente durante 1 año, tiempo durante el cual se mantuvo comunicación con los propietarios. Por otro lado, la paciente no. 302 fue sometida a eutanasia por negativa al tratamiento por parte de los propietarios.

El uso de electroforesis en SDS-PAGE en la localización del daño renal y la clasificación de la proteinuria, es de gran utilidad en el tratamiento y pronóstico de los pacientes diagnosticados insuficiencia renal, así como en aquellos con sospecha de daño renal, gracias a su gran sensibilidad del orden de nanogramos, sin la necesidad de técnicas adicionales de concentración.

Dentro de las mismas técnicas electroforéticas se encuentra la electroforesis capilar, con algunas ventajas significativas, como la rapidez en la obtención de resultados, la mínima cantidad de muestra requerida, la alta sensibilidad y la posibilidad de separar varios analitos de manera simultánea (Jenkins, 2000). En estudios recientes, la EC ha sido utilizada en la identificación de proteínas como biomarcadores, tanto en forma individual, como acoplada a otras técnicas. Esta técnica ha sido aplicada en el análisis de muestras urinarias, plasmáticas, de líquido cefalorraquídeo y demás fluidos biológicos, en busca de proteínas y péptidos como potenciales marcadores de diferentes enfermedades (Mischak y Schanstra, 2011). En 2010, Good y colaboradores, identificaron 634 péptidos en pacientes con enfermedad renal, los cuales no se observaron en pacientes sanos, gran parte de ellos correspondieron a fragmentos de colágeno. En 2008, Rossing y colaboradores, lograron identificar y validar un panel de 40 biomarcadores urinarios en pacientes diabéticos, con un 89% de sensibilidad y 91% de especificidad. La EC también ha sido propuesta para la detección temprana de IR aguda, mediante la identificación de biomarcadores. Metzger y colaboradores (2010),

analizaron muestras seriadas de pacientes en terapia intensiva, los cuales posteriormente desarrollaron IR aguda. En este estudio se identificaron 20 péptidos, productos de la degradación de albúmina, AA1 y  $\beta$ -2-microglobulina, fibrinógeno y colágeno.

En el presente estudio se logró desarrollar un método para la separación de AA1 y fibrinógeno mediante EC. La separación de una proteína de alto PM como el fibrinógeno, que ya se sospechaba estaba presente en muestras urinarias de pacientes con nefropatías, indicaría un daño severo en la estructura del glomérulo. Sin embargo, únicamente se tienen antecedentes del estudio de fibrinopéptidos o fragmentos de fibrinógeno, no existen antecedentes de su estudio de la proteína completa mediante EC. Este es de suponerse, debido a lo lábil de la proteína y a que son necesarias condiciones específicas para evitar su degradación durante el análisis. En 2005, Profumo y colaboradores, desarrollaron un método para el análisis de fibrinopéptidos humanos en ECZ, utilizando capilares de sílice con cubierta de PEG, en buffer de fosfato de sodio 20mM pH 6.2 y 20KV en polaridad inversa. Cabe señalar que los fibrinopéptidos son responsables de la elevada carga negativa de la molécula completa, la cual posee un *pI* 4.9 que ayuda a mantener separadas las moléculas de fibrinógeno en el medio plasmático.

Tomando en cuenta las características de la molécula de fibrinógeno y el único antecedente del estudio de sus fragmentos, se optó por el uso de un buffer fisiológico con pH básico, en polaridad inversa. Además de seleccionar las condiciones para el análisis, fue necesario tomar medidas precautorias para evitar la adhesión del fibrinógeno a los recipientes (utilizando sólo recipientes plásticos), su degradación por temperatura y fuerza iónica de la solución donde se disolvería (utilizando Sol. Salina 0.9% a 37°C) y por manipulación excesiva (se disolvió mediante agitación manual suave durante 2 horas). De las condiciones de análisis probadas (Tabla 9), se encontró que con buffer de Tricina 25mM pH 8 y -20KV se obtenía una señal de excelente eficiencia. En estas condiciones, la ionización negativa de la molécula, aunado al uso de polaridad inversa, se logró la migración del fibrinógeno hacia el detector en un tiempo menor a 20 min (Figura 7).

Para la elección de la fuerza iónica del buffer de corrimiento en EC, es necesario tomar en cuenta el fenómeno del flujo electrosmótico (FEO), componente efector más importante en EC. El FEO es consecuencia de aplicar un campo eléctrico a un medio líquido, el cual genera una doble capa de iones entre la solución y la pared del capilar. En pH elevado los grupos silanol de la superficie capilar son desprotonados y el FEO aumenta. En pH bajo, los grupos silanol son protonados y el FEO disminuye. Sin embargo la concentración o fuerza iónica del buffer también influye en la intensidad del FEO. La capa difusa que se forma al aplicar un campo eléctrico, contiene un exceso

de cationes solvatados y móviles que se encuentran adyacentes a la capa inmóvil adsorbida a la pared del capilar. Cuando aumenta la concentración del buffer, la capa difusa se hace más delgada y al disminuir la concentración, esta capa es de mayor espesor (Harris, 2007).

La modificación de las características del buffer de corrimiento, tiene un efecto directo sobre la intensidad del FEO. En las condiciones utilizadas para Fibrinógeno, un pH básico y una concentración relativamente alta, se produjo la ionización de la proteína y el equilibrio en la intensidad del FEO. Cabe señalar que, al hacer uso de polaridad inversa, el FEO adquirió sentido opuesto al de migración del fibrinógeno. Sin embargo, la carga neta altamente negativa que adquirió la proteína, permitió que su  $\mu ep$  (migración electroforética) superara el FEO y migrara hacia el detector.

Se realizaron corrimientos en buffer de Tricina con pH 8 en un intervalo de concentraciones desde 15mM hasta 35mM y en Tricina 25mM en un intervalo de pH 7.5 a 8.5 con el fin de identificar el comportamiento de la  $\mu ep$ . Se observó que la  $\mu ep$  se mantuvo estable entre 15mM y 30mM, aumentando de forma marcada en 35mM (Figura 8), mientras que la  $\mu ep$  se mantiene estable en el rango de pH mencionado (Figura 9). El incremento registrado en la  $\mu ep$  a 35mM es debido a la disminución en el espesor de la capa difusa de cationes y con ello, la disminución en la intensidad del FEO, lo cual se traduce en una menor resistencia a la migración del fibrinógeno que, como ya se mencionó, en polaridad inversa es contraria al sentido del FEO. La estabilidad de la  $\mu ep$  en el intervalo de pH utilizado, se atribuye a que se trata de pH básico en el cual el fibrinógeno permanece con carga neta negativa y la intensidad del FEO no se incrementa significativamente.

Por otro lado, el estudio de una proteína de menor PM como AA1, la cual fue identificada en estudios de proteómica urinaria en muestras de pacientes con IRA (Metzer *et al*, 2010), sería de utilidad en la identificación de daño tubular temprano. Por ello, en el presente estudio se buscó establecer un método para su identificación y separación mediante EC. Se tienen antecedentes del análisis de las isoformas que presenta esta proteína mediante ECZ (Chang *et al*, 2000), en donde se utilizaron capilares sin cubierta y con cubierta dinámica. La separación en dicho estudio, se realizó en buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.3, con inyección electrocinética a -10KV/60s y el corrimiento se realizó en polaridad inversa a -25KV. Estas condiciones favorecieron la ionización negativa de la proteína, debido al  $pI$  de 4.4- 4.6 (Sarkar y Wintrobe, 2011) y al pH utilizado.

Cabe señalar, que el tipo de inyección utilizada en la introducción de la muestra en EC, depende en gran medida de las características que ésta posee. La inyección puede ser hidrodinámica, usando diferencias de presión, o electrocinética, utilizando un campo

eléctrico que fuerce a la muestra a penetrar al capilar. Ésta última es de utilidad para la introducción de muestras que poseen el analito de interés en bajas concentraciones y cuando éste puede ser ionizado con facilidad (Harris, 2007), como es el caso de AA1. Por tal motivo se decidió utilizar este tipo de inyección en el análisis de AA1 estándar, además de condiciones similares a las propuestas por Chang y colaboradores, buffer Borato de Sodio 65mM pH 8.5 con inyección a -10KV durante 20s y un corrimiento a -20KV. Se cambiaron los KV para el corrimiento utilizados por Chang, con el fin de disminuir el efecto *Joule* y el tiempo de inyección para evitar la degradación de la proteína, además de utilizar capilares sin cubierta para simplificar las condiciones de análisis. Con estas condiciones se obtuvo una señal de buena eficiencia, atribuyéndose al *pI* de AA1, el cual en el pH básico utilizado, resulto en una carga neta altamente negativa que favoreció su migración hacia el detector, con un tiempo de migración menor a 6.5min (Figura 10).

Las repeticiones realizadas, mostraron un incremento en el tiempo de migración conforme se hacía más básico el pH del buffer. Esto es atribuible al incremento en la intensidad del FEO, el cual en polaridad inversa es contrario al sentido de migración de la AA1, representando un factor de resistencia. El tamaño de AA1 es menor en comparación al fibrinógeno, y como consecuencia se reduce la relación carga/masa y su migración es a menor velocidad, a diferencia del fibrinógeno el cual no se ve afectado de esta forma, debido a su gran tamaño y una relación carga/masa mayor.

## ***IX. CONCLUSIONES***

La técnica de SDS-PAGE demostró ser de gran utilidad en el análisis de proteínas y se logró el establecimiento de patrones de proteinuria en perros sanos y con enfermedad renal, realizando la detección de proteinuria y localización de la lesión, cuando las pruebas rutinarias no presentaron alteraciones. Su uso como complemento en el diagnóstico de IR, ofreció la posibilidad de detectar daño renal subclínico.

La ECZ mostró ser una técnica altamente eficiente, capaz de obtener resultados en poco tiempo y prometedora en el análisis de proteínas propuestas como marcadores de daño renal. Su utilidad real en la detección de IR, se demostrará al aplicar los métodos establecidos en el análisis de muestras clínicas.

## **X. BIBLIOGRAFÍA**

Araki, S.I., Haneda M., Koya D., Isshiki K., Kume S., Sugimoto T., Kawai H., Nishio Y., Kashiwagi A., Uzu T., Maegawa H. **2010**. Association Between Urinary Type IV Collagen Level and Deterioration of Renal Function in Type 2 Diabetic Patients Without Overt Proteinuria. *Diabetes Care*. Vol. 33; 8: 1805- 1810.

Besse-Eschmann V, Klisic J, Nief V. **2002**. Regulation of the proximal tubular sodium/proton exchanger NHE3 in rats with uromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol* Vol. 13:2199-206.

Bollag D.M., Edelstein S.J. **1994**. *Protein Methods*. WileyLiss Publications. USA. pp. 229.

Chen F.T., Liu C.M., Hsleh W.Z., Sternberg J.C. **1991**. Capillary Electrophoresis-a New Clinical Tool *Clinical Chemistry*. Vol. 37; 1: 114-19 Tipo de publicacion

Chew, D.J. **1996**. *Terapéutica con líquidos para perros y gatos*. En: *Manual clínico de pequeñas especies*. Vol. I. Editorial McGraw- Hill. Interamericana. México. pp. 73- 87.

Clemo F.S. **1998**. Urinary Enzyme Evaluation of Nephrotoxicity in the Dog. *Toxicol Pathol* Vol. 26; 1: 29- 32

Cunningham G. J. **2005**. *Fisiología veterinaria*. Tercera edición. Ed. Elsevier-Saunders. Madrid, España. Pp 430-437.

Davies M. **1996**. *Canine and Feline Geriatrics*. Blackwell Science. Massachusetts, USA. pp. 2-10; 112-118.

Dennis, R. **1999**. *Diagnóstico por imagen del tracto urinario*. En: *Manual de nefrología y urología en pequeños animales*. Editorial Saunders. Barcelona, España. pp. 161- 190.

Di Palma A.M., D'Apollò A.M., Vendemia F., Stallone G., Infante B., Gesualdo L. **2010**. Kidney biopsy in the elderly. *Journal Nephrology*. Sep-Oct;23 Suppl 15:S55-60.

Dolník V. **2006**. Capillary electrophoresis of proteins 2003–2005. *Electrophoresis*. Vol. 27: 126–141

Facio M.L., Madalena L., Bacqué M.C., Idiarte L. Pandolfo M., Angerosa M., Alejandro M., Fraind S., Bresciani P., Pizzolato M. **2010**. Seguimiento del perfil proteico urinario en el trasplante renal. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. Vol.44:4; 653-60.

Finco D., Brown S.A., Brown C.A., Crowell W.A., Cooper T.A., Barsanti J.A. **1999**. Progression of Chronic Renal Disease in the Dog J Vet Intern Med Vol. 13: 516–528.

Frandsen R. D. y Spurgeon T. L. **1995**. Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Quinta edición. Ed. Mc-Graw Hill interamericana. México, D.F. Pp. 370-372.

Fuentes A.I. **2011**. Caracterización de proteínas presentes en orina de perros con diferentes enfermedades renales, mediante electroforesis capilar. [Tesis de Maestría] Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas. División de Estudios de Posgrado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.

García P. H. **2000**. Electroforésis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. UNIV DIAG Vol. 1; 2: 31-41.

Good, D. M., Zurbig, P., Argiles, A., Bauer, H. W. **2010**. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. Mol Cell Proteomics Vol. 9;11: 2424- 2437.

Govantes J. M., Sánchez M. A. **2008**. Proteinuria. Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Nefrología Pediátrica. Asociación Española de Pediatría. [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)

Grauer, G.F. **2007** Medición, interpretación e implicaciones de la proteinuria y la albuminuria. Vet Clin Small Anim. Vol. 37: 283-295.

Harris D.C. **2007**. Análisis químico cuantitativo. 3ª ed. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 654-662.

Hurley, K.J. y Vaden, S.L. **1995**. Proteinuria in dogs and cats: A diagnostic approach. En: Bonagura, J.D. y Kirk, R.W. Eds. Kirk's current veterinary therapy XII. Small animal practice. Philadelphia: W.B. Saunders. p. 937-939.

Hutterer K. y Dolník V. **2003**. Capillary electrophoresis of proteins 2001–2003. Electrophoresis. Vol. 24: 3998–4012.

Jenkins, M.A. **2000**. Clinical aplicaciones of capillary electrophoresis. Molecular biotechnology. Vol. 15:201-209

Keller F., Lyreal S.Y., Schuppan D. **1992**. Raised concentrations of the carboxy terminal propeptide of type IV (basement membrane) procollagen (NC1) in serum and urine of patients with glomerulonephritis. *Europe Journal Clinical Investigation*. Vol. 22:175–181

Kim M.J., Frankel H.A., Tam W.K.F. **2011**. Urine Proteomics and Biomarkers in Renal Disease. *Nephron Experimental Nephrology*. Vol.119: e1–e7.

Lanz M. H. **2007** Nuevas tecnologías para la investigación de enfermedades infecciosas. Utilidad de la proteómica en la identificación de nuevos biomarcadores. *Salud Pública de México. Edición especial, XII congreso de investigación en salud pública* Vol. 49: E62-E63.

Lulich, J.P. y Osborne, C.A. **1990**. Interpretation of urine protein-creatinine ratios in dogs with glomerular and nonglomerular disorders. *The Compendium on Continuing Education*. Vol. 12: 59-73.

Macarulla J. M. **2008**. *Bioquímica*. Editorial Reverté. Barcelona, España. pp. 71-73.

Maldonado B.N. **2003**. Frecuencia de casos médico quirúrgicos en una clínica veterinaria de la ciudad de Morelia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. 30 de enero del 2003.

Medicina Molecular de FIBAO. Definición: Proteómica. PDF obtenido en el portal Medicina molecular ([www.medmol.es](http://www.medmol.es)) de FIBAO. Página: <http://www.medmol.es/glosario/75/>  
Fecha: 15-8-2011.

Metzger, J., Kirsch, T., Schiffer, E., Ulger, P., Menten E., Brand K., Weissinger E.M., Haubitz M., Mischak H., Herget-Rosenthal S. **2010**. Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of acute kidney injury. *Kidney International*. Vol 78; 1252-1262.

Mischak H. y Schanstra J.P. **2011**. CE-MS in biomarker discovery, validation, and clinical Applications. *Proteomics Clin. Appl*. Vol. 5: 9–23.

Montañés B.R., Gracia G.S., Pérez S.D., Martínez C.A., J. Bover S. **2011**. Documento de Consenso. Recomendaciones sobre la valoración de la proteinuria en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad renal crónica. *Nefrología*. Vol. 31; 3: 331-45.



Moreno C. E., Vidal D., Barajas L. I.N., Solorio R. J.L. **2007**. Factores de riesgo asociados a la insuficiencia renal en perros. Memorias del V Congreso Internacional de Epidemiología Veterinaria. Asociación Mexicana de Epidemiólogos Veterinarios A.C. Villahermosa, Tabasco.

Morgan R. V., Bright R.M., Swartout M.S. **2004**. Clínica de Pequeños Animales. 4a. ed. Elsevier Saunders. Madrid, España. pp. 508- 547.

Nadal L.I., Clerigué A. N., Del Moral A.J.M., Aznal S.E. **2008**. Proteinuria. Protocolos Diagnóstico Terapeúticos de la AEP: Nefrología Pediátrica. Asociación Española de Pediatría. [www.aeped.es/protocolos/](http://www.aeped.es/protocolos/)

Parra G. y Rodríguez B. **1998**. Estudio de las alteraciones en el examen de orina: hematuria y proteinuria. En: Sellares VL, Torres A, Hernández D, Ayus JC. Manual de nefrología clínica, diálisis y trasplante renal. Harcourt Brace de España. Madrid. pp. 1-52.

Pérez, G. **2011**. Normas de Actuación Clínica en Nefrología. Proteinuria. Servicio Andaluz de Salud. España. 17 pág.

Pesce M.A. y Covolo G.C. **1982**. Electrophoresis of Serum Protein on Cellulose Acetate. En: Selected Methods for the Small Clinical Chemistry Laboratory. Faulkner W.R., Meites S., Editorial AACC. Wasington, D.C.pp. 223-233.

Piccione G., Casella E., Giannetto C., Giudice E. **2010**. Effect of storage condition on prothrombin time, activated partial, troboplastin time and fibrinogen concentration on canine plasma samples. Journal of Veterinary Science. Vol. 11: 2; 121- 124.

Polzin J.D., Osborne A.C., Ross S. **2007**. Nefropatías crónicas. En: Tratado de Medicina Interna Veterinaria. Ettinger J.S. y Feldman C.E. Vol. II. Madrid, España.

Portillo D.J., Fernández B.M.T., Paredes S.F. **1997**. Aspectos Básicos de Bioquímica Clínica. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España. pp. 87-90.

Praga M. **2005**. Tratamiento de la glomeruloesclerosis segmentaria y focal. Nefrología Vol. 25; 6: 612-621.

Profumo A., Cardinali B., Cuniberti C., Rocco M. **2005**. Separation of human fibrinopeptides by capillary zone electrophoresis. Electrophoresis. Vol. 26; 600-609.

Revert R., Darnell T., Alcázar R.A., Bergadá E.B., Caramelo C. D., García G. J.M., Griñó B. L., Avendaño H., Pueyo J., Mirapeix V., Durán M., Purroy U., Rodicio D.J.L., Rodríguez S.J., Romero G.R., Sánchez S.L., Solé B.F., Tabernero R.J.M., Torras R.A., Torres E.V. **2011**. Nefrología. Consultado en: [www.revistanefrologia.com](http://www.revistanefrologia.com)

Reyers, F. **2003**. Renal function assessment: the strengths and weaknesses of various parameters. Proceedings 28th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Bangkok, Thailandia. Consulta en línea.

<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2003&PID=6560> [fecha de consulta: 30 de septiembre de 2008].

Robinson F. V.A. **2006**. Notas del curso: Introducción a la Electroforesis capilar. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich. p. 4-5

Rosenberg. **2005**. Protein Analysis and Purification. Benchtop Techniques. 2<sup>nd</sup> Edition. Birkhäuser. pp. 72- 73.

Rossing, K., Mischak, H., Dakna, M., Z.urbig, P. **2008**. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *Journal American Society of Nephrology*. Vol.19; 1283–1290.

Sanderson S. **2005**. Current Concepts for the Management of Chronic Renal Failure in the Dog and Cat--Early Diagnosis and Supportive Care. Proceedings 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. México. Australia. Consulta en línea. <<http://www.vin.com/Members/Proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2005&PID=pr10999&O=Generic>> [Fecha de consulta 20 de agosto del 2008].

Smets P.M.Y., Meyer E., Maddens B.E.J., Duchateau L. and Daminet S. **2010**. Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*. Vol. 24:65–72

Steinberg T.H. **2009**. Protein Gel Staining Methods: An Introduction and Overview. *Methods in Enzymology*. Elsevier. Vol. 463: 547-549.

Stockham S.L. y Scott M.A. **2008**. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology. Second Edition. Blackwell Pub. P. 908.

Stocking, C.J., Slater, J.M., Simpson, C.F. **1998**. Applications of capillary electrophoresis in nephrology. *Experimental Nephrology*. Vol. 6:415-420.

Strasinger S.K., Di Lorenzo M.S. **2010**. Análisis de orina y de los líquidos corporales. 5ª edición. Editorial médica panamericana. Argentina. pp. 145- 150.

Schultze, A.E. y Jensen, R.K. **1989**. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. Veterinary Clinical Pathology. Vol. 18: 93-97.

Trof R.J., Maggio F.D., Leemreis, J., Groeneveld A.B.J. **2006**. Biomarkers of acute renal injury and renal failure. SHOCK, Vol. 26; 3: 245- 253.

Voet D. 2006. Bioquímica. 3ª ed. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Argentina. pp. 153-156.

Wang a.Y.M. y Lai K.N. **2008**. Use of Cardiac Biomarkers in End-Stage Renal Disease. J Am Soc Nephrol. Vol. 19: 1643–1652.

Zaragoza B. C. **2001**. Estudio electroforético de la proteinuria en perros sanos y en perros con enfermedad renal. [Tesis Doctoral] Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura. Cáceres, España.

<http://www.beckmancoulter.com/literature/Bioresearch/360643-CEPrimer1.pdf>  
Introduction to Capillary Electrophoresis. Beckman Coulter, INC. [41 páginas]

<http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>  
Principales Causas de Mortalidad General. Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS). Última modificación: 27 de Octubre de 2010 a las 14:27 por la Dirección General de Información en Salud. México, D.F.

<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/130603.htm>. Fecha de consulta: 22/03/11

[http://www.kidney.org/search\\_results.cfm?q=stages%20of%20kidney%20disease](http://www.kidney.org/search_results.cfm?q=stages%20of%20kidney%20disease)  
The National Kidney Foundation. Fecha de Consulta: 2/05/11

[http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009\\_Staging\\_CKD.pdf](http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf) En: <http://www.iris-kidney.com> Fecha de consulta: 18/05/11

[http://www.asn-online.org/facts\\_and\\_statistics/](http://www.asn-online.org/facts_and_statistics/)  
Facts and Statistics: Kidney Disease Facts. American Society of Nephrology. 2009.