

ESTANDARIZACIÓN, VALIDACIÓN Y ESTABLECIMIENTO DE VALORES DE REFERENCIA EN ELECTROFORESIS CAPILAR URINARIA EN PERROS SANOS. COMPARATIVA CON ENFERMOS RENALES

AUTOR: Paula Fátima Navarro Martínez

Nº PÁGINAS: 189

RESUMEN:

Los objetivos de este trabajo son los de validar y establecer unos intervalos de referencia en orina de perros sanos mediante la técnica de electroforesis capilar e identificar posibles diferencias significativas en las diferentes fracciones de los proteinogramas urinarios de individuos sanos e individuos con enfermedad renal crónica asociada o no, a infección por *Leishmania infantum*. La electroforesis capilar es una técnica analítica de separación de solutos que se fundamenta en la diferencia de velocidad de los compuestos iónicos bajo un campo eléctrico, y es la modalidad más utilizada ya que representa una técnica simple, versátil, rápida y que requiere de poco volumen de muestra. Es por ello que cada vez se utiliza en un mayor número de áreas de investigación tales como la industria farmacéutica, análisis clínicos, biotecnología e industria alimentaria entre otras. El análisis de las proteínas séricas por electroforesis capilar es un método de laboratorio bien establecido y utilizado para el diagnóstico y seguimiento de enfermedades infecciosas, inflamatorias, inmunomediadas y neoplásicas tanto en medicina humana como en veterinaria. Respecto al uso de orina en electroforesis en medicina veterinaria, no existen muchas referencias, y entre las pocas encontradas se utilizan técnicas electroforéticas en gel. Respecto al uso de electroforesis capilar en orina, sólo hay un estudio publicado donde se analizan los péptidos encontrados en orina de pacientes caninos con enfermedad renal crónica en comparación con un grupo control mediante el uso de electroforesis capilar asociada a la espectrofotometría de masas.

En este estudio se obtuvieron muestras de orina de 151 perros, de los cuales 123 fueron perros aparentemente sanos, de tres rangos de edad diferentes (cachorros, adultos y senior), machos y hembras y en diferentes estados reproductivos (entero/a, castrado/esterilizada), desde diciembre de 2016 hasta abril de 2019. Se incluyeron en el estudio 11 muestras de perros con

enfermedad renal crónica y proteinúricos y 17 muestras de perros con enfermedad renal y proteinúricos asociada a infección por *Leishmania infantum*. El estudio se localizó en la Comunidad Valenciana y colaboraron 15 centros veterinarios. En todos los individuos se realizó exploración física básica, así como estudios laboratoriales, que incluyeron hemograma, bioquímica básica, proteinograma sérico, serología de *Leishmania infantum* y urianálisis completo. Las muestras de orina fueron obtenidas mediante micción espontánea en un recipiente estéril y congeladas a -20°C hasta el análisis electroforético. Tras concentrar y dializar las muestras de orina siguiendo las recomendaciones del fabricante se migraron 4 mL de orina para la obtención posterior de un proteinograma urinario en el analizador MiniCap Sebia que se dividió en 5 fracciones (F). Los rangos de referencia fueron obtenidos (Reference value advisor v.2.0; Microsoft) mediante métodos no paramétricos siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Americana de Patología Clínica Veterinaria (ASVCP) con un intervalo de confianza del noventa por cien (90%CI). La detección de los valores atípicos se realizó mediante inspección visual de los histogramas y métodos estadísticos. Se compararon las variables del grupo sano y los grupos de animales enfermos mediante el programa R versión 3.4.3 (R Development Core Team). El test Anderson-Darling ($p > 0,05$) fue utilizado para comprobar la hipótesis de normalidad. La comparación de las distintas fracciones del proteinograma entre grupos fue determinado utilizando el test ANOVA. La relación entre el valor del ratio proteína creatinina en orina y las distintas fracciones urinarias se estableció mediante regresión lineal. La relación entre las distintas fracciones del proteinograma sérico y urinario de individuos con patología renal se determinó mediante regresión lineal. Se obtuvieron los siguientes rangos de referencia en porcentaje para la población de perros sanos 5,5 – 56,2% para F1, 3,2 – 16,5% para F2, 3,5 – 16,2% para F3, 17,8 – 69,8% para F4 y 5,1 – 23,9% para F5. Para los rangos de referencia en valores absolutos (mg/L) se obtuvieron los siguientes resultados: 2,49-138 mg/L para F1, 0,87-36,3 mg/L para F2, 1,23-33,5 mg/L para F3, 6,68-182 mg/L para F4 Y 2,32 – 51,5 mg/L para F5. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el grupo de individuos sanos

respecto a la edad en las fracciones F2 ($p = 0,01$) y F3 ($p = 0,02$) donde se estas se encontraron disminuidas en el subgrupo de cachorros y respecto al sexo se encontraron diferencias significativas en la fracción F1 ($p = 0,03$) donde se presentó aumentada en el subgrupo hembras respecto a los machos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos estados reproductivos. La comparativa de la población de sanos frente al total de enfermos reveló diferencias estadísticamente significativas para las fracciones F2 ($p = 0,00$) y F3 ($p = 0,00$) donde se encontró elevada en la población de enfermos y para la fracción F4 ($p = 0,00$) donde se encontró disminuida en la población total de enfermos respecto a la población de sanos. La comparativa de los tres grupos de individuos entre si, reveló diferencias estadísticamente significativas en la fracción F2 ($p = 0,00$) siendo mayor en la población de enfermos renales crónicos frente a la población de sanos y de enfermos renales asociados a infección por *Leishmania infantum*, en la fracción F3 ($p = 0,00$) donde se encontró aumentada en ambas poblaciones de enfermos, en la fracción F4 ($p = 0,00$) done se encontró disminuida en la totalidad de enfermos respecto a los sanos y por último en la fracción F5 ($p = 0,00$) donde se observó un aumento significativo en los enfermos renales con afección por *Leishmania infantum* respecto a la población sana y a la población de enfermos renales crónicos. No se encontró correlación entre el valor del ratio proteína creatinina en orina y las distintas fracciones del proteinograma urinario en la totalidad de la población de animales enfermos, así como tampoco se detectó correlación entre las distintas fracciones del proteinograma sérico y urinario de los individuos enfermos evaluados.

La técnica laboratorial se validó mediante el experimento del límite de detección, realizando diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16) de una muestra de orina dializada de un paciente canino sano y mediante los experimentos de repetibilidad y reproducibilidad donde se realizaron 3 migraciones de esta misma orina dializada durante 5 días consecutivos. El control de calidad del analizador se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Los valores de referencia obtenidos concuerdan con la excreción de proteínas en orina de perros sanos estudiadas mediante otras técnicas electroforéticas, donde las fracciones F1 y F4 son las más abundantes. No obstante, no existen estudios de rangos de referencia en orina de perros sanos realizados mediante ningún método electroforético. Mediante electroforesis capilar urinaria no es posible la identificación de las diferentes proteínas contenidas en cada fracción urinaria por lo que estudios asociados a técnicas de inmunotipado y/o inmunofijación serían necesarias. Las diferencias en las distintas fracciones en animales sanos podrían asociarse en el caso del aumento de las fracciones F2 y F3 en cachorros al desarrollo de la inmunidad durante el crecimiento o a la administración de ciertos tratamientos preventivos, pero estos datos no fueron recogidos en este estudio. En el caso del aumento de la fracción F1 en el subgrupo hembras respecto a los machos, la hipótesis es que la obesidad y el género puedan afectar a la metabolómica urinaria en perros, sin embargo, la condición corporal no fue recogida en este estudio por lo que no se pudo relacionar estadísticamente. Los resultados obtenidos en las comparativas de los animales enfermos concuerdan con los estudios realizados hasta la fecha en su mayoría en técnicas electroforéticas en gel, donde se asocia a ciertas patologías renales crónicas tubulares o mixtas la excreción de diferentes proteínas, no obstante estudios con una población más grande y grupos más definidos serían necesarios.

Los resultados para la validación de la técnica reflejan una sensibilidad mediante el experimento de límite de detección de 2,1 mg/dL y una desviación estándar total para todas las fracciones (F1-F5) igual o inferior al 10%.

Esta técnica ofrece futuras líneas de investigación tales como el estudio de la orina en otras especies de mamíferos, la comparativa de perros con patología renal con el estudio de histopatología de los mismos, la realización de electroforesis capilar en pacientes con enfermedad renal aguda y por último asociar la electroforesis capilar a técnicas laboratoriales más complejas como el inmunotipado y/o inmunofijación o acoplada a espectrofotometría de

masas con el fin de obtener biomarcadores renales y determinar el tipo de proteínas contenidas en cada fracción.

Algunas de las limitaciones de este estudio han sido la falta de recogida de algunos datos como la condición corporal y tratamientos preventivos de la población de estudio que potencialmente podrían alterar la excreción de proteínas en estos animales, la incapacidad de realizar un seguimiento a largo plazo de estos pacientes y la dificultad para comparar con otros estudios ya que utilizan técnicas electroforéticas basadas en gel y un número bajo de animales, así como la limitada bibliografía del uso de esta técnica en orina tanto en medicina humana como en medicina veterinaria.

En este trabajo se puede concluir que se valida la técnica laboratorial mediante sensibilidad de detección mínima de 2,1 mg/L y de repetibilidad y reproducibilidad con una desviación estándar inferior o igual al 10%, sin embargo, no es posible la identificación de las diferentes proteínas contenidas en cada fracción urinaria. Se establecen rangos de referencia tanto en % como en valores absolutos (mg/dL) mediante electroforesis capilar en orina para la especie canina. Las fracciones F1 y F4 son las más representadas. No se detectan diferencias estadísticamente significativas entre individuos sanos respecto al estado reproductivo. La edad si es un factor significativo para F2 y F3 estando disminuida en el grupo cachorros. El sexo es un factor significativo para F1 en hembras encontrándose aumentada. Los proteinogramas de individuos enfermos presentan diferencias visuales para todas las fracciones electroforéticas. Existen diferencias estadísticamente significativas para las fracciones F2, F3 y F4 del proteinograma que podrían atribuirse a la excreción aumentada o disminuida de proteínas asociadas a procesos inflamatorios que ocurren durante la enfermedad renal. En el caso de los animales con azotemia asociada a *Leishmania infantum* existe un aumento estadísticamente significativo de la F5, que puede deberse a la glomerulonefritis provocada por el depósito de inmunocomplejos asociadas a la enfermedad parasitaria. No existe relación entre las distintas fracciones del proteinograma

urinario y el aumento del ratio proteína creatinina en orina en perros con azotemia y proteinuria.

No existe relación entre las fracciones del proteinograma sérico y urinario para un mismo individuo con enfermedad renal crónica o enfermedad renal asociada a infección por *Leishmania infantum*.