



Universidad
**Católica de
Valencia**
San Vicente Mártir

**Estandarización, Validación y Establecimiento de Valores de
Referencia en Electroforesis Capilar Urinaria en Perros Sanos.
Comparativa con Enfermos Renales**

Presentada por:

Paula Fátima Navarro Martínez

Dirigida por:

Laura Gil Vicente

Salceda Fernández-Barredo del Amo

“Lo esencial es invisible a los ojos”

Antoine de Saint-Exupéry

AGRADECIMIENTOS

A Laura, por su disponibilidad y paciencia y por confiar en mi para este proyecto. Por empezar siendo mi jefa y acabar siendo mi amiga.

A Salceda, por todos sus conocimientos y ayuda. Por esas tardes de poke, estadística y risas.

A Germán, por su paciencia infinita y por hacer que la estadística parezca sencilla.

A todos los veterinarios y centros colaboradores, por su implicación desinteresada, en especial a todo el equipo de Faunatura y CEDIVET.

Al hospital veterinario de la Universidad Católica de Valencia por permitir que este proyecto tome forma y a Maite por dejar que invada su espacio sin previo aviso.

A todos los colaboradores de cuatro patas, por ser mi motivación, sin ellos este trabajo no hubiese sido posible.

A mi familia y amigos que me han acompañado durante esta carrera de fondo, por animarme siempre a seguir. Por celebrar mis triunfos como si fuesen suyos.

A Vicente, por saber estar en los peores momentos, por su paciencia y comprensión. Por hacerme reír y no dejar que tire la toalla.

A mi querida Nesa, por acompañarme pacientemente en este camino. A Lucas y Killah por ser sin saberlo mi sitio de paz.

A los que no están conmigo, pero me vigilan desde el cielo, por ser mis ángeles de la guarda.

A mis padres, Jorge y Gemma, por dejarme ser y ayudarme a volar alto, por estar siempre ahí, no hay palabras suficientes para agradecerlos todo lo que habéis hecho por mí, os quiero mucho.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
FISIOLOGÍA RENAL	11
<i>Función glomerular y filtración glomerular.....</i>	<i>13</i>
<i>Función tubular.....</i>	<i>14</i>
EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL.....	15
<i>Evaluación de la función glomerular.....</i>	<i>15</i>
<i>Evaluación de la función tubular.....</i>	<i>29</i>
ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	34
<i>Principales causas de enfermedad renal.....</i>	<i>35</i>
<i>Clasificación de la enfermedad renal crónica.....</i>	<i>36</i>
<i>Glomerulopatía en enfermedad renal crónica</i>	<i>39</i>
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	46
<i>Electroforesis zonal.....</i>	<i>46</i>
<i>Electroforesis capilar</i>	<i>51</i>
MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
POBLACIÓN DE ESTUDIO	57
<i>Grupo perros sanos (G₀)</i>	<i>58</i>
<i>Grupo de perros con enfermedad renal crónica (G₁)</i>	<i>61</i>
<i>Grupo de perros con enfermedad renal asociada a infección por Leishmania Infantum (G₂).....</i>	<i>61</i>

MÉTODOS ANALÍTICOS	62
<i>Recolección y procesado de muestras</i>	62
<i>Hematología</i>	62
<i>Bioquímica</i>	64
<i>Serología</i>	65
<i>Proteinograma sérico</i>	67
<i>Urianálisis</i>	67
<i>Electroforesis capilar urinaria</i>	70
<i>Validación de la técnica</i>	74
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
<i>Cálculo de los intervalos de referencia (IR)</i>	77
RESULTADOS.....	79
GRUPO PERROS SANOS (G ₀)	79
<i>Anamnesis y exploración física</i>	79
<i>Hemograma</i>	79
<i>Bioquímica</i>	79
<i>Serología</i>	80
<i>Proteinograma</i>	80
<i>Urianálisis</i>	81
GRUPO ENFERMOS ENFERMOS RENALES CRÓNICOS NO ASOCIADOS A INFECCIÓN POR LEISHMANIA	
INFANTUM (G ₁)	82
<i>Población incluida</i>	82
<i>Hemograma</i>	83
<i>Bioquímica</i>	83
<i>Serología</i>	85
<i>Proteinograma</i>	85

<i>Urianálisis</i>	85
GRUPO ENFERMOS RENALES ASOCIADOS A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM (G ₂).....	88
<i>Población incluida</i>	88
<i>Hemograma</i>	89
<i>Bioquímica</i>	90
<i>Serología</i>	91
<i>Proteinograma sérico</i>	92
<i>Urianálisis</i>	92
ELECTROFORESIS CAPILAR URINARIA.....	95
<i>Separación de las fracciones urinarias</i>	95
<i>Validación de la técnica</i>	98
<i>Eliminación de valores anormales para el cálculo de los rangos de referencia en porcentaje</i>	102
<i>Eliminación valores anormales para el cálculo de rangos de referencia en valores absolutos</i>	103
<i>Rangos de referencia población perros sanos (G₀) en porcentaje</i>	104
<i>Rangos de referencia población perros sanos (G₀) en valores absolutos</i>	104
<i>Influencia de los factores intrínsecos en individuos sanos (G₀)</i>	105
<i>Comparación fracciones urinarias de individuos sanos frente a enfermos</i>	107
DISCUSIÓN	117
ESTUDIO EN EL POBLACIÓN PERROS SANOS (G ₀).....	117
<i>Alteraciones laboratoriales</i>	117
<i>Electroforesis capilar urinaria</i>	118
<i>Edad</i>	121
<i>Sexo</i>	122
<i>Estado reproductivo</i>	122
ESTUDIO EN EL POBLACIÓN PERROS ENFERMOS.....	123
<i>Comparativa población individuos sanos vs totalidad de enfermos</i>	123

<i>Comparativa de los tres grupos poblacionales</i>	124
<i>Comparativa del upc con las distintas fracciones</i>	126
<i>Comparativa proteinograma urinario y sérico</i>	127
LIMITACIONES DEL ESTUDIO	128
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	129
CONCLUSIONES	131
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. <i>PRINCIPALES CAUSAS DE ENFERMEDAD RENAL EN PERROS</i>	35
TABLA 2. <i>CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN BASE A LA CONCENTRACIÓN DE CREATININA SÉRICA</i>	36
TABLA 3. <i>CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN BASE AL RATIO PROTEÍNA CREATININA EN ORINA</i>	38
TABLA 4. <i>CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN BASE A LA MEDICIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL SISTÉMICA Y SU RELACIÓN CON EL DAÑO A ÓRGANOS DIANA</i>	38
TABLA 5. <i>ENFERMEDADES ASOCIADAS CON LA GLOMERULONEFRITIS EN PERROS</i>	40
TABLA 6. <i>TIPOS DE RESPUESTA INMUNITARIA ADQUIRIDA FRENTE AL CONTACTO CON LEISHMANIA INFANTUM</i>	42
TABLA 7. <i>DIFERENTES MANIFESTACIONES CLÍNICAS ASOCIADAS A LA INFECCIÓN Y DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD DE LEISHMANIA INFANTUM</i>	44
TABLA 8. <i>CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADIOS CLÍNICOS DE LA INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM EN BASE A LA SEROLOGÍA, SIGNOS CLÍNICOS, HALLAZGOS LABORATORIALES, TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO</i>	45
TABLA 9. <i>RANGOS DE REFERENCIA PARA LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA SÉRICO EN PERROS SANOS</i>	53
TABLA 10. <i>RELACIÓN DE ENFERMEDADES CON ASOCIADAS A LOS CAMBIOS EN LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA SÉRICO</i>	54
TABLA 11. <i>RELACIÓN CENTROS VETERINARIOS COLABORADORES EN EL ESTUDIO Y EL NÚMERO DE MUESTRAS REMITIDAS</i>	58
TABLA 12. <i>POBLACIÓN DE PERROS SANOS INCLUIDA EN EL ESTUDIO</i>	59
TABLA 13. <i>VALORES DE REFERENCIA CANINOS DE LOS DISTINTOS PARÁMETROS DEL HEMOGRAMA EN EL EQUIPO CELLTAC ALPHA VET MEK-6550</i>	63
TABLA 14. <i>VALORES DE REFERENCIA CANINOS DE LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO CON EL ANALIZADOR CS 300DIRIU</i>	65
TABLA 15. <i>CLASIFICACIÓN SEGÚN EL TÍTULO DE ANTICUERPOS OBTENIDOS MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA PROPORCIONADA POR EL LABORATORIO DE REFERENCIA</i>	66
TABLA 16. <i>VALORES DE REFERENCIA CANINOS DE LAS DIFERENTES FRACCIONES INCLUIDAS EN EL PROTEINOGRAMA SÉRICO OBTENIDAS EN EL LABORATORIO DE REFERENCIA MEDIANTE EL EQUIPO MINICAP</i>	67
TABLA 17. <i>GRADO DE CONCENTRACIÓN DE LA ORINA EN RELACIÓN A LA DENSIDAD URINARIA</i>	68
TABLA 18. <i>VALORES DE REFERENCIA DE UPC EN PERROS</i>	69

TABLA 19. RELACIÓN RESULTADOS DE UPC E INDIVIDUOS PERTENECIENTES A LOS DISTINTOS RANGOS DE EDAD.....	82
TABLA 20. RELACIÓN RESULTADOS DE UPC E INDIVIDUOS DE DIFERENTE SEXO.....	82
TABLA 21. CLASIFICACIÓN DE LOS 11 INDIVIDUOS SEGÚN EL ESTADIO IRIS.....	83
TABLA 22. NIVELES DE CREATININA Y UREA SÉRICA DE CADA UNO DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL G1	84
TABLA 23. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS ALTERACIONES DE LA TIRA COLORIMÉTRICA Y EL NÚMERO DE INDIVIDUOS QUE LAS PRESENTAN	86
TABLA 24. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ORINA Y EL NÚMERO DE INDIVIDUOS.....	86
TABLA 25. RELACIÓN DE CADA INDIVIDUO CON SU GRADO DE PROTEINURIA	87
TABLA 26. CLASIFICACIÓN DE LOS 17 INDIVIDUOS SEGÚN LA GRAVEDAD DE LA ENFERMEDAD CLASIFICACIÓN PROPUESTA POR SOLANO- GALLEGO EN 2011	88
TABLA 27. CARACTERÍSTICAS DEL HEMOGRAMA DE LOS PERROS CON ANEMIA EN EL GRUPO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM.....	89
TABLA 28. NIVELES DE CREATININA Y UREA SÉRICA DE CADA UNO DE LOS INDIVIDUOS INCLUIDOS EN EL G ₂	90
TABLA 29. RELACIÓN ENTRE TÍTULO DE ANTICUERPOS FRENTE A LEISHMANIA INFANTUM Y NÚMERO DE INDIVIDUOS.....	91
TABLA 30. RELACIÓN ENTRE LOS RESULTADOS DE LA TIRA COLORIMÉTRICA Y EL NÚMERO DE INDIVIDUOS.....	92
TABLA 31. RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE ORINA Y EL NÚMERO DE INDIVIDUOS.....	93
TABLA 32. RELACIÓN DE CADA INDIVIDUO CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM CON SU GRADO DE PROTEINURIA.....	94
TABLA 33. RESULTADOS EXPERIMENTO REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD (F1-F5) OBTENIDOS PARA EL INSTRUMENTO MINICAP EN ORINA DE PERRO	99
TABLA 34. RANGOS DE REFERENCIA (90% CI) EN PORCENTAJE PARA LAS DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS URINARIAS OBTENIDAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR UTILIZANDO MINICAP SEBIA	104
TABLA 35. RANGOS DE REFERENCIA (90% CI) EN VALORES ABSOLUTOS PARA LAS DIFERENTES FRACCIONES PROTEICAS URINARIAS OBTENIDAS MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR UTILIZANDO MINICAP SEBIA	105
TABLA 36. EFECTOS DE LA EDAD EN EL PROTEINOGRAMA OBTENIDO MEDIANTE PORCENTAJES EN ORINA DIALIZADA CANINA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EVALUADO CON ANOVA UNIDIRECCIONAL (TEST DE TUKEY POST HOC CON 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA)	106

TABLA 37. EFECTOS DEL SEXO EN EL PROTEINOGRAMA OBTENIDO MEDIANTE PORCENTAJES EN ORINA DIALIZADA CANINA MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EVALUADO CON ANOVA UNIDIRECCIONAL (TEST DE TUKEY POST HOC CON 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA)	107
TABLA 38. COMPARATIVA MEDIANTE ANOVA UNIDIRECCIONAL DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO ENTRE EL GRUPO DE PERROS SANOS FRENTE A LA TOTALIDAD DE ANIMALES CON PATOLOGÍA RENAL. (TEST DE TUKEY POST HOC CON 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA).	108
TABLA 39. COMPARATIVA MEDIANTE ANOVA UNIDIRECCIONAL DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO ENTRE EL GRUPO DE PERROS SANOS FRENTE AL GRUPO ENFERMOS RENALES CRÓNICOS Y AL GRUPO RENALES POR LEISHMANIA INFANTUM (TEST DE TUKEY POST HOC CON 95% DE INTERVALO DE CONFIANZA).....	110
TABLA 40. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (G ₁) Y UPC.	113
TABLA 41. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A LEISHMANIA INFANTUM (G ₂) Y UPC.	114
TABLA 42. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO Y SÉRICO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (G ₁).	114
TABLA 43. RELACIÓN ENTRE LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO Y SÉRICO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A LEISHMANIA INFANTUM (G ₂).	115

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LAS NEFRONAS YUXTAMEDULARES Y SUPERFICIALES Y SUS FUNCIONES.....	12
FIGURA 2. RELACIÓN ENTRE LA CREATININA SÉRICA Y LA TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR	18
FIGURA 3 . FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA DE ELECTROFORESIS EN GEL.....	46
FIGURA 4. CURVA REPRESENTATIVA DE LA MIGRACIÓN DE PROTEÍNAS SÉRICA DE UN PERRO SANO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR..	52
FIGURA 5. GRÁFICO CIRCULAR CON LAS DIFERENTES RAZAS Y EL NÚMERO DE PERROS INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	60
FIGURA 6. TUBOS DE DIALIZACIÓN.....	72
FIGURA 7. PANTALLA DE INICIO DEL PROGRAMA “PHORESIS.EXE”	73
FIGURA 8. POCILLOS DEL MINICAP CON CAPACIDAD PARA 26 MUESTRAS	73
FIGURA 9. CURVA ELECTROFORÉTICA URINARIA CANINA	73
FIGURA 10. DIAGRAMA DE CAJAS DE LAS DISTINTAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA SÉRICO EN RELACIÓN A LAS DISTINTAS EDADES ..	80
FIGURA 11. DIAGRAMA DE CAJAS DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA PARA LOS VALORES DE CREATININA Y UREA.	84
FIGURA 12. DIAGRAMA DE CAJAS DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA PARA EL RATIO PROTEÍNA/CREATININA EN ORINA	87
FIGURA 13. DIAGRAMA DE CAJAS DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A LEISHMANIA INFANTUM PARA LOS VALORES DE CREATININA Y UREA.....	90
FIGURA 14. DIAGRAMA DE CAJAS DEL TOTAL DE LA POBLACIÓN DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A LEISHMANIA INFANTUM PARA EL RATIO PROTEÍNA/CREATININA EN ORINA	94
FIGURA 15. SUERO CANINO DILUIDO 1:49 MIGRADO EN EL MINICAP EN EL MODO ORINA UTILIZADO COMO CONTROL.....	96
FIGURA 16. SUPERPOSICIÓN SUERO CANINO DILUIDO 1:49 CON CURVA DE INDIVIDUO SANO (G ₀).	96
FIGURA 17. SUPERPOSICIÓN SUERO CANINO DILUIDO 1:49 CON CURVA DE INDIVIDUO ENFERMO RENAL CRÓNICO (G ₁).....	97
FIGURA 18. SUPERPOSICIÓN SUERO CANINO DILUIDO 1:49 CON CURVA DE INDIVIDUO ENFERMO RENAL POR LEISHMANIA INFANTUM (G ₂)	97
FIGURA 19. DETECCIÓN MÍNIMA PROTEÍNAS DILUCIÓN 1:8 (2,1 MG/L).....	98
FIGURA 20. CURVAS OBTENIDAS EN EL EXPERIMENTO DE REPETIBILIDAD	101

FIGURA 21. HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES (1-5) EN PORCENTAJES MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN ORINA DIALIZADA DE 123 PERROS SANOS.....	102
FIGURA 22. HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LAS DISTINTAS FRACCIONES (1-5) EN VALOR ABSOLUTO (MG/L) MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR EN ORINA DIALIZADA DE 110 PERROS SANOS	103
FIGURA 23. GRÁFICO DE MEDIAS PARA CADA UNA DE LAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO COMPARANDO EL GRUPO DE ANIMALES SANOS CON LA TOTALIDAD DE ANIMALES ENFERMOS.....	109
FIGURA 24. GRÁFICO DE MEDIAS PARA CADA UNA DE LAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA URINARIO COMPARANDO LOS TRES GRUPOS DE ESTUDIO.	112

ANEXOS

ANEXO 1. Reference intervals for electrophoretograms obtained by capillary electrophoresis of dialyzed urine from healthy dogs.....159

ABREVIATURAS

ACVIM: American College of Veterinary Internal Medicine.

CE-MS: Espectrofotometría de masas.

EAR: Electroforesis de alta resolución.

EC: Electroforesis capilar.

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.

ERC: enfermedad renal crónica.

F: Fracción.

FAL: Fosfatasa alcalina.

GGT: Gamma-glutamyl-transpeptidasa.

IFI: Inmunofluorescencia indirecta.

IR: Intervalo de referencia.

IRIS: International Renal Interest Society.

Lcan: Leishmaniasis canina.

LV: Leishmaniasis visceral.

MA: Microalbuminuria.

NAG: N-acetil-B-D-glucosaminidasa.

NGAL: Lipocalina-gelatinasa neutrofílica urinaria.

PCr: Proteína C reactiva.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PM: Peso molecular.

PTH: Proteína de Tamm-Horsfall.

PTR: Proteína transportadora de retinol.

SDMA: Dimetilarginina simétrica.

SDS-AGE: Electroforesis en gel de agarosa.

SDS-PAGE: Electroforesis en sodiododecilsulfato gel de poliacrilamida.

SSA: Ácido sulfosalicílico.

TFG: Tasa filtración glomerular.

UPC: Ratio proteína/creatinina en orina.

RESUMEN

Los objetivos de este trabajo son los de establecer unos intervalos de referencia en orina de perros sanos mediante electroforesis capilar e identificar posibles diferencias significativas en las diferentes fracciones de los proteinogramas urinarios de individuos sanos e individuos con enfermedad renal asociada o no, a infección por *Leishmania infantum*. Se obtuvieron muestras de orina de 123 perros sanos, de tres rangos de edad diferentes, desde diciembre de 2016 hasta abril de 2019. Tras concentrar y dializar las muestras de orina 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 con un intervalo de confianza del noventa por cien (90%CI). 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 UPC 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 ($p = 0,02$) y respecto al sexo en la fracción F1 ($p = 0,03$). La comparativa de la población de sanos frente al total de enfermos reveló

diferencias estadísticamente significativas para las fracciones F2 ($p = 0,00$), F3 ($p = 0,00$) y F4 ($p = 0,00$). La comparativa de los tres grupos de individuos entre si, reveló diferencias estadísticamente significativas en la F2 ($p = 0,00$), F3 ($p = 0,00$), F4 ($p = 0,00$) y F5 ($p = 0,00$). No se encontró correlación entre el valor del UPC 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. Los valores de referencia obtenidos concuerdan con la excreción de proteínas en orina de perros sanos estudiadas mediante otras técnicas electroforéticas, no obstante, no existen estudios de rangos de referencia en orina de perros realizados mediante ningún método electroforético. Las diferencias en las distintas fracciones tanto en animales sanos como en animales enfermos concuerdan con los estudios realizados hasta la fecha donde se asocia a ciertas patologías a la excreción de diferentes proteínas, no obstante estudios con una población más grande y grupos más definidos serían necesarios. 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 de interés.

ABSTRACT

The aim of this study is to establish reference intervals for the urine protein fractions obtained by capillary electrophoresis from healthy dogs, to identify possible significant factors between the different fractions of the healthy urinary proteinogram and pathological urine from dogs with azotemia and proteinuria associated with chronic kidney disease or infection caused by *Leishmania infantum*. Urine samples from 123 healthy dogs of different ages were collected between December 2016 and April 2019. Four mL of urine were migrated by the MiniCap Sebia analyzer after concentration and dialysis to obtain an electrophoretic pattern that was divided into 5 protein fractions (F). Reference intervals were obtained (Reference value advisor v.2.0; Microsoft) through the nonparametric method with a ninety per cent interval confidence (90% IC). Statistical analysis to compare the different subgroups and differences between healthy and pathological samples was performed (R v.3.4.3; <https://www.r-project.org/>). The Anderson–Darling test was used to test the hypothesis of normality. The ANOVA test was used to establish if the different subgroups influenced the electrophoretic fractions. Linear regression was used to determine if the UPC value was significant for any of the five fractions of the proteinogram. Linear regression was also used to determine if the relation between serum and urine electrophoretogram fractions of each dog with renal disease was significant. Reference intervals in percentages were obtained for the different fractions as follows: 5.5–56.1% for F1, 3.2–16.5% for F2, 3.5–16.2% for F3, 17.8–69.8% for F4, and 5.1–23.9% for F5. Reference intervals in absolute values (mg/L) were obtained for the fractions, with the following values: 2.49–138 mg/L for F1, 0.87–36.3 mg/L for F2, 1.23–33.5 mg/L for F3, 6.68–182 mg/L for F4, and 2.32– 51.5 mg/L for F5. Significant differences were found in the healthy population regarding age for F2 ($p = 0.01$) and F3 ($p = 0.02$) and F1 ($p = 0.03$) for sex. Comparative between healthy and sick population was statistically significant for fractions F2 ($p = 0.00$), F3 ($p = 0.00$) and F4 ($p = 0.00$). Comparative between the three main groups was statistically significant for F2 ($p = 0.00$), F3 ($p = 0.00$), F4 ($p = 0.00$) and F5 ($p = 0.00$). No correlation was found between the UPC value and any of the five fractions

of the proteinogram in urine, as well as no correlation was found between serum and urine electrophoretogram fractions of each dog with renal disease. Reference intervals obtained agree with the excretion of proteins in urine from healthy dogs studied by other electrophoretic techniques, nevertheless there are no published studies about RIs in urine from healthy dogs with electrophoretic techniques. Differences between healthy dogs and dogs with renal pathologies are consistent with the studies carried out to date, where the excretion of some proteins is related to certain pathologies, however, studies with a larger population and more defined groups would be necessary. Urinary capillary electrophoresis does not allow the identification of the proteins contained in each fraction, so studies associated with immunotyping and/or immunofixation would be necessary.

INTRODUCCIÓN

La técnica laboratorial de electroforesis se describe en términos generales como la migración de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. Constituye una técnica de separación basada en diferentes velocidades de un conjunto de solutos, que pueden ser de distinta naturaleza, sometidos a la acción del campo eléctrico. Existen diferentes técnicas de electroforesis como cromatografía electrocinética, isoelectroenfoque, isotacoforesis, electroforesis capilar en gel o electroforesis capilar en zona (Osatinsky, 2007). Los usos prácticos de esta técnica son múltiples: análisis de ADN, proteínas, síntesis de antibióticos e incluso análisis de vacunas (Doroteo, 2012; Voeten et al., 2018).

A pesar de que la electroforesis convencional fue descrita por primera vez en 1937 el empleo de capilares no llegó hasta los años 60, y no fue hasta principios de los 90 que apareció el primer aparato comercial de electroforesis capilar (Gay-Bellile et al., 2003; Tothova et al., 2016). La electroforesis capilar (EC) es una técnica analítica de separación 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 (Jenkins y Guerin, 1996; Osatinsky, 2007).

La EC es una técnica bien implantada en laboratorios de medicina humana desde hace al menos dos décadas. Esta técnica se ha usado principalmente en muestras de suero, aunque en menor proporción también se ha utilizado para identificación de paraproteínas por inmunofijación, electroforesis de orina y diagnóstico de hemoglobinopatías (Jenkins, 1997; Voeten et al., 2018). El análisis de proteína sérica 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 (Bossuyt et al., 1998; Counotte, 2010; Jenkins, 2009; Jenkins y Guerin, 1996).

Recientemente en medicina humana, el análisis de la orina por EC ha sido probado como una buena técnica para identificar expresiones de distintas proteínas en distintas patologías y que como consecuencia dan lugar a biomarcadores renales en muestras sanas y patológicas (Jellum et al., 1996; Jenkins, 1997; le Bricon et al., 1998; Theodorescu et al., 2005). La técnica ha mostrado un elevado potencial para separar e identificar proteínas tanto en muestras normales como en patológicas, ya que el uso de orina presenta grandes ventajas frente al uso de otros fluidos corporales ya que se puede obtener en grandes cantidades, no requiere de personal cualificado para su recolección, y las proteínas urinarias se mantienen estables durante 3 días almacenada a 4°C, o congelada a -20°C durante un año (Mischak et al., 2010; Théron et al., 2017).

Respecto al uso de orina en electroforesis en medicina veterinaria, no existen muchas referencias, y entre las pocas encontradas se encuentra un estudio donde se evaluó la proteinuria mediante el uso electroforesis en gel de agarosa en comparación con los resultados de la histología renal en perros (Zini et al., 2004). En base a los animales analizados, el estudio concluyó que la electroforesis presenta una gran sensibilidad para identificar el daño glomerular y tubulointersticial, pero una baja especificidad para diferenciar entre ambas lesiones. Con lo que la técnica se presenta como útil en el diagnóstico para perros con enfermedad tubulointersticial avanzada pero no para diferenciar entre desordenes glomerulares. Siguiendo estas líneas, otro estudio confirmó las diferencias de patrón obtenidas mediante electroforesis en gel de agarosa entre perros sanos y perros enfermos de *Leishmania infantum* (Zaragoza et al., 2003). Posteriormente, se publicó un estudio realizado mediante electroforesis en gel de agarosa con el fin de evaluar cuantitativamente la proteinuria en perros (Giori et al., 2011). Respecto al uso de EC en orina, sólo hay un estudio publicado donde se analizan los péptidos encontrados en orina de pacientes caninos con

enfermedad renal crónica mediante el uso de electroforesis capilar asociada a la espectrofotometría de masas (Pelander et al., 2019).

Esta tesis doctoral se centra en primer lugar en el estudio de la orina mediante la técnica de EC en individuos sanos con el fin de establecer valores de referencia fisiológicos. La segunda parte del estudio conlleva el análisis de muestras patológicas para la posterior comparación entre ambos grupos.

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es:

1- Estandarizar y validar la técnica de electroforesis capilar urinaria en perros como parte del diagnóstico y seguimiento de patologías renales en esta especie.

Como objetivos parciales se han planteado:

2- Determinar los valores de referencia biológicos de perros libres de enfermedad renal y clínicamente sanos, incluyendo individuos situados en diferentes rangos de edad (menores de un año, entre 1 año y 8 años y mayores de 8 años), de diferente sexo (machos o hembras) y en diferentes estados reproductivos (entero/castrado o entera/esterilizada).

3- Determinar si existen diferencias significativas en la población de perros sanos entre los diferentes rangos de edad, machos y hembras y los diferentes estados reproductivos.

4- Comparar los proteinogramas urinarios de 3 poblaciones distintas: perros sanos y libres de enfermedad renal, perros con enfermedad renal no asociada a causas infecciosas/parasitarias y perros con enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum*.

5- Comparar el ratio proteína/creatinina en orina con los proteinogramas de perros con enfermedad renal no asociada a causas infecciosas/parasitarias y enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum*.

6- Comparar las distintas fracciones del proteinograma sérico y urinario de los individuos con enfermedad renal no asociada a causas infecciosas/parasitarias y enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum*.

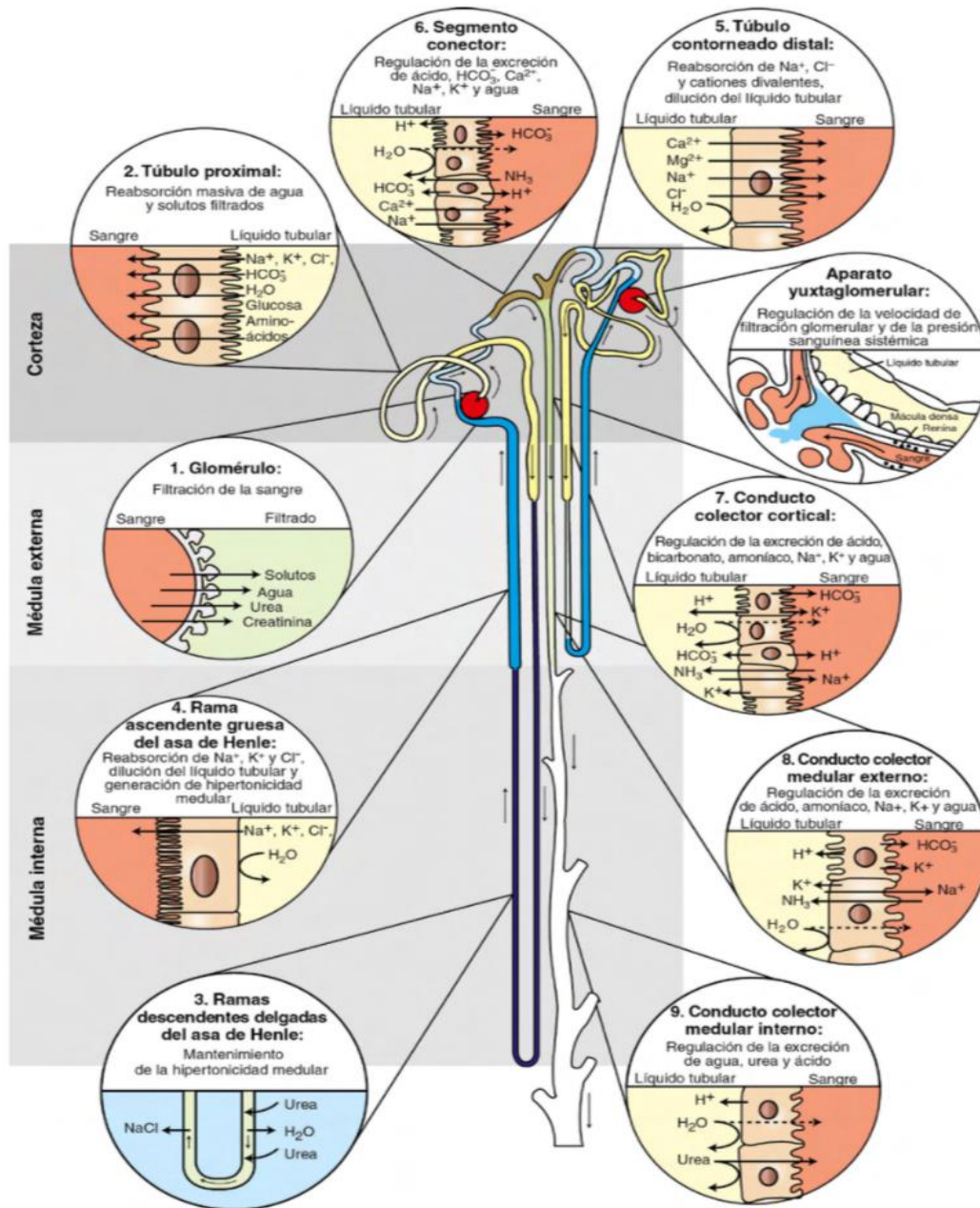
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

FISIOLOGÍA RENAL

La función principal de los riñones es la de mantener el volumen y la composición de los líquidos extracelulares. Los riñones reciben aproximadamente el 20-25% del gasto cardiaco. Filtran la sangre y excretan los productos de desecho a través de la orina además de recuperar los productos necesarios para el funcionamiento del organismo incluyendo proteínas de bajo peso molecular, electrolitos, glucosa y agua. Los riñones participan también en la síntesis de hormonas que están implicadas en la regulación de la presión arterial sistémica, en la producción de glóbulos rojos y en la homeostasis del calcio (Verlander, 2014a).

La unidad funcional de riñón es la nefrona, las cuales se pueden clasificar en superficiales o yuxtamedulares en función de su penetración en la corteza renal. Cada nefrona a su vez, está compuesta por el glomérulo encargado de filtrar el plasma sanguíneo y un túbulo renal que se encarga de la reabsorción de sustancias (Riordan y Schaer, 2005; Verlander, 2014a) (Figura 1).

Figura 1. Representación Esquemática de las Nefronas Yuxtamedulares y Superficiales y sus Funciones



Nota. Reproducida de Cunningham Fisiología Veterinaria (p. 461), por Klein B.G, 2014, Elsevier.

FUNCIÓN GLOMERULAR Y FILTRACIÓN GLOMERULAR

En el glomérulo es donde se lleva a cabo la filtración de la sangre con el fin de eliminar las sustancias tóxicas del organismo. El ovillo glomerular actúa como una barrera de capilares íntimamente ligados a la cápsula de Bowman, el área existente entre esta y la barrera de capilares se denomina espacio de Bowman y es el lugar donde se forma el filtrado glomerular. La barrera de filtración glomerular está compuesta por tres capas: el endotelio vascular, la membrana basal y el epitelio vascular. La función normal de esta barrera depende tanto de la estructura de cada componente como del estado hemodinámico de los mismo (Verlander, 2014a). La barrera glomerular posee permeabilidad selectiva, retiene componentes celulares en función de la carga eléctrica, radio molecular y el peso molecular, así pues, las moléculas superiores a 4,2 nanómetros (nm) casi no se filtran con la orina y las inferiores a 2 nm se filtran sin restricciones, de la misma manera las moléculas con cargas positivas o catiónicas, se filtran con mayor rapidez que las formas neutras o aniónicas, por último, también interfieren la forma y capacidad de deformación de las moléculas (Arrizabalaga, 2005; D'Amico y Bazzi, 2003). Como resultado de estos procesos de selección se expulsa un ultrafiltrado con agua y electrolitos de composición casi idéntico al plasma, pero sin proteínas (Verlander, 2014a). Este líquido es lo que se conoce como filtrado glomerular y está directamente relacionado con la presión hidrostática y oncótica, así como la del propio ultrafiltrado ya presente en el espacio de Bowman, el cual está regulado por factores intrínsecos y extrínsecos (Littman, 2011; Verlander, 2014a; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011).

La Tasa de Filtración Glomerular (TFG) hace referencia a la suma del filtrado de ambos riñones y de cada una de las nefronas y es el mejor parámetro para medir la funcionalidad renal en la práctica clínica ya que está directamente relacionado con el número de nefronas funcionales. La TFG está controlada por un sistema renal de autorregulación cuya principal función es la de mantener la TFG constante frente a situaciones de bajo flujo sanguíneo, hipovolemia o descensos en la presión arterial además de mantener

la excreción renal de solutos y agua (Littman, 2011; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011). La TFG se expresa en mililitros de filtrado glomerular por minuto por kg de peso corporal (mL/min/kg) (Bexfield et al., 2008; Brown et al., 2015; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011).

FUNCIÓN TUBULAR

La estructura tubular de la nefrona se compone de túbulo proximal, asa de Henle, túbulo distal y túbulo colector, y su principal función es la de reabsorción y secreción. El ultrafiltrado glomerular se transporta a través de esta estructura para finalmente desembocar en los cálices renales convertido ya en orina. Es muy importante que la mayoría de ultrafiltrado se reabsorba en el resto de la nefrona ya que sino se perderían con la orina gran cantidad de solutos como sodio, cloruros, potasio, bicarbonato y glucosa, que habría que reponer diariamente de manera externa si se excretasen (Littman, 2011; Verlander, 2014a).

En el túbulo proximal se reabsorben la mayoría de solutos mediante cuatro formas de transporte diferentes: difusión pasiva, arrastre de solvente y transporte activo primario y secundario. El túbulo proximal cuenta también con función excretora de iones orgánicos, siendo capaz de eliminar de la sangre sustancias tóxicas endógenas o exógenas a través de procesos mediados por transportadores. El túbulo distal se encarga de la reabsorción de sales y de la dilución del fluido tubular. El conducto colector reabsorbe cloruro sódico y puede reabsorber o excretar potasio (DiBartola, 2012; Riordan y Schaer, 2005; Verlander, 2014b).

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN GLOMERULAR

TASA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR (TFG)

La determinación del total de la TFG mediante métodos laboratoriales se basa en el concepto de aclaramiento. El aclaramiento se define como el volumen de fluido limpio de una determinada sustancia que se obtiene en un intervalo de tiempo y se mide en mL/min. El aclaramiento se obtiene tras la administración exógena de marcadores vía intravenoso y puede determinarse vía plasmática donde se suman todas las vías de aclaramiento o vía urinaria donde se determina el volumen de plasma limpio de marcador que pasa a través del riñón y acaba en orina (Bexfield et al., 2008; Finco, 2005; Kampa et al., 2002).

El marcador ideal debe cumplir las siguientes características (Brown et al., 1996; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011):

- Excretarse solo a través del riñón, libremente filtrado a través de las membranas capilares glomerulares.
- No debe absorberse o secretarse en los túbulos renales.
- No debe unirse a proteínas plasmáticas.
- No debe interferir con el proceso de ultrafiltrado.
- No debe ser tóxico.
- Debe ser fácilmente medible en los líquidos celulares con cierta precisión.

MÉTODOS DIRECTOS

- **TFG mediante aclaramiento urinario:**

La inulina es un polímero de la fructosa eliminado del plasma exclusivamente por filtración glomerular, no se reabsorbe o metaboliza en los riñones y no interfiere en la TFG, por ello es el marcador más utilizado para este tipo de estudio. El procedimiento consiste en administrar de manera continua inulina vía intravenosa y recoger la orina producida durante 24 horas que resultan en la siguiente ecuación (Finco, 2005; Heiene et al., 2010):

$$\text{Aclaramiento} = \frac{\text{producción orina} \times \text{concentración inulina en orina}}{\text{concentración inulina en plasma}}$$

Pese a cumplir la inulina los requerimientos de un marcador ideal, la técnica es poco útil a efectos prácticos, ya que requiere de la cateterización y sedación del paciente para la medición de orina durante 24 horas, que además de las desventajas que puede presentar para el paciente, también puede alterar la TFG debido al requerimiento de sedación o anestesia para la colocación del catéter urinario (Linnetz y Graves, 2010).

- **TFG mediante aclaramiento plasmático:**

Iohexol es un contraste iodado no iónico, estéril, estable en plasma, y más asequible que la inulina (Heine y Lefebvre, 2007). Este compuesto se excreta sin cambios a través de la orina con una vida media de 74 min (von Hendy-Wilson y Pressler, 2011). Las reacciones adversas tras su administración son poco frecuentes incluso en pacientes con la función renal comprometida (Nossen et al., 1995). Tras el estudio de varios protocolos se determinó que la toma de tres muestras de plasma a las 2, 3 y 4 horas tras la inyección de iohexol, era suficiente para determinar la TFG en perros sanos (Bexfield et al., 2008), así como la toma de dos únicas muestras a los 5 y 120 min tras la inyección del marcador con un margen de error razonable (Goy-Thollot et al., 2006; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011). Como inconveniente cabe

destacar que la TFG puede variar entre animales, ya sea enfermos o en diferentes estadios de la enfermedad renal, debido a que los protocolos pueden ser dispares entre investigadores (Linnetz y Graves, 2010). La edad y el peso son factores que deben tenerse en cuenta sobre todo en perros de tamaño pequeño (Bexfield et al., 2008).

La creatinina administrada de manera exógena cumple la mayoría de características para ser un marcador ideal. Aunque su uso pueda parecer controvertido es seguro y bien tolerado. Siendo un componente de la azotemia su administración no contribuye a la uremia y no se ha registrado efectos adversos relacionados con su uso en perros sanos o con la función renal alterada. No existe en la actualidad creatinina comercializada para su uso inyectable, aunque se puede usar creatinina sintética (Linnetz y Graves, 2010; von Hendy-Wilson y Pressler, 2011; Watson et al., 2002).

Pese a que varias técnicas con diferentes marcadores han sido validadas para la medición de la TFG, su uso es poco frecuente ya que puede resultar más caro que otros métodos indirectos y una técnica más compleja, ya que se requieren múltiples extracciones sanguíneas o medición y recolección de orina durante 24 horas. Además, no se puede establecer un rango de referencia universal ya que la TFG puede verse influenciada por numerosos factores externos como la raza, el sexo, la edad, proteína en la dieta, estado de hidratación, balance de sodio y el ciclo circadiano (von Hendy-Wilson y Pressler, 2011).

MÉTODOS INDIRECTOS

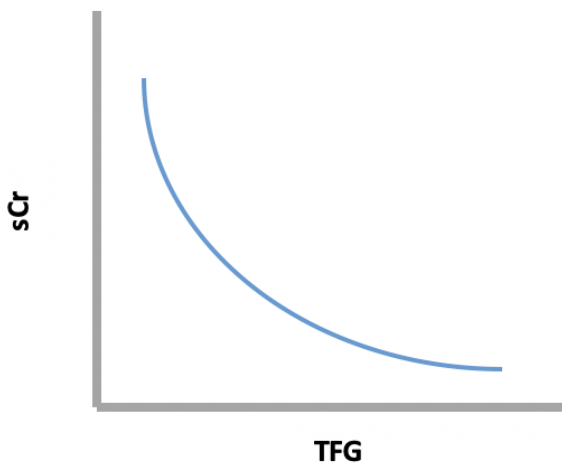
- **Marcadores séricos**

- *Creatinina:*

La creatinina es un producto endógeno procedente del catabolismo muscular. Es una molécula pequeña, 113 Daltons (Da), que se filtra libremente a través del glomérulo, no se absorbe en los túbulos renales y es mínimamente secretada por estos. Aunque clínicamente se considera este parámetro como

el indicador indirecto más fiable para la evaluación de la TFG, se correlacionan inversamente representado una hipérbola (Cobrin et al., 2013; Hokamp y Nabity, 2016), es decir una gran reducción en uno de los parámetros supone un cambio pequeño en el otro (Figura 2), por este motivo la creatinina no es un buen marcador para identificar la enfermedad renal en estadios tempranos ya que aumenta cuando al menos hay un 75% de pérdida de la masa renal que se corresponde con una pérdida de aproximadamente el 50-60% de la funcionalidad renal (Braun et al., 2003; Hokamp y Nabity, 2016)

Figura 2. Relación Entre la Creatinina Sérica y la Tasa de Filtración glomerular



Nota. sCr= Creatinina sérica. TFG= Tasa de filtración glomerular. Adaptado de Creatinine in the Dog: a review (p.167), por Braun J. et al. 2003. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(4).

Inicialmente descensos graves en la TFG no implican grandes cambios en la concentración de creatinina, mientras que en los individuos que ya presentan un descenso notable de la TFG, pequeños cambios se traducen en grandes aumentos de la concentración de creatinina (Braun et al., 2003).

Hay algunos factores extrarrenales que contribuyen al aumento sérico/plasmático de esta molécula. La creatinina aumenta tras la ingestión de carne, su concentración tiende a ser ligeramente más elevada en perros de razas grandes y en animales muy musculados (Craig et al., 2006). En individuos

jóvenes (<1 año) las concentraciones de creatinina son más bajas, su aumento es progresivo durante el crecimiento y se mantiene estable hasta los 8-9 años donde vuelve a decrecer. Situaciones de deshidratación superiores al 5% también pueden incrementar la concentración de creatinina. Algunos fármacos pueden influir en su concentración, haciendo que aumente como en el caso de la administración de aminoglucósidos o algunos inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina o provocando su disminución como cuando se administran glucocorticoides (Braun et al., 2003; Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012). También se ha visto que la concentración puede ser mayor (0,05-0,1 mg/dL) en suero que en plasma (Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012; Thoresen et al., 1992) e incluso también existe variabilidad individual respecto a muestras tomadas de la vena yugular o la cefálica. Dada la variabilidad de esta molécula entre los diferentes individuos de una misma especie, la sensibilidad de este parámetro podría aumentar realizando mediciones seriadas a un mismo individuo y evaluando los cambios dentro de su propio rango de mediciones (Braun et al., 2003).

- *Urea:*

La urea se sintetiza en el hígado a partir del amoníaco derivado del catabolismo de aminoácidos procedentes de proteínas endógenas y exógenas (Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012).

La urea se excreta casi exclusivamente a través de los riñones, pese a que las bacterias intestinales degraden la urea en amoníaco en cantidades relativamente importantes, este se recicla en el hígado donde es nuevamente convertido en urea. Tiene un peso de 60 Da, es filtrada libremente en el glomérulo y reabsorbida por los túbulos, aumentando o disminuyendo su reabsorción en función del flujo de orina. De esta manera en circunstancias en las que hay un descenso del volumen intravascular, o un bajo flujo tubular urinario y aumento de la hormona antidiurética, la reabsorción de urea es mayor, por tanto, no es un buen marcador directo para estimar la TFG (Ferguson y Waikar, 2012; Israni y Kasiske, 2012).

El incremento de urea puede verse afectado también por circunstancias extrarrenales como la deshidratación, sangrado de origen gastrointestinal, ingesta de dietas híper proteicas, algunos fármacos y situaciones en las que aumente el catabolismo proteico como individuos con fiebre o infecciones. En el lado opuesto, afecciones del hígado como la insuficiencia hepática severa, el shunt portosistémico o dietas muy pobres en proteínas también pueden llegar a provocar disminuciones en su concentración (Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012; Prause y Grauer, 1998).

- *Dimetilarginina simétrica:*

La dimetilarginina simétrica (SDMA) es un aminoácido metilizado, con un peso molecular de 202 Da. Se elimina casi completamente en los riñones por filtración glomerular y no parece existir reabsorción tubular para su reutilización. El SDMA presenta la ventaja de no verse influenciado por variables externas como pueden ser la dieta, masa muscular o procesos inflamatorios, además de ser estable en suero o plasma durante al menos 7 días a temperatura ambiente y 14 días a 4 °C (Hokamp y Nability, 2016; Nability et al., 2015). Estudios recientes en veterinaria demuestran que otras variables externas tales como el sexo, edad, variaciones diurnas, síndrome de la bata blanca, o administración a corto plazo de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina tampoco influyen en su concentración sérica (Hokamp y Nability, 2016; Moesgaard et al., 2007).

En estudios realizados en medicina humana, el SDMA ha demostrado ser un potente biomarcador sérico renal con una alta correlación con la TFG, basándose en el aclaramiento mediante inulina, por encima de la creatinina, pero al mismo nivel que la cistatina C (El-Khoury et al., 2016; Kielstein et al., 2006)

En medicina veterinaria la determinación de SDMA ha demostrado tener una buena correlación con la TFG, incrementado antes que la creatinina sérica (Hall et al., 2016; Nability et al., 2015). Además de ser útil tanto en la identificación de perros con enfermedad renal crónica como aguda, pero no para diferenciar entre ambas condiciones (Dahlem et al., 2017).

- **Marcadores urinarios**

En los últimos años se ha producido un aumento del estudio de diferentes marcadores urinarios. Como ventaja, estos marcadores pueden indicar daño en la funcionalidad renal antes que marcadores séricos como la creatinina, y además pueden localizar el origen de la lesión como renal, glomerular o tubular. Algunos de estos marcadores incluso sufren variaciones según el fallo renal sea agudo o crónico. Estos marcadores son proteínas de diferentes pesos moleculares que pueden aumentar o disminuir según la lesión renal que presente el individuo (Kovarikova, 2015).

- *Proteinuria:*

El concepto de proteinuria se define como la existencia de proteínas en la orina. En animales sanos es normal encontrar pequeñas cantidades de proteínas de bajo peso molecular en la orina que se filtran a través de la barrera glomerular y que se reabsorben a través del túbulo proximal, alteraciones en la permeabilidad glomerular dan lugar a un aumento de las proteínas en orina debido a procesos patológicos. En condiciones normales las proteínas séricas son bloqueadas según su carga y tamaño por el glomérulo (Harley y Langston, 2012).

La proteinuria persistente en ausencia de enfermedad de tracto urinario inferior o reproductivo, puede contribuir al desarrollo de fenómenos tales como hipoalbuminemia, hipertensión arterial sistémica, alteraciones en los factores de coagulación, alteraciones de la inmunidad celular, cambios en el peso y masa muscular, así como desarrollo de hipercolesterolemia (Cortadellas y Fernández del Palacio, 2012). Además de esto, estudios realizados en animales de laboratorio y seres humanos han visto que el aumento sostenido en el tiempo de la concentración de proteínas en la orina puede causar daño glomerular y tubular resultando en una pérdida progresiva de nefronas (Grauer, 2011; Jerums et al., 1998). La presencia de proteinuria en animales con enfermedad renal crónica se asocia con un peor pronóstico y, por tanto, con un mayor índice de mortalidad (Jacob et al., 2005).

Según su origen, y de acuerdo con el consenso del Colegio Americano de Veterinarios especializados en Medicina Interna (ACVIM), la proteinuria puede clasificarse como prerrenal, renal y postrenal y a su vez la proteinuria renal puede clasificarse como fisiológica o patológica y la proteinuria postrenal puede englobar causas no-urinarias o urinarias (Lees et al., 2005)

Proteinuria prerrenal

La proteinuria prerrenal se produce cuando existe una cantidad anormal de proteínas en el torrente sanguíneo y pasan a la orina a través de la barrera de filtración glomerular de un riñón sano. Se asocia a patologías no localizadas en el tracto urinario. Este tipo de proteinuria está generalmente causada por (Bartges, 2012; Lees et al., 2005):

- Aumento de proteínas libres en plasma como la hemoglobina o mioglobina.
- Presencia de inmunoglobulinas de cadena ligera como las proteínas de Bence-Jones asociadas a procesos tumorales como el mieloma múltiple.
- Hemólisis intravascular.
- Daño muscular grave con pérdida masiva de mioglobina.

Proteinuria renal

La proteinuria renal se produce cuando hay un daño estructural o funcional en los riñones en ausencia de un sedimento urinario activo. Puede ser fisiológica cuando existe una respuesta por parte de los riñones a acontecimientos transitorios tales como fiebre, calor extremo, ejercicio intenso, convulsiones, congestión venosa o estrés. La proteinuria renal suele ser reversible, transitoria y moderada y existe una pérdida mayoritariamente de albúmina (DiBartola, 2012; Harley y Langston, 2012; Lees et al., 2005).

En caso de proteinuria patológica esta se puede clasificar según el origen de la lesión (Lees et al., 2005):

- Glomerular, cuando existe un aumento de la filtración de proteínas plasmáticas por alteraciones en la barrera glomerular, que puede estar causado por hipertensión intraglomerular, presencia de inmunocomplejos, daño estructural o inflamación vascular en los propios capilares del glomérulo (Grauer, 2011). Suele ser una proteinuria de carácter moderado – grave y que da lugar a la manifestación de sintomatología clínica en el individuo que la padece. En este tipo de patologías predomina generalmente la pérdida de albúmina y con el progreso de la enfermedad aparecen otras proteínas de más alto peso molecular (inmunoglobulinas) (Kovarikova, 2015). Patologías renales tales como la amiloidosis y la glomerulonefritis son dos causas frecuentes de proteinuria de origen glomerular (Harley y Langston, 2012; Littman, 2011).
- Tubular, cuando existe una disminución en la reabsorción o un aumento de la secreción de proteínas (Grauer, 2011). En este tipo de proteinuria predomina generalmente la pérdida de proteínas de bajo peso molecular, aunque también pueden perderse proteínas de peso molecular moderado como la albúmina, pero en menor medida. La proteinuria tubular es menos frecuente y la pérdida proteica suele ser leve - moderada. Está asociada a patologías tales como síndrome de Fanconi, necrosis tubular aguda y fallo renal agudo o crónico (Lees et al., 2005; Riordan y Schaer, 2005; Grauer, 2011).
- Intersticial o del parénquima renal, cuando existen procesos inflamatorios o patológicos que cursan con secreción de proteínas en el espacio urinario desde los capilares peritubulares. Las causas asociadas a este tipo de proteinuria son lesiones inflamatorias como, leptospirosis,

presencia de urolitos en el parénquima renal, pielonefritis o neoplasia renal (Harley y Langston, 2012; Lees et al., 2005).

Proteinuria postrenal

Se produce cuando existe una entrada de proteínas en la orina en el tracto urinario distal, posterior a los riñones. A su vez, se puede clasificar en no-urinaria cuando es causada por infección/inflamación genital o por contaminación durante la recogida o análisis de la muestra, y urinaria, cuando las proteínas proceden de procesos hemorrágicos o inflamatorios que ocurren en el trayecto de la orina desde los riñones hasta el exterior (uréteres, vejiga urinaria y uretra). La proteinuria de origen postrenal se resuelve en cuanto se trata la causa primaria (Lees et al., 2005).

- *Evaluación de la proteinuria:*

Métodos semicuantitativos

Tiras colorimétricas de orina

Este test semicuantitativo detecta principalmente aumentos de albúmina en orina por encima de 30 mg/dL, aunque también puede detectar otras proteínas. Pueden darse falsos negativos cuando el origen de la proteinuria son proteínas de Bence-Jones, si la concentración de albúmina es muy baja o la orina se encuentra muy diluida o ácida (Grauer, 2011). Los falsos positivos, aunque menos comunes en perros respecto a los gatos, pueden ocurrir si la orina está muy concentrada, pigmentada, es alcalina, el sedimento es activo o en machos enteros (Grauer, 2005; Lyon et al., 2010; Vientós-Plotts et al., 2018).

La lectura de la tira debería realizarse durante los 60 segundos posteriores al contacto con la orina y retirando el exceso de la misma para no interpretar los resultados de manera errónea (Grauer, 2007; Zatelli et al., 2010).

Albúmina

La albúmina se sintetiza principalmente en el hígado y funciona como proteína transportadora, resultando esencial para el mantenimiento de la presión oncótica. Tiene un peso molecular de 69 kiloDalton (kDa). El filtrado glomerular de perros sanos contiene 2-3 mg/dL de albúmina, posteriormente esta cantidad es reabsorbida en el túbulo proximal, excretándose una cantidad final de albúmina en individuos sanos de menos de 1 mg/dL (Kovarikova, 2015).

Por lo tanto, la albúmina no es solo un marcador de disfunción glomerular, sino también tubular, aunque suele ser de mayor magnitud en caso de glomerulopatías. No obstante, es un marcador temprano de disfunción renal (Kovarikova, 2015).

La microalbuminuria (MA) se define como el hallazgo de concentraciones de albúmina por encima del rango de normalidad (<1mg/mL), pero por debajo del límite de detección mediante métodos semicuantitativos, como la tira de orina colorimétrica (30 mg/dL). La microalbuminuria puede ser detectada en la práctica habitual únicamente mediante el test semicuantitativo Early Renal Damage - Health Screen (Heska, Colorado, USA) (Kovarikova, 2015; Whittemore et al., 2006).

Estudios realizados en medicina humana han demostrado que la presencia de MA precede a la aparición de la enfermedad renal en pacientes con patologías de riesgo concurrentes como diabetes mellitus, hipertensión o enfermedades sistémicas asociadas a glomerulopatías (Gorriz y Martinez-Castelao, 2012; Hovind et al., 2001; Pinto- Sietsma et al., 2000; Redon y Williams, 2002).

En medicina veterinaria diversos estudios han relacionado la presencia de MA como un indicador temprano previo al aumento del ratio creatinina/proteína en orina (UPC) de la enfermedad renal en perros con glomerulopatías hereditarias (Grauer, 2005) así como en perros con hipertensión asociada a enfermedad renal crónica, siendo útil su detección en pacientes con un UPC inferior a uno (Bacic et al.,

2010). Sin embargo, enfermedades sistémicas pueden dar lugar a un aumento de la microalbuminuria, como enfermedades infecciosas, inflamatorias, metabólicas, cardíacas o neoplásicas. Un estudio realizado en perros con linfosarcoma y osteosarcoma demostró que la cantidad de microalbuminuria en estos individuos era significativamente más alta que en aquellos individuos sanos, aunque no superior al rango de referencia y que esta cantidad no disminuyó una vez lo hizo la carga tumoral (Grauer, 2007). En otro estudio realizado en perros en estado crítico, hospitalizados en la unidad de cuidados intensivos o en la recuperación tras una anestesia, la presencia de microalbuminuria fue mayor a la reportada anteriormente y en algunos casos se relacionó con una tasa de supervivencia menor (Vaden, 2011). No obstante, la prevalencia de microalbuminuria en perros sanos se encuentra entre el 19 – 36% según los diferentes estudios (Grauer, 2005; Marynissen et al., 2016).

Ácido sulfosalicílico

El test de turbidez con ácido sulfosalicílico (SSA) consiste en mezclar de manera equitativa el sobrenadante urinario con SSA al 5%, los resultados se evalúan en base al gradiente de turbidez de la mezcla en una escala del 0 al 4, por lo que el método se evalúa de manera subjetiva. Además de albúmina este test es capaz de detectar globulinas y proteínas de Bence-Jones, sin embargo, los falsos positivos se pueden dar si la orina contiene restos de sustancias como contrastes radiológicos, cefalosporinas o penicilinas (Grauer, 2007; Harley y Langston, 2012), se ha descrito con este método hasta un 36,1% de falsos positivos en perros en muestras con trazas de proteínas o proteinuria leve (Lyon et al., 2010).

Métodos cuantitativos

Ratio proteína/creatinina urinaria (UPC)

El ratio UPC mide de manera objetiva la cantidad de proteínas que se eliminan por la orina. Su aumento en perros con enfermedad renal crónica está relacionado con un mayor índice de mortalidad

(Jacob et al., 2005). A nivel clínico se considera el “gold standard” utilizado para cuantificar la proteinuria. Aunque idealmente debería medirse sobre la orina producida durante 24 h, se ha visto que existe una buena correlación entre esta medición y la medición de las proteínas de una sola muestra (Adams et al., 1992; Harley y Langston, 2012)

La Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS) desde 2019, clasifica la proteinuria del perro de la siguiente manera:

UPC < 0,2	No Proteinúrico
UPC 0,2-0,5	Al borde de la proteinuria
UPC > 0,5	Proteinúrico

En cualquier caso, resultados positivos deberían medirse en un periodo de dos semanas para descartar proteinurias transitorias o fisiológicas (Grauer, 2011)

Generalmente, resultados superiores a 2 indican proteinuria de origen glomerular, aunque también pueden dar resultados inferiores. La proteinuria de origen tubular suele relacionarse con UPC inferiores a uno (Lees et al., 2005; Littman et al., 2013). En perros con enfermedad renal crónica UPC superiores a uno se correlacionan con un peor pronóstico (Lees et al., 2005).

Cistatina C

La cistatina C es una proteína no glucosilada producida de manera constante por las células nucleadas del organismo, a la que se le han otorgado funciones protectoras. Tiene un peso molecular de 13 kDa es filtrada en el glomérulo renal, reabsorbida en el túbulo proximal y eliminada completamente por los riñones (Fernández et al., 2011). A diferencia de la creatinina parece que su concentración sérica no se ve influenciada por factores externos como la dieta o la masa muscular (Antognoni et al., 2005). Sin

embargo, otro estudio reveló que los perros jóvenes o de edad avanzada sanos, así como perros de más de 15 kg presentaban concentraciones de cistatina C más altas (Braun et al., 2002; Cobrin et al., 2013)

En medicina humana los estudios han demostrado que es un indicador más sensible para la determinación indirecta de la TFG que la creatinina, además su excreción no se ve afectada por la edad, el sexo o la dieta en individuos sanos, aunque si puede verse alterada en enfermedad tiroidea y estados de inflamación (Fernández et al., 2011). Diferentes estudios realizados en pacientes caninos demuestran su utilidad en enfermedad renal crónica con una sensibilidad mayor respecto a la creatinina (Antognoni et al., 2005; Wehner et al., 2008), sin embargo, no se ha demostrado la utilidad de la cistatina C en pacientes con enfermedad renal aguda (Cobrin et al., 2013; de Loor et al., 2013). No obstante, García-Martínez et al. (2015), demostraron una correlación positiva entre la concentración de cistatina C en orina y pacientes afectados de Leishmania con proteinuria y azotemia. A pesar de estos estudios, se recomienda la determinación simultánea de cistatina C y creatininas séricas para una mayor eficacia diagnóstica, ya que esta última tiene mayor especificidad (Wehner et al., 2008)

Inmunoglobulina G

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas de alto peso molecular (160 kDa), producidas por las células plasmáticas del bazo, linfonodos y médula ósea con una función principalmente de defensa mediada por anticuerpos (Hokamp y Nabity, 2016). Su hallazgo en la orina implica daño en la barrera glomerular (D'Amico y Bazzi, 2003). El aumento de esta proteína en orina previo al aumento de creatinina sérica y su correlación con el aumento del UPC se ha visto en individuos con nefropatía hereditaria (Nabity et al., 2012). Otras causas por las que puede haber un aumento de esta proteína en orina, son por ejemplo perros proteinúricos infectados por Leishmania (García-Martínez et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2003; Zaragoza et al., 2003). Parece ser que en la orina de individuos con enfermedad renal concurrente y

sedimento urinario activo (hematuria, piuria) la IgG se encuentra una mayor cantidad en comparación a la orina de individuos que no padecen patología del tracto urinario inferior (Hokamp y Nabity, 2016).

Proteína C reactiva

La proteína C reactiva (PCr) es una proteína de fase aguda con un peso molecular de 115 kDa sintetizada principalmente por los hepatocitos (Kovarikova, 2015). Aunque su hallazgo en orina implicaría daño glomerular, en un estudio realizado en perros con enfermedad renal crónica esta no se vio aumentada de una manera significativa. La hipótesis es que para observar un aumento de la PCr en orina es necesario que también esté aumentada en el plasma y se filtre a la orina a través de la barrera glomerular (Smets et al., 2010). En perros con daño renal, ya sea agudo o crónico, relacionado con otras causas, como leishmaniosis, babesiosis, piometra, o envenenamiento por mordedura de serpiente (24 horas después), la PCr también se encuentra aumentada (de Loor et al., 2013; Hrovat et al., 2013; Kovarikova, 2015; Martínez-Subiela et al., 2013).

EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN TUBULAR

- *Densidad urinaria:*

El peso específico de la orina o densidad urinaria (DU), hace referencia al cociente que se establece entre el peso de un determinado volumen de orina y de agua destilada, y determina la concentración total de solutos en la orina. La capacidad para concentrar la orina va a depender de los receptores hipotalámicos y su respuesta frente a los cambios de osmolaridad, la respuesta de los baroreceptores frente a cambios de presión arterial y volumen y la liberación de hormona antidiurética desde la neurohipófisis (van Vonderen et al., 1997). La disminución de la capacidad de concentración de la orina por parte de los túbulos aparece cuando aproximadamente el 65 - 75% de las nefronas no son funcionales por lo que no es un marcador más precoz de lesión renal que la creatinina (Nabity et al., 2011).

La DU puede clasificarse de la siguiente manera según la concentración de solutos existente (Graham, 2017):

- Hipostenúrica DU <1.008: los túbulos renales son capaces de diluir la orina.
- Isostenúrica DU 1.008 – 1.012: existe la misma densidad entre la orina y el filtrado glomerular antes de su paso por los túbulos renales, por lo que en presencia de deshidratación o azotemia es indicativo de que la función tubular está comprometida.
- Orina mínimamente concentrada DU 1.013- 1.025: si es persistente en el tiempo sugiere que parte de la función tubular puede estar comprometida.
- Orina concentrada DU > 1.030: es indicativo de que los túbulos concentran la orina con normalidad.

La medición de la DU puede verse afectada por factores externos tales como la edad, el estado de hidratación, la administración de fluidos o fármacos como diuréticos o antiinflamatorios esteroideos, la existencia de otras enfermedades o la existencia de glucosa en la orina (Graham, 2017; Piech y Wycislo, 2019) incluso un estudio realizado en gatos recoge que las modificaciones en la alimentación pueden alterar este factor en hembras (Rishniw y Bicalho, 2015).

○ *Osmolaridad urinaria:*

Este término hace referencia no solo a la medida de concentración de solutos en la orina, sino que también mide la cantidad de moléculas por litro de orina y se expresa en osmoles/kg. Es una medida más precisa que la DU, puesto que además no se ve afectada por factores externos tales como la presencia de glucosuria u otros solutos (Ayoub et al., 2013) aunque parece existir gran variabilidad intra- e interindividual (van Vonderen et al., 1997). Sin embargo, a nivel clínico la determinación de la DU

mediante refractómetro es mucho más sencilla y utilizada, ya que no requiere de fórmulas específicas (Ayoub et al., 2013).

- *Enzimuria:*

Las enzimas más estudiadas en animales de compañía son la N-acetil-B-D-glucosaminidasa (NAG), la gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT) y la fosfatasa alcalina (FAL). Estas enzimas se sitúan en las células de los túbulos proximales y son fácilmente excretadas por la orina cuando se dañan (Kovarikova, 2015).

En el caso del NAG se han visto concentraciones mayores, pero no significativas en machos que hembras, pudiendo deberse a la contaminación con el semen, la edad sin embargo no influye en la concentración de esta enzima. Otro factor que puede influir en el aumento de la enzima es la presencia de infección de tracto urinario inferior junto con pielonefritis (Sato et al., 2002; Smets et al., 2010).

Perros con nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X también presentan cantidades anormalmente altas en la orina. No obstante, la detección de NAG se muestra especialmente útil en la detección precoz de daño renal, no resultando útil en estadios avanzados de la enfermedad (Cobrin et al., 2013; Nabity et al., 2012). A pesar de la creencia de que es un marcador exclusivo de daño tubular, estudios en perros con enfermedad renal crónica han relacionado el aumento de NAG en orina con lesiones glomerulares confirmadas mediante histología, sin embargo, no se encontró relación entre su aumento y la presencia de lesiones histológicas tubulares (Hokamp et al., 2016)

El incremento de la GGT se relaciona con daño renal agudo previo al aumento de creatinina sérica, como en el caso de necrosis tubular por administración de sustancias nefrotóxicas como la gentamicina o amikacina (Cobrin et al., 2013).

En el caso de la FAL los estudios publicados sugieren que su aumento en la orina está relacionado con daño en el túbulo proximal (Kovarikova, 2015).

- *Proteína transportadora de retinol:*

La proteína transportadora de retinol (PTR) es una proteína de bajo peso molecular (21 kDa) que se sintetiza principalmente en el hígado (Frey et al., 2008). Niveles altos de esta proteína en orina son significativos de daño tubular en pacientes con enfermedad renal crónica. Factores extrarrenales como la edad no suponen diferencias en la concentración (Smets et al., 2010). La presencia de piuria o bacteriuria provoca incrementos moderados de esta proteína respecto a perros con enfermedad renal proteinúricos y sedimento inactivo (Hokamp y Nabity, 2016).

En perros con nefropatía hereditaria el aumento de la PTR se produjo antes que la presencia de azotemia, pero posterior a la presencia de proteinuria, los aumentos más significativos se dieron en estadios medios tardíos de la enfermedad, con lo que esta proteína podría ser útil no solo en la detección precoz de daño tubular sino también la monitorización de la progresión de la enfermedad (Cobrin et al., 2013; Hokamp y Nabity, 2016)

- *Lipocalina-gelatinasa neutrofilica urinaria:*

La lipocalina-gelatinasa neutrofilica urinaria (NGAL) es una proteína que pesa 25 kDa y que se expresa en los neutrófilos, así como en otras células epiteliales que se encuentran en diferentes tejidos entre ellos el renal, por lo tanto, aumenta cuando hay lesión en el epitelio del túbulo renal (Cobrin et al., 2013; Nickolas et al., 2008).

En medicina humana, estudios relacionan positivamente el aumento de NGAL en enfermedad renal de curso agudo, siendo la sensibilidad y especificidad del mismo superior que otros biomarcadores como el NAG, alfa₁-microglobulina y creatinina sérica (Nickolas et al., 2008).

Parece ser que en cachorros menores de 4 meses existe un aumento del NGAL, que puede deberse a la contaminación de neutrófilos en el prepucio en muestras recogidas por micción espontánea. Perros

con infecciones del tracto urinario inferior y piuria también son susceptibles de tener niveles de NGAL aumentados (Nabity et al., 2012).

La detección de esta proteína en la orina ocurre en casos de enfermedad renal aguda antes de que se produzca el aumento de creatinina. En perros con enfermedad renal crónica se ha demostrado una buena correlación tanto en daño glomerular como intersticial. También el aumento de la NGAL previo al aumento de la creatinina en el caso de individuos con nefropatía hereditaria ligada al gen X (Hokamp y Nabity, 2016; Nabity et al., 2012).

- *Microglobulinas:*

La alfa₁-microglobulina es una proteína antiinflamatoria con un peso de 27 kDa que se filtra a través del glomérulo y se reabsorbe en el túbulo, por lo tanto, su aumento en orina es indicador de lesión tubular. La beta₂-microglobulina es una proteína que se encuentra en la superficie de las células nucleadas y tiene un peso molecular de 11,8 kDa. Al contrario que la alfa₁-globulina esta proteína es de carácter inestable en orina ácida (Penders y Delanghe, 2004). En el estudio realizado en perros con nefropatía hereditaria ligada al cromosoma X, la beta₂-globulina fue un mejor marcador para los estadios tempranos de la enfermedad renal, sin embargo, los cambios no fueron significativos en la monitorización de la enfermedad (Nabity et al., 2012).

- *Proteína de Tamm-Horsfall:*

La proteína de Tamm-Horsfall (PTH), con un peso molecular de 100 kDa es sintetizada en las células epiteliales situadas en el Asa de Henle y los túbulos contorneados distales. La presencia de esta proteína en orina de perros sanos es un hallazgo común (Chacar et al., 2017), en medicina humana parece que juega un papel importante en los mecanismos de defensa frente a infecciones del tracto urinario inferior (Devuyst et al., 2005).

Varios estudios en medicina veterinaria realizados en individuos con enfermedad renal crónica apoyan la teoría de que la cantidad de esta proteína se correlaciona negativamente con el grado de enfermedad renal, es decir, en estadios III y IV de la enfermedad renal crónica hay una disminución de la concentración de PTH en orina, sin embargo no parece haber diferencias significativas entre individuos sanos e individuos no azotémicos pero proteinúricos, por lo tanto no es un buen marcador de enfermedad renal crónica en estadios iniciales (Chacar et al., 2017; Raila et al., 2014).

ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La enfermedad renal crónica (ERC) es una de las patologías más frecuentes en perros de edad avanzada. La ERC hace referencia a una insuficiencia estructural y/o funcional irreversible de uno o ambos riñones que se mantiene al menos durante 3 meses y provoca que los riñones no sean capaces de mantener las funciones propias, como la homeostasis. La prevalencia de esta enfermedad en la especie canina es del 0,5 al 1,5% (Bartges, 2012). Generalmente la enfermedad progresa de manera lenta desde un estadio inicial sin sintomatología clínica, ni cambios laboratoriales, hasta un estadio terminal con signos clínicos severos asociados. El objetivo del tratamiento de la ERC es el de frenar el progreso de la enfermedad y tratar los síntomas clínicos asociados a la misma (Bartges, 2012; Jacob et al., 2005).

PRINCIPALES CAUSAS DE ENFERMEDAD RENAL

Las principales causas de enfermedad renal en la especie canina se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales Causas de Enfermedad Renal en Perros

	Causas
Isquemia renal	Shock; Disminución gasto cardiaco; Anestesia; Trauma; Hipertermia/hipotermia; Quemaduras extensas; Reacción a transfusión; Trombosis vasos renales/coagulación intravascular diseminada; Hiperviscosidad/policitemia; Antiinflamatorios no esteroideos.
Enfermedades renales primarias	Agentes infecciosos; Inmunomediado; Neoplasia.
Enfermedades secundarias con manifestación renal	Agentes infecciosos; Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica; Fallo multiorgánico; Coagulación intravascular diseminada; Pancreatitis; Síndrome hepatorenal; Hipertensión maligna.
Nefrotoxinas	Toxinas exógenas; Fármacos; Toxinas endógenas.

Nota. Adaptado de Veterinary Internal Medicine (p. 4653), Ettinger S.J., Feldman E.C., Coté E., 2017, Elsevier.

CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La International Renal Interest Society (IRIS) clasifica a los pacientes con enfermedad renal según la concentración sérica de creatinina, el UPC y la presión arterial, con el objetivo de clasificar y monitorizar a los pacientes con enfermedad renal crónica (Tablas 2,3 y 4):

Tabla 2. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica en Base a la Concentración de Creatinina Sérica

Estadio	Creatinina en sangre (mg/dL)	Comentarios
En riesgo	<1,4	La historia clínica del paciente sugiere que pueda estar en riesgo de desarrollar ERC debido a factores de riesgo como la edad, raza, exposición a sustancias nefrotóxicas, o alta prevalencia de enfermedades infecciosas en la zona.
Estadio I	<1,4	No azotémico. Presencia de otras alteraciones renales como incapacidad para concentrar bien la orina, palpación o imagen renal anormal o proteinuria de origen renal.
Estadio II	1,4-2,8	Azotemia media. Si hay existencia de signos clínicos serán de carácter leve.
Estadio III	2,9-5	Azotemia moderada. Puede haber múltiple sintomatología clínica asociada, dependiendo de la severidad de las mismas se puede clasificar en un estadio III temprano o avanzado.
Estadio IV	>5	Riesgo alto de signos clínicos asociados y crisis urémica.

Nota. Reproducida de International Renal Society (IRIS), 2019.

(<http://iris-kidney.com>). Dominio público.

Debido a la capacidad del SDMA como marcador sérico temprano de ERC, la IRIS considera que su medición y aumento persistente por encima de los rangos de referencia ($>14 \mu\text{g/dL}$) debería tenerse en cuenta a la hora de estadificar un paciente. Así pues, establece que pacientes con aumentos de este marcador superiores a $18 \mu\text{g/dL}$ y con niveles de creatinina por debajo de $1,4$ sean considerados como estadio II (IRIS, 2019).

Pacientes clasificados como IRIS II, pero con una baja condición corporal y con valores de SDMA superiores a $35 \mu\text{g/dL}$, deberían clasificarse como estadio III y aplicar el tratamiento correspondiente, ya que es posible que se haya subestimado el grado de disfunción renal, debido a las variaciones de la creatinina en relación a la condición corporal. De la misma manera, pacientes que se encuentran en un estadio III, pero con valores de SDMA superiores a $54 \mu\text{g/dL}$ deberían clasificarse y tratarse como estadio IV (IRIS, 2019).

Para la clasificación de los pacientes renales según las pérdidas de proteínas en orina se han de descartar causas prerrenales y postrenales. Los pacientes en subestadio no proteinúrico o al borde de la proteinuria, deberían clasificarse como "microalbuminúricos". En pacientes proteinúricos la medición del UPC debería repetirse a las dos semanas para confirmar que se trata de una proteinuria renal persistente (Lees et al., 2005).

La evaluación de respuesta al tratamiento debería ser monitorizada periódicamente mediante el UPC (IRIS, 2019).

Tabla 3. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica en Base al Ratio Proteína Creatinina en Orina

UPC	Subestadio
<0,2	No Proteinúrico
0,2-0,5	Al borde de la proteinuria
>0,5	Proteinúrico

Nota. Reproducida de International Renal Society (IRIS), 2019

(<http://iris-kidney.com>). Dominio público.

Tabla 4. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica en Base a la Medición de la Presión Arterial

Sistémica y su Relación con el Daño a Órganos Diana

Presión arterial sistólica mmHg	Subestadio	Riesgo de daño en órgano diana
<140	Normotenso	Mínimo
140 - 159	Prehipertenso	Bajo
160 - 179	Hipertenso	Moderado
>180	Hipertenso grave	Alto

Nota. Reproducida de International Renal Society (IRIS), 2019

(<http://iris-kidney.com>). Dominio público.

Hay que tener en cuenta que las presiones arteriales altas, en ausencia de daño en órganos diana, deben de ser sostenidas en el tiempo, uno o dos meses, para considerarse como patológicas. Así mismo hay algunas razas, como los lebreles que, de manera fisiológica presentan presiones arteriales más altas (IRIS, 2019; Acierno et al., 2018).

GLOMERULOPATÍA EN ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

La enfermedad glomerular es una de las principales causas que conducen a enfermedad renal crónica en el caso de los perros. La glomerulopatía puede ser de origen congénito con predisposición en algunos tipos de razas como el Samoyedo, Bull Terrier, Galgo, Dálmata, Cocker Spaniel inglés, Pincher, Terriers de capa blanca (Jansen et al., 1987; Littman et al., 2013; Vaden, 2011) aunque la mayoría tienen un origen adquirido por formación de inmunocomplejos en el glomérulo (glomerulonefritis) u otros tipos de alteraciones como depósitos amiloides en el interior de glomérulo (amiloidosis). La prevalencia de la enfermedad glomerular, aunque es desconocida podría oscilar entre el 43 y 90% en perros seleccionados aleatoriamente (Grauer, 2005; Vaden, 2011)

La enfermedad glomerular puede clasificarse también en primaria, si el inicio de la lesión se produce en el glomérulo o secundaria, si el daño en el glomérulo se produce después de una lesión en el sistema tubular o por una pérdida de nefronas. La magnitud de la proteinuria refleja la severidad de la enfermedad (Brown et al., 2013)

GLOMERULONEFRITIS

La glomerulonefritis es la causa más habitual de glomerulopatía, y se produce habitualmente cuando se depositan inmunocomplejos (IC) dentro de las paredes del glomérulo (Tabla 5). El depósito de IC puede darse a través de dos mecanismos (Grauer, 2005)

- IC circulantes que quedan atrapados.
- Complejos inmunes que se forman in situ.

Tabla 5. Enfermedades Asociadas con la Glomerulonefritis en Perros

	Causas
Infeciosas	<i>Bacterianas:</i> Anaplasmosis; Borreliosis; Bartonelosis; Brucelosis; Endocarditis; Piometra; Pioderma; Infecciones bacterianas crónicas; <i>Protozoarias:</i> Babesia; Hepatozoonosis; Leishmaniasis ; Tripanosomiasis; <i>Rickettsiales:</i> Ehrlichiosis; <i>Virales:</i> Adenovirus canino tipo I; <i>Parasitarias:</i> Dirofilariosis; <i>Fúngicas:</i> Blastomicosis; Coccidiomicosis
Neoplasia	Leucemia; Linfoma; Mastocitosis; Eritrocitosis primaria; Histiocitosis sistémica; Otras neoplasias
Inflamatoria	Dermatitis crónica; Enfermedad inflamatoria intestinal; Pancreatitis; Enfermedad periodontal; Poliartritis; Lupus eritematoso sistémico; Otras enfermedades inmunomediadas
Miscelánea	Idiopática; Exceso corticoterapia; Terapia con trimetoprim-sulfa; Infusión crónica de insulina; Deficiencia de complemento C3 congénita; Terapia con Masitinib

Nota. Adaptado de Veterinary Internal Medicine (p. 4653), Ettinger S.J., Feldman E.C., Coté E., 2017, Elsevier.

GLOMERULONEFRITIS ASOCIADA A LEISHMANIA INFANTUM

La Leishmaniosis canina (Lcan) es una enfermedad protozoaria, endémica en más de 70 países. Se transmite a través de la picadura del mosquito hembra del género flebótomo. La *Leishmania infantum* completa su ciclo a través de dos hospedadores, el flebótomo, donde el parásito se transforma en promastigote flagelado y un mamífero, donde el parásito se transforma en amastigote intracelular

obligatorio. El perro es el reservorio principal en la cuenca Mediterránea. Se han descrito algunos factores de riesgo a la hora de desarrollar la enfermedad como las razas Bóxer, Cocker Spaniel, Rottweiler y Pastor Alemán (Miranda et al., 2008; Laia Solano-Gallego et al., 2011). La edad también parece ser un factor influyente, así pues, hay una mayor prevalencia de la enfermedad en los perros menores de tres años y mayores de ocho (Solano-Gallego et al., 2011), sin embargo, los signos clínicos patológicos asociados a la población joven parecen ser más leves (Cabré et al., 2021)

Además de la transmisión mediante flebótomos, el contagio a través de transfusiones de sangre donde el donante es portador (de Freitas et al., 2006), la transmisión vertical y la venérea han sido descritas (Boggiatto et al., 2011; da Silva et al., 2009). Del mismo modo, existe la sospecha de que pueda haber contagio directo entre perros mediante heridas o mordeduras (Ribeiro et al., 2018).

- **Leishmaniasis visceral (LV)**

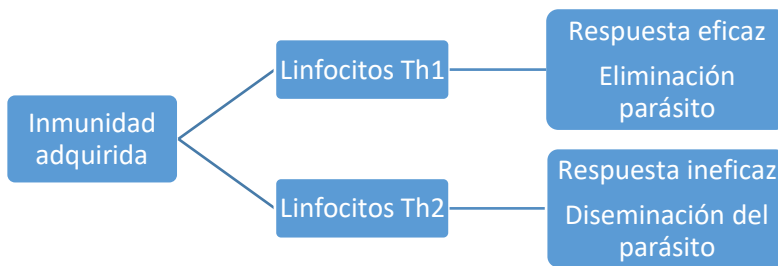
La LV afecta principalmente a los riñones, provocando finalmente una insuficiencia renal aguda o crónica, sin embargo, esto es poco frecuente siendo la presencia de proteinuria un hallazgo mucho más habitual en estos perros infectados (Meléndez-Lazo et al., 2018). La afección de los riñones se relaciona con la forma más grave de la enfermedad (estadio 3 y 4) y con un peor pronóstico. El título serológico de estos animales varía de moderado a alto. Además de los signos clínicos propios de la infección activa, los pacientes presentan sintomatología asociada a la formación de inmunocomplejos y/o síndrome nefrótico. Los cambios clinicopatológicos que se pueden encontrar son entre otros, anemia moderada no regenerativa, hipoalbuminemia, aumento de los valores de creatinina y UPC por encima de 1 (Solano-Gallego et al., 2009).

- *Patogenia:*

Existe una gran prevalencia de infección subclínica puesto que infección no es igual a enfermedad y, por lo tanto, no siempre se manifiestan los signos clínicos. Esto depende mayoritariamente del tipo de respuesta inmunitaria adquirida del animal, siendo más efectiva la vía celular frente a humoral (Cardoso et al., 2007; Hosein et al., 2017).

Los animales que no desarrollan la enfermedad presentan una respuesta celular predominante mediada por los linfocitos T CD4+ (T helper 1), los cuales liberan γ -interferón, IL-2 y $\text{TNF}\alpha$, que inducen la actividad anti – Leishmania por parte de los macrófagos. Sin embargo, si se desarrolla mayoritariamente la respuesta humoral tipo T helper 2, que implica la producción de citoquinas tales como la IL-10, la IL-4 o el $\text{TNF-}\alpha$, hacen que la carga parasitaria aumente y los mecanismos para el control de la enfermedad sean escasos, desarrollándose sintomatología clínica (Tabla 6) (Baneth et al., 2008; Hosein et al., 2017).

Tabla 6. *Tipos de respuesta Inmunitaria Adquirida Frente al Contacto con Leishmania infantum*



Nota. Adaptada de Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs (p. 1184), por Paltrinieri S. et al. 2010, *Journal of American Veterinary Medical Association*, 236 (11).

- *Diagnóstico:*

La detección del parásito en el hospedador puede realizarse de varias maneras:

1-. Detección de anticuerpos anti-leishmania en el suero del hospedador, esto puede realizarse mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) o ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). De forma que un alto número de anticuerpos es diagnóstico de Lcan (Miró et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2009).

2-. Detección del ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito mediante técnicas moleculares. Las muestras de médula ósea, linfonodos y bazo son las más sensibles para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (de Carvalho et al., 2018; Maia et al., 2009).

3-. Observación directa del parásito (amastigote) mediante citología de tejidos corporales como linfonodos, lesiones en la piel, bazo, médula ósea o mediante histopatología de órganos afectados. La no observación del parásito no es significativa de que no exista infección (Solano-Gallego et al., 2009).

4-. Nuevos marcadores urinarios: se han realizado varios estudios para detectar las distintas proteínas en orina de perros proteinúricos con *Leishmania* con el fin de encontrar marcadores más tempranos que la creatinina. Así pues, García-Martínez et al. (2015) concluyeron en un estudio realizado mediante ensayo inmunoturbidimétrico, que la concentración de ferritina aumentaba en perros con proteinuria antes que la creatinina sérica. Ibba et al. (2016) en un estudio realizado mediante SDS-AGE, determinaron que el ratio GGT/creatinina urinaria podía ser un método rápido y eficaz para la identificación de perros con proteinuria de origen tubular, consistente con enfermedad avanzada y que por tanto se podría usar como indicador de patología para llevar a cabo más pruebas diagnósticas. En esta misma línea, Solano-Gallego et al. (2003) determinaron mediante análisis de electrotransferencia, la presencia de anticuerpos anti-Leishmania Inmunoglobulina G solo en la orina perros proteinúricos.

- *Signos clínicos:*

Los signos clínicos pueden ser muy variados (Tabla 7) dependiendo de si es una forma cutánea, visceral (LV) o mixta. No obstante, la manifestación clínica varía entre individuos y el desarrollo de la enfermedad puede ser crónico o agudo (Solano-Gallego et al., 2011).

Tabla 7. *Diferentes Manifestaciones Clínicas Asociadas a la Infección y Desarrollo de la Enfermedad de Leishmania infantum*

Sintomatología clínica	
General	Linfadenopatía generalizada; Pérdida de peso; Cambios apetito; Letargia; Palidez de mucosas; Esplenomegalia; Poliuria/polidipsia; Fiebre; Desórdenes gastrointestinales.
Cutáneo	Dermatitis exfoliativa no pruriginosas con o sin alopecia; Dermatitis erosiva-ulcerativa; Dermatitis nodular; Dermatitis papular; Dermatitis pustular; Onicogrifosis.
Ocular	Blefaritis y conjuntivitis; Queratoconjuntivitis; Uveítis anterior/Endoftalmitis
Otros	Lesiones nodulares o ulcerativas mucocutáneas o mucosas; Epistaxis; Cojera; Miositis masticatoria atrófica; Alteraciones vasculares; Alteraciones neurológicas

Nota. Adaptada de LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis por Solano-Gallego L. et al. 2011, *Parasites and Vectors*, 4 (86).

La enfermedad se ha clasificado en cuatro grados dependiendo de la serología, de los hallazgos laboratoriales, signos clínicos, tratamiento y pronóstico (Solano-Gallego et al., 2011) (Tabla 8):

Tabla 8. Clasificación de los Estadios Clínicos de la Infección por *Leishmania infantum* en Base a la Serología, Signos Clínicos, Hallazgos Laboratoriales, Tratamiento y Pronóstico

	Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Niveles de anticuerpos	Negativos o positivos bajos	Bajos a altos	Medios a altos	Medios a altos
Signos clínicos	Linfadenopatía periférica, dermatitis papular	Lesiones cutáneas, anorexia, pérdida de peso, epistaxis, fiebre	Lesiones producidas por inmunocomplejos	Tromboembolismo pulmonar, estadio final de la enfermedad renal
Hallazgos laboratoriales	Sin hallazgos	Leve anemia no regenerativa, hipergammaglobulinemia, síndrome del suero hiperviscoso	Estadio IRIS I o II	Estadio IRIS III a IV
Tratamiento	A o AG o M o A + AG o A + M	A+AM o A+M	A+AM o A+M Guías IRIS	A Guías IRIS
Pronóstico	Bueno	Bueno o reservado	Reservado o pobre	Pobre

Nota. A= Alopurinol; AG= Antimoniato de Meglumine; IRIS= International Renal Society; M= Mitelfosina. Los estadios II, III y IV comprenden los signos clínicos y hallazgos laboratoriales del estadio que les precede.

Adaptada de LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis por Solano-Gallego L. et al. 2011, *Parasites and Vectors*, 4 (86).

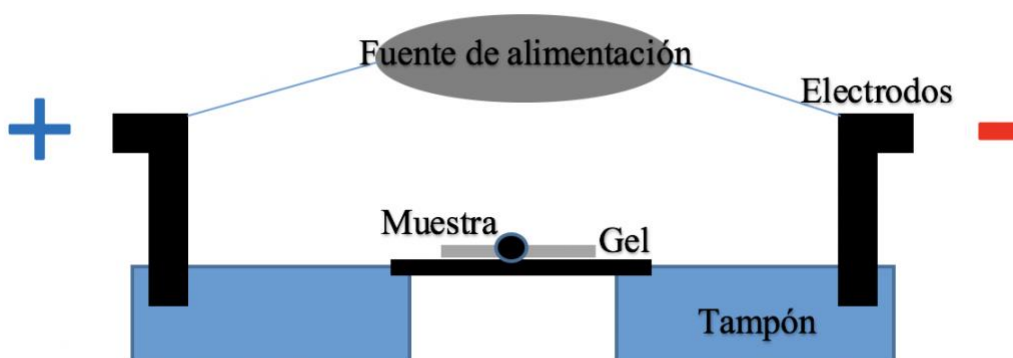
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

La electroforesis en términos generales se describe como una técnica donde se produce una migración a través de un campo eléctrico de moléculas orgánicas ionizadas hacia el polo de carga opuesta. Fue empleado por primera vez en 1937 por Tiselius. Estas moléculas pueden ser proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas, dada su versatilidad no solo se utiliza en la medicina, sino que también es de gran utilidad en otros campos como la biología, farmacia o la industria alimentaria. En medicina veterinaria se utiliza principalmente para separar proteínas séricas, aunque en las últimas décadas también se ha utilizado para la separación de proteínas en otros líquidos corporales, como la orina y el líquido cefalorraquídeo (Cowdrey et al., 1995; Jenkins y Guerin, 1996).

ELECTROFORESIS ZONAL

Las moléculas se desplazan sobre un soporte sólido y homogéneo, como el papel o algunos tipos de geles, en un campo eléctrico, donde existe diferencia de potenciales (Figura 3) (Counotte, 2010).

Figura 3 . *Funcionamiento del sistema de electroforesis en gel*



- **Electroforesis en papel**

Actualmente es una técnica en desuso. Se realiza sumergiendo papel de filtro que actúa como soporte, en una solución tampón de pH alcalino, donde una vez colocada la muestra se aplicará una corriente eléctrica directa durante horas. Mediante colorante se diferencian 5 zonas (Khon, 1957; Lubran, 1966).

- **Electroforesis en acetato de celulosa**

Al igual que en la técnica anterior se necesita de una solución tampón de pH alcalino. En esta técnica el soporte lo forman tiras de acetato de celulosa. La separación se realiza de manera rápida y se puede realizar utilizando muestras en pequeña cantidad, sin embargo, absorben poca agua y por ello son más susceptibles a la evaporación y a una menor resolución (Khon, 1957) .

- **Electroforesis en gel de agarosa**

El medio de soporte en este caso es un gel de agarosa, donde las proteínas se separan por carga y tamaño cuando se les aplica una corriente eléctrica. Durante la electroforesis la matriz de agarosa se debe sumergir en una solución buffer para reducir las variaciones de pH (García, 2000; Krizek y Rick, 2002; Lee et al., 2012).

- **Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)**

El medio de soporte en esta técnica es un gel de poliacrilamida que se forma por la copolimerización vinílica del monómero acrilamida y de un agente formador de enlaces cruzados (N-N-metilen-bis-acrilamida). Es una de las técnicas más usadas habitualmente, ya que la matriz de gel es químicamente inerte, con propiedades uniformes y fácilmente reproducible, además, la visualización de

las bandas se mantiene en el tiempo de manera prolongada con una buena resolución (García, 2000; Jeannot et al., 1999).

- **Electroforesis en sodio dodecilsulfato -gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Es una variación de la técnica anterior siendo un método desnaturalizante de proteínas mediante el gel SDS, donde se fijan. Es la electroforesis en gel más utilizada ya que permite no solo la identificación de las proteínas, sino que además permite determinar su peso molecular (Jeannot et al., 1999).

- **Electroforesis de alta resolución**

La electroforesis de alta resolución (EAR) en suero junto con el inmunotipado electroforético (IFE) permite la identificación de proteínas contenidas en una región electroforética (Abate et al., 2000). En esta técnica las proteínas migran en base a su carga, volumen y masa (Littman et al., 2013). Según el estudio realizado por Abate et al. (2000), las diferentes proteínas encontradas en suero en las diferentes regiones electroforéticas fueron albúmina, α lipoproteína, α_1 antitripsina, haptoglobulina, hemoglobulina, α_2 macroglobulina, β lipoproteína, C3 complemento, fibrinógeno e inmunoglobulinas, por lo tanto, concluye que la EAR, proporciona una mejor resolución que las técnicas en gel.

USO DE LA ELECTROFORESIS EN GEL EN LA ORINA

La electroforesis de zona en distintos soportes para evaluar las proteínas contenidas en la orina sigue los mismos principios mecánicos que la electroforesis en suero. En los últimos años el uso de esta técnica ha ido incrementado hasta ser considerada por la IRIS como una herramienta más en el diagnóstico de la enfermedad renal en pequeños animales (Littman et al., 2013)

El objetivo de la mayoría de los estudios realizados mediante técnicas electroforéticas es el de diferenciar entre proteinuria de origen glomerular, tubular o mixto, basándose en la migración de las

diferentes proteínas (Giori et al., 2011) . Las proteínas de alto peso molecular se relacionan con lesiones de origen glomerular y las proteínas de bajo peso molecular se relacionan con lesiones de origen tubular (Harley y Langston, 2012). Un estudio realizado por Zini et al. (2004) mediante SDS-AGE, se evaluó la relación entre 49 perros con proteinuria asociada a causas renales y los hallazgos de la histología renal. Los resultados revelaron que la técnica electroforética presentaba una alta sensibilidad para detectar daño glomerular o tubular pero muy baja especificidad para diferenciar entre ambos.

Un estudio realizado por Giori et al. (2011) evaluó la eficacia de la técnica de la EAR comparándola con SDS- AGE, para detectar individuos con UPC superiores a 0,2, concluyendo que con la EAR se obtenía una alta especificidad, pero baja sensibilidad y a la inversa para SDS-AGE, por lo que ninguna de las dos técnicas puede sustituir el UPC como método cuantitativo para evaluar la proteinuria. En relación al origen de la proteinuria se concluyó que un ratio elevado albúmina/alfa₁-globulina se podía corresponder con una proteinuria de origen glomerular y un ratio disminuido pueda relacionarse con proteinuria de origen tubular. En otro estudio realizado por Beristain-Ruiz et al. (2013) utilizaron la técnica SDS-PAGE para evaluar las proteínas urinarias en perros con enfermedad cardíaca asociada a *Dirofilaria immitis*. Se observó una disminución de transferrina que se relacionó con que en perros con diferentes procesos inflamatorios esta pudiese disminuir en la excreción renal. En este mismo estudio el aumento de la proteína alfa₁-globulina también se relacionó con daño tubular.

Raila et al. (2014) estudiaron mediante SDS-PAGE la relación entre la excreción urinaria de proteína Tamm-Horsfall y el estado de la función renal en perros, concluyendo que la disminución de la misma se produce en perros con una concentración de creatinina sérica por encima del rango de referencia y un UPC superior a 2,17 por lo que no es una técnica válida para evaluar daño renal en estadios tempranos.

Un estudio preliminar presentado por Paltrinieri et al. (2015) evaluó la orina mediante SDS-AGE de 11 perros con Leishmania con proteinuria clasificados como estadio I de la clasificación IRIS, durante las distintas semanas de tratamiento (0,2,4 y 6), concluyendo que no encontraron cambios significativos en los patrones electroforéticos durante el tratamiento, aunque los perros presentaron variaciones en el UPC.

Lavoué et al. (2015) publicaron un estudio retrospectivo con el objetivo de caracterizar la proteinuria en la raza Dogo de Burdeos, ya que está predispuesta a padecer glomerulonefropatía de origen familiar. En este estudio el origen de la proteinuria fue determinado mediante SDS-AGE además de otros marcadores urinarios, concluyendo que el uso de SDS-AGE junto con la medición de otros marcadores urinarios puede ser útil para descartar lesiones glomerulares en Dogo de Burdeos al borde de la proteinuria.

Un estudio retrospectivo publicado por Hokamp et al. (2018), relacionó los patrones urinarios obtenidos mediante electroforesis en gel urinaria con el daño renal identificado mediante histología de perros con proteinuria y ERC. Los resultados de los distintos patrones mostraron alta sensibilidad y especificidad para la detección de daño glomerular, y alta especificidad para la detección de daño tubulointersticial, pero correlación moderada en ambos casos para detectar la severidad del daño renal. En cualquier caso, concluyeron que las bandas electroforéticas pueden resultar útiles para la detección de daño glomerular y/o tubulointersticial pero no deben sustituir a la biopsia renal.

El uso de las técnicas electroforéticas en gel asociadas (SDS-PAGE) asociadas a la técnica Western blot también han sido utilizadas en orina para determinar la expresión de ciertas proteínas que puedan estar relacionadas con la ERC. En un estudio realizado por Chacar et al. (2017) , se identificó la expresión de proteínas tales como albúmina, proteína de unión de vitamina D, proteína de unión del retinol y proteína de Tamm-Horsfall. El uso de esta técnica en perros con Leishmania también ha sido probado

habiendo excreción de proteínas del tipo inmunoglobulina G o inmunoglobulina A en los perros con daño glomerular (Zaragoza et al., 2003).

Más recientemente, con el objetivo de encontrar biomarcadores renales en orina canina (Ferlizza et al., 2020) han combinado SDS-PAGE asociado a espectrofotometría de masas, asociando la presencia de componente tubulares como uromodulina, trigonelina y carnosina a la presencia de ERC.

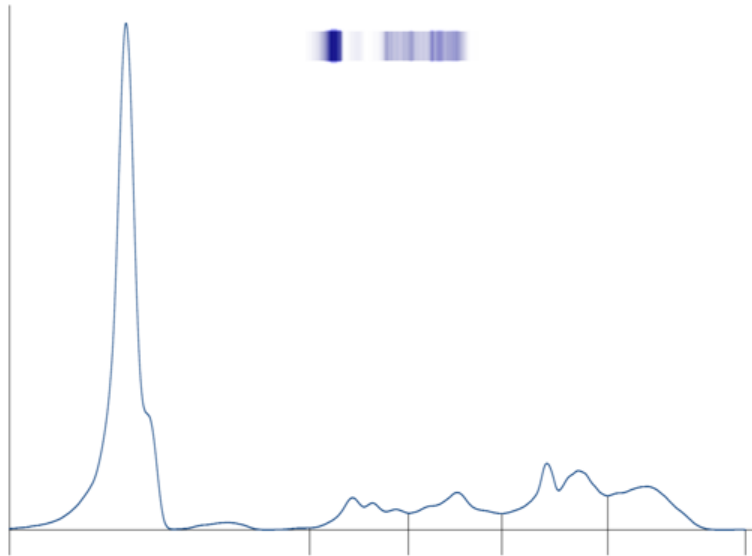
ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (EC) es una técnica laboratorial que empezó a utilizarse a principios de 1990 y que, en términos generales, permite la separación y cuantificación de proteínas entre otros analitos, en función de su movilidad electroforética. La separación de estas moléculas cargadas se produce por la migración en una solución tampón con un pH determinado (Doroteo, 2012; Jenkins, 2009; Uji y Okabe, 2001).

Las ventajas que presenta frente a otras técnicas de separación de proteínas son la automatización del proceso, la excelente resolución, el mínimo consumo de reactivos y excreción de productos tóxicos, la poca cantidad de muestra requerida, el corto tiempo de procesado, y la capacidad de procesar varias muestras a la vez (Jenkins y Guerin, 1996).

El resultado de esta técnica es la obtención de una curva electroforética o proteinograma que se divide en cinco fracciones; albúmina, alfa₁-globulina, alfa₂-globulina, beta₁-globulinas, beta₂-globulinas y gammaglobulina (Figura 4) (Tothova et al., 2016).

Figura 4. Curva Representativa de la Migración de Proteínas Sérica de un Perro Sano mediante Electroforesis Capilar



Giordano y Paltrinieri (2010) establecieron los rangos de referencia de individuos sanos para las distintas fracciones del proteinograma sérico (Tabla 9) en la especie canina comparándolos con los ya establecidos mediante electroforesis en gel de agarosa (AGE), resultando en rangos similares, pero ligeramente más amplios para cada una de las distintas fracciones.

Tabla 9. Rangos de Referencia para las Distintas Fracciones del Proteinograma Sérico en Perros Sanos

IC	Albúmina	Alfa ₁ globulina	Alfa ₂ globulina	Beta ₁ globulina	Beta ₂ globulina	Gammaglobulina
97.5%						
%	44,4-65,7	3,1-7,3	6,2-16,7	2,9-11,1	6,3-20,7	4,5-20,1

Nota. IC= Intervalo de Confianza

Adaptado de Interpretation of capillary zone electrophoresis compared with cellulose acetate and agarose gel electrophoresis: reference intervals and diagnostic efficiency in dogs and cats, por Giordano A. y Paltrinieri S. 2010, *Veterinary Clinical Pathology*, 39 (4).

En medicina veterinaria la obtención de esta curva permite la identificación de paraproteinemias que pueden tener su origen en procesos inflamatorios, infecciosos o tumorales, como los que se indican en la tabla 10 (Tappin et al., 2011; Tothova et al., 2016):

Tabla 10. *Relación de Enfermedades con Asociadas a los Cambios en las Distintas Fracciones del Proteinograma Sérico*

Fracción del proteinograma	Descenso	Aumento
Albúmina	Enfermedad hepática, hepatitis crónica, cirrosis, fallo hepático Enfermedad renal, síndrome nefrótico Malnutrición crónica Enteropatía perdedora de proteínas, enfermedad parasitaria Inflamación aguda	Deshidratación
Alfa ₁ globulina	Deficiencia de alfa ₁ -antitripsina Malnutrición, insuficiencia hepática	Inflamación activa
Alfa ₂ globulina	Anemia hemolítica	Enfermedad inflamatoria, trauma Síndrome nefrótico

Fracción del proteinograma	Descenso	Aumento
Beta ₁ globulina	Malnutrición, insuficiencia hepática	Enfermedad inflamación, infecciones Hepatitis activa, enfermedad hepática crónica, cirrosis Síndrome nefrótico, hipercolesterolemia Anemia por deficiencia de hierro
Gammaglobulina	Immunodeficiencia, infecciones recurrentes Immunodeficiencias hereditarias	Monoclonal: Mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica, linfosarcoma, mieloma células plasmáticas, linfoma maligno Policlonal: inflamación crónica y aguda, infecciones severas, desórdenes inmunomediados

Nota. Reproducida de Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: a review (475) por Tothova C., Nagy O. y Kovac G., 2016, *Veterinari Medicina*, 61 (9).

USO DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR EN ORINA

El estudio de la orina mediante electroforesis capilar en medicina humana ha sido descrito con el principal objetivo de identificar y cuantificar proteínas de Bence-Jones, además de diferenciar entre proteinuria de origen glomerular y tubular (Jenkins, 1997). Jellum et al. (1996) compararon las técnicas clásicas de electroforesis en gel con la EC en orina de pacientes con problemas metabólicos obteniendo

patrones casi idénticos a excepción de pequeñas cantidades de fibrinógeno que solo se vieron en las técnicas de gel. También hay estudios que asocian esta técnica a otras más sofisticadas como el inmunotipado y cuantificación de inmunoglobulinas identificando patrones de proteínas monoclonales que pueden estar asociadas a pacientes con mielomas (Jenkins, 2009).

La electroforesis capilar asociada a la espectrofotometría de masas (CE-MS) en medicina humana ha demostrado ser un método válido y prometedor para la detección de biomarcadores asociados al cáncer de próstata (Theodorescu et al., 2005). En estas mismas líneas la CE-MS también puede ser útil en la detección temprana mediante la expresión de diferentes biomarcadores de diferentes nefropatías tales como la ERC o nefropatías asociadas a diabetes (Mischak et al., 2010).

Por último, en medicina veterinaria, existe un estudio realizado por Pelander et al., (2019), sobre el uso de electroforesis capilar en orina ligado a la técnica de la CE-MS con el fin de identificar péptidos urinarios existentes en pacientes caninos con ERC.

MATERIAL Y MÉTODOS

POBLACIÓN DE ESTUDIO

El estudio presentado es de tipo transversal, prospectivo y multicéntrico, y fue evaluado favorablemente por el comité de investigación y ética de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (UCV 2017-2018-33).

La población de estudio se localizó en la Comunidad Valenciana, incluyendo a perros de propietario y de protectora, de vida exterior e interior. Los parámetros que se incluyeron en el estudio fueron los datos biológicos del paciente, como la edad, sexo, estado reproductivo y raza. Así como parámetros clínicos, tales como historia clínica y examen físico. La información sobre el estado de medicina preventiva (vacunaciones y desparasitaciones) de cada animal no estaba disponible en todos los pacientes. La evaluación diagnóstica se realizó mediante examen físico básico, hematología, bioquímica, análisis de orina completo incluyendo UPC y urinocultivo, proteinograma y serología de *Leishmania Infantum*. Se incluyeron 123 perros sanos y 28 con enfermedad renal, de los cuales 17 presentaban enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum* y 11 presentaban enfermedad renal crónica no asociada a *Leishmania infantum*. Participaron en el estudio 15 centros veterinarios, incluyendo clínicas de primera opinión, protectoras y centros de referencia (Tabla 11), localizados desde octubre de 2016 hasta junio de 2019.

Tabla 11. *Relación Centros Veterinarios Colaboradores en el Estudio y el Número de Muestras Remitidas*

Centro veterinario	Número individuos
CEDIVET	13
CV Eliavet	6
CV Evet	2
CV El Puerto	2
CV Fauntura	48
CV La Graveta	1
CV Petcenter	7
CV San Antoni	6
CV San Francisco	1
CV Vila-Real	2
HV Sagrada Familia	6
HV UCH-CEU	5
HV Universidad Católica	32
SP Modepran	18
SP SOS Manada	2

Nota. CV: Clínica Veterinaria; HV: Hospital Veterinario; SP: Sociedad Protectora

GRUPO PERROS SANOS (G_0)

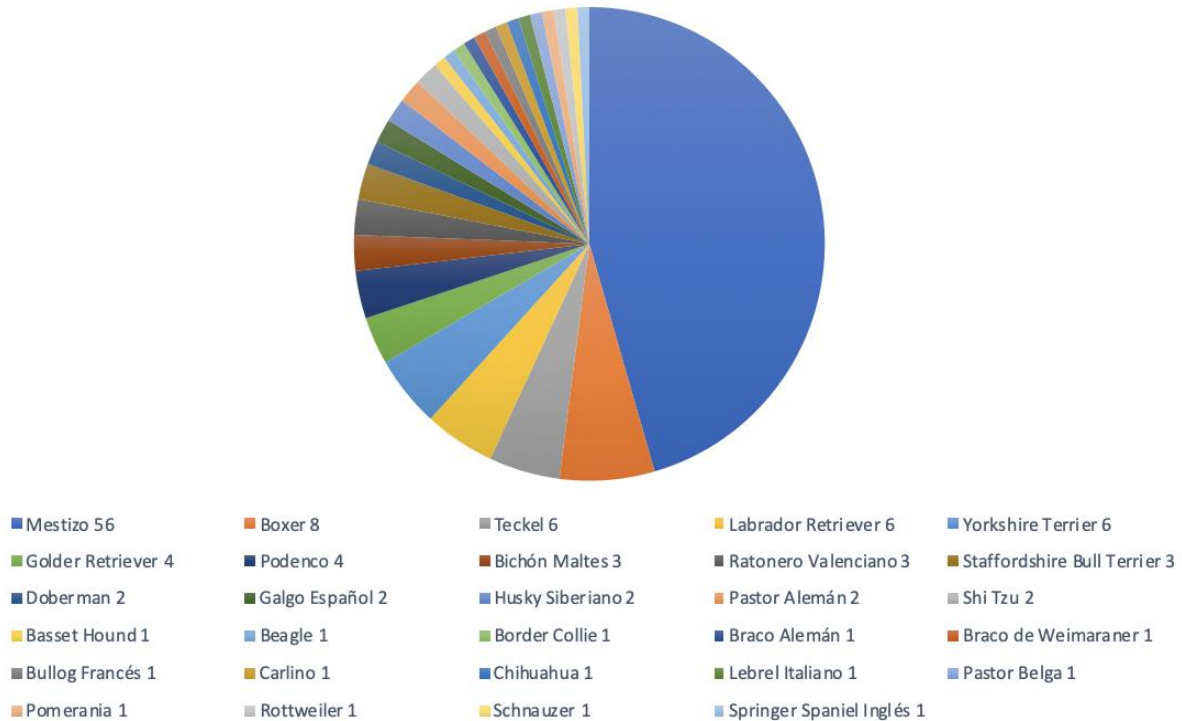
El G_0 ($n_{\text{total}}=123$) se dividió en tres subgrupos para su posterior análisis estadístico: un grupo de cachorros, incluyendo 33 perros, de edad desde los 3 meses hasta los 12 meses; grupo de adultos, con 53 perros a partir del año de edad y hasta los 8 años; grupo senior con 37 perros mayores de 8 años. La

inclusión de individuos en cuanto al sexo y estado reproductivo (entero/a, castrado o esterilizada) fue aleatoria (Tabla 12). Las diferentes razas aceptadas en el estudio también resultaron aleatorias (Figura 5).

Tabla 12. *Población de Perros Sanos Incluida en el Estudio*

	Macho	Hembra	Entero (M/H)	Castrado/Esterilizada	Estado desconocido (M/H)
Cachorros	15	18	12/17	3/0	0/1
%	(12,19)	(14,63)	(9,75/13,82)	(2,43/0)	(0/0,81)
Adultos	19	34	6/10	13/18	0/6
%	(15,44)	(27,64)	(4,87/8,13)	(10,56/14,63)	(0/4,87)
Senior	20	17	4/2	12/12	4/3
%	(16,26)	(13,82)	(3,25/1,62)	(9,75/9,75)	(3,25/2,43)
Total	54	69	22/29	28/30	4/10
%	(43,90)	(56,09)	(17,88/23,57)	(22,76/24,39)	(3,25/8,13)

Figura 5. Gráfico Circular con las Diferentes Razas y el Número de Perros Incluidos en el Estudio



CRITERIOS INICIALES DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO PARA G₀:

- Anamnesis sin alteraciones destacables.
- Historial clínico libre de patologías concurrentes o toma de medicación en el momento de la extracción de la muestra.
- Exploración física básica aparentemente normal.
- Resultados clínico-patológicos dentro de la normalidad.

GRUPO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA (G₁)

Los perros incluidos en este grupo fueron diagnosticados de enfermedad renal crónica, acorde a la clasificación IRIS. El número de animales de este grupo no permitió realizar estratificaciones conforme a los estadios IRIS para obtener un tamaño muestral significativo en cada estrato.

CRITERIOS INICIALES DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO PARA G₁:

- Historia de enfermedad renal crónica no asociada a *Leishmania Infantum*.
- No estar recibiendo tratamiento con diuréticos, corticoides o fluidoterapia, en el momento de recolección de la orina, ni en los quince días anteriores.
- Presentar concentraciones séricas de creatinina >1,4 mg/dl, proteinuria (UPC >0,5) y títulos de anticuerpos para *Leishmania infantum* <1/50.

GRUPO DE PERROS CON ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM (G₂):

Los perros incluidos en este grupo fueron diagnosticados de Leishmaniosis y enfermedad renal crónica, acorde a la clasificación IRIS.

CRITERIOS INICIALES DE INCLUSIÓN EN EL ESTUDIO PARA G₂:

- Historia de infección activa por *Leishmania Infantum*.
- No estar recibiendo tratamiento con diuréticos, corticoides o fluidoterapia, en el momento de recolección de la orina, ni en los quince días anteriores.
- Presentar concentraciones séricas de creatinina >1,4 mg/dl, proteinuria (UPC >0,5) y títulos de anticuerpos para *Leishmania Infantum* >1/100.

MÉTODOS ANALÍTICOS

RECOLECCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS

Se realizó la extracción de sangre de la vena cefálica o yugular indistintamente. Los perros incluidos en el estudio debieron de estar al menos 12 horas en ayuno de sólidos. Para la extracción se utilizó una aguja azul de 0,6 mm x 25 mm de 23 G y una jeringuilla de 2,5 mL. Como mínimo se extrajeron 2 mL de sangre de cada individuo.

La recolección de orina se realizó por parte del propietario del perro, mediante micción espontánea, en un bote estéril de 150 mL (Deltalab) de capacidad proporcionado por el estudio. Se seleccionó la primera orina de la mañana, descartando la primera fracción de orina, obteniendo un mínimo de 8 mL de orina por individuo.

Las analíticas correspondientes al hemograma, bioquímica, serología, proteinograma, urinocultivo y UPC se procesaron en el laboratorio de referencia CEDIVET (Centro Diagnóstico Veterinario). La detección de elementos anormales mediante tira colorimétrica, estudio del sedimento urinario y la electroforesis capilar de la orina se procesó en el laboratorio del Hospital Veterinario de la Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, siempre por la misma persona.

HEMATOLOGÍA

Se utilizó un tubo colector de 0,5 mL con anticoagulante EDTA (Aquisel), agitado suavemente tras la introducción de la muestra y refrigerado a 4 °C hasta el análisis. El tiempo máximo desde la extracción de la muestra hasta su análisis fue de 24 horas. Los hemogramas se realizaron en un equipo Celltac Alpha VET MEK-6550 (Nihon Kohden) con una evaluación adicional del frotis sanguíneo, con el fin de detectar

otras anomalías, tales como agregados plaquetarios o agentes infecciosos. Los parámetros estudiados y los rangos de referencia se encuentran en la Tabla 13.

Tabla 13. Valores de Referencia Caninos de los Distintos Parámetros del Hemograma en el Equipo Celltac Alpha VET MEK-6550

Parámetro	Rango referencia	Unidades
Leucocitos	5,5-17	K/ μ L
Serie Roja		
Hematías	5,00-8,50	M/ μ L
Hemoglobina	8,5-15,0	g/dL
Hematocrito	30,0-41,0	%
Volumen Corpuscular Medio (VCM)	65,0-83,0	fL
Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)	18,5-30,0	pg
Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)	30,0-37,5	g/dL
Serie Plaquetar		
Plaquetas	175-500	K/ μ L
Volumen Plaquetario Medio (VPM)	5,8-9,2	fL
Fórmula Leucocitaria		
Neutrófilos	3,0-12,0	K/ μ L
Cayados	< 0,3	K/ μ L
Linfocitos	0,5-4,9	K/ μ L
Monocitos	<2,0	K/ μ L
Eosinófilos	<1,5	K/ μ L

Parámetro	Rango referencia	Unidades
Basófilos		K/ μ L
Neutrófilos	60,0-77,0	%
Cayados	<6,0	%
Linfocitos	12,0-30,0	%
Monocitos	<10,0	%
Eosinófilos	<10,0	%
Basófilos	<1,0	%

BIOQUÍMICA:

Se utilizó un tubo recolector con gel activador separador, con capacidad máxima de 2 mL (Aquisel). Los tubos se llenaron con al menos 1,5 mL de sangre. La muestra se dejó reposar unos 20 minutos a temperatura ambiente para posteriormente centrifugarse durante 10 minutos a 1,341 x g (Centrífuga 2650; Nahita). El suero se separó e introdujo en un tubo cónico de microcentrífuga (Lambda) de 1,5 mL de capacidad, y se mantuvo refrigerado a 4 °C hasta su posterior análisis, dejando siempre como máximo 24 horas tras la extracción de la muestra. Para el análisis de los distintos parámetros se utilizó la máquina de bioquímica CS 300 analizador Dirui. Los parámetros estudiados y los rangos de referencia se encuentran en la tabla 14.

Tabla 14. Valores de Referencia Caninos de los Parámetros Bioquímicos Incluidos en el Estudio con el Analizador CS 300 Diriu

Parámetro	Valor de referencia	Unidades
Creatinina sérica	0,50-1,60	mg/dL
Urea	18-60	mg/dL
Transaminasa ALT	10-75	U/L
Proteínas Totales	5,2-7,6	g/dL

SEROLOGÍA:

Se realizó serología de *Leishmania infantum*, con el suero extraído tras el proceso de centrifugación de la sangre anteriormente citado. La determinación de los anticuerpos se realizó mediante inmunofluorescencia (IFI) y para su lectura se utilizó el microscopio (Axio Scope HBO 50; Zeiss). Se consideraron como animales enfermos de Leishmaniosis, aquellos que presentaban títulos de anticuerpos superiores a 1/100, con sintomatología y hallazgos laboratoriales compatibles, siguiendo las recomendaciones del laboratorio de referencia (Tabla 15).

Tabla 15. *Clasificación según el Título de Anticuerpos Obtenidos Mediante Inmunofluorescencia Proporcionada por el Laboratorio de Referencia.*

Título Anticuerpos	
Negativo o menor de 1/50	Animal negativo, animal asintomático con muy poca (no inexistente) probabilidad de mostrar signos clínicos. También puede tratarse de un animal en el inicio de una seroconversión.
1/50	Título dudoso. Se recomienda repetir el título más proteinograma en 4 semanas para valorar una posible seroconversión.
1/100	Título positivo bajo. Evaluar la presencia de síntomas compatibles con la enfermedad. Se recomienda realizar un seguimiento del título más proteinograma en 4 semanas para valorar una posible seroconversión.
1/200	Título positivo medio. Animal generalmente sintomático (aunque a veces pueden ser asintomáticos), que suele requerir tratamiento leishmanicida y monitorización de parámetros bioquímicos básicos tras éste.
≥1/400	Título positivo alto. Animal que suele mostrar uno o más signos evidentes de la enfermedad, y a menudo alteraciones bioquímicas (renales, hepáticas) que requieren tratamiento leishmanicida y de sistemas afectados.

PROTEINOGRAMA SÉRICO:

El proteinograma sérico se realizó mediante la técnica de electroforesis capilar (Minicap; Sebia) analizando las siguientes fracciones proteicas: albúmina, alfa₁globulina, alfa₂globulina, betaglobulina, gammaglobulina y el cociente albúmina/globulinas (A/G). Los valores de referencia se encuentran descritos en la tabla 16.

Tabla 16. Valores de Referencia Caninos de las Diferentes Fracciones Incluidas en el Proteinograma Sérico Obtenidas en el Laboratorio de Referencia Mediante el Equipo MiniCap

Fracción proteica	Valor referencia g/dL	Valor referencia %
Albúmina	2,3-4,5	40,0-65,0
Alfa ₁ -globulinas	0,2-0,5	1,0-6,0
Alfa ₂ -globulinas	0,3-1,1	5,0-15,0
Betaglobulinas	0,9-2,7	8,0-22,0
Gammaglobulinas	0,5-1,2	6,0-12,0
Cociente (A/G)	Mayor de 0,6	

URIANÁLISIS

La muestra recolectada se refrigeró a 4°C hasta su procesamiento, no dejando más de 12 horas desde la recolección hasta la realización del urianálisis. De los 8 mL de orina recolectados, al menos 4 mL se centrifugaron (Centrífuga 2650; Nahita) durante 10 minutos a 804 x g, el sobrenadante se dividió en alícuotas de 1 mL en tubos de microcentrífuga de fondo cónico de 1,5 mL (Lambda) y se congeló a -20°C. El análisis de la orina se realizó con 2 mL e incluyó los siguientes parámetros.

- **Inspección visual**, evaluando parámetros tales como el color y la turbidez de la muestra.

- **Tira colorimétrica**, realizada mediante tiras reactivas (LabStrip U11 Plus; 77 Elektronika Kft). Se evaluaron de manera semicuantitativa (en base a una reacción colorimétrica), los siguientes parámetros: pH, bilirrubina, cuerpos cetónicos, glucosa. Los leucocitos se evaluaron en el sedimento debido a la baja especificidad de la tira para esta determinación, así como la presencia de eritrocitos. En cuanto a las proteínas se determinaron de manera cuantitativa mediante pruebas bioquímicas.

- **Densidad urinaria**, medida mediante refractómetro (Optika Ponteranica), previamente calibrado con agua destilada antes de cada tanda de mediciones (Tabla 17).

Tabla 17. *Grado de Concentración de la Orina en Relación a la Densidad Urinaria*

Densidad Urinaria	Valor
Normal	1.025-1.035
Mínimamente concentrada	1.012-1.025
Isostenúrica	1.008-1.012
Hipostenúrica	<1.008
Hiperestenúrica	>1.035

- El **sedimento** obtenido tras la centrifugación anterior, se colocó en un portaobjetos para su posterior evaluación microscópica (Microscopio binocular DM500; Leica). La evaluación se realizó en primer lugar en fresco para evaluar la presencia de cristaluria, celularidad, cilindros y/o bacterias. Posteriormente, se procedió a la realización de una citología del mismo sedimento usando una tinción panóptica, para evaluar la presencia de bacterias, restos celulares y confirmar la presencia e identificar el tipo de células observadas en el examen en fresco.

- **Cultivo**, realizado en medio de cultivo sólido cromogénico específico para orina (BD CHROMagar Orientation Medium, Becton Dickinson). Una vez sembrada la muestra con un asa de siembra estéril (Deltalab) desechable (10µL), se incubó en la estufa (Nahita) a 37°C un máximo de 48 horas, para posteriormente evaluar la presencia y el número de colonias bacterianas en las placas inoculadas.

- **UPC**, realizado para evaluar la cantidad de proteínas eliminadas en la orina en relación con la creatininuria presente en la muestra de cada individuo (Tabla 18). Para calcular el UPC se midieron las proteínas contenidas en la orina mediante el reactivo rojo de pirogalol. La creatinina se determinó mediante un método enzimático, utilizando un autoanizador bioquímico (CS 300Dirui). En las orinas con densidad > 1.035 la dilución de éstas fue de 1 volumen de orina más 49 volúmenes de agua destilada. En todos los casos se comprobó la curva de reacción enzimática para confirmar que el resultado se encontraba dentro de los límites establecidos en la calibración del aparato. El UPC se calculó de la siguiente manera:

$$UPC = \frac{\text{proteínas ultrasensibles (mg/dL)}}{\text{creatininuria (mg/dL)}}$$

Tabla 18. Valores de Referencia de UPC en Perros

Valor Referencia	
<0,2	No proteinúrico
0,2-0,5	Al borde de la proteinuria
>0,5	Proteinúrico

Nota. Reproducida de International Renal Society (IRIS), 2017

(<http://iris-kidney.com>). Dominio público.

ELECTROFORESIS CAPILAR URINARIA

Para la realización de la electroforesis capilar, y con el fin de eliminar componentes que pudieran interferir en la técnica, originar artefactos, y para concentrar las proteínas existentes en la orina, esta se trató previamente mediante un proceso de dialización y concentración, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante y que se describe a continuación:

1. Preparación de la muestra de orina previa a la dialización

1.1 Se descongeló la orina alicuotada (4 mL) del individuo a estudiar a temperatura ambiente y se centrifugaron los 4 tubos de microcentrifuga de fondo cónico durante 10 minutos a $1,609 \times g$.

2. Diálisis y concentración de las muestras de forma previa a la EC.

La muestra de orina debe someterse a este proceso para eliminar las sales y otros compuestos que pueden interferir con la longitud de onda que usa el aparato de EC, produciendo picos no específicos, y para concentrar las proteínas en un menor volumen de filtrado. Las columnas de ultrafiltración utilizadas (Vivaspin Turbo 4 10000 MWCO, Sartorius) poseen una doble membrana de concentración que retiene en la parte superior aquellas moléculas con un PM superior a 10 kDa.

2.1 Se transfirieron los 4 mL del sobrenadante obtenido en el paso 1.1 a la membrana de concentración de una columna de ultrafiltración de 4 mL de capacidad previamente identificada.

2.3 Se centrifugó la columna de ultrafiltración a $1,878 \times g$ durante 25 minutos para la concentración de las proteínas en la muestra. Normalmente, el volumen restante en la membrana de concentración tras dicho paso fue de 500 microlitros (μL).

2.4 Se preparó la solución de lavado a partir del tampón de diálisis (Dialysis Buffer, Sebia) y agua osmotizada al 50% v/v en un bote estéril.

2.5 Se descartó el líquido resultante de la centrifugación que se encontraba en el fondo del tubo de la columna de ultrafiltración, dejando el líquido de la parte superior de la columna (Figura 6). Se añadió la solución de lavado preparada en el paso 2.4 con una pipeta Pasteur a la columna de lavado hasta la marca que indica 4 mL de volumen (aproximadamente 3,5 mL).

2.6 Se centrifugó la columna con la solución de lavado a $1,878 \times g$ durante 20 minutos. Debe quedar un volumen en la columna de ultrafiltración de entre 100 y 500 μL .

2.7 Se homogeneizó el contenido de la columna con una micropipeta de 20-200 μL , y se transfirió a un tubo de 1,5 mL de capacidad de fondo cónico. Dicho contenido constituye la muestra de orina ya dializada.

El equipo de EC requiere un mínimo de 100 μL para realizar la lectura.

3. EC de las muestras de orina dializada en Minicap Sebia.

3.1 Simultáneamente, y durante los procesos de centrifugación de las muestras se encendió el aparato Minicap Sebia y se inició el programa "Phoresis.exe" que gestiona el funcionamiento del instrumento. Se cambió el modo de trabajo que aparece por defecto (PROTEIN) al modo de trabajo URINE (Figura 7). En la pantalla de inicio se debe comprobar que el estado de los reactivos y de los contenedores de desechos se corresponde con el mostrado en la interfaz. A continuación, se realizó un ciclo de limpieza y otro de activación de los capilares.

3.2 Una vez completado el paso anterior, cuando la interfaz mostraba el mensaje "esperando tubos de muestra", se colocaron los tubos en los pocillos indicados en la figura 8 con las muestras dializadas debidamente identificadas, a partir de la posición que nos indicaba la interfaz, y anotando qué muestra se corresponde con cada posición. Al cerrar la tapa del instrumento, el ciclo comenzaba de forma automática.

Una vez introducidas las muestras, los capilares de sílice se llenaban con el tampón de separación. Posteriormente las muestras se inyectaban mediante aspiración en el polo anódico del capilar. Se aplicó alto voltaje de separación de proteínas para que la muestra migrara a lo largo del capilar. Cuando la muestra alcanzaba el polo catódico, se realizaba la detección directa y cuantificación de las diferentes fracciones proteicas a una longitud de onda específica. Al final de este proceso se obtenía una curva electroforética (Figura 9).

4. Separación de las fracciones.

4.1 Cuando el proceso de migración finalizaba, las gráficas de electroforesis aparecían directamente en la interfaz del programa. Este permite introducir el número o nombre de la muestra. Tras identificar cada una de las gráficas, se procedió a situar las líneas que separan las fracciones obtenidas. Dicha separación se realizó superponiendo un suero canino diluido 1:49 en solución de lavado de diálisis (preparada en el paso 2.4.), tal y como aconseja el fabricante, y que se incluyó en cada lote de muestras que migraban como control. Las gráficas se dividieron en 5 fracciones, de forma similar a como se dividen las gráficas que se obtienen de las muestras de suero.

Figura 6. *Tubos de Dialización*

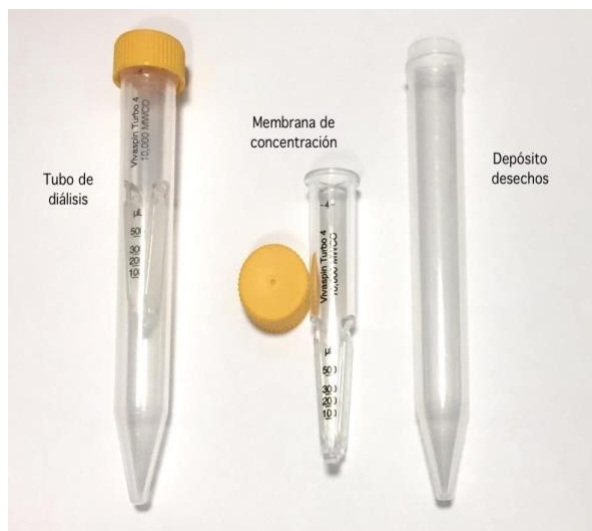


Figura 7. Pantalla de Inicio del Programa
"Phoresis.exe"

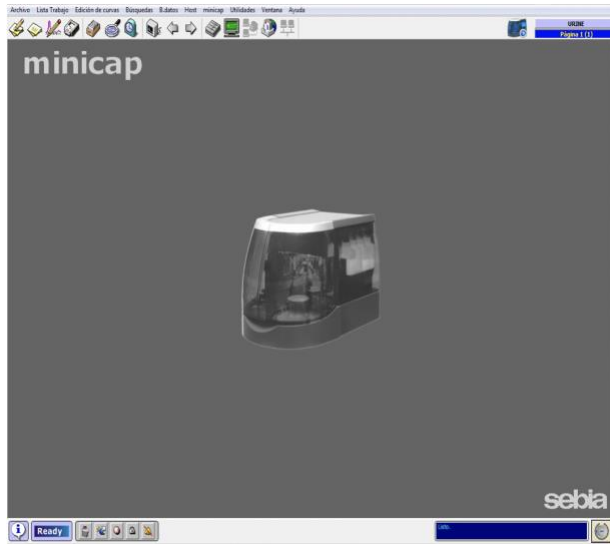


Figura 8. Pocillos del MiniCap con Capacidad para 26 Muestras

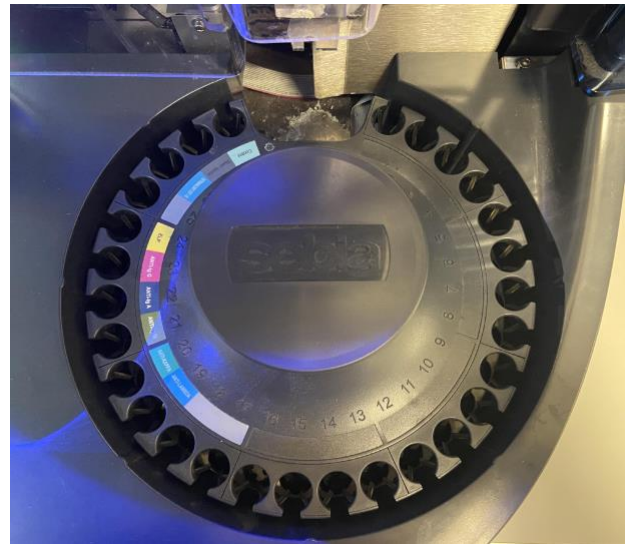
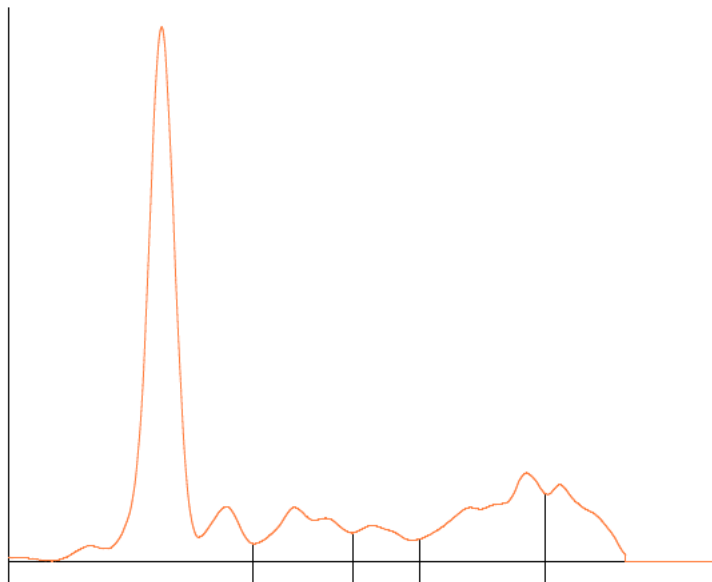


Figura 9. Curva Electroforética Urinaria Canina



Electroforesis de proteínas en orina

Nota. Curva realizada en una hembra sana de 4 años esterilizada de la raza Golden Retriever con un ratio proteína/creatinina en orina de 0,1.

FRACCIONES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR URINARIA:

El patrón de orina electroforético obtenido para cada individuo se dividió tal y como se explica en el paso 4.1 en cinco fracciones: fracción uno (F1), fracción dos (F2), fracción tres (F3), fracción cuatro (F4) y fracción cinco (F5). Todas las muestras fueron divididas por la misma persona (Paula Navarro).

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA:

La validación de la técnica de electroforesis capilar en orina de pacientes caninos, se realizó en base a las recomendaciones para definir, establecer y verificar estudios de rangos de referencia en laboratorios clínicos para muestras biológicas en el ámbito de la medicina veterinaria, así como las recomendaciones propuestas en el libro de Westgard (2013) y la guía propuesta por Horowitz et al. (2010). Siguiendo estas recomendaciones, se evaluaron los pasos a seguir para una técnica para la cual el fabricante ya había realizado los experimentos de evaluación para determinar el error aleatorio y el error sistemático.

En el caso del presente estudio, y ya que el equipo Sebia Minicap se había utilizado de forma rutinaria para realizar los proteinogramas séricos, no se repitieron todos los experimentos relacionados con el periodo de familiarización (validar el rango reportable, verificar la calibración y verificar el límite de detección). Puesto que la calibración se verificó de forma rutinaria como parte del control de calidad del aparato, únicamente se realizaron los experimentos de límite de detección, donde el fabricante reportó un límite de 20 mg/L. Estos experimentos realizados por el fabricante se limitan a las proteínas monoclonales, y la sensibilidad de detección se describe como muy variable dependiendo del fondo policlonal. A continuación, se describe la metodología utilizada para determinar el límite de detección.

Experimento límite de detección. Consiste en partir de una solución con una concentración de proteínas conocida, ir haciendo diluciones seriadas con la solución de trabajo utilizada para la

electroforesis de las proteínas en orina. En este caso se hicieron las siguientes diluciones de las muestras dializadas; 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, y el límite de detección mínima se estableció según la última dilución con una curva electroforética similar a la no diluida.

Con respecto a la verificación del error aleatorio (cálculo de la imprecisión), se realizaron los experimentos de *Repetibilidad y reproducibilidad*. Como material para dichos experimentos, se dializó y concentró la orina de un individuo sano siguiendo el proceso citado anteriormente. Se realizaron de dicha muestra 3 migraciones por día (repetibilidad), durante 5 días consecutivos (reproducibilidad), con el objetivo de calcular la media, desviación estándar y el coeficiente de variación, definido como el cociente entre la desviación estándar y la media, multiplicado por 100, intra-carrera e inter-día para cada una de las fracciones del proteinograma urinario. Para el experimento de reproducibilidad, las muestras se guardaron a 4°C durante los 5 días que duró el ensayo.

Con respecto a la verificación del error sistemático, no se pudo realizar el experimento de comparación de métodos, ya que no se dispone de ningún otro instrumento de electroforesis, ni hay publicaciones de experimentos similares en orina realizados en electroforesis capilar, por lo que no se pudo calcular el sesgo, y, por tanto, tampoco el error total admitido.

CONTROL DE CALIDAD DEL APARATO

Los controles de calidad del MiniCap Sebia se establecieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Previo a cada tanda de electroforesis capilar, se migró un suero canino diluido 1:49 en tampón de migración.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa informático R versión 3.4.3 (R Development Core Team, Viena, Austria), y para ejecutar los diferentes contrastes se utilizaron las librerías gráficas R Commander y los plugin correspondientes a la librería HH Ipsus. Se comprobó la hipótesis de normalidad para las diferentes muestras mediante el test de Anderson-Darling. En este trabajo los resultados se consideraron significativos con p-valores inferiores a 0,05. Los individuos de la muestra que no se incluyeron en la población de estudio por no cumplir con la normalidad fueron detectados mediante el gráfico box-plot y eliminados.

En el grupo G_0 cuando las variables tenían una distribución Gaussiana, el test ANOVA de una vía y la prueba de Tukey (95% CI) fueron utilizados para determinar si la edad, el sexo o el estado reproductivo, tenía alguna influencia en las diferentes fracciones del proteinograma.

La comparación de las distintas fracciones del proteinograma entre los tres grupos o sanos versus enfermos fue determinado mediante el test ANOVA de una vía.

En ambos casos se comprobó la igualdad de varianzas y el test ANOVA se utilizó bajo la hipótesis de varianzas iguales o no.

La determinación de si el valor del UPC presentaba diferencias significativas con respecto a las distintas fracciones del proteinograma urinario se realizó mediante regresión lineal.

La relación entre las distintas fracciones en suero y orina de un mismo individuo se determinó mediante regresión lineal.

CÁLCULO DE LOS INTERVALOS DE REFERENCIA (IR)

Los intervalos de referencia expresados en porcentajes y valores absolutos (mg/L) para el G₀ se obtuvieron utilizando el programa Reference Value Advisor v.2.0; Microsoft, mediante métodos no paramétricos ya que la población era suficientemente amplia. La información en relación a la distribución de los datos no fue necesaria ya que se utilizaron métodos no paramétricos. Los rangos de referencia (95%) fueron obtenidos con un intervalo de confianza del 90% (IC) para los límites de referencia de acuerdo con las guías de 2012 establecidas por la Sociedad Americana de Patología Clínica (ASVCP) (Friedrichs et al., 2012). El método de remuestreo *bootstrapping* fue utilizado cuando la población fue menor a 120. El análisis de partición en base a la edad y el estado reproductivo no pudo realizarse debido al bajo número de perros en cada subgrupo (<40). El análisis de partición según el sexo fue rechazado acorde a la puntuación z.

DETERMINACIÓN DE VALORES ATÍPICOS

Todos los valores atípicos de las diferentes fracciones de los intervalos de referencia se detectaron utilizando el programa Reference Value Advisor v.2.0; Microsoft. Los histogramas de valores de referencia para cada fracción del proteinograma de orina se evaluaron para identificar posibles valores atípicos. Así como métodos estadísticos, *Turkey's interquartile fences* y *Dixon's outlier range statistic*, se utilizaron para examinar los valores atípicos potenciales y verdaderos. Los valores atípicos que se consideraron observaciones aberrantes por quedar muy distantes del conjunto de datos se eliminaron, aunque se hizo hincapié en mantenerlos en lugar de eliminarlos siguiendo las recomendaciones de la ASVCP.

RESULTADOS

GRUPO PERROS SANOS (G₀)

ANAMNESIS Y EXPLORACIÓN FÍSICA

Se realizó una anamnesis de los todos los perros para descartar la presencia de enfermedades concurrentes, recientes o el tratamiento durante el mes anterior y en el momento del estudio, con fármacos que pudiesen alterar los valores analíticos, como por ejemplo diuréticos o corticosteroides.

La exploración física se centró en la evaluación de parámetros que pudiesen ser sugestivos de enfermedad renal crónica asociada o no a causas infecciosas; color e hidratación de mucosas, tiempo de relleno capilar, persistencia del pliegue cutáneo, palpación de ganglios linfáticos y evaluación del pulso femoral siendo normal en todos los individuos.

HEMOGRAMA

Los parámetros evaluados en el hemograma se encontraron dentro de los rangos establecidos por el laboratorio a excepción de un leve aumento del hematocrito en 33 del total de los individuos (26,82%), 19 de los cuales se encontraron en el grupo cachorro.

BIOQUÍMICA

Los parámetros evaluados en la bioquímica sérica se encontraron dentro de los rangos de referencia establecidos por el laboratorio, a excepción de un aumento de las proteínas totales en 8 de los 123 individuos (6,50%).

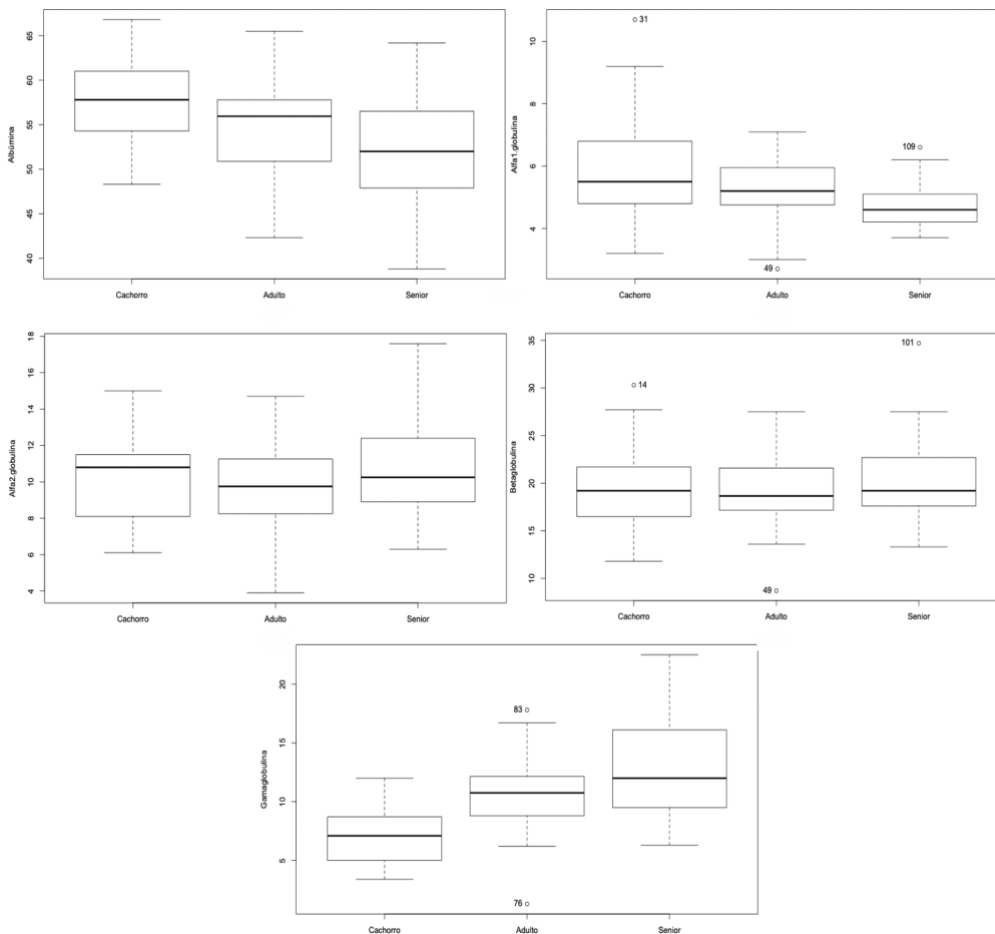
SEROLOGÍA

Todos los animales incluidos en el estudio obtuvieron títulos negativos o $<1/50$ para *Leishmania infantum*.

PROTEINOGRAMA

Los animales incluidos en el estudio obtuvieron valores dentro del rango de referencia para las diferentes fracciones (Figura 10), sin embargo, en 20 individuos (16,26%) pertenecientes al grupo senior fue común encontrar un aumento policlonal en la fracción gammaglobulina expresada en porcentaje.

Figura 10. Diagrama de Cajas de las Distintas Fracciones del Proteinograma Sérico en Relación a las Distintas Edades



URIANÁLISIS

TIRA COLORIMÉTRICA

Los individuos incluidos en el estudio presentaron resultados normales para todos los parámetros citados en la sección material y métodos.

DENSIDAD URINARIA

La densidad urinaria de todas las muestras se encontró dentro de rango o por encima del mismo. Con un valor mínimo de 1.025 y un máximo de 1.050 o superior.

CITOLOGÍA DEL SEDIMENTO URINARIO

El estudio del sedimento resultó normal a excepción de la citología en fresco de 7 individuos (5,69%), donde se encontraron pequeños cristales aislados de estruvita.

URINOCULTIVO

Todas las muestras obtenidas para el G₀ resultaron menores de 100.000 UFC/mL de orina.

UPC

Los valores de UPC de los individuos incluidos en el G₀, se encontraron entre 0,0 y 0,5 (Tabla 19 y 20).

Tabla 19. Relación Resultados de UPC e Individuos Pertenecientes a los Distintos Rangos de Edad

Número de individuos	No proteinúricos (0 – 0,2)	Proteinuria límite (0,2-0,5)
Cachorros	2 (22,76%)	5 (4,06%)
Adultos	51 (41,46%)	2 (1,62%)
Senior	31 (25,20%)	6 (4,87%)

Tabla 20. Relación Resultados de UPC e Individuos de Diferente Sexo.

Número individuos	No proteinúricos (0 – 0,2)	Proteinuria límite (0,2-0,5)
Machos	46 (37,39%)	8 (6,50%)
Hembras	63 (51,21%)	5 (4,06%)

La relación entre los resultados de UPC y el estado reproductivo no se realizó puesto que ese dato no se recogió en tres de los perros de totalidad de la población.

GRUPO DE ENFERMOS RENALES CRÓNICOS NO ASOCIADOS A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM (G₁)

POBLACIÓN INCLUIDA

Se incluyeron en este grupo 11 perros con enfermedad renal crónica y en diferentes estadios de enfermedad renal según la clasificación IRIS, en base a los niveles séricos de creatinina y cociente proteinuria/creatinuria (UPC) (Tabla 21). Los factores edad, sexo o estado reproductivo no se tuvieron en cuenta para este grupo, debido al escaso número de individuos que se pudieron incluir en el estudio.

Tabla 21. Clasificación de los 11 Individuos según el Estadio IRIS

Estadio	Número de individuos	Rango UPC
IRIS I	0	
IRIS II	4 (36,36%)	0,51 – 2,61
IRIS III	2 (18,18%)	0,92-1,5
IRIS IV	5 (45,45%)	0,52-4,67

HEMOGRAMA

6 de los 11 perros (54,54%) incluidos en este grupo presentaron anemia no regenerativa, normocrómica, normocítica, estos individuos se situaron dentro de un estadio IRIS 3 o 4. En uno de los 11 individuos (9,09%) no se pudo realizar el hemograma dada la dificultad para extraer muestra y la posterior muerte del paciente. El estudio del frotis sanguíneo reveló la presencia de efecto Rouleaux en 4 de los 10 individuos donde se realizó (40%).

BIOQUÍMICA

Todos los individuos incluidos en este grupo presentaron azotemia (Figura 11), es decir, elevaciones séricas de la concentración de creatinina $4,50 \pm 2,52$ [media, SD] y urea $241,90 \pm 109,98$ (Tabla 22).

Figura 11. Diagrama de Cajas del Total de la Población de Perros con Enfermedad Renal Crónica para los Valores de Creatinina y Urea

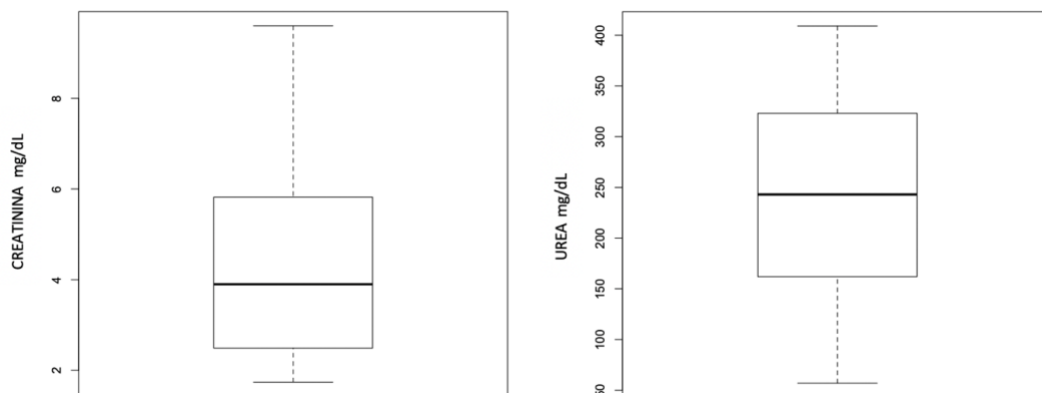


Tabla 22. Niveles de Creatinina y Urea Sérica de cada uno de los Individuos Incluidos en el G_1

Individuo	Creatinina (0,5-1,60 mg/dL)	Urea (18-60 mg/dL)
1	1,74	60
2	1,94	156
3	2,27	168
4	2,71	150
5	3,50	243
6	3,90	360
7	4,48	265
8	5,50	287
9	6,14	184

Individuo	Creatinina (0,5-1,60 mg/dL)	Urea (18-60 mg/dL)
10	7,74	409
11	9,60	379

SEROLOGÍA

Se realizó titulación de anticuerpos anti IgG para *Leishmania Infantum* en todos los individuos del grupo, incluyéndose solo aquellos con título negativo o <1/50.

PROTEINOGRAMA

De los 11 individuos evaluados 3 (27,27%) presentaron hipoalbuminemia en el proteinograma, debido a la gravedad de la nefropatía que presentaban, con un valor mínimo de 1,7 g/dL y un máximo de 2,2 g/dL.

URIANÁLISIS

TIRA COLORIMÉTRICA

Las alteraciones encontradas con más frecuencia respecto a los parámetros evaluados se describen en la siguiente tabla (Tabla 23).

Tabla 23. *Relación entre las Distintas Alteraciones de la Tira Colorimétrica y el Número de Individuos que las Presentan*

Parámetro	Sangre	Glucosa	Proteínas	Cuerpos cetónicos	Bilirrubina
N.º individuos	3/11	2/11	10/11	0/11	0/11
	(27,27%)	(18,18%)	(90,90%)	(0%)	(0%)

DENSIDAD URINARIA

La densidad urinaria de los animales evaluados fue en todos los casos inferior a 1.020 (Tabla 24).

Tabla 24. *Relación entre la Concentración de Orina y el Número de Individuos*

Densidad	Isostenúrica	Mínimamente concentrada
	(1.008-1.012)	(1.012-1.025)
N.º individuos	7/11 (63,63%)	3/11 (27,27%)

CITOLOGÍA SEDIMENTO

Dos del total de los individuos (18,18%) presentaron pequeños cristales de estruvita aislados, y en ninguno de los animales se observaron eritrocitos, leucocitos ni cilindros, así como flora bacteriana.

CULTIVO

Todos los cultivos resultaron menores de 100.000 UFC/mL.

UPC

Todos los individuos incluidos en el G₁ presentaron proteinuria en diferentes grados (Figura 12), con UPC de $1,87 \pm 1,44$ (Tabla 25).

Figura 12. Diagrama de Cajas del Total de la Población de Perros con Enfermedad Renal Crónica para el Ratio Proteína/creatinina en Orina

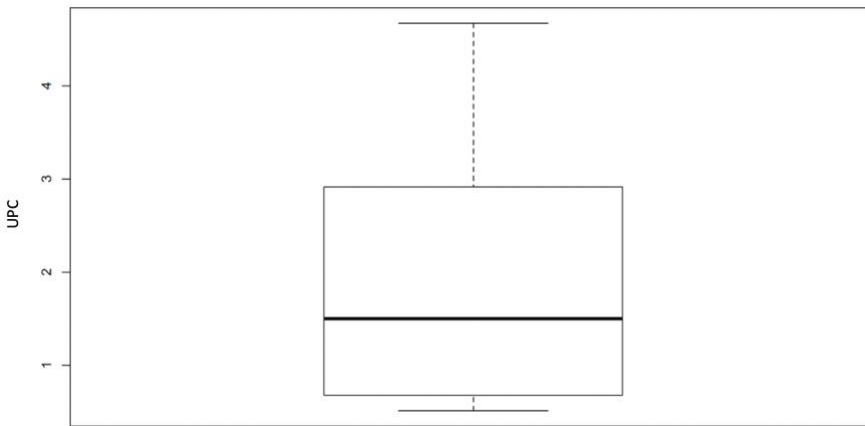


Tabla 25. Relación de Cada Individuo con su Grado de Proteinuria

Individuo	UPC >0,5
1	0,65
2	0,51
3	1,5
4	2,61
5	1,68
6	0,92
7	3,63
8	0,7

Individuo	UPC >0,5
9	0,52
10	3,22
11	4,67

GRUPO DE ENFERMOS RENALES ASOCIADOS A INFECCIÓN POR LEISHMANIA
INFANTUM (G₂)

POBLACIÓN INCLUIDA

Se incluyeron en este grupo 17 perros con enfermedad renal crónica y serología positiva para *Leishmania infantum* en diferentes estadios de la enfermedad según la clasificación propuesta por Solano – Gallego en 2011 en base a la serología, signos clínicos y hallazgos laboratoriales. Los factores edad, sexo o estado reproductivo no se tuvieron en cuenta para este grupo debido al escaso número de individuos disponibles (Tabla 26).

Tabla 26. Clasificación de los 17 Individuos según la Gravedad de la Enfermedad. Clasificación Propuesta por Solano-Gallego en 2011

Estadio	Número de individuos
I Enfermedad leve	0
II Enfermedad moderada	0
III Enfermedad grave	4 (23,52%)
IV Enfermedad muy grave	13 (76,47%)

Nota. Adaptada de la clasificación propuesta en LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis por Solano-Gallego L. et al. 2011, *Parasites and Vectors*, 4 (86).

HEMOGRAMA

De los 17 individuos 12 (70,58%) presentaron cambios en la serie roja. En 6 (50%) de estos 12 individuos, se detectó en el frotis sanguíneo la presencia de más de 2-3 policromatófilos por campo de 100x, asociada a regeneración medular. En 5 (41,66%) de los 12 individuos, se detectó efecto Rouleaux en el estudio del frotis sanguíneo compatible con aumento de las globulinas (Tabla 27).

Tabla 27. Características del Hemograma de los Perros con Anemia en el Grupo de Perros con Enfermedad Renal Asociada a Infección por *Leishmania infantum*

Individuo	Gravedad (Hematocrito)	Policromatófilos	Efecto Rouleaux
1	Leve ^a	Si	Si
2	Leve	No	No
3	Moderada ^b	Si	No
4	Moderada	Si	Si
5	Moderada	No	No
6	Moderada	No	Si
7	Leve	Si	Si
8	Leve	No	Si
9	Severa ^c	Si	No
10	Leve	Si	No
11	Leve	No	No
12	Moderada	No	No

Nota. ^aLeve (30-37%); ^bmoderada (20-29%); ^csevera (13-19%).

Todos los individuos incluidos en este grupo presentaron azotemia (Figura 13), es decir, elevaciones séricas de la concentración de creatinina $3,56 \pm 1,75$ y urea $200,23 \pm 107,60$ (Tabla 28).

Figura 13. Diagrama de Cajas del Total de la Población de Perros con Enfermedad Renal Asociada a *Leishmania infantum* para los Valores de Creatinina y Urea

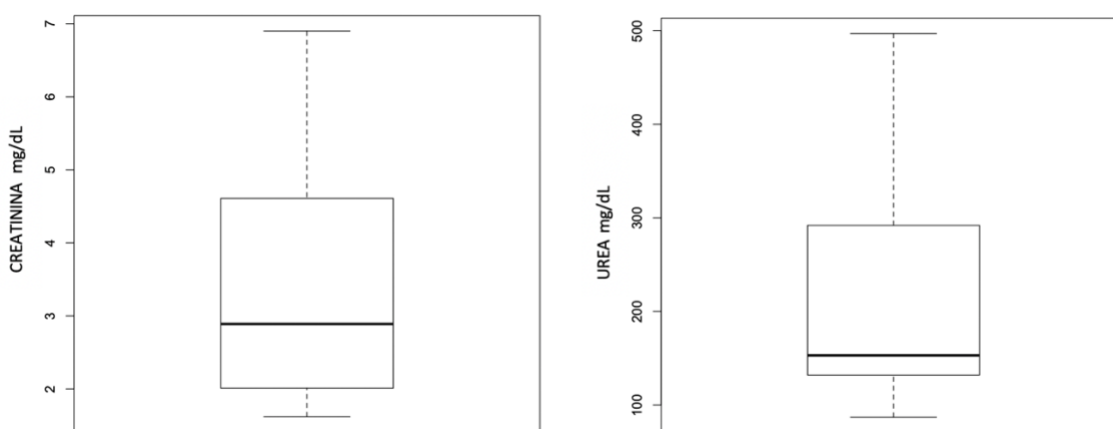


Tabla 28. Niveles de Creatinina y Urea Sérica de Cada uno de los Individuos Incluidos en el G₂

Individuo	Creatinina (0,5 – 1,60 mg/dL)	Urea (18 - 60 mg/dL)
1	1,62	102
2	1,64	98
3	1,70	137
4	1,80	153
5	2,01	87
6	2,10	149
7	2,64	112
8	2,80	132

Individuo	Creatinina (0,5 – 1,60 mg/dL)	Urea (18 - 60 mg/dL)
9	2,89	149
10	4,22	278
11	4,40	315
12	4,60	168
13	4,61	228
14	4,93	202
15	4,99	296
16	6,81	301
17	6,90	497

SEROLOGÍA

Todos los individuos incluidos en este grupo presentaron títulos positivos a *Leishmania infantum*, siendo el punto de corte de 1/100, y presentando la mayoría de ellos un título mayor o igual a 4 veces el título de corte (Tabla 29).

Tabla 29. Relación entre Título de Anticuerpos frente a *Leishmania infantum* y Número de Individuos

Título	1/200	1/400
Número individuos	3/17	14/17
%	(17,64%)	(82,35%)

PROTEINOGRAMA SÉRICO

La alteración presente en todos los individuos (100%) de este grupo fue un aumento policlonal de las gammaglobulinas. Del total de individuos de este grupo, 10 (58,82%) presentaron también valores por debajo del rango de referencia en la fracción albúmina.

URIANÁLISIS

TIRA COLORIMÉTRICA

Las alteraciones encontradas con más frecuencia respecto a los parámetros evaluados se describen en la siguiente tabla (Tabla 30).

Tabla 30. *Relación entre los Resultados de la Tira Colorimétrica y el Número de Individuos*

Parámetro	Sangre	Leucocitos	Glucosa	Proteínas	Cuerpos cetónicos	Bilirrubina
N.º individuos	9/17	2/17	4/17	17/17	0/11	0/11
%	(52,94%)	(11,76%)	(23,59%)	(100%)	(0%)	(0%)

DENSIDAD URINARIA

La densidad de los animales evaluados fue en todos los casos inferior a 1.020, excepto en un individuo donde fue de 1.026 (Tabla 31).

Tabla 31. Relación entre la Concentración de Orina y el Número de Individuos

Densidad urinaria	Isostenúrica (1.008-1.012)	Mínimamente concentrada (1.012-1.025)	Concentrada (>1.025)
Número individuos	5/17	11/17	1/17
%	(29,41%)	(64,70%)	(5,88%)

CITOLOGÍA

Un individuo (5,88%) presentó pequeños cristales de estruvita aislados. Dos individuos (11,76%) presentaron bacteriuria, aunque el cultivo de estos individuos se dio como negativo, al presentar un número de colonias de menos de 100.000 UFC/mL y teniendo en cuenta que la orina se obtuvo por micción espontánea. En la citología en 3 (17,64%) de los 17 individuos se evidenciaron 1-5 leucocitos por campo de 40x, considerándose un hallazgo no patológico en una citología en la que se ha concentrado la orina mediante centrifugación.

CULTIVO

Todos los cultivos resultaron menores de 100.000 UFC/mL.

UPC

Todos los individuos incluidos en el G₂ presentaron proteinuria (Figura 14) $3,15 \pm 2,99$ en diferentes grados (Tabla 32).

Figura 14. Diagrama de Cajas del Total de la Población de Perros con Enfermedad Renal Asociada a *Leishmania infantum* para el Ratio Proteína/creatinina en Orina

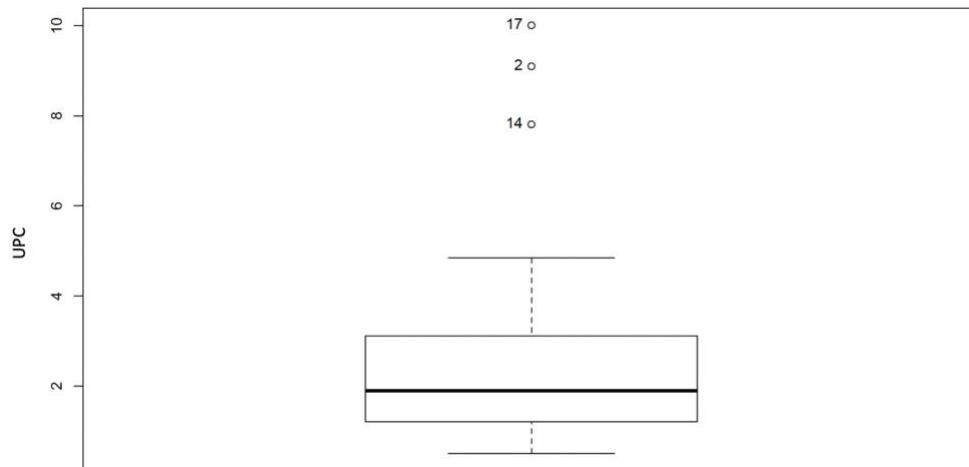


Tabla 32. Relación de cada Individuo con Enfermedad Renal Asociada a Infección por *Leishmania infantum* con su Grado de Proteinuria

Individuo	UPC
1	0,9
2	2,75
3	1,86
4	0,54
5	1,46
6	3,11
7	1,05
8	9,1
9	0,77

Individuo	UPC
10	1,89
11	1,2
12	2,82
13	4,84
14	10,01
15	2,06
16	7,81
17	1,43

ELECTROFORESIS CAPILAR URINARIA

SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES URINARIAS

La separación de las diferentes fracciones del proteinograma fue realizada siempre por la misma persona (Paula Navarro) y las divisiones se realizaron en base a la superposición de la curva control (suero canino diluido 1:49) en la curva a estudiar, tanto en muestras de perros sanos como en muestras de animales enfermos (Figuras 15-18).

Figura 15. Suero Canino Diluido 1:49 Migrado en el Minicap en el Modo Orina Utilizado Como Control

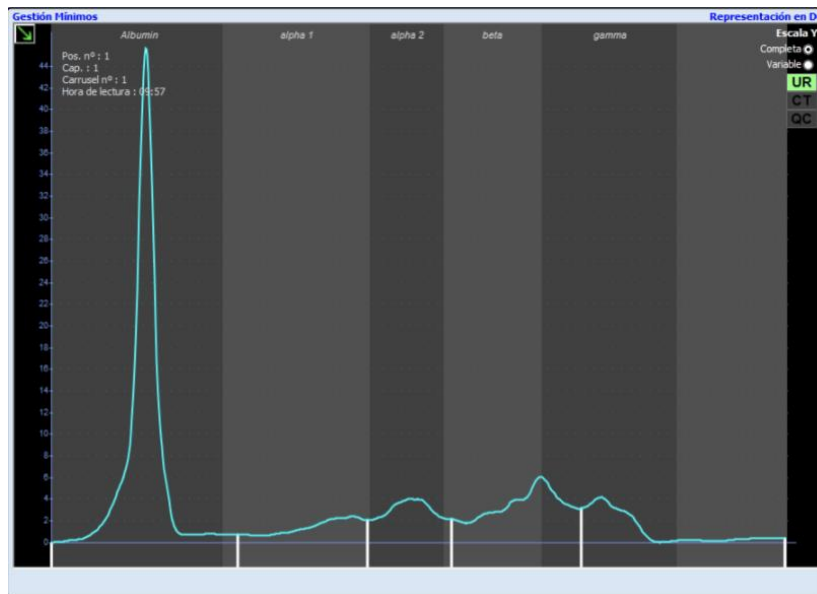
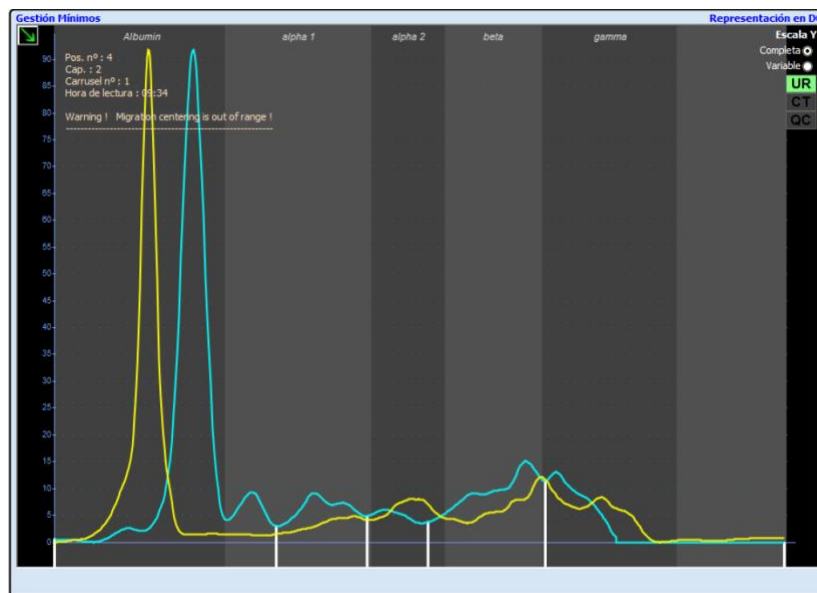
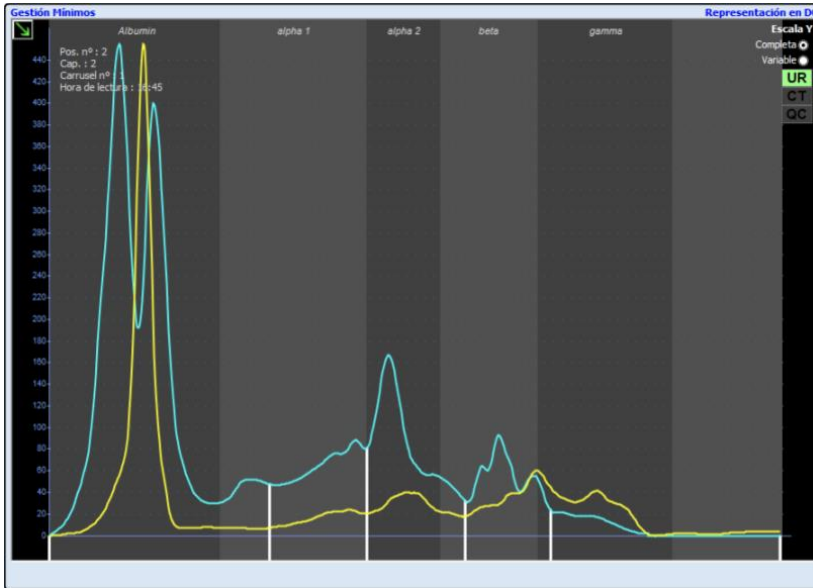


Figura 16. Superposición Suero Canino Diluido 1:49 con Curva de Individuo Sano (G_0).



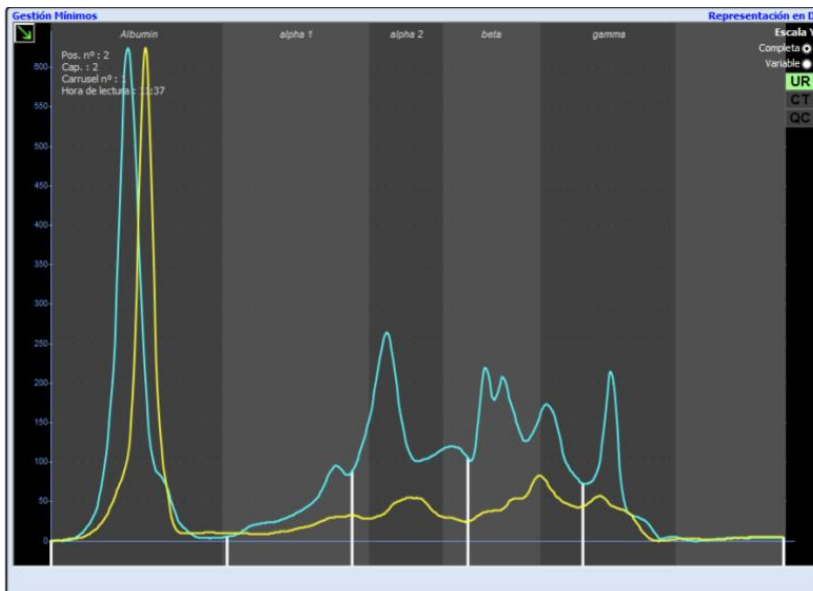
Nota. La línea amarilla representa la curva control. La línea azul representa la orina.

Figura 17. Superposición Suero Canino Diluido 1:49 con Curva de Individuo Enfermo Renal Crónico (G_1)



Nota. La línea amarilla representa la curva control. La línea azul representa la orina.

Figura 18. Superposición Suero Canino Diluido 1:49 con Curva de Individuo Enfermo Renal por *Leishmania infantum* (G_2)



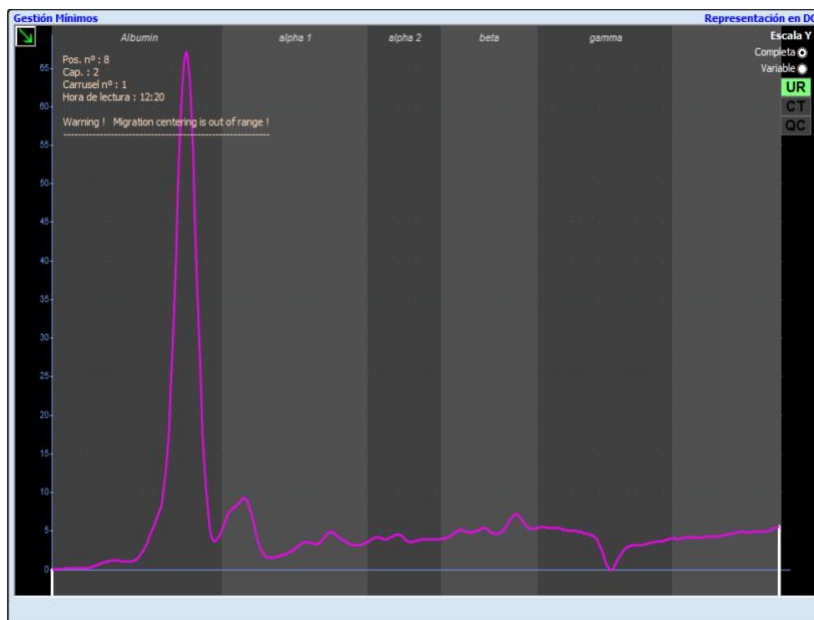
Nota. La línea amarilla representa la curva control. La línea azul representa la orina.

VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA

Experimento detección límite inferior

La concentración inicial de proteínas totales de la orina a analizar fue de 17,5 mg/L. El instrumento pudo realizar la electroforesis sin incidencias hasta la dilución 1:8 (Figura 19), por lo que la detección mínima se estableció en 2,1 mg/L.

Figura 19. *Detección Mínima Proteínas Dilución 1:8 (2,1 mg/L)*



Nota. Orina dializada de un perro sano hembra esterilizada de 6 años de la raza Golden Retriever.

Experimentos de reproducibilidad y repetibilidad

Los coeficientes de variación de cada una de las fracciones obtenidos por día (CV_D) y totales (CV_T) están reflejados en la siguiente tabla (Tabla 33). Todos los resultados fueron inferiores o igual al 10%. En la figura 20 se pueden observar las 3 migraciones de la orina durante 5 días.

Tabla 33. Resultados Experimento Repetibilidad y Reproducibilidad (F1-F5) Obtenidos para el Instrumento*Minicap en Orina de Perro*

F1	R1(%)	R2(%)	R3(%)	CV_D(%)	CV_T(%)
Día 1	54	53,2	54	0,86	4,77
Día 2	45,3	49,8	55	9,70	
Día 3	54,2	52,1	53,5	2,00	
Día 4	53,5	53,4	51,3	2,35	
Día 5	54,8	53,2	55,3	2,01	

F2	R1(%)	R2(%)	R3(%)	CV_D(%)	CV_T(%)
Día 1	9,6	9,6	9,7	0,60	5,72
Día 2	11,2	11,2	9,6	8,66	
Día 3	10,5	9,9	9,4	5,54	
Día 4	10,9	10,4	10,1	3,86	
Día 5	10,1	10	10,1	0,57	

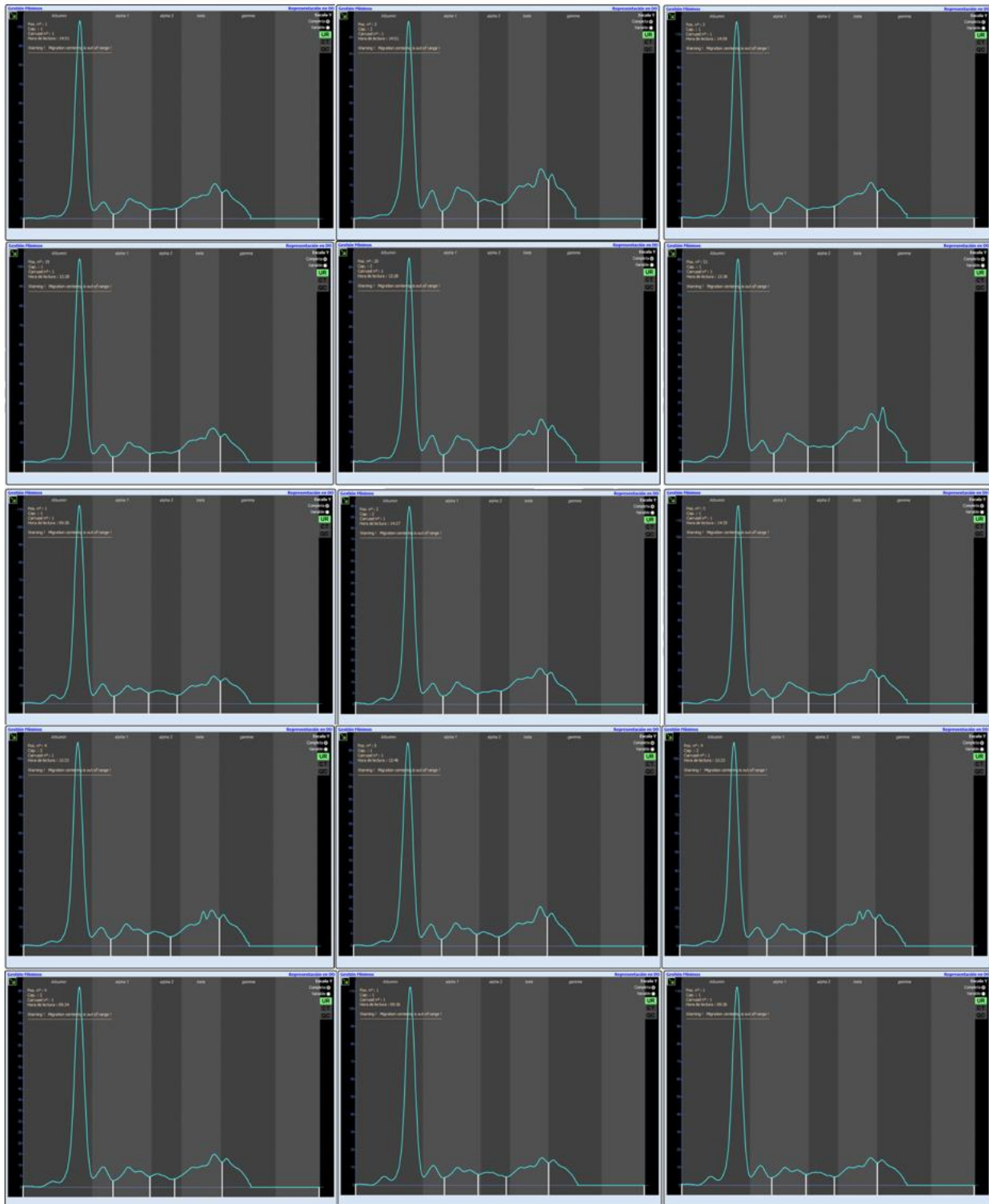
F3	R1(%)	R2(%)	R3(%)	CV_D(%)	CV_T(%)
Día 1	5,8	5,7	5,2	5,77	10
Día 2	6,8	5,7	5,8	9,97	
Día 3	5,2	5,6	4,9	6,71	
Día 4	5,1	5	5,2	1,96	
Día 5	6,6	5,9	5,2	11,86	

F4	R1(%)	R2(%)	R3(%)	CV_D(%)	CV_T(%)
Día 1	20,6	21	21	1,10	6,09
Día 2	23,3	22,2	20	7,69	
Día 3	20,3	22,2	22,1	4,96	
Día 4	19,5	21,2	21,2	4,75	
Día 5	18,6	20	19,3	3,62	

F5	R1(%)	R2(%)	R3(%)	CV_D(%)	CV_T(%)
Día 1	10	10,5	10,1	2,59	9,66
Día 2	13,4	11,1	9,6	16,83	
Día 3	9,8	10,2	10,1	2,07	
Día 4	11	10	12,2	9,95	
Día 5	9,9	10,9	10,1	5,13	

Nota. CV_D= Coeficiente de Variación Diario; CV_T= Coeficiente de Variación Total; R= Repetición.

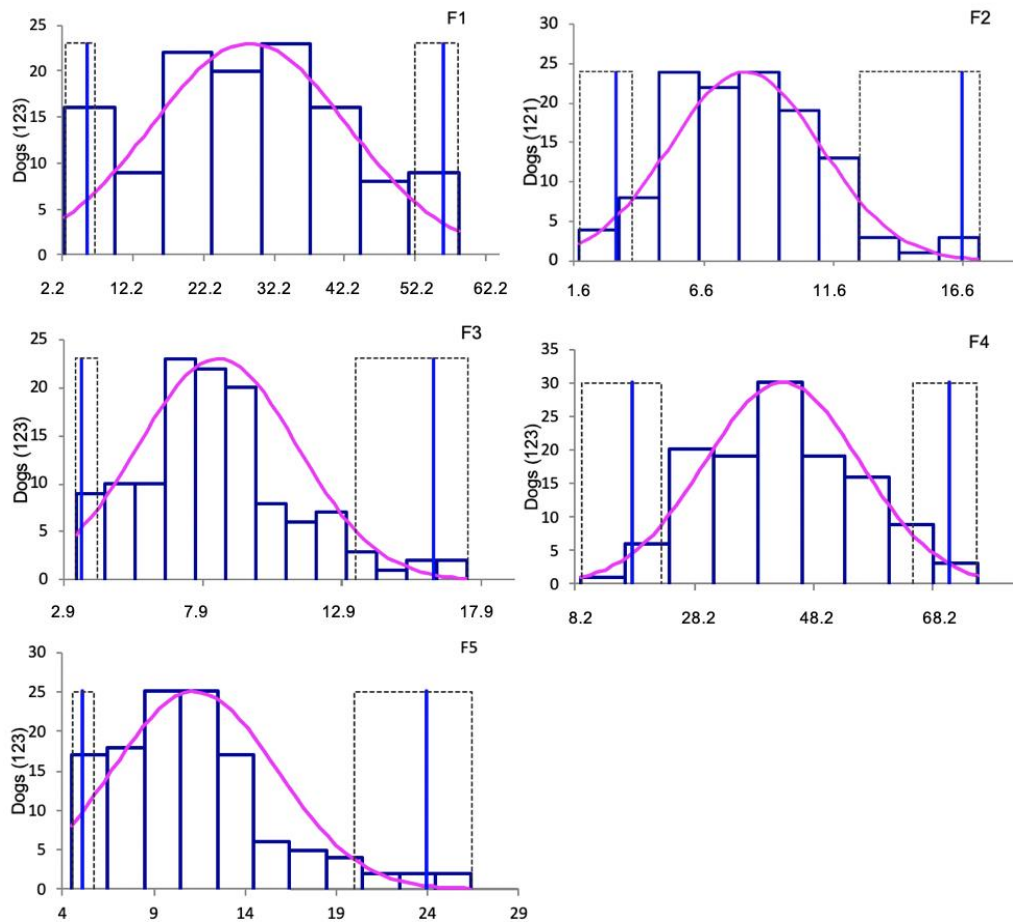
Figura 20. Curvas Obtenidas en el Experimento de Repetibilidad



ELIMINACIÓN DE VALORES ANORMALES PARA EL CÁLCULO DE LOS RANGOS DE REFERENCIA EN PORCENTAJE

Un total de 2 valores anormales correspondientes a las F2 fueron eliminados del total de individuos sanos (n=123), para el posterior cálculo de los rangos de referencia (Figura 21).

Figura 21. Histogramas Representativos de la Distribución de las Distintas Fracciones (1-5) en Porcentajes mediante Electroforesis Capilar en orina Dializada de 123 Perros Sanos



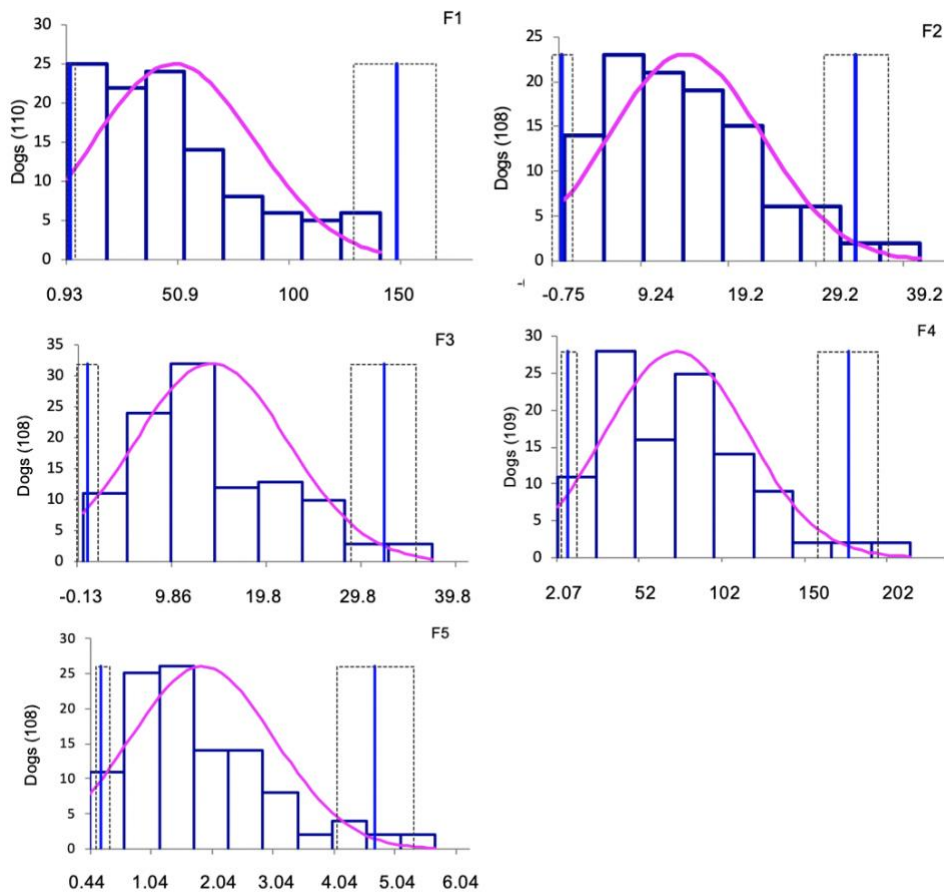
Nota. Dos valores anormales fueron eliminados de F2. Los valores en el eje de las X están dados en porcentajes.

Los cuadros líneas discontinuas representan los ICs al 90% de los límites superior e inferior del IR para cada fracción.

ELIMINACIÓN VALORES ANORMALES PARA EL CÁLCULO DE RANGOS DE REFERENCIA EN VALORES ABSOLUTOS

Se eliminaron un total de 13 individuos de la totalidad de la población porque no se disponía en ellos de valores completos de UPC para el cálculo de valores absolutos (n=110). Se eliminaron 2 individuos de las fracciones F2, F3 y F5, y un individuo de la F4 (Figura 22) por presentar valores anormales mediante la inspección de histogramas y el método de Tukey.

Figura 22. Histogramas Representativos de la Distribución de las Distintas Fracciones (1-5) en Valor Absoluto (mg/L) mediante Electroforesis Capilar en Orina Dializada de 110 Perros Sanos



Nota. Dos valores anormales fueron eliminados de F2, F3 y F5 y un valor anormal fue eliminado de F4. Los valores en el eje de las X están dados en mg/L. Los cuadros líneas discontinuas representan los ICs al 90% de los límites superior e inferior del IR para cada fracción.

RANGOS DE REFERENCIA POBLACIÓN PERROS SANOS (G₀) EN PORCENTAJE

Se obtuvieron rangos de referencia con un intervalo de confianza (IC) del 90% (Tabla 34), utilizando el total de la población (n=123) para cada una de las fracciones, excepto en F2 donde dos valores anormales fueron eliminados.

Tabla 34. Rangos de Referencia (90% CI) en Porcentaje para las Diferentes Fracciones Proteicas Urinarias Obtenidas Mediante Electroforesis Capilar Utilizando MiniCap Sebia

Analito	Unidad	n	Media	SD	Mediana	IQR	Min	Max	RR	LBR	LAR	Distribución poblacional	Método de cálculo estadístico
										90% IC	90% IC		
F1	%	123	28,7	14,0	27,0	19,6–39,2	2,5	58,3	5,54–56,2	2,50–6,70	52,2–58,3	Gausiana	NP
F2	%	121	8,19	2,91	8,10	6,2–9,9	1,8	17,2	3,21–16,5	1,80–3,80	12,6–17,2	Gausiana	NP
F3	%	123	8,41	2,87	8,10	6,6–9,6	3,3	17,4	3,51–16,2	3,30–4,10	13,4–17,4	No-Gausiana	NP
F4	%	123	43,0	13,0	42,5	33,2–51,7	9,2	75,7	17,8–69,8	9,20–22,7	65,0–75,7	Gausiana	NP
F5	%	123	11,2	4,48	10,5	8,05–13,1	4,5	26,4	5,11–23,9	4,50–5,70	20,0–26,4	No-Gausiana	NP

Nota. n = número de perros; IC= intervalo de confianza; IQ= rango intercuartílico; LAR= límite alto de referencia; LBR= límite bajo de referencia; NP= no paramétrico; RR= rango de referencia.

RANGOS DE REFERENCIA POBLACIÓN PERROS SANOS (G₀) EN VALORES ABSOLUTOS

Se obtuvieron rangos de referencia utilizando el total de la población (n=110) para cada una de las fracciones, excepto en F2, F3 y F5 donde dos valores fueron eliminados y F4 donde un valor fue eliminado, con un intervalo de confianza (IC) del 90% (Tabla 35).

Tabla 35. Rangos de referencia (90% CI) en Valores Absolutos para las Diferentes Fracciones Proteicas Urinarias Obtenidas mediante Electroforesis Capilar Utilizando MiniCap Sebia

Analito	Unidad	n	Media	SD	Mediana	IQR	Min	Max	RR	LBR	LAR	Distribución poblacional	Método de cálculo estadístico
										90% IC	90% IC		
F1	mg/L	110	4,92	3,63	4,38	2,06–6,82	1,1	141	2,49–138	11,1–42,0	131–142	No Gaussiana	NP
F2	mg/L	108	1,43	0,87	1,29	0,80–1,95	0,64	41,0	0,87–36,3	0,64–2,21	31,0–41,0	No Gaussiana	NP
F3	mg/L	108	1,40	0,81	1,25	0,84–1,93	0,46	37,3	1,23–33,5	0,46–2,29	29,0–37,3	No Gaussiana	NP
F4	mg/L	109	7,45	4,30	7,35	4,35–10,18	2,30	216	6,68–182	2,30–16,7	154–216	No Gaussiana	NP
F5	mg/L	108	1,88	1,18	1,64	1,02–2,39	0,49	57,1	2,32–51,5	0,49–4,69	452–57,1	No Gaussiana	NP

Nota. n = número de perros; IC= intervalo de confianza; IQ= rango intercuartílico; LAR= límite alto de referencia; LBR= límite bajo de referencia; NP= no paramétrico; RR= rango de referencia.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES INTRÍNSECOS EN INDIVIDUOS SANOS (G₀)

Se determinó si los factores individuales de cada uno de los individuos como la edad, el sexo y el estado reproductivo eran factores estadísticamente significativos para alguna de las fracciones.

La edad fue un factor significativo en el proteinograma para las fracciones F2 y F3, donde se encontró disminuido en cachorros en comparación con el grupo adultos y senior (Tabla 36). En el caso del sexo se encontraron diferencias significativas para la fracción F1, donde se vio aumentada en el grupo hembras en comparación con el de machos (Tabla 37). En relación al estado reproductivo, entero/a, castrado o esterilizada, no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las 5 fracciones del proteinograma urinario.

Tabla 36. Efectos de la Edad en el Proteinograma Obtenido mediante Porcentajes en Orina Dializada Canina mediante Electroforesis Capilar Evaluado con ANOVA Unidireccional (Test de Tukey Post Hoc con 95% de Intervalo de Confianza)

Analito	n	Factor	Media	SD	p valor *
F2	121	Cachorro	6,87	2,37	0,01
		Adulto	8,55	2,37	
		Senior	8,85	3,62	
F3	122	Cachorro	7,23	2,35	0,02
		Adulto	8,85	2,79	
		Senior	8,53	2,84	

Nota. n=123 perros (33 cachorros, 53 adultos, 37 senior excepto cuando los valores anormales fueron excluidos); el test de normalidad fue realizado utilizando el test de Anderson-Darling (ajustado mediante el método Holm). ANOVA análisis de varianza, SD desviación estándar.

* significancia de p-valor <0,05

Tabla 37. Efectos del Sexo en el Proteinograma Obtenido Mediante Porcentajes en Orina Dializada

Canina mediante Electroforesis Capilar Evaluado con ANOVA Unidireccional (Test de Tukey Post Hoc con 95% de Intervalo de Confianza)

Analito	n	Factor	Media	SD	p-valor*
F1	123	Macho	25,6	14,3	0,03
		Hembra	31,1	13,6	

Nota. n=123 perros (69 hembras, 54 machos excepto cuando los valores anormales fueron excluidos); el test de normalidad fue realizado utilizando el test de Anderson-Darling (ajustado mediante el método Holm) con ANOVA análisis de varianza, SD desviación estándar.

* significancia de p-valor <0,05

COMPARACIÓN FRACCIONES URINARIAS DE INDIVIDUOS SANOS FRENTE A ENFERMOS

COMPARATIVA ENTRE SANOS (G_0) Y ENFERMOS TOTALES (G_1 Y G_2)

Se realizó una comparación entre la totalidad de individuos sanos (n=123) y la totalidad de individuos enfermos, independientemente del origen de la enfermedad renal (n= 28) de las diferentes fracciones urinarias para comprobar si existían diferencias significativas en alguna de las fracciones. No se han hallado diferencias estadísticamente significativas para las fracciones F1 y F5, pero si para las fracciones F2, F3 donde se evidenció un aumento en el grupo de enfermos totales respecto a la población sana y la F4 que se encontró disminuida respecto a la población sana (Tabla 38). Visualmente, mediante la gráfica comparativa de medias se aprecian desigualdades evidentes en las 5 fracciones (Figura 23).

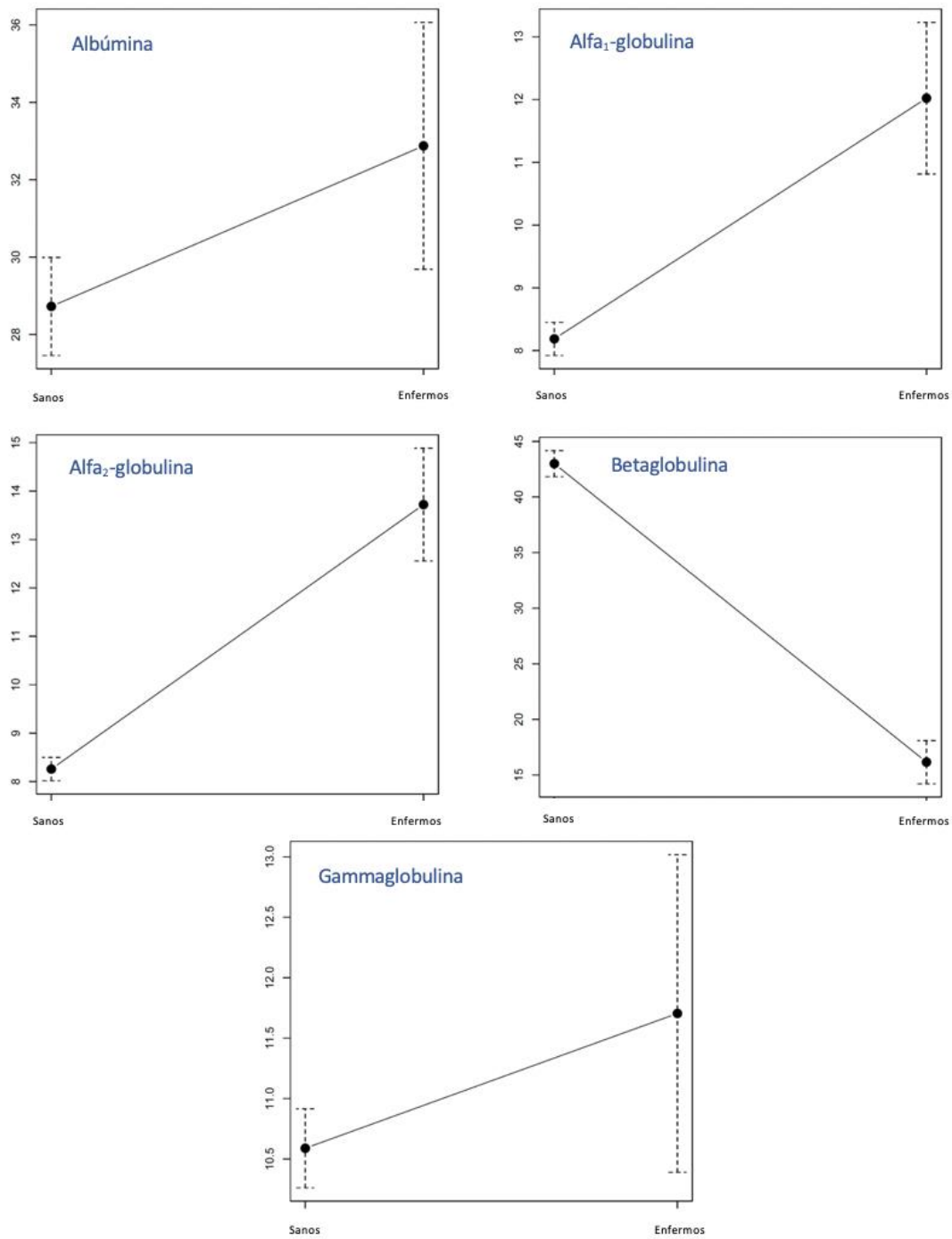
Tabla 38. Comparativa Mediante ANOVA Unidireccional de las Diferentes Fracciones del Proteinograma Urinario entre el Grupo de Perros Sanos Frente a la Totalidad de Animales con Patología Renal. (Test de Tukey Post Hoc con 95% de Intervalo de Confianza).

Analito	n	Factor	Media	SD	p-valor*
F2	147	Sanos	8,18	2,90	0,00
		Enfermos	12,02	6,16	
F3	149	Sanos	8,25	2,65	0,00
		Enfermos	13,72	6,17	
F4	148	Sanos	42,99	13,01	0,00
		Enfermos	16,16	9,68	

Nota. n=151 perros (123 sanos, 28 enfermos excepto cuando los valores anormales fueron excluidos); el test de normalidad fue realizado utilizando el test de Anderson-Darling. ANOVA análisis de varianza, SD desviación estándar.

* significancia de p-valor <0,05

Figura 23. Gráfico de Medias para cada una de las Fracciones del Proteinograma Urinario Comparando el Grupo de Animales Sanos con la Totalidad de Animales Enfermos



COMPARATIVA ENTRE INDIVIDUOS SANOS (G_0) Y ENFERMOS RENALES CRÓNICOS (G_1) Y
ENFERMOS RENALES ASOCIADOS A INFECCIÓN POR LEISHMANIA INFANTUM (G_2)

Se realizó una comparación entre los tres grupos de estudio de las diferentes fracciones del proteinograma. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas para la fracción F1, pero si para la fracción F2 que se encontró aumentada para el G_1 , la fracción F3 evidenció un aumento para la población G_1 y G_2 respecto a la población sana, la fracción F4 que se encontró disminuida en ambas poblaciones de animales enfermos y la fracción F5 donde resultó estar aumentada en la población de enfermos renales asociados a *Leishmania infantum* (Tabla 39). Visualmente, mediante la gráfica de medias comparativa de los tres grupos se aprecian desigualdades evidentes (Figura 24).

Tabla 39. Comparativa mediante ANOVA Unidireccional de las Diferentes Fracciones del Proteinograma Urinario entre el Grupo de Perros Sanos Frente al Grupo Enfermos Renales Crónicos y al Grupo Renales por *Leishmania infantum* (Test de Tukey Post Hoc con 95% de Intervalo de Confianza)

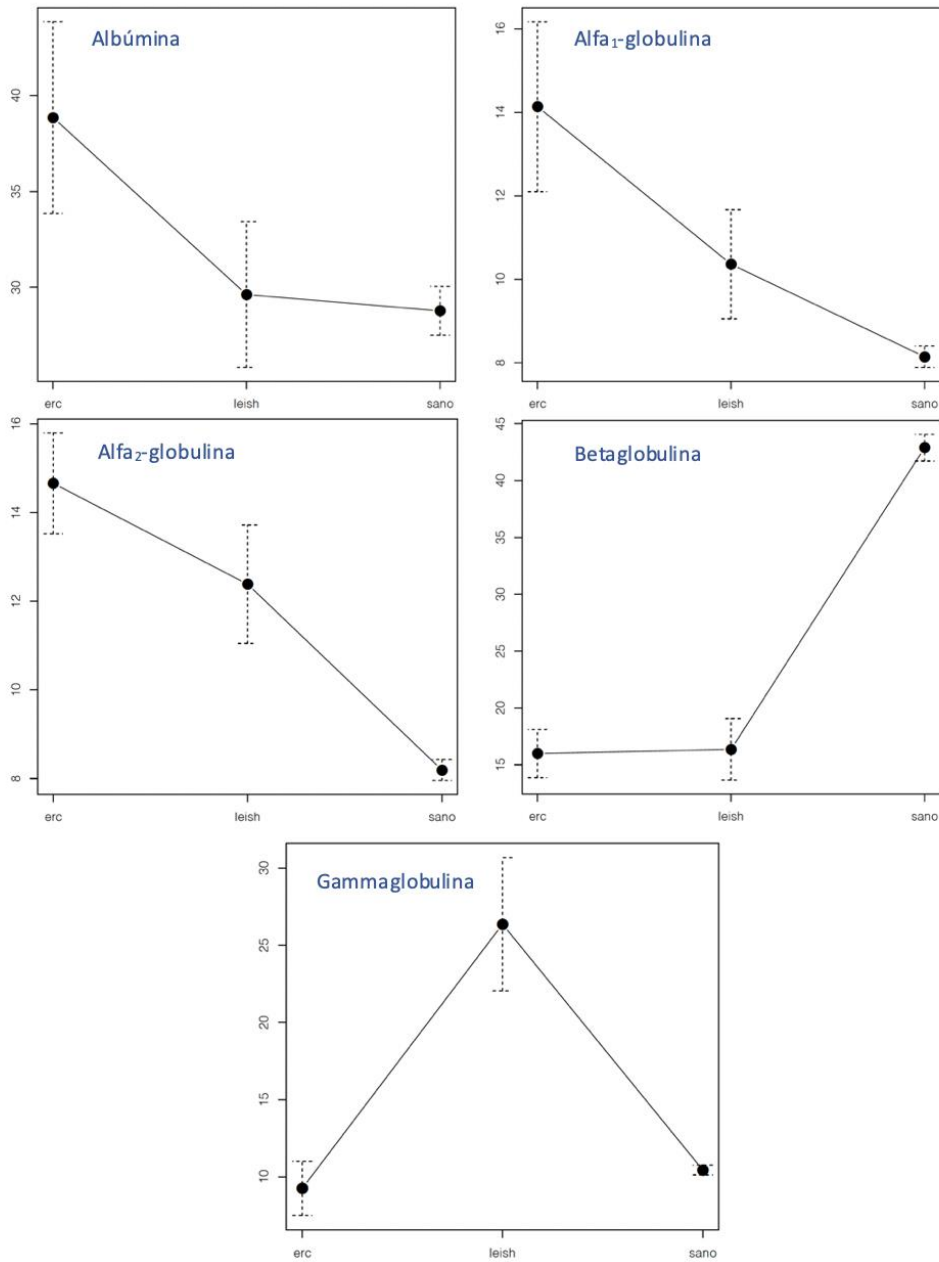
Analito	n	Factor	Media	SD	p-valor*
F2	146	Sano	8,18	2,90	0,00
		ERC	15,53	2,94	
		Leishmania	9,60	6,05	
F3	149	Sano	8,25	2,65	0,00
		ERC	13,25	3,50	
		Leishmania	12,44	5,34	
F4	151	Sano	42,99	13,01	0,00
		ERC	23,92	13,56	
		Leishmania	22,95	13,86	

Analito	n	Factor	Media	SD	p-valor*
F5	144	Sano	10,50	3,43	0,00
		ERC	7,80	5,74	
		Leishmania	22,48	13,77	

Nota. n=151perros (123 sanos, 11 enfermedad renal crónica, 17 *Leishmania infantum* excepto cuando los valores anormales fueron excluidos); el test de normalidad fue realizado utilizando el test de Anderson-Darling. ANOVA análisis de varianza, SD desviación estándar.

* significancia de p-valor <0,05

Figura 24. Gráfico de Medias para cada una de las Fracciones del Proteinograma Urinario Comparando los tres Grupos de Estudio



RELACIÓN DEL RATIO PROTEÍNA CREATININA EN ORINA (UPC) CON LAS DISTINTAS
FRACCIONES EN LOS INDIVIDUOS PERTENECIENTES A G₁ Y G₂.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las distintas fracciones del proteinograma urinario de perros del grupo G₁ y el UPC (Tabla 40).

Tabla 40. Relación entre las Distintas Fracciones del Proteinograma Urinario de Perros con Enfermedad Renal Crónica (G₁) y UPC

Fracción G ₁	p-valor*
F1	0,972
F2	0,919
F3	0,660
F4	0,914
F5	0,609

* significancia de p-valor <0,05

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las distintas fracciones del proteinograma urinario de perros con enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum* (G₂) y el UPC (Tabla 41).

Tabla 41. Relación entre las Distintas Fracciones del Proteinograma Urinario de Perros con Enfermedad Renal Asociada a *Leishmania infantum* (G₂) y UPC

Fracción G ₂	p-valor*
F1	0,641
F2	0,072
F3	0,283
F4	0,228
F5	0,269

* significancia de p-valor <0,05

RELACIÓN ENTRE LAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA EN SUERO CON LAS FRACCIONES DEL PROTEINOGRAMA EN ORINA

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las distintas fracciones del proteinograma urinario y sérico de perros con enfermedad renal crónica (G₁) (Tabla 42).

Tabla 42. Relación entre las Distintas Fracciones del Proteinograma Urinario y Sérico de Perros con Enfermedad Renal Crónica (G₁).

Fracción G ₁	p-valor*
F1	0,565
F2	0,576
F3	0,407
F4	0,310
F5	0,209

* significancia de p-valor <0,05

No se encontró relación estadísticamente significativa entre las distintas fracciones del proteinograma urinario y sérico de perros con enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum* (G₂) (Tabla 43).

Tabla 43. *Relación entre las Distintas Fracciones del Proteinograma Urinario y Sérico de Perros con Enfermedad Renal Asociada a Leishmania infantum (G₂).*

Fracción G₂	p-valor*
F1	0,618
F2	0,715
F3	0,366
F4	0,646
F5	0,055

* significancia de p-valor <0,05

DISCUSIÓN

ESTUDIO EN LA POBLACIÓN DE PERROS SANOS (G₀)

ALTERACIONES LABORATORIALES

En la evaluación laboratorial de la población de estudio, algunos individuos sanos presentaron anomalías incluyéndose de igual manera en el estudio por no considerarse elementos que pudiesen afectar a los resultados del proteinograma urinario. Así pues, 33 de los 123 de los perros incluidos, mayoritariamente en el grupo de cachorros, presentaron un aumento en el valor hematocrito y en el valor de proteínas totales, relacionándose estos cambios con hemoconcentración asociada a un estado de ligera deshidratación por el ayuno requerido para la extracción sanguínea (Atata et al., 2019) o un aumento en el valor del hematocrito relacionado con la contracción esplénica relacionada a situaciones de estrés (Nitsche, 2004). Con respecto al proteinograma sérico, en el grupo senior o mayores de 8 años, se detectaron aumentos en la fracción gammaglobulina de algunos individuos. Dado que esta fracción proteica aumenta entre otras causas por procesos inflamatorios crónicos (Lee et al., 2020; Tothova et al., 2016), dichas elevaciones podrían deberse a patologías normales en este rango de edad, como enfermedad periodontal o enfermedad degenerativa articular, como se comprobó que padecían muchos de los individuos de este subgrupo durante el examen clínico.

Del mismo modo, 7 de los 123 individuos presentaron una leve cristaluria (cristales de estruvita de pequeño tamaño) en la citología urinaria en fresco. La hipótesis planteada es que, tras la refrigeración, el cambio de pH de la muestra y el tiempo transcurrido entre recolección e inspección de la misma, se produjo una leve precipitación de cristales de este tipo (Albasan et al., 2003).

Todas las muestras presentaron un UPC menor a 0,5 según los criterios IRIS para perros no proteinúricos (Lees et al., 2005).

Varios estudios en medicina veterinaria han utilizado métodos electroforéticos analíticos como la electroforesis en gel de agarosa (PAGE/SDS-PAGE) o electroforesis de alta resolución (EAR) para la identificación de los patrones de migración de las diferentes proteínas contenidas en la orina tanto de animales sanos como proteinúricos. Solo un estudio reciente ha utilizado la electroforesis capilar asociada a la espectrofotometría de masas (CE-MS) para la identificación de biomarcadores renales, demostrando la existencia de 133 péptidos distintos en perros sanos respecto a perros con ERC (Pelander et al., 2019). Estudios cualitativos han sido llevados a cabo en animales con enfermedad renal en diferentes estadios de la patología, principalmente en busca de biomarcadores tempranos, como la proteína transportadora de la vitamina D o la proteína transportadora de retinol (Chacar et al., 2017). Otro estudio fue realizado en perros con enfermedad renal con el objetivo de diferenciar patrones característicos de daño renal tubular o glomerular mediante SDS-PAGE (Schultze y Jensen, 1989). Siguiendo estas líneas, un estudio comparó patrones obtenidos en orina mediante SDS-PAGE con lesiones histológicas renales (Zini et al., 2004). Utilizando electrotransferencia, otro estudio comparó las bandas obtenidas mediante SDS-PAGE en perros sanos con aquellas obtenidas en pacientes con proteinuria renal (Yalçin et al., 2004). La banda más abundante encontrada en este estudio en animales sanos fue la perteneciente a la albúmina (PM 65 kDa), en este caso coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente trabajo para la F1. Otras proteínas detectadas en menor cantidad, fueron la alfa₁-microglobulina (PM 27 kDa) y la transferrina (PM 76 kDa). Estos estudios detectaron patrones mixtos, glomerular y tubular con contenido en proteínas de alto (>65 kDa) y bajo (<65 kDa) peso molecular y patrones tubulares mostrando solo bandas de bajo peso molecular.

Sin embargo, la comparación de los resultados obtenidos con los estudios ya existentes en veterinaria sobre proteínas urinarias ha resultado complicado en este trabajo, ya que las técnicas utilizadas no se rigen por los mismos principios, en la EC las proteínas migran en base a su carga y tamaño, sin

embargo, en las técnicas SDS las proteínas migran solamente en base a su tamaño y en la EAR las proteínas migran en base a la carga, volumen y masa (Giori et al., 2011). Los trabajos citados anteriormente se centran principalmente en el estudio de posibles biomarcadores tempranos de afección renal, en una población de perros enfermos, y el grupo control de sanos, en caso de haberlo suele ser reducido. El principal objeto de este estudio ha sido el de establecer rangos de referencia para una población sana y la posterior comparación con una muestra de perros enfermos.

Dado que en la electroforesis capilar la migración de las proteínas se realiza en base al tamaño y a la carga de las mismas, no es posible la identificación de las proteínas incluidas en cada fracción como ocurre en la electroforesis en gel (Giordano y Paltrinieri, 2010). Para solucionar este problema, en medicina humana se han realizado estudios con EC asociada a espectrofotometría de masas (Theodorescu et al., 2005). Aunque en un inicio, en este trabajo se propuso la identificación de las proteínas incluidas en cada fracción, se presentaron dificultades técnicas para obtener resultados mediante espectrofotometría de masas (MS) para analizar las muestras empleadas, y dicha parte del trabajo no pudo realizarse.

Solo un estudio reciente en medicina veterinaria ha utilizado la electroforesis capilar asociada a la espectrofotometría de masas (CE-MS) para la identificación de biomarcadores renales, demostrando la existencia de 133 péptidos distintos en perros sanos respecto a perros con ERC (Pelander et al., 2019). Existen dos estudios en medicina humana sobre la estandarización a la hora de informar sobre la electroforesis de proteínas tanto en suero como en orina, pero se centran principalmente en las paraproteinemias (Inman et al., 2009; Tate et al., 2012).

Uno de los puntos más dificultosos del estudio ha sido la delimitación de las fracciones en cada una de las curvas electroforéticas. Estudios similares realizados en veterinaria en suero, han determinado las diferentes fracciones siguiendo las propias delimitaciones que ofrece el mismo programa informático del equipo electroforético (Riond et al., 2009). En este estudio, para una identificación más objetiva de las

diferentes fracciones entre perfiles de diferentes animales, se realizó la migración de una curva patrón con suero canino diluido 1:49 para superponerlo a las curvas del estudio y poder realizar las divisiones de manera más certera. En estudios realizados en humana se ha visto la existencia de pre albúmina (Beetham et al., 1993; Jenkins et al., 1994) así como una tendencia de la albúmina a migrar más cerca del ánodo respecto al suero en la EC (Keren, 2003), que podría ser la razón de que al superponer la curva sérica patrón a las curvas urinarias de perros sanos, la albúmina en el caso de estos últimos migre ligeramente más tarde.

Los rangos de referencia de electroforesis capilar urinaria obtenidos en el presente estudio se han presentado en porcentajes (5,5 – 56,1% para F1, 3,2 – 16,5% para F2, 3,5 – 16,2% para F3, 17,8 – 69,8% para F4 y 4,50 – 23,9% para F5) y valores absolutos (2,49-148 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), debido a que no en todos los animales evaluados se dispuso de la cantidad de proteínas excretadas (mg/L). Se ha realizado diversos experimentos de detección límite inferior, reproducibilidad y repetibilidad, que han servido para validar el uso de esta técnica laboratorial, por lo que la electroforesis capilar urinaria es una nueva herramienta diagnóstica con la que contamos para evaluar a perros sanos y proteinúricos, como consecuencia de patologías renales o paraproteinemias en medicina veterinaria.

ALTERACIONES EN EL PROTEINOGRAMA URINARIO

Los patrones de las curvas observadas en los animales sanos, son similares a los pocos estudios realizados en orina de humanos y perros sanos donde las principales proteínas contenidas en la orina son albúmina, transferrina y uromodulina. Una de las principales limitaciones del estudio ha sido no identificar las proteínas contenidas en cada fracción, por lo que no se puede asegurar en este trabajo que albúmina, transferrina y uromodulina sean las proteínas mayoritarias en la orina de perros sanos, aunque según la distribución de las fracciones urinarias en comparación con la de otros trabajos (Ferlizza et al., 2017; Miller

et al., 2014; Raila et al., 2014; Yalçin et al., 2004) es probable que así sea. Las fracciones más abundantes en la orina de perros sanos en este estudio han sido la F1 y la F4. La principal hipótesis extrapolando los datos de migración de proteínas séricas y otros estudios realizados mediante EC en orina, es que la F1 contiene la albúmina (Jenkins, 1997; Jenkins et al., 1994) y la F4, donde en el proteinograma sérico esta fracción se corresponde con las betaglobulinas, contiene la transferrina además de otras proteínas (Tothova et al., 2016). En los estudios realizados en orina en medicina humana mediante EC, la transferrina también es una de las proteínas presentes en esta fracción y que además migra en un tiempo similar a la uromodulina (Jenkins et al., 1994). En los estudios realizados en el ámbito veterinario, aunque se han realizado en base a técnicas electroforéticas de gel, coinciden que, en perros sanos además de la albúmina ya citada, la transferrina y la uromodulina también están presentes de manera fisiológica en la orina (Beristain-Ruiz et al., 2013; Ferlizza et al., 2017; Raila et al., 2014; Schultze y Jensen, 1989). La hipótesis planteada para este aumento en la F4 tan significativo es que la uromodulina pueda migrar en esta fracción, ya que estudios realizados en humana han demostrado que esta proteína forma distintas disposiciones poliméricas según las diferentes condiciones fisicoquímicas y pueden unirse a otras proteínas como la inmunoglobulina G y complemento q1 (Rampoldi et al., 2011), pero dado el diseño del presente estudio no podemos confirmarlo.

EDAD

Con respecto a la variable edad, se encontraron diferencias significativas para las fracciones F2 y F3, correspondientes por zona de migración del suero control, con las globulinas alfa₁ y alfa₂, siendo menores éstas en cachorros respecto al resto de la población. A pesar de los pocos estudios encontrados al respecto, una posible explicación es que la disminución de estas dos fracciones esté relacionada con el desarrollo de la inmunidad durante el crecimiento (Pereira et al., 2019) o con la administración reciente de tratamientos preventivos como las vacunas, pero estos datos no se recogieron en este estudio.

SEXO

La variable sexo resultó estadísticamente significativa para la fracción F1 correspondiente en el proteinograma sérico de control con la albúmina, donde se encontró incrementada en hembras respecto a los machos. La bibliografía encontrada sugiere que la obesidad y el género puede caracterizar la metabolómica urinaria, no obstante, en este estudio la condición corporal de los individuos no se recogió, por lo que no se ha podido comparar este aspecto (Bjørnvad et al., 2019; Forster et al., 2018).

ESTADO REPRODUCTIVO

La variable estado reproductivo, entero/a, castrado o esterilizada fue objeto de estudio estadístico, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ellas cuando se compararon con cada fracción del proteinograma urinario. Estos resultados podrían sugerir que, aunque se conoce que los machos intactos pueden liberar proteína prostática (arginina estereasa) en su orina, es posible que esta no se libere de manera constante o en cantidades significativas (Hokamp et al., 2018; Lavoué et al., 2015). Otra hipótesis podría ser que dicha proteína se encuentre por debajo del límite de detección mínima del instrumento de electroforesis utilizado para este trabajo. También convendría puntualizar que el mayor número de perros enteros se encuentra en el grupo cachorros o menores de 1 año, donde es posible que muchos de estos individuos todavía no hayan alcanzado la madurez sexual y por tanto no produzcan cantidades detectables de arginina estereasa. Para confirmar o destacar esta hipótesis, sería necesario realizar un estudio con una población regulada de machos enteros en mayor número y con más de un año de edad.

COMPARATIVA POBLACIÓN INDIVIDUOS SANOS VS TOTALIDAD DE ENFERMOS

Uno de los objetivos de este estudio fue la comparación de las distintas fracciones del proteinograma urinario entre la población sana y la totalidad de población con patología renal. A pesar de que el origen de la enfermedad renal es distinto para los dos grupos de animales enfermos se decidió la unión de ambos grupos para hacer una comparativa estadística y que así el tamaño muestral del grupo enfermos fuera más grande. Los resultados de esta comparativa resultaron estadísticamente significativos para las fracciones F2, F3 y F4, siendo mayor su excreción en el grupo de enfermos respecto al grupo sano, excepto para la F4 donde su excreción fue mayor en la población sana respecto a la totalidad de enfermos. La α_1 -microglobulina es una proteína antiinflamatoria además de un marcador de lesión tubular, cuyo aumento en pacientes con enfermedad renal podría darse en respuesta a la inflamación que se produce durante la enfermedad en los túbulos renales proximales (Cobrin et al., 2013). Respecto a la fracción α_2 -globulina, ningún estudio hace referencia a su excreción, ni en individuos sanos ni en individuos con enfermedad renal crónica. No obstante, desconocemos las proteínas contenidas en esta fracción. En suero esta fracción aumenta en caso de enfermedad inflamatoria o síndrome nefrótico entre otros, lo que podría apoyar la teoría de que en esta franja se encuentren proteínas relacionadas con procesos inflamatorios relacionados con el daño renal (Cobrin et al., 2013; Tothova et al., 2016). Según estudios realizados en suero de humanos, una isoforma de la proteína transportadora de retinol (RBP4-LL), cuya excreción está asociada también a daño en el túbulo proximal podrían encontrarse en esta franja además de en la fracción habitual betaglobulina (Frey et al., 2008). La F4 o betaglobulina, se encontró disminuida significativamente respecto al grupo de perros sanos. Estudios de biomarcadores renales en humana indican que la proteína de Tamm-Horsfall o uromodulina podría encontrarse en esta franja proteica, su excreción es habitual en perros sanos, puesto que se le han atribuido propiedades de defensa frente a infecciones del tracto

urinario inferior, y además existe una relación correlativa negativa respecto a perros con enfermedad renal crónica en estadios avanzados de la enfermedad, lo que apoya la hipótesis de que pueda estar disminuida respecto al grupo de perros sanos (Chacar et al., 2017; Devuyt et al., 2005; Raila et al., 2014).

La F1 que coincide con la migración de la albúmina en la curva patrón, no resultó ser estadísticamente significativa, no obstante, en la gráfica de medias sí se observa un aumento respecto al grupo sanos. Son varios los estudios que corroboran que en pacientes con enfermedad renal la albúmina se excreta en mayor cantidad (Giori et al., 2011; Hokamp et al., 2018; Lavoué et al., 2015; Raila et al., 2014). Quizás se necesitaría un grupo de individuos más amplio y homogéneo en cuanto a clasificación respecto a los estadios IRIS en enfermedad renal para poder confirmar esta teoría.

La F5 o gammaglobulina tampoco presenta diferencias estadísticamente significativas. Visualmente en el gráfico de medias no se observa una diferencia tan evidente como en las fracciones ya citadas. Este hallazgo podría deberse al hecho de juntar la población de enfermos renales crónicos con la población enfermos renales por *Leishmania infantum* donde se espera que exista una mayor excreción de inmunoglobulinas debido al depósito de inmunocomplejos glomerulares provocados por la enfermedad parasitaria, además la excreción de proteínas con peso molecular superior al de la albúmina (65 kDa), localiza el origen de la lesión en el glomérulo (Giori et al., 2011; Lavoué et al., 2015; Solano-Gallego et al., 2009).

COMPARATIVA DE LOS TRES GRUPOS POBLACIONALES

Parte de este estudio se centró en comparar las distintas fracciones entre los tres grupos poblacionales, con el principal objetivo de conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo sanos-grupo enfermos renales crónicos, grupo sano-grupo enfermos renales asociados a *Leishmania infantum* y diferencias entre los dos grupos de animales enfermos.

La F1 resultó no ser estadísticamente significativa en ningún caso. Sin embargo, en el gráfico de medias se observa un incremento de esta fracción en el grupo enfermos renales. Varios estudios realizados en orina detectan albúmina en muestras de perros con enfermedad renal crónica (Giori et al., 2011; Hokamp et al., 2018; Lavoué et al., 2015) .

En el caso de la F2, los resultados muestran diferencias estadísticamente significativas para esta fracción con un aumento en el grupo de ERC respecto a los otros dos grupos. En esta fracción se encuentra la alfa₁-microglobulina que es un marcador de lesión tubular, cuyo aumento en pacientes con enfermedad renal podría darse en respuesta a la inflamación que se produce durante la enfermedad en los túbulos renales proximales. Puede apoyar esta hipótesis el hecho de que el 63,6% (7/11) de los individuos tengan UPC inferiores a dos y esto se pueda relacionar con una proteinuria de origen tubular, asociado a proteínas de bajo peso molecular (< 65 kDa) (Giori et al., 2011; Lees et al., 2005).

La F3 se encontró elevada en ambos grupos de animales enfermos respecto al grupo sanos. En un estudio realizado en orina humana mediante métodos inmunoquímicos, la proteína alfa₂-macroglobulina se encontró elevada en pacientes con proteinuria severa, detectándose solo trazas de esta en los pacientes no proteinúricos, lo que podría ser indicativo de una proteinuria de origen glomerular (Hofmann et al., 1992; Killingsworth y Savory, 1974) . Como hemos citado anteriormente, estudios realizados en medicina humana nos indican que pueda encontrarse en esta fracción una isoforma de la proteína transportadora de retinol (RBP4-LL), cuya excreción está asociada también a daño en el túbulo proximal (Frey et al., 2008).

La F4, se encontró disminuida significativamente para las dos poblaciones de enfermos respecto al grupo de sanos. En esta fracción, como hemos citado anteriormente y aunque no era objeto de este estudio, suponemos que se pueda encontrar la uromodulina, la cual mantiene una relación correlativa negativa respecto a perros con enfermedad renal crónica en estadios avanzados de la enfermedad renal, lo que apoya los resultados de que pueda estar disminuida respecto al grupo de perros sanos (Chacar et

al., 2017; Devuyt et al., 2005; Schaefer et al., 2011). En esta fracción podemos encontrar también la proteína beta₂-globulina, marcador de estadios tempranos de la enfermedad renal (Nabity et al., 2012). Sin embargo, en este estudio los estadios IRIS no siguieron una distribución equitativa, situándose la mayoría de pacientes en los estadios III y IV.

La F5 se encontró en este estudio significativamente más elevada en el grupo de perros enfermos por *Leishmania infantum*, respecto a las otras dos poblaciones. Son varios los estudios que confirman mediante otros métodos analíticos la presencia de inmunoglobulinas G en la orina de estos perros infectados por *Leishmania infantum* y glomerulonefritis asociados a la disfunción de la barrera glomerular (Solano-Gallego et al., 2003; Zaragoza et al., 2003).

COMPARATIVA DEL UPC CON LAS DISTINTAS FRACCIONES

COMPARATIVA UPC FRENTE A ENFERMOS POR ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA

Se realizó un estudio de correlación entre las distintas fracciones del proteinograma urinario frente al UPC de cada individuo, con resultado negativo. Como hemos citado anteriormente el UPC se utiliza como herramienta cuantitativa para evaluar la pérdida de proteínas por lo que parece lógico que hubiera una correlación positiva entre el aumento del UPC y una o varias fracciones del proteinograma urinario. No obstante, este resultado podría estar sesgado dado que la población de estudio en este grupo es muy limitada y el valor de los UPC no resulta equitativo respecto a la totalidad de la población, donde más de la mitad de los individuos (63,6%) presentan un UPC inferior a dos. Sería necesario un estudio con un grupo más numeroso y con una distribución más homogénea respecto al número de individuos según el estadiaje IRIS para consolidar o descartar esta hipótesis.

COMPARATIVA UPC FRENTE A ENFERMOS POR ENFERMEDAD RENAL ASOCIADA A

LEISHMANIA INFANTUM

Se realizó un estudio de correlación entre las distintas fracciones del proteinograma urinario frente al UPC de cada individuo, con resultado negativo. En este grupo, a pesar de contar con un número ligeramente mayor de individuos, los resultados de los valores del UPC, tampoco siguieron una distribución homogénea, situándose más de la mitad de los mismos (53%) en valores de UPC inferiores a dos. Sería necesaria la realización de un estudio con mayor tamaño de la muestra y con resultados distribuidos de una manera más equitativa para el UPC.

COMPARATIVA PROTEINOGRAMA URINARIO Y SÉRICO

Se realizó un estudio de correlación entre las distintas fracciones del proteinograma sérico y urinario de cada individuo con resultado negativo en todas ellas, tanto para el G₁ como para el G₂. Esto indica que el aumento o disminución de cualquiera de las fracciones en suero no supone un aumento o disminución de la misma en la orina del mismo individuo. El 27,27% y el 58,82% de G₁ y G₂ respectivamente de la población de estudio presentó hipoalbuminemia sin embargo estadísticamente esta disminución en suero no se correlacionó con un aumento en el proteinograma urinario, esto podría deberse a que los animales con albúmina sérica baja no presentaban necesariamente proteinuria con valores altos en todos los casos. En el caso del G₂ respecto a la F5 donde el 100% de la población presentó un aumento en la fracción gamma globulina, tampoco hubo correlación con la cantidad excretada en orina, esto al igual que para la F1 puede ser debido a que este aumento en las gammaglobulinas séricas en estos pacientes no estaba relacionado con una mayor excreción de proteínas a través de la orina. A pesar de los datos expuestos, y que la comparativa de proteinogramas entre grupos si resultó ser significativa, parece que variaciones de proteinogramas séricos no se corresponde con una mayor excreción de proteínas urinarias

a nivel individual. No obstante, una población más grande y con características en cuanto a estadio IRIS más homogéneas serían necesarios.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Las limitaciones que hemos encontrado durante la realización del estudio y que deben tenerse en cuenta para futuras líneas de investigación son:

Dificultad para realizar un seguimiento de los pacientes más de dos semanas para asegurar la ausencia de enfermedad renal u otras en el caso del grupo de perros sanos.

Falta de recogida de datos como la condición corporal, y el estado de salud respecto a posibles tratamientos preventivos como vacunas o desparasitaciones que pudieran alterar algunos valores en las analíticas realizadas.

Dificultad para recoger muestras de la población de perros enfermos y que estos pacientes no estuviesen recibiendo tratamientos que pudiesen alterar posteriormente el estudio de la orina, como fluidoterapia, fármacos diuréticos o antiinflamatorios esteroideos.

Dificultad para comparar con otras técnicas electroforéticas, puesto que la migración de las proteínas en la electroforesis capilar, se realiza en base a conceptos diferentes, migrando en base a la carga y el tamaño. Por ello ha sido imposible la comparación de resultados con otras técnicas más utilizadas como la electroforesis en gel.

Falta de bibliografía tanto en medicina humana como en medicina veterinaria para realizar las divisiones de los diferentes proteinogramas.

Falta de recursos para la realización de la técnica asociada a inmunotipado y/o inmunofijación, así como electroforesis capilar asociada a espectrofotometría de masas para la identificación de las proteínas mayoritarias en cada fracción.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Al ser la EC urinaria una técnica poco utilizada en veterinaria para el estudio de la orina, ofrece la posibilidad de nuevos campos de investigación:

Aplicación de la técnica a otras especies de mamíferos, puesto que el protocolo de preparación de la orina será el mismo y el propio equipo de electroforesis (MiniCap Sebia) puede procesar este tipo de fluidos independientemente de la especie de origen.

Comparación de los resultados de electroforesis capilar de perros enfermos con el estudio de histopatología renal de los mismos, para confirmar el origen de la lesión renal (glomerular, tubular e intersticial).

Electroforesis capilar en pacientes con insuficiencia renal aguda, y comparativa con los proteinogramas de enfermedad renal crónica.

Estudios de electroforesis capilar asociada a inmunotipado y/o inmunofijación o acoplada a espectrofotometría de masas con el fin de obtener biomarcadores renales y determinar qué tipo de proteínas corresponden a cada fracción del proteinograma urinario en pacientes caninos.

CONCLUSIONES

De los resultados de este estudio podemos sacar las siguientes conclusiones:

1-. Validación de la técnica mediante experimento de límite de detección con una sensibilidad de detección mínima de 2,1 mg/L y de repetibilidad y reproducibilidad con una desviación estándar para cada una de las fracciones inferior o igual al 10%, siendo esta técnica una posible herramienta diagnóstica complementaria a la hora de evaluar pacientes con sospecha de enfermedad renal. Mediante electroforesis capilar urinaria no es posible la identificación de las diferentes proteínas contenidas en cada fracción urinaria, por lo que estudios de esta técnica acoplada a la espectrofotometría de masas, inmunotipado y/o inmunofijación serían necesarios.

2-. Se establecen unos rangos de referencia tanto en porcentaje como en valores absolutos mediante electroforesis capilar en orina para la especie canina donde F1 y F4 son las fracciones mayoritarias como corroboran otros estudios realizados mediante electroforesis de proteínas urinarias con técnicas de gel.

3-. No se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre individuos sanos respecto al estado reproductivo, ni en machos ni en hembras. La edad resultó ser un factor significativo para F2 y F3 donde se encontró disminuida respecto al grupo adultos y senior. El sexo resultó ser un factor significativo para F1 en hembras donde se encontró aumentada respecto al grupo machos.

4-. Los proteinogramas de individuos enfermos presentan diferencias visuales para todas las fracciones electroforéticas urinarias, y existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los sanos 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 crónica. En el caso de los animales con azotemia asociada a *Leishmania infantum* existe un aumento

estadísticamente significativo de la F5 respecto a los individuos sanos y con ERC, que puede deberse a la glomerulonefritis provocada por el depósito de inmunocomplejos asociadas a la enfermedad parasitaria.

5-. No existe relación entre el aumento o disminución de las distintas fracciones del proteinograma y el aumento del ratio proteína/creatinina en orina en perros con azotemia y proteinuria.

6-. No existe relación entre el aumento o disminución de las distintas fracciones del proteinograma sérico y urinario para un mismo individuo con enfermedad renal crónica o enfermedad renal asociada a *Leishmania infantum*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abate, O., Zanatta, R., Malisano, T. and Dotta, U. (2000). Canine Serum Protein Patterns Using High-Resolution Electrophoresis (HRE). *Veterinary Journal*, 159(2), 154–160.
<https://doi.org/10.1053/tvj.1999.0407>
- Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L. and Syme, H. M. (2018). ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1803–1822. <https://doi.org/10.1111/jvim.15331>
- Adams, L. G., Polzin, D. J., Osborne, C. A. and O'Brien, T. D. (1992). Correlation of Urine Protein/Creatinine Ratio and Twenty-Four-Hour Urinary Protein Excretion in Normal Cats and Cats with Surgically Induced Chronic Renal Failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(1), 36–40. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1992.tb00983.x>
- Albasan, H., Lulich, J. P., Osborne, C. A., Lekcharoensuk, C., Ulrich, L. K. and Carpenter, K. A. (2003). Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(2), 176–179. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.176>
- Antognoni, M. T., Siepi, D., Porciello, F. and Fruganti, G. (2005). Use of serum cistatin C determination as a marker of renal function in the dog. *Veterinary Research Communications*, 29(SUPPL. 2), 265–267. <https://doi.org/10.1007/s11259-005-0058-5>
- Arrizabalaga, P. (2005). El diafragma de filtración glomerular. Orientación diagnóstica y terapéutica en el síndrome nefrótico. *Nefrología*, 25(4), 361–368.

Atata, J. A., Esiebo, K. A. N., Adamu, S., Abdulsalam, H., Adam, M., Chiroma, M. A. and Avazi, D. O.

(2019). Haematological and biochemical parameters of clinically dehydrated and euhydrated dogs. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 73–78.

<https://doi.org/10.4314/sokjvs.v16i4.9>

Ayoub, J. A., Hugues Beaufrere, D. ; and Acierno, M. J. (2013). Association between urine osmolality

and specific gravity in dogs and the effect of commonly measured urine solutes on that association. *American Journal of Veterinary Research* , 74(12), 1542–1545.

<https://doi.org/10.2460/ajvr.74.12.1542>

Bacic, A., Kogika, M. M., Barbaro, K. C., Iuamoto, C. S., Simões, D. M. N. and Santoro, M. L. (2010).

Evaluation of albuminuria and its relationship with blood pressure in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(2), 203–209. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00207.x)

[165X.2009.00207.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00207.x)

Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P. and Ferrer, L. (2008). Canine

leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends in Parasitology*, 24(7), 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.04.001>

Bartges J. W. (2012). Chronic kidney disease in dogs and cats. *The Veterinary clinics of North*

America. Small animal practice, 42(4), 669–vi. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2012.04.008>

Beetham, R., Dawnay, A., Ghany, C., Dubrey, S. and Miles, J. (1993). A radioimmunoassay for human urinary prealbumin. *Annals of Clinical Biochemistry*, 30(4), 377–382.

<https://doi.org/10.1177/000456329303000405>

- Beristain-Ruiz, D. M., Carretón, E., Rodríguez-Alarcón, C. A., Montoya-Alonso, J. A. and Barrera, R. (2013). SDS-PAGE analysis of urinary proteins in dogs with heartworm disease. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 14(3), 245–249.
- Bexfield, N. H., Heiene, R., Gerritsen, R. J., Eliassen, K. A., Herrtage, M. E. and Michell, A. R. (2008). Glomerular Filtration Rate Estimated by 3-Sample Plasma Clearance of Iohexol in 118 Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 66–73. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.0035.x>
- Bjørnvad, C. R., Gloor, S., Johansen, S. S., Sandøe, P. and Lund, T. B. (2019). Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches — A cross-sectional study of dog- and owner-related risk factors for obesity in Danish companion dogs. *Preventive Veterinary Medicine*, 170, 104730. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.104730>
- Boggiatto, P. M., Gibson-Corley, K. N., Metz, K., Gallup, J. M., Hostetter, J. M., Mullin, K. and Petersen, C. A. (2011). Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001019>
- Bossuyt, X., Schiettekatte, G., Bogaerts, A. and Blanckaert, N. (1998). Serum protein electrophoresis by CZE 2000 clinical capillary electrophoresis system. *Clinical Chemistry*, 44(4), 749–759. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.4.749>
- Braun, J. P., Lefebvre, H. P. and Watson, A. D. J. (2003). Creatinine in the Dog: A Review. *Veterinary Clinical Pathology*, 32(4), 162–179. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2003.tb00332.x>

- Braun, J. P., Perxachs, A., Péchereau, D. and de La Farge, F. (2002). Plasma cystatin C in the dog: Reference values and variations with renal failure. *Comparative Clinical Pathology*, 11(1), 44–49. <https://doi.org/10.1007/s580-002-8081-2>
- Brown, N., Segev, G., Francey, T., Kass, P. and Cowgill, L. D. (2015). Glomerular Filtration Rate, Urine Production, and Fractional Clearance of Electrolytes in Acute Kidney Injury in Dogs and Their Association with Survival. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(1), 28–34. <https://doi.org/10.1111/jvim.12518>
- Brown, S. A., Finco, D. R., Boudinot, F. D., Wright, J., Taver, S. L. and Cooper, T. (1996). Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 57(1), 105–110. <http://europepmc.org/abstract/MED/8720247>
- Brown, S., Elliott, J., Francey, T., Polzin, D. and Vaden, S. (2013). Consensus Recommendations for Standard Therapy of Glomerular Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, 27, 27–43. <https://doi.org/10.1111/jvim.12230>
- Cabré, M., Planellas, M., Ordeix, L. and Solano-Gallego, L. (2021). Is signalment associated with clinicopathological findings in dogs with leishmaniosis? *Veterinary Record*, e451. <https://doi.org/10.1002/vetr.451>
- Cardoso, L., Schallig, H. D. F. H., Cordeiro-da-Silva, A., Cabral, M., Alunda, J. M. and Rodrigues, M. (2007). Anti-Leishmania humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 117(1–2), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.014>

- Chacar, F., Kogika, M., Sanches, T. R., Caragelasco, D., Martorelli, C., Rodrigues, C., Capcha, J. M. C., Chew, D. and Andrade, L. (2017). Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. *Physiological Reports*, 5(11), 1–9. <https://doi.org/10.14814/phy2.13262>
- Cobrin, A. R., Blois, S. L., Kruth, S. A., Abrams-Ogg, A. C. G. and Dewey, C. (2013). Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*, 54(12), 647–655. <https://doi.org/10.1111/jsap.12150>
- Cortadellas, O. and Fernández del Palacio, M. (2012). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC) en el perro y el gato.: Parte 1: evaluación del paciente con ERC. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales: Revista Oficial de AVEPA, Asociación Veterinaria Española de Especialistas En Pequeños Animales*, 32(4), 215–223.
- Counotte, G. (2010). Electrophoretic techniques: The old and the new. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(4), 399–400. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00279.x>
- Cowdrey, G., Firth, M. and Firth, G. (1995). Separation of cerebrospinal fluid proteins using capillary electrophoresis: A potential method for the diagnosis of neurological disorders. *Electrophoresis*, 16(1), 1922–1926. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601317>
- Craig, A. J., Seguela, J., Queau, Y., Murgier, P., Concordet, D., Fleeman, L. M., Mimouni, P., Braun, J.-P., Germain, C. and Lefebvre, H. P. (2006). Redefining the reference interval for plasma creatinine in dogs: Effect of age, gender, body weight, and breed. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 697-802. <https://doi.org/10.1111/J.1939-1676.2006.TB02919.X>
- D'Amico, G. and Bazzi, C. (2003). Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, 63, 809–825. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2003.00840.x>

- da Silva, S. M., Ribeiro, V. M., Ribeiro, R. R., Tafuri, W. L., Melo, M. N. and Michalick, M. S. M. (2009). First report of vertical transmission of *Leishmania (Leishmania) infantum* in a naturally infected bitch from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166(1–2), 159–162.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.011>
- Dahlem, D. P., Neiger, R., Schweighauser, A., Francey, T., Yerramilli, M., Obare, E. and Steinbach, S. M. L. (2017). Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31, 799–804.
<https://doi.org/10.1111/jvim.14694>
- de Carvalho, F. L. N., Riboldi, E. D. O., Bello, G. L., Ramos, R. R., Barcellos, R. B., Gehlen, M., Halon, M. L., Romão, P. R. T., Dallegrave, E. and Rossetti, M. L. R. (2018). Canine visceral leishmaniasis diagnosis: A comparative performance of serological and molecular tests in symptomatic and asymptomatic dogs. *Epidemiology and Infection*, 146(5), 571–576.
<https://doi.org/10.1017/S0950268818000225>
- de Freitas, E., Melo, M. N., da Costa-Val, A. P. and Michalick, M. S. M. (2006). Transmission of *Leishmania infantum* via blood transfusion in dogs: Potential for infection and importance of clinical factors. *Veterinary Parasitology*, 137(1–2), 159–167.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.12.011>
- de Loor, J., Daminet, S., Smets, P., Maddens, B. and Meyer, E. (2013). Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(5), 998–1010.
<https://doi.org/10.1111/jvim.12155>

- Devuyst, O., Dahan, K. and Pirson, Y. (2005). Tamm-Horsfall protein or uromodulin: New ideas about an old molecule. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 20(7), 1290–1294.
<https://doi.org/10.1093/ndt/gfh851>
- DiBartola, S. P. (2012). Applied renal physiology. In *Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice* (4th ed., pp. 26–41). Elsevier Saunders.
- Doroteo, M. C. (2012). Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Investigación En Discapacidad*, 1(2), 86–89.
- El-Khoury, J. M., Bunch, D. R., Hu, B., Payto, D., Reineks, E. Z. and Wang, S. (2016). Comparison of symmetric dimethylarginine with creatinine, cystatin C and their eGFR equations as markers of kidney function. *Clinical Biochemistry*, 49(15), 1140–1143.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.009>
- Ferguson, M. A. and Waikar, S. S. (2012). Established and Emerging Markers of Kidney Function. *Clin Chem.*, 58(4), 680–689. <https://doi.org/10.1111/mec.13536>.
- Ferlizza, E., Dondi, F., Andreani, G., Bucci, D., Archer, J. and Isani, G. (2017). Validation of an electrophoretic method to detect albuminuria in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 19(8), 860–868. <https://doi.org/10.1177/1098612X16664112>
- Ferlizza, E., Isani, G., Dondi, F., Andreani, G., Vasylyeva, K., Bellei, E., Almeida, A. M. and Matzapetakis, M. (2020). Urinary proteome and metabolome in dogs (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease. *Journal of Proteomics*, 222, 103795.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103795>
- Fernández, M., Coll, E., Ventura, S., Bermudo, C., Cárdenas, M. C., Cortés, M., García, M., Martínez, C., Pérez, D., Rodríguez, T., Valldecabres, C., Viedma, J. A. and Zapico, E. (2011). Cistatina C en

la evaluación de la función renal. *Revista Del Laboratorio Clinico*, 4(1), 50–62.

<https://doi.org/10.1016/j.labcli.2010.11.002>

Finco, D. R. (2005). Measurement of glomerular filtration rate via urinary clearance of inulin and plasma clearance of technetium Tc 99m pentetate and exogenous creatinine in dogs.

American Journal of Veterinary Research, 66(6), 1046–1055.

<https://doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.1046>

Forster, G. M., Stockman, J., Noyes, N., Heuberger, A. L., Broeckling, C. D., Bantle, C. M. and Ryan, E.

P. (2018). A Comparative Study of Serum Biochemistry, Metabolome and Microbiome Parameters of Clinically Healthy, Normal Weight, Overweight, and Obese Companion Dogs.

Topics in Companion Animal Medicine, 33(4), 126–135.

<https://doi.org/10.1053/j.tcam.2018.08.003>

Frey, S. K., Nagl, B., Henze, A., Raila, J., Schlosser, B., Berg, T., Tepel, M., Zidek, W., Weickert, M. O., Pfeiffer, A. F. H. and Schweigert, F. J. (2008). Isoforms of Retinol binding protein 4 (RBP4) are increased in chronic diseases of the kidney but not of the liver. *Lipids in Health and Disease*, 7,

1–9. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-7-29>

Friedrichs, K. R., Harr, K. E., Freeman, K. P., Szladovits, B., Walton, R. M., Barnhart, K. F. and Blanco-

Chavez, J. (2012). ASVCP reference interval guidelines: Determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(4),

441–453. <https://doi.org/10.1111/vcp.12006>

García, H. M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida : fundamentos , actualidad e importancia. *Univ Diag*, 1(2), 31–41.

- García-Martínez, J. D., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Caldin, M. and Ceron, J. J. (2015). Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Science*, 99, 204–207.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.01.002>
- Gay-Bellile, C., Bengoufa, D., Houze, P., le Carrer, D., Benlakehal, M., Bousquet, B., Gourmel, B. and le Bricon, T. (2003). Automated Multicapillary Electrophoresis for Analysis of Human Serum Proteins. *Clinical Chemistry*, 49(11), 1909–1915.
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.017756>
- Giordano, A. and Paltrinieri, S. (2010). Interpretation of capillary zone electrophoresis compared with cellulose acetate and agarose gel electrophoresis: Reference intervals and diagnostic efficiency in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 39(4), 464–473.
<https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2010.00255.x>
- Giori, L., Tricoli, F. M., Zatelli, A., Roura, X. and Paltrinieri, S. (2011). High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4), 682–690. <https://doi.org/10.1177/1040638711407900>
- Gorri, J. L. and Martínez-Castelao, A. (2012). Proteinuria: Detection and role in native renal disease progression. *Transplantation Reviews*, 26(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2011.10.002>
- Goy-Thollot, I., Besse, S., Garnier, F., Marignan, M. and Barthez, P. Y. (2006). Simplified Methods for Estimation of Plasma Clearance of Iohexol in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med*, 20, 52–56.
[https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[52:smfeop\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[52:smfeop]2.0.co;2)

- Graham P A. (2017). Urinalysis. In S. Ettinger, E. Feldman, & E. Cote (Eds.), *Textbook of Veterinary Internal Medicine* (8th ed., pp. 849–865). Elsevier.
- Grauer, G. F. (2005). Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 46, 469–478. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2005.tb00275.x>
- Grauer, G. F. (2007). Measurement, Interpretation, and Implications of Proteinuria and Albuminuria. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 37, 283–295. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2006.11.003>
- Grauer, G. F. (2011). Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 121–127. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.002>
- Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Almes, K. and Jewell, D. E. (2016). Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(3), 794–802. <https://doi.org/10.1111/jvim.13942>
- Harley, L., and Langston, C. (2012). Proteinuria in dogs and cats. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 53(6), 631–638.
- Heiene, R., Eliassen, K. A., Risøen, U., Neal, L. A. and Cowgill, L. D. (2010). Glomerular filtration rate in dogs as estimated via plasma clearance of inulin and iohexol and use of limited-sample methods. *American Journal of Veterinary Research*, 71(9), 1100–1107. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.9.1100>

- Heine, R. and Lefebvre, H. P. (2007). Assessment of renal function. In J. Elliott, G.F. Grauer, & J.L Westropp (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology*. Gloucester (3rd ed., pp. 117–125). British Small Animal Veterinary Association.
- Hofmann, W., Rossmüller, B., Guder, W. G. and Edel, H. H. (1992). A new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from a single pattern of defined proteins in urine. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry : Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 30(10), 707—712.
- Hokamp, J. A., Cianciolo, R. E., Boggess, M., Lees, G. E., Benali, S. L., Kovarsky, M. and Nabity, M. B. (2016). Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 591–601. <https://doi.org/10.1111/jvim.13832>
- Hokamp, Jessica A., Leidy, S. A., Gaynanova, I., Cianciolo, R. E. and Nabity, M. B. (2018). Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 47(3), 425–434. <https://doi.org/10.1111/vcp.12648>
- Hokamp, Jessica A. and Nabity, M. B. (2016). Renal biomarkers in domestic species. *Veterinary Clinical Pathology*, 45(1), 28–56. <https://doi.org/10.1111/vcp.12333>
- Horowitz G L, Altaie S, Boyd J C, Ceriotti F, Horn P, Pesce A, Sine H E and Zakowski J. (2010). EP28-A3c Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition. *Clinical Laboratory Standards Institute* , 28(30).

- Hosein, S., Blake, D. P. and Solano-Gallego, L. (2017). Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniasis. *Parasitology*, *144*(1), 95–115.
<https://doi.org/10.1017/S003118201600055X>
- Hovind, P., Rossing, P., Tarnow, L., Toft, H., Parving, J. and Parving, H. H. (2001). Remission of nephrotic-range albuminuria in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, *24*(11), 1972–1977.
<https://doi.org/10.2337/diacare.24.11.1972>
- Hrovat, A., Schoeman, J. P., de Laat, B., Meyer, E., Smets, P., Goddard, A., Nagel, S. and Daminet, S. (2013). Evaluation of snake envenomation-induced renal dysfunction in dogs using early urinary biomarkers of nephrotoxicity. *Veterinary Journal*, *198*(1), 239–244.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.06.030>
- Ibba, F., Mangiagalli, G. and Paltrinieri, S. (2016). Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *Veterinary Journal*, *210*, 89–91.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2016.01.012>
- Inman, Z., Martin, H. and Chubb, S. P. (2009). Reporting of Quantitative Protein Electrophoresis in Australia and New Zealand: a Call for Standardisation. *Clin Biochem Rev*, *30*, 141–151.
- Israni, AK. and Kasiske, BL. (2012). Laboratory assessment of kidney disease: clearance, urinalysis, and kidney biopsy. In M.R. Clarkson, B.M. Brenner & C.N. Magee (Eds.), *Brenner and Rector's the kidney* (8th ed., pp. 725–735). Saunders.
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborne, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A. and Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs

with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393–400. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.393>

Jansen, B., Valli, V. E. O., Thorner, P., Baumal, R. and Lumsdem, J. h. (1987). Samoyed Hereditary Glomerulopathy: Serial, Clinical and Laboratory (Urine, Serum Biochemistry and Hematology) Studies. *Canine Journal Veterinary Research*, 51, 387–393.

Jeannot, M., Zheng, J. and Li, L. (1999). Observation of Sodium Gel-Induced Protein Modifications in Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Its Implications for Accurate Molecular Weight Determination of Gel-Separated Proteins by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, 10, 512–520.

Jellum, E., Dollekamp, H. and Blessum, C. (1996). Capillary electrophoresis for clinical problem solving: Analysis of urinary diagnostic metabolites and serum proteins. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 683(1), 55–65. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(96\)00132-6](https://doi.org/10.1016/0378-4347(96)00132-6)

Jenkins, M. A. (1997). Clinical application of capillary electrophoresis to unconcentrated human urine proteins. *Electrophoresis*, 18(10), 1842–1846. <https://doi.org/10.1002/elps.1150181020>

Jenkins, M. A. (2009). Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. *The Clinical Biochemist. Reviews*, 30(3), 119–122.

Jenkins, M. A. and Guerin, M. D. (1996). Capillary electrophoresis as a clinical tool. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, 682(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(95\)00552-8](https://doi.org/10.1016/0378-4347(95)00552-8)

- Jenkins, M. A., O'Leary, T. D. and Guerin, M. D. (1994). Identification and quantitation of human urine proteins by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 662(1), 108–112. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(94\)00387-4](https://doi.org/10.1016/0378-4347(94)00387-4)
- Jerums, G., Panagiotopoulos, S., Tsalamandris, C., Allen, T. J., Gilbert, R. E. and Comper, W. D. (1998). Why is proteinuria such an important risk factor for progression in clinical trials? *Kidney International*, 63, 87–92.
- Kampa, N., Wennstrom, U., Lord, P., Twardock, R., Maripuu, E., Eksell, P. and Fredriksson, S. U. (2002). Effect of region of interest selection and uptake measurement on glomerular filtration rate measured by 99mTc-DTPA scintigraphy in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 43(4), 383–391. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2002.tb01022.x>
- Keren, D. F. (2003). Examination of urine for proteinuria. In D. F. Keren (Ed.), *Protein Electrophoresis in Clinical Diagnosis* (1st ed., pp. 217–257), Arnold.
- Khon, J. (1957). A Cellulose Acetate Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*, 2, 297–303.
- Kielstein, J. T., Salpeter, S. R., Bode-boeger, S. M., Cooke, J. P. and Fliser, D. (2006). *Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function — a meta-analysis*, 21, 2446–2451. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfl292>
- Killingsworth, L. M. and Savory, J. (1974). Nephelometric methods for the determination of urinary albumin, transferrin and alpha 2 macroglobulin. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 4(1), 46–52.
- Kovarikova, S. (2015). Urinary biomarkers of renal function in dogs and cats: A review. *Veterinari Medicina*, 60(11), 589–602. <https://doi.org/10.17221/8527-VETMED>

- Krizek, D. and Rick, M. (2002). Agarose Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Cell Biology*, 15(1), 6.7.1-6.7.13. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0607s15>
- Lavoué, R., Trumel, C., Smets, P. M. Y., Braun, J. P., Aresu, L., Daminet, S., Concordet, D., Palanché, F. and Peeters, D. (2015). Characterization of proteinuria in dogue de bordeaux dogs, a breed predisposed to a familial glomerulonephropathy: A retrospective study. *PLoS ONE*, 10(7), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133311>
- le Bricon, T., Erlich, D., Bengoufa, D., Dussaucy, M., Garnier, J. P. and Bousquet, B. (1998). Sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis of urinary proteins: Application to multiple myeloma. *Clinical Chemistry*, 44(6), 1191–1197. <https://doi.org/10.1093/clinchem/44.6.1191>
- Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. and Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (63), 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>
- Lee, S. H., Kim, J. W., Lee, B. C. and Oh, H. J. (2020). Age-specific variations in hematological and biochemical parameters in middle- and large-sized of dogs. *Journal of Veterinary Science*, 21(1), 1–13. <https://doi.org/10.4142/jvs.2020.21.e7>
- Lees, G. E., Brown, S. A., Elliott, J., Grauer, G. F. and Vaden, S. L. (2005). Defining and Classifying Proteinuria. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19, 377–385. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2005\)19\[377:AAMOP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2005)19[377:AAMOP]2.0.CO;2)
- Linnetz, E. H. and Graves, T. K. (2010). Glomerular filtration rate in general small animal practice. *Compendium: Continuing Education For Veterinarians*, 32(10), e1–e6.
- Littman, M. P. (2011). Protein-losing Nephropathy in Small Animals. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*, 41(1), 31–62. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.09.006>

- Littman, M. P., Daminet, S., Grauer, G. F., Lees, G. E. and van Dongen, A. M. (2013). Consensus recommendations for the diagnostic investigation of dogs with suspected glomerular disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(S1), 19–26. <https://doi.org/10.1111/jvim.12223>
- Littman, M. P., Wiley, C. A., Raducha, M. G. and Henthorn, P. S. (2013). Glomerulopathy and mutations in NPHS1 and KIRREL2 in soft-coated Wheaten Terrier dogs. *Mammalian Genome*, 24(3–4), 119–126. <https://doi.org/10.1007/s00335-012-9445-8>
- Lubran, M. (1966). Paper Electrophoresis. *JAMA*, 197(5), 360–361. <https://doi.org/10.1001/jama.1966.03110050098023>
- Lyon, S. D., Sanderson, M. W., Vaden, S. L., Lappin, M. R., Jensen, W. a and F, G. (2010). Comparison of urine dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein-to-creatinine ratio, and species-specific ELISA methods for detection of albumin in Urine Samples of Cats and Dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association (JAVMA)*, 236(8), 874–879. <http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.236.8.874>
- Maia, C., Afonso, M. O., Neto, L., Dionísio, L. and Campino, L. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in naturally infected phlebotomus perniciosus from Algarve Region, Portugal. *Journal of Vector Borne Diseases*, 46(4), 268–272.
- Martínez-Subiela, S., García-Martínez, J. D., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., Caldin, M., Bernal, L. J. and Cerón, J. J. (2013). Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Research in Veterinary Science*, 95(3), 924–929. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.07.002>
- Marynissen, S. J. J., Willems, A. L., Paepe, D., Picavet, P., Duchateau, L. and Daminet, S. (2016). Proteinuria in Apparently Healthy Elderly Dogs: Persistency and Comparison Between Free

Catch and Cystocentesis Urine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(1), 93–101.

<https://doi.org/10.1111/jvim.14635>

Meléndez-Lazo, A., Ordeix, L., Planellas, M., Pastor, J. and Solano-Gallego, L. (2018).

Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems. *Research in Veterinary Science*, 117, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.10.011>

Miller, I., Preßlmayer-Hartler, A., Wait, R., Hummel, K., Sensi, C., Eberini, I., Razzazi-Fazeli, E. and

Gianazza, E. (2014). In between - Proteomics of dog biological fluids. *Journal of Proteomics*, 106, 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.016>

Miranda, S., Roura, X., Picado, A., Ferrer, L. and Ramis, A. (2008). Characterization of sex, age, and

breed for a population of canine leishmaniosis diseased dogs. *Research in Veterinary Science*, 85(1), 35–38. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2007.09.003>

Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C. and Bianciardi, P. (2009).

Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, 20(5–6), 397–404.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x>

Mischak, H., Delles, C., Klein, J. and Schanstra, J. P. (2010). Urinary Proteomics Based on Capillary

Electrophoresis-Coupled Mass Spectrometry in Kidney Disease: Discovery and Validation of Biomarkers, and Clinical Application. *Advances in Chronic Kidney Disease*, 17(6), 493–506.

<https://doi.org/10.1053/j.ackd.2010.09.004>

Moesgaard, S. G., Holte, A. v, Mogensen, T., Mølbak, J., Kristensen, A. T., Jensen, A. L., Teerlink, T.,

Reynolds, A. J. and Olsen, L. H. (2007). Effects of breed, gender, exercise and white-coat effect

on markers of endothelial function in dogs. *Research in Veterinary Science*, 82(3), 409–415.

<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2006.09.003>

Nabity, M B, Lees, G. E., Boggess, M., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, A., Rakitin, A., Aguiar, J. and Relford, R. (2015). Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29, 1036–1044. <https://doi.org/10.1111/jvim.12835>

Nabity, M. B., Lees, G. E., Cianciolo, R., Boggess, M. M., Steiner, J. M. and Suchodolski, J. S. (2012). Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(2), 282–293. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00891.x>

Nabity, Mary B., Lees, G. E., Dangott, L. J., Cianciolo, R., Suchodolski, J. S. and Steiner, J. M. (2011). Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(2), 222–236. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x>

Nickolas, T. L., O'Rourke, M. J., Yang, J., Sise, M. E., Canetta, P. A., Barasch, N., Buchen, C., Khan, F., Mori, K., Giglio, J., Devarajan, P. and Barasch, J. (2008). Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. *Annals of Internal Medicine*, 148(11), 810–819. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-148-11-200806030-00003>

Nitsche, E. (2004). Erythrocytosis in Dogs and Cats: Diagnosis and Management. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 26(2), 104–118.

- Nossen, J. O., Jakobsen, J. A., Kjaersgaard, P., Andrew, E., Jacobsen, P. B. and Berg, K. J. (1995). Elimination of the non-ionic X-ray contrast media iodixanol and iohexol in patients with severely impaired renal function. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 55, 341–350. <https://doi.org/10.3109/00365519509104972>.
- Osatinsky, R. (2007). ¿Qué es la electroforesis capilar? *Bioquímica y Patología Clínica*, 71(2), 60–66.
- Paltrinieri, S., Sironi, G., Giori, L., Faverzani, S. and Longeri, M. (2015). Changes in Serum and Urine SAA Concentrations and Qualitative and Quantitative Proteinuria in Abyssinian Cats with Familial Amyloidosis: A Five-year Longitudinal Study (2009-2014). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 505–512. <https://doi.org/10.1111/jvim.12561>
- Pelander, L., Brunchault, V., Buffin-Meyer, B., Klein, J., Breuil, B., Züribig, P., Magalhães, P., Mullen, W., Elliott, J., Syme, H., Schanstra, J. P., Häggström, J. and Ljungvall, I. (2019). Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. *Veterinary Journal*, 249, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.010>
- Penders, J. and Delanghe, J. R. (2004). Alpha 1-microglobulin: Clinical laboratory aspects and applications. *Clinica Chimica Acta*, 346(2), 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.cccn.2004.03.037>
- Pereira, M., Valério-Bolas, A., Saraiva-Marques, C., Alexandre-Pires, G., da Fonseca, I. P. and Santos-Gomes, G. (2019). Development of dog immune system: From in uterus to elderly. *Veterinary Sciences*, 6(4). <https://doi.org/10.3390/vetsci6040083>
- Piech, T. L., & Wycislo, K. L. (2019). Importance of Urinalysis. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 49(2), 233–245. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.10.005>

Pinto- Sietsma, S. J., Janssen, W. M. T., Hillege, H. L., Navis, G., Zeeuw, D. D. E. and Jong, P. E. D. E.

(2000). Urinary Albumin Excretion Is Associated with Renal Functional Abnormalities in a Nondiabetic Population. *Journal of American Society of Nephrology*, *11*, 1882–1888.

<https://doi.org/10.1681/ASN.V11101882>

Prause, L. C. and Grauer, G. F. (1998). Association of Gastrointestinal Hemorrhage with Increased Blood Urea Nitrogen and BUN/Creatinine Ratio in Dogs: A Literature Review and Retrospective Study. *Veterinary Clinical Pathology*, *27*(4), 107–111. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1998.tb01028.x>

Raila, J., Schweigert, F. J. and Kohn, B. (2014). Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. *Veterinary Clinical Pathology*, *43*(2), 261–265. <https://doi.org/10.1111/vcp.12143>

Rampoldi, L., Scolari, F., Amoroso, A., Ghiggeri, G. and Devuyst, O. (2011). The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): From tubulointerstitial nephropathy to chronic kidney disease. *Kidney International*, *80*(4), 338–347. <https://doi.org/10.1038/ki.2011.134>

Redon, J. and Williams, B. (2002). Microalbuminuria in essential hypertension: Redefining the threshold. *Journal of Hypertension*, *20*(3), 353–355. <https://doi.org/10.1097/00004872-200203000-00002>

Ribeiro, R. R., Michalick, M., da Silva, M. E., Dos Santos, C., Frézard, F., & da Silva, S. M. (2018). Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed research international*, *2018*, 3296893. <https://doi.org/10.1155/2018/3296893>

- Riond, B., Wenger-Riggenbach, B., Hofmann-Lehmann, R., & Lutz, H. (2009). Serum protein concentrations from healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. *Veterinary clinical pathology*, 38(1), 73-77. [10.1111/j.1939-165X.2008.00100.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2008.00100.x)
- Riordan, L. and Schaer, M. (2005). Renal Tubular Acidosis. *Compendium*, 27(7), 513–529.
- Rishniw, M. and Bicalho, R. (2015). Factors affecting urine specific gravity in apparently healthy cats presenting to first opinion practice for routine evaluation. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 17(4), 329–337. <https://doi.org/10.1177/1098612X14541263>
- Sato, R., Soeta, S., Miyazaki, M., Syuto, B., Sato, J., Miyake, Y. I., Yasuda, J., Okada, K. and Naito, Y. (2002). Clinical availability of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase index in dogs with urinary diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(4), 361–365. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.361>
- Schaefer, H., Kohn, B., Schweigert, F. J. and Raila, J. (2011). Quantitative and Qualitative Urine Protein Excretion in Dogs with Severe Inflammatory Response Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1292–1297. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00829.x>
- Schultze, A. E. and 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*, 18(4), 93–97. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.1989.tb00527.x>
- 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. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1), 65–72. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2009.0426.x>

Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miró, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. and Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 165(1–2), 1–18.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.022>

Solano-Gallego, L., Rodriguez, A., Iniesta, L., Arboix, M., Portus, M. and Alberola, J. (2003).

Detection of Anti-Leishmania Immunoglobulin G Antibodies in Urine Specimens of Dogs with Leishmaniasis. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(5), 849–855.

<https://doi.org/10.1128/CDLI.10.5.849-855.2003>

Solano-Gallego, Laia, Mirá, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M. G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. and Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-86>

Tappin, S. W., Taylor, S. S., Tasker, S., Dodkin, S. J., Papasouliotis, K. and Murphy, K. F. (2011).

Serum protein electrophoresis in 147 dogs. *Veterinary Record*, 168(17), 456.

<https://doi.org/10.1136/vr.d88>

Tate, J., Caldwell, G., Daly, J., Gillis, D., Jenkins, M., Jovanovich, S., Martin, H., Steele, R., Wienholt, L. and Mollee, P. (2012). Recommendations for standardized reporting of protein

electrophoresis in Australia and New Zealand. *Annals of Clinical Biochemistry*, 49(3), 242–256.

<https://doi.org/10.1258/acb.2011.011158>

Theodorescu, D., Fliser, D., Wittke, S., Mischak, H., Krebs, R., Walden, M., Ross, M., Eltze, E.,

Bettendorf, O., Wulfig, C. and Semjonow, A. (2005). Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in

urine. *Electrophoresis*, 26(14), 2797–2808. <https://doi.org/10.1002/elps.200400208>

Théron Marie-Laure, Piane Laetitia, Lucarelli Laetitia, Henrion Rémi, Layssol-Lamour, C., Palanché, F., Concordet, D., Braun, J.-P. D., Trumel, C. and Lavoué, R. (2017). Effects of storage conditions on results for quantitative and qualitative evaluation of proteins in canine urine. *American Journal of Veterinary Research* , 78(8), 990–999. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.8.990>.

Thoresen, S. I., Havre, G., Morberg, H. and Mowinckel, P. (1992). Effects of storage time on chemistry results from canine whole blood, heparinized whole blood, serum and heparinized plasma. *Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 21, 88–94. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.1992.tb00591.x>

Tothova, C., Nagy, O. and Kovac, G. (2016). Serum proteins and their diagnostic utility in veterinary medicine: A review. *Veterinarni Medicina*, 61(9), 475–496. <https://doi.org/10.17221/19/2016-VETMED>

Uji, Y. and Okabe, H. (2001). Serum Proteins Analysis by Capillary Electrophoresis. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* , 16(2), 166–180.

Vaden, S. L. (2011). Glomerular Disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3), 128–134. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>

van Vonderen, I. K., Kooistra, H. S. and Rijnberk, A. (1997). Intra- and interindividual variation in urine osmolality and urine specific gravity in healthy pet dogs of various ages. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 11(1), 30–35. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1997.tb00070.x>

- Verlander, J. W. (2014a). Filtración glomerular. In J. G. Cunningham & B. G. Klein (Eds.), *Fisiología Veterinaria* (4th ed., pp. 460–468). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-317-8/00056-7>
- Verlander, J. W. (2014b). Reabsorción de solutos. In J. G. Cunningham & B. G. Klein (Eds.), *Fisiología Veterinaria* (pp. 469–480). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-84-9022-317-8/00056-7>
- Vientós-Plotts, A. I., Behrend, E. N., Welles, E. G., Chew, D. J., Gaillard, P. R., Busler, J. N. and Lee, H. P. (2018). Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine samples from dogs and cats. *American Journal of Veterinary Research*, 79(5), 525–531. <https://doi.org/10.2460/ajvr.79.5.525>
- Voeten, R. L. C., Ventouri, I. K., Haselberg, R. and Somsen, G. W. (2018). Capillary Electrophoresis: Trends and Recent Advances. *Analytical Chemistry*, 90(3), 1464–1481. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b00015>
- von Hendy-Wilson, V. E. and Pressler, B. M. (2011). An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 188(2), 156–165. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.05.006>
- Watson, A. D. J., Lefebvre, H. P., Concordet, D., Laroute, V., Ferré, J. P., Braun, J. P., Conchou, F. and Toutain, P. L. (2002). Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: Comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16(1), 22–33. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2002.tb01603.x>
- Wehner, A., Hartmann, K. and Hirschberger, J. (2008). Utility of serum cystatin C as a clinical measure of renal function in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 44(3), 131–138. <https://doi.org/10.5326/0440131>

- Westgard J. O. (Ed.). (2013). *Validación Básica de Método*. Westgard QC.
- Whittemore, J. C., Gill, V. L., Jensen, W. A., Radecki, S. v. and Lappin, M. R. (2006). Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumin-creatinine ratio and systemic disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(6), 958–963.
<https://doi.org/10.2460/javma.229.6.958>
- Yalçın, A., Çetin, M. and Cetin, M. (2004). Electrophoretic Separation of Urine Proteins of Healthy Dogs and Dogs with Nephropathy and Detection of Some Urine Proteins of Dogs Using Immunoblotting. *Revue Méd. Vét.*, 155(2), 104–112.
- Zaragoza, C., Barrera, R., Centeno, F., Tapia, J. A., Durán, E., González, M., & Mañé, M. C. (2003). SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary research*, 34(2), 137–151. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002061>
- Zatelli, A., Paltrinieri, S., Nizi, F., Roura, X. and Zini, E. (2010). Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 71(2), 235–240. <https://doi.org/10.2460/ajvr.71.2.235>
- Zini, E., Bonfanti, U. and Zatelli, A. (2004). Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 65(7), 964–971.
<https://doi.org/10.2460/ajvr.2004.65.964>



Reference intervals for electrophoretograms obtained by capillary electrophoresis of dialyzed urine from healthy dogs

Paula F. Navarro, Laura Gil,¹ Germán Martín, Salceda Fernández-Barredo

Abstract. Electrophoresis of urine to evaluate protein fractions in dogs with proteinuria to differentiate glomerular from tubular damage has increased in recent years; however, capillary electrophoresis (CE) of urine has not been reported in a study of >40 healthy animals, to our knowledge. We aimed to establish reference intervals (RIs) for the urine protein fractions obtained by CE of urine from healthy dogs. We obtained urine samples from 123 clinically healthy dogs of both sexes between December 2016 and April 2019; urine was frozen until CE was performed. The electrophoretic patterns obtained were divided into 5 protein fractions, and RIs were established in percentages and absolute values using nonparametric methods. RIs were obtained for the fractions (F) as follows: 5.5–56.2% for F1, 3.2–16.5% for F2, 3.5–16.2% for F3, 17.8–69.8% for F4, and 5.1–23.9% for F5. These RIs obtained by CE might be useful clinically as a basis for comparison with pathologic samples. Age was a statistically significant factor for F2 ($p=0.01$) and F3 ($p=0.02$), and sex was a statistically significant factor for F1 ($p=0.03$).

Keywords: canine; dialysis; electrophoretic pattern; proteinuria; reference intervals; renal disease; urinary.

Serum protein analysis by capillary electrophoresis (CE) is a well-established laboratory method used for the diagnosis and follow-up of infectious, inflammatory, immune-mediated, and neoplastic conditions in human and veterinary medicine, given that it is a simple, adaptable, and rapid technique that does not require a large amount of sample.^{9,18,25} The CE process is based on the separation of charged molecules based on their electrophoretic mobility in an alkaline buffer at a specific pH. The separation occurs according to the buffer pH and electroosmotic flow, yielding various electrophoretic fractions.^{26,32} In plasma or serum, the electrophoretogram in mammals is commonly divided into the following fractions from low to high molecular weight (MW) and charge: albumin, alpha-1-, alpha-2-, beta-1-, beta-2-, and gamma globulins.^{5,30}

Analysis of proteins in urine by CE has proven to be a suitable method in human medicine to detect the presence of characteristic electrophoretic patterns in renal and extrarenal disorders.^{17,24,31} Although only quantitative proteinuria can be assessed by the urine protein:creatinine ratio (UPC), electrophoretic techniques can be used as a semiquantitative method to assess the loss of proteins through urine because different patterns can be identified.¹⁴

Pathologic renal proteinuria is the presence of protein in urine attributable to structural or functional lesions within the kidneys. The origin of this pathologic proteinuria can be glomerular, tubular, or interstitial.²¹ Normally, the small amount of protein present in filtrate passes through

the glomerular capillary walls and is reabsorbed by the proximal tubules. Proteins larger than albumin (69 kDa) rarely pass through glomeruli.¹³ A few studies have examined the most abundant proteins in the urine of healthy animals. In 2010, a study detected C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2, and retinol-binding protein in the urine of healthy dogs.²³

Different methods can be used to evaluate proteinuria in dogs, including colorimetric strips, the UPC ratio, and urine albumin and microalbumin concentrations.¹¹ The most common method used today in veterinary medicine to measure proteinuria is the UPC ratio given that it provides a quantitative result. Physiologic proteinuria in canine species is considered when the UPC ratio is <0.2, borderline proteinuria is considered when the ratio is 0.2 to 0.5, and significant proteinuria is considered when the ratio is >0.5, provided that it is accompanied by an inactive urinary sediment.²¹

A few studies in veterinary medicine have correlated different urine electrophoretogram patterns with pathologic

Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales (Navarro, Gil, Martín) and Escuela de Doctorado (Navarro), Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Valencia, Spain; Cedivet Centro Diagnóstico Veterinario, Valencia, Spain (Fernández-Barredo).

¹Corresponding author: Laura Gil, Facultad de Veterinaria y Ciencias Experimentales, Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir, Calle Guillem de Castro, 94 46001, Valencia, Spain. laura.gil@ucv.es

Table 1. Age and sex of the 123 healthy dogs studied to evaluate dialyzed urine fractions by capillary electrophoresis.

	M	F	Intact (M/F)	Castrated/spayed	Unknown (M/F)
Puppy (1 mo–1 y)	15	18	12/17	3/0	0/1
Adult (1–8 y)	19	34	6/10	13/18	0/6
Senior (>8 y)	20	17	4/2	12/12	4/3
Total	54	69	22/29	28/30	4/10

F = female; M = male.

conditions using sodium dodecyl sulfate agarose–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-AGE; SDS-PAGE) and high-resolution gel electrophoresis (HRE).^{2,10,14,20,33,35} To our knowledge, no data are available concerning CE electrophoretic patterns in normal or pathologic urine from dogs. We chose CE because of its advantages in serum, including the reduced separation time (2 min vs. 20 min in a gel), reduction of waste harmful to humans and the environment, and ability to obtain a curve without the need for additional staining as is needed for gel electrophoresis.^{8,9,12,22} Moreover, urinary CE in dogs is new and may be of interest to veterinary laboratorians.

We aimed to establish reference intervals (RIs) for the various protein fractions obtained from the urine of healthy dogs by CE for comparison with pathologic conditions.

Materials and methods

Twenty-three veterinary centers, including veterinary clinics and reference veterinary hospitals, collaborated between December 2016 and April 2019. Our study was approved by the research and ethics committee of the Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (Valencia, Spain; UCV 2017-2018-33). Urine samples were obtained from 123 clinically healthy dogs by free catch, which could be done easily by the owners and did not require specific training. A potential disadvantage of free catch, instead of cystocentesis, is the hypothetical presence of proteins from the reproductive system, given that we also included intact animals in our study. The inclusion criteria for the study were biological data for the patient, such as age (juvenile = 0–1 y old; adult = >1–8 y old; senior = >8 y old), sex (female, male), reproductive status (intact, castrated, or spayed), breed, and clinical parameters such as clinical history (no signs of illness in the 2 wk preceding or following sample collection because longer follow-up was not possible in some cases), and a routine physical examination.

The study population was located in Spain and included outdoor and indoor dogs. Preventive care information was not available for all patients; therefore, it was not included as a study factor. Routine hematology, serum biochemistry, urinalysis, and serology to detect antibody titers for *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Rickettsia conorii* were performed. Data for urine protein concentration were only recorded in 110 dogs. We excluded from our study patients

with an abnormal history or physical examination and/or concurrent diseases and those that were apparently healthy but subsequently developed clinicopathologic alterations.

The dogs were divided into 4 subgroups by age range, sex, and reproductive status, differentiating males from females (Table 1). Several breeds were included randomly in our study: mixed-breed (56), Boxer (8), Dachshund (6), Labrador Retriever (6), Yorkshire Terrier (6), Golden Retriever (4), Spanish Hound (4), Maltese Bichon (3), Ratonero Valenciano (3), Staffordshire Bull Terrier (3), Doberman Pinscher (2), German Shepherd (2), Greyhound (2), and Siberian Husky (2). Breeds represented by a single dog each included Basset Hound, Beagle, Belgian Shepherd, Border Collie, Chihuahua, French Bulldog, German Shorthair Pointer, Pomeranian, and Pug.

Blood samples were collected from either the cephalic or jugular vein after 12 h of fasting. Samples of 0.5 mL of whole blood in a 0.5-mL EDTA tube (Aquisel) and a minimum of 1.5 mL of blood in a 2-mL tiger-top tube for serum collection (Aquisel) were obtained, centrifuged (Centrifuge 2650; Nahita) at $1,340 \times g$ for 10 min, refrigerated in 1.5-mL microcentrifuge tubes (Lambda) at 4°C, and analyzed within the following 24 h. Owners were asked to collect a minimum of 8 mL of the first urine in the morning by free catch of a mid-stream sample in a 150-mL sterile plastic specimen cup (Deltalab) supplied by the hospital. Urine was stored at 4°C and analyzed within the following 12 h.

All EDTA blood, sera, and urine samples were processed by a reference laboratory (Cedivet, Valencia, Spain). The analysis included a complete blood count (CBC; Celltac Alpha VET MEK-6550; Nihon) with blood smear evaluation. Biochemical analytes measured included creatinine, urea, alanine aminotransferase, and total serum proteins (CS 300 analyzer; Dirui). Serum electrophoretograms were run by CE (Minicap instrument; Sebia). Sera of all animals were also tested for antibodies to *L. infantum*, *E. canis*, and *R. conorii* by an immunofluorescent antibody test (Axio Scope HBO 50 microscope; Zeiss) because these infectious disease agents are highly prevalent in the Mediterranean area.

Urine samples were centrifuged (Centrifuge 2650; Nahita) at $804 \times g$ for 5 min, and the supernatants were divided into 1-mL aliquots, minimum of 4 mL, and stored at –20°C prior to dialysis in a 1.5-mL plastic microcentrifuge tube (Lambda). An aliquot of freshly collected urine (maximum of 24 h after collection) was kept to evaluate the following variables:

1) microscopic fresh and stained sediment at low- and high-power fields (Binocular microscope DM500; Leica); 2) urine total proteins and creatinine (automated chemistry analyzer; Dirui), to allow calculation of the UPC (urine creatinine dilution was 1:49 in all samples; creatinine was measured by a creatinine enzymatic method, and proteins in urine were measured with pyrogallol red reagent); 3) urine culture in a specific chromogenic medium (CHROMagar orientation medium; Becton Dickinson); 4) specific gravity (refractometer; Optika Ponteranica); and 5) pH, glucose, ketone, bilirubin, and hemoglobin or myoglobin levels (Lab-Strip U11 Plus; 77 Elektronika).

Urine was dialyzed before CE (Sebia) to eliminate compounds that could interfere with the wavelength used for reading and cause artifact peaks, and to avoid salts that could have deleterious effects on the capillary tube. The dialysis procedure followed the manufacturer's protocol. Urine supernatant (4 mL) from each dog was thawed at room temperature and centrifuged at $1,609 \times g$ for 10 min. The resulting supernatant was transferred to a 4-mL dialysate column (Vivaspin Turbo 4 10,000 MWCO; Sartorius). Dialysate columns containing urine were centrifuged at $1,878 \times g$ for 25 min; the urine that emerged at the filtrate container was discarded. Washing solution was prepared adding 50% ultra-pure distilled water and 50% dialysis buffer (Sebia) in a sterile container. The concentrator was refilled to 4-mL volume with this solution and centrifuged at $1,878 \times g$ for 20 min. The 200 μ L obtained was transferred to a 1.5-mL microcentrifuge tube and subjected to CE (Minicap; Sebia).

Twenty-six samples could be run at once, and 100 μ L was sufficient to perform the analysis. Silica capillaries were filled with protein separation buffer (Sebia). Then the samples were aspirated into the anodic end of the capillary. High-voltage was applied to run the sample along the capillary. When samples reached the cathodic end, detection and quantification of the protein fractions were performed at a wavelength of 200 nm. An electrophoretic curve was obtained for analysis.

As quality control (QC) material, we included frozen aliquoted sera from a healthy dog, diluted in running buffer at 1:49 and migrated prior to any run and in each batch. The manufacturer reported a sensitivity of 20.0 mg/L, and a maximum coefficient of variation (CV) of 4% from the area comprised of the baseline of the chart to the peak apex of the electrophoretogram, validated for monoclonal proteins, which may vary depending on the polyclonal background.

Internal verification experiments were also performed; within-run and between-run experiments were performed using urine from a healthy dog. This urine was stored at 4°C during the entire experiment and dialyzed and concentrated for every run following the manufacturer's protocol. Three migrations per sample and day (repeatability) were made for 5 consecutive days (reproducibility), with the objective of calculating the CV for each of the fractions of the urinary

proteinogram. As QC material, a 1:49 diluted serum from the same dog was run simultaneously. The limit of detection (LOD) was determined with the urine sample of the same healthy dog. Briefly, 1 in 2, 1 in 4, 1 in 8, and 1 in 16 dilutions of the dialyzed urine were made in running buffer and were run. The LOD was selected as the last dilution with an electrophoretic pattern equal to the undiluted urine.

The urine electrophoretic pattern obtained for each dog was divided into protein fractions 1 to 5 (F1–F5). These fractions were determined by superimposing the normal canine diluted serum used as QC material over the electrophoretic samples (instead of human serum as suggested by the manufacturer in the human urine protocol). Protein fractions were verified and, if necessary, corrected by visual inspection of the electrophoretogram. All samples were analyzed by the same person (P. Navarro).

Outliers were detected (Reference value advisor macro v.2.0; Microsoft).⁷ Histograms of the reference values of each urine electrophoretogram fraction were assessed to identify potential outliers (Figs. 1, 2). Tukey interquartile fences and the Dixon outlier range statistic were used to identify true and suspected outliers. True outliers were deleted, whereas suspected outliers were retained following the American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) guidelines.⁴

RIs were obtained (Reference value advisor v.2.0; Microsoft) through the nonparametric method given that the population was large enough.⁷ Information regarding data distribution was not necessary because nonparametric methods were used. Moreover, 95% RIs in percentages and absolute values were calculated with 90% CIs for reference limits according to the ASVCP 2012 guidelines. Bootstrapping was used when the population was <120 .^{4,6} Partitioning analysis by age and reproductive status was not possible given the low number of dogs in each subgroup (<40).⁴ Partitioning by sex was rejected according to the z -score.¹⁹

Statistical analysis to compare the different subgroups was performed (R v.3.4.3; <https://www.r-project.org/>). The Anderson–Darling test was used for each subgroup to test the hypothesis of normality. Outliers were detected and eliminated if they were considered aberrant observations, although the emphasis was to retain them rather than delete them. The ANOVA test was used to establish whether age, sex, or reproductive status, or differentiating males from females, influenced the proteinogram fractions.

Results

In the within-run experiment, the CV results were 3.38%, 3.84%, 7.25%, 4.43%, and 7.31% for F1, F2, F3, F4, and F5, respectively. In the between-run experiment, the CV results were 4.78%, 5.17%, 10.0%, 6.09%, and 9.66% for F1, F2, F3, F4, and F5, respectively. The sensitivity obtained in the LOD experiment was 2.1 mg/L.

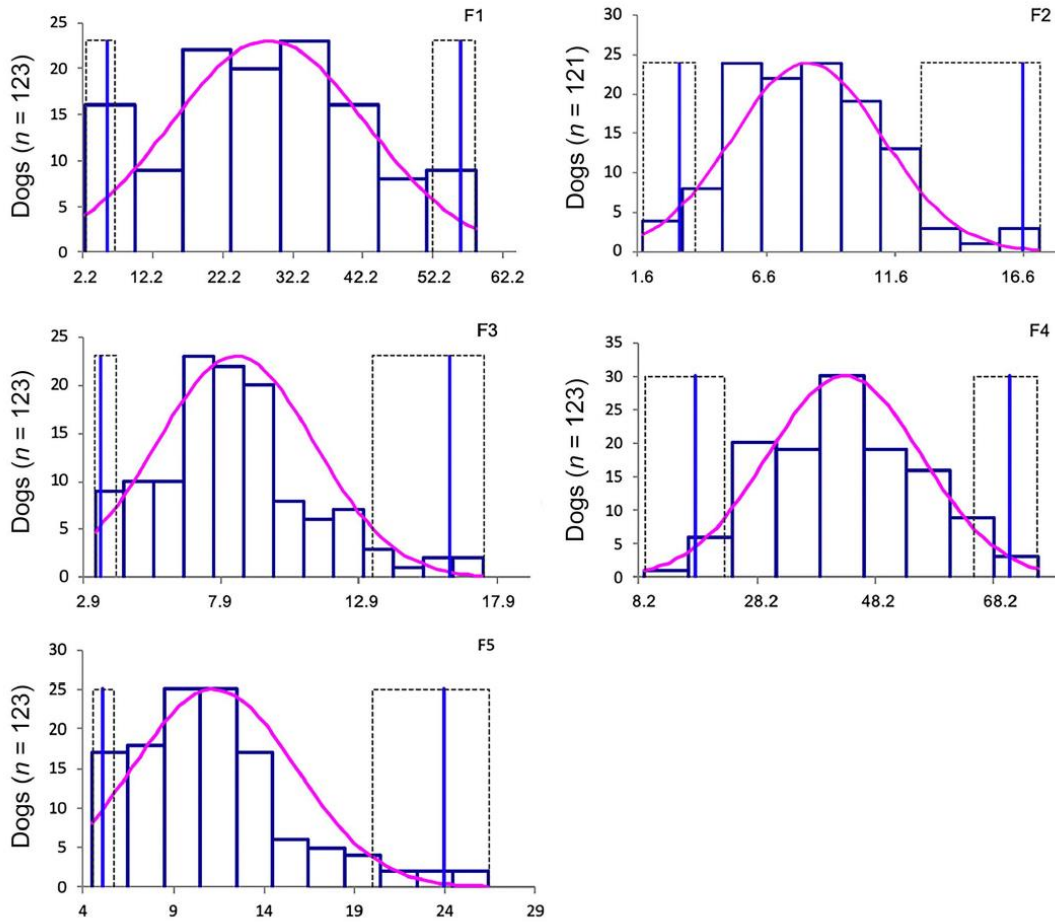


Figure 1. Histograms used to assess distribution in percentages of fractions 1–5 by capillary electrophoresis in dialyzed urine from healthy dogs. Two outlier values were eliminated from F2. X-axis values are percentages. The dashed line boxes represent 90% CIs of upper and lower limits of the RI of each fraction.

Electrophoretogram fractions F2 and F3 were decreased significantly in puppies compared to the adult and senior groups (Table 2). F1 was increased significantly in females compared to males (Table 3). No significant differences were found between intact and castrated males in the 5 urinary electrophoretogram fractions; no significant differences were found between intact or spayed females in any fraction. From percentage data, 2 outliers were deleted from F2. Regarding absolute data, 2, 2, 1, and 2 outliers were removed from F2, F3, F4, and F5, respectively. The set of the remaining dogs was used to obtain the RIs of each fraction of the urine curve (percentage and absolute). RIs were obtained for the different fractions as follows: 5.5–56.1% for F1, 3.2–16.5% for F2, 3.5–16.2% for F3, 17.8–

69.8% for F4, and 5.1–23.9% for F5 (Table 4). RIs in absolute values (mg/L) were obtained for the fractions, with the following values: 2.49–138 mg/L for F1, 0.87–36.3 mg/L for F2, 1.23–33.5 mg/L for F3, 6.68–182 mg/L for F4, and 2.32–51.5 mg/L for F5 (Table 5). A urine electrophoretogram from a healthy dog with 5 different fractions is shown in Fig. 3. The RI obtained for the UPC (n = 123) was 0.0–0.3. The RI for total proteins in urine (n = 109) was 14–408 mg/L.

Discussion

The UPC ratios of all samples included in our study were <0.5, and all sediments were inactive. This UPC range is

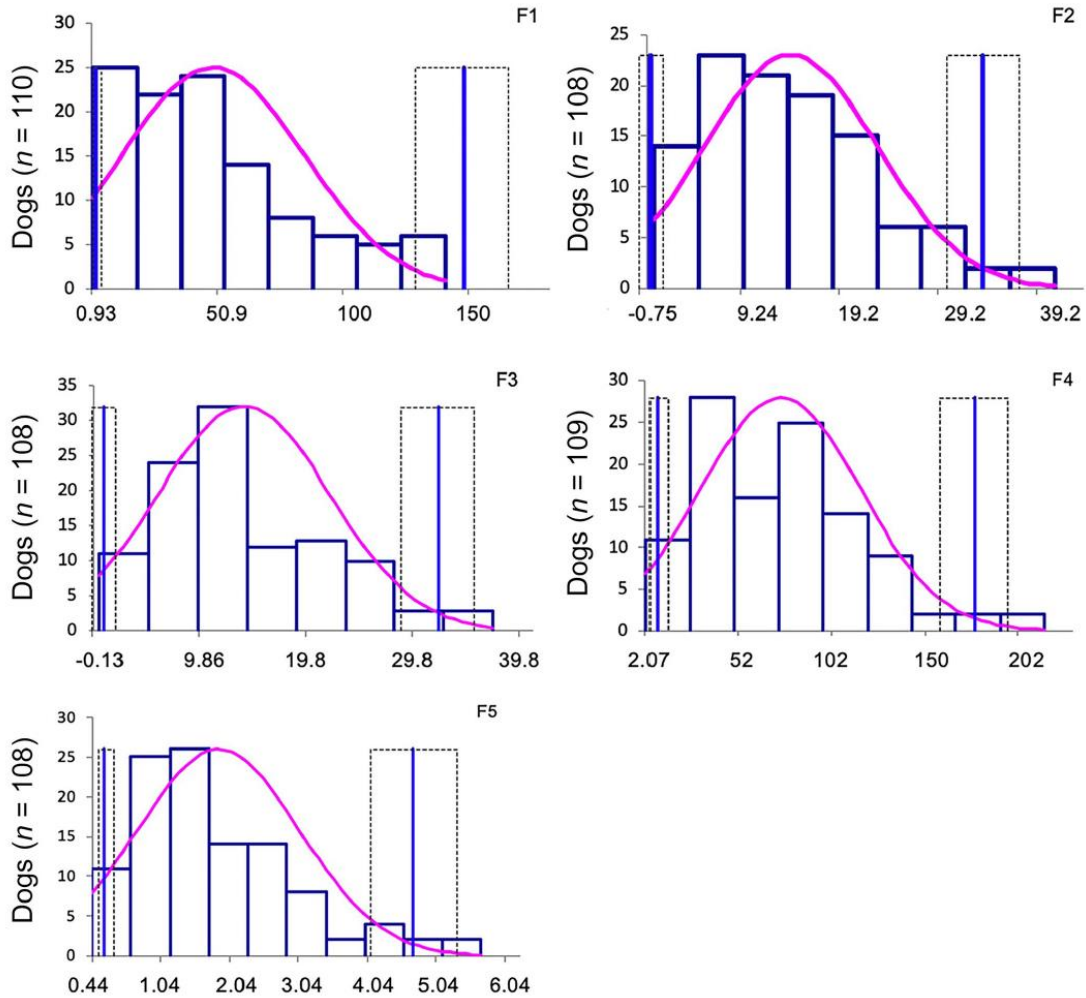


Figure 2. Distribution in absolute values (mg/L) of fractions 1–5 by capillary electrophoresis in dialyzed urine from healthy dogs. Two outlier values were eliminated from F2, F3, and F5, and one outlier value was eliminated from F4. X-axis values are in mg/L. The dashed line boxes represent 90% CIs of upper and lower limits of the RI of each fraction.

consistent with non-proteinuric IRIS (International Renal Interest Society) staging of proteinuria. We observed no statistically significant relationship in the urine electrophoretic pattern between entire or neutered male or female animals. These results could suggest that, although prostatic antigen arginine esterase is known to be found in urine of intact males, it may not be excreted constantly or in a significant amount, or it might be below the instrument's LOD. Nevertheless, studies with a larger population would be necessary to verify this suggestion.^{15,20,28}

Statistical differences found between age and sex in some fractions were significant. F2 and F3 were found to be

decreased in puppies compared to adult and senior dogs. In serum, these 2 fractions are related to globulins α_1 and α_2 ³⁰; therefore, this decrease could be related to immunity development during growth or to the administration of some recent preventive therapy for which information was not available to us.²⁷ F1 was found to be significantly higher in bitches compared to males. It may be that obesity and sex played a role in the urinary metabolome. Additional studies with a larger and homogeneous population would be necessary to confirm these hypotheses.^{1,3}

To our knowledge, RIs for CE in the urine of healthy dogs over a wide age range, with this number of animals, and with

a high confidence level have not been reported previously. RIs of urine CE in healthy dogs could be used to assess pathologic urinary samples, as used in human medicine to

Table 2. Effects of age on canine dialyzed urine electrophoretogram analytes by capillary electrophoresis evaluated with a one-way ANOVA (Tukey post hoc test with 95% CI).

Analyte	n	Factor	Mean	SD	p value*
F2	121	Puppy	6.87	2.37	0.01
		Adult	8.55	2.37	
		Senior	8.85	3.62	
F3	122	Puppy	7.23	2.35	0.02
		Adult	8.85	2.79	
		Senior	8.53	2.84	

n= 123 dogs (53 adults, 33 puppies, 37 seniors, except when outliers were excluded); normality testing was assessed using the Anderson–Darling test with adjusted Holm test. ANOVA= analysis of variance; CI= confidence interval; SD= standard deviation.

* Significance p≤0.05.

Table 3. Effects of sex on canine dialyzed urine electrophoretogram analytes by capillary electrophoresis evaluated with a one-way ANOVA (Tukey post hoc test with 95% CI).

Analyte	n	Factor	Mean	SD	p value*
F1	123	Male	25.6	14.3	0.03
		Female	31.1	13.6	

n= 123 dogs (69 females, 54 males, except when outliers were excluded); normality testing was assessed using the Anderson–Darling test with adjusted Holm test.

ANOVA= analysis of variance; CI= confidence interval; SD= standard deviation.

* Significance p≤0.05.

evaluate patients with kidney disease and paraproteinemia. Future lines of study include comparison with urine from dogs with renal disease in which differences between fractions would be expected, such as an increase in the excretion of F1 in dogs with chronic kidney disease. Anti-IgG has been detected in the urine of dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease³⁴; therefore, it would be reasonable to think that F5 would be increased if renal damage occurred in infectious diseases. Comparing our results with the data obtained in other studies on the identification of urine proteins is difficult because the techniques used in those studies are different, and the numbers of animals in the samples are very diverse. Qualitative studies have been conducted in animals with kidney disease at different stages of severity, primarily in search of biomarkers.^{2,10,14,15,20,22} A study was conducted in dogs with kidney disease in an attempt to differentiate patterns of renal tubular and glomerular disease by SDS-PAGE.²⁹ Another study³⁵ compared the patterns obtained with renal histologic lesions using SDS-PAGE in dogs. Using immunoblotting, another study³³ compared the bands obtained by SDS-PAGE in healthy dogs to those observed in animals with renal proteinuria; the most abundant protein in healthy animals was albumin (MW 65 kDa). Other proteins were also detected in lesser amounts, such as α1-microglobulin (MW 27 kDa) and transferrin (MW 76 kDa). All of these studies detected mixed glomerular and tubular patterns, showing high (>65 kDa) and low (<65 kDa) MW bands, and tubular patterns showing only low MW bands.

A limitation in our study is the inability to compare CE results with the results of other techniques using gel

Table 4. Reference intervals in percentages for dialyzed urinary capillary electrophoresis fractions using Minicap (Sebia) in dogs.

Analyte	Unit	n	Mean	SD	Median	IQR	Min.	Max.	RI	LRL (90% CI)	URL (90% CI)	Distribution	Method
F1	%	123	28.7	14.0	27.0	19.6–39.2	2.5	58.3	5.54–56.2	2.50–6.70	52.2–58.3	Gaussian	NP
F2	%	121	8.19	2.91	8.10	6.2–9.9	1.8	17.2	3.21–16.5	1.80–3.80	12.6–17.2	Gaussian	NP
F3	%	123	8.41	2.87	8.10	6.6–9.6	3.3	17.4	3.51–16.2	3.30–4.10	13.4–17.4	Non-Gaussian	NP
F4	%	123	43.0	13.0	42.5	33.2–51.7	9.2	75.7	17.8–69.8	9.20–22.7	65.0–75.7	Gaussian	NP
F5	%	123	11.2	4.48	10.5	8.05–13.1	4.5	26.4	5.11–23.9	4.50–5.70	20.0–26.4	Non-Gaussian	NP

n= 123 dogs, except when outliers were excluded. CI= confidence interval; IQR= interquartile range; LRL= lower reference limit; NP= nonparametric; RI= reference interval; SD= standard deviation; URL= upper reference limit.

Table 5. Reference intervals in absolute values for dialyzed canine urinary capillary electrophoresis fractions using Minicap (Sebia) in dogs.

Analyte	Unit	n	Mean	SD	Median	IQR	Min.	Max.	RI	LRL (90% CI)	URL (90% CI)	Distribution	Method
F1	mg/L	110	4.92	3.63	4.38	2.06–6.82	1.11	141	2.49–138	11.1–42.0	131–142	Non-Gaussian	NP
F2	mg/L	108	1.43	0.87	1.29	0.80–1.95	0.64	41.0	0.87–36.3	0.64–2.21	31.0–41.0	Non-Gaussian	NP
F3	mg/L	108	1.40	0.81	1.25	0.84–1.93	0.46	37.3	1.23–33.5	0.46–2.29	29.0–37.3	Non-Gaussian	NP
F4	mg/L	109	7.45	4.30	7.35	4.35–10.2	2.30	216	6.68–182	2.30–16.7	154–216	Non-Gaussian	NP
F5	mg/L	108	1.88	1.18	1.64	1.02–2.39	0.49	57.1	2.32–51.5	0.49–4.69	45.2–57.1	Non-Gaussian	NP

n= 110 dogs, except when outliers were excluded. CI= confidence interval; IQR= interquartile range; LRL= lower reference limit; NP= nonparametric; RI= reference interval; SD= standard deviation; URL= upper reference limit.

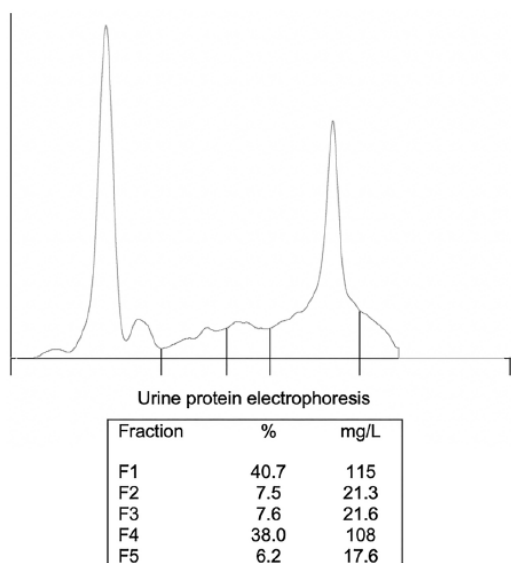


Figure 3. Example electrophoretogram by capillary electrophoresis in dialyzed urine with 5 fractions differentiated; results given in percentages and absolute values. Urine collected by free catch from a healthy 4-y-old, spayed female Golden Retriever. Urine protein:creatinine ratio=0.10. The values of all fractions fall within the RIs found in our study.

electrophoresis, such as SDS-PAGE. Proteins in CE migrate based on their charge and size; proteins migrate only based on their size in SDS techniques. Establishment of the different fractions has also been challenging because we found only one reference related to the establishment of the urinary fractions, and it was focused on paraproteins.¹⁶ A follow-up period of >2 wk to ensure the lack of renal disease was not possible in the majority of our cases. No data were recorded on preventive care, weight, and body condition score in our cases, factors that could potentially alter protein excretion in urine from healthy animals.

Acknowledgments

We thank all of the veterinarians who cooperated in our study and provided samples for the project, and the technical personnel of Cedivet for their collaboration in sample processing.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir (grant UCV 2016-226-001/UCV 2018-226-001).

ORCID iDs

Laura Gil  <https://orcid.org/0000-0001-5635-8915>

Salceda Fernández-Barredo  <https://orcid.org/0000-0001-8281-3096>

References

- Bjørnvad CR, et al. Neutering increases the risk of obesity in male dogs but not in bitches—a cross-sectional study of dog- and owner-related risk factors for obesity in Danish companion dogs. *Prev Vet Med* 2019;170:104730.
- Chacar F, et al. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. *Physiol Rep* 2017;5:e13262.
- Forster GM, et al. A comparative study of serum biochemistry, metabolome and microbiome parameters of clinically healthy, normal weight, overweight, and obese companion dogs. *Top Companion Anim Med* 2018;33:126–135.
- Friedrichs K, et al. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol* 2012;41:441–453.
- Gay-Bellile C, et al. Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins. *Clin Chem* 2003;49:1909–1915.
- Geffré A, et al. Reference values: a review. *Vet Clin Pathol* 2009;38:288–298.
- Geffré A, et al. Reference value advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol* 2011;40:107–112.
- Gherasim P, et al. Updates on serum protein electrophoresis. *Rom J Gerontol Geriatr* 2017;6:41–46.
- Giordano A, Paltrinieri S. Interpretation of capillary zone electrophoresis compared with cellulose acetate and agarose gel electrophoresis: reference intervals and diagnostic efficiency in dogs and cats. *Vet Clin Pathol* 2010;39:464–473.
- Giori L, et al. High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:682–690.
- Grauer FG. Measurement, interpretation and implications of proteinuria and albuminuria. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007;37:283–295.
- Guillaume C. Electrophoretic techniques: the old and the new. *Vet Clin Pathol* 2010;38:399–400.
- Harley L, Langston C. Proteinuria in dogs and cats. *Can Vet J* 2012;53:631–638.
- Hokamp JA, Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol* 2016;45:28–56.
- Hokamp JA, et al. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. *Vet Clin Pathol* 2018;47:425–434.
- Inman Z, et al. Reporting of quantitative protein electrophoresis in Australia and New Zealand: a call for standardisation. *Clin Biochem Rev* 2009;30:141–151.
- Jenkins MA. Clinical application of capillary electrophoresis to unconcentrated human urine proteins. *Electrophoresis* 1997;18:1842–1846.

18. Jenkins MA. Serum and urine electrophoresis for detection and identification of monoclonal proteins. *Clin Biochem Rev* 2009;30:119–122.
19. Lahti A, et al. Objective criteria for partitioning Gaussian distributed reference values into subgroups. *Clin Chem* 2002; 48:338–352.
20. Lavoue R, et al. Characterization of proteinuria in Dogue de Bordeaux dogs, a breed predisposed to a familial glomerulonephropathy: a retrospective study. *PLoS One* 2015;10:e0133311.
21. Lees GE, et al. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement. *J Vet Intern Med* 2005;19:377–385.
22. Levinson SS. Urine protein electrophoresis and immunofixation electrophoresis supplement one another in characterizing proteinuria. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30:79–84.
23. Maddens BE, et al. Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;134:259–264.
24. Mischak H, et al. Urinary proteomics based on capillary electrophoresis-coupled mass spectrometry in kidney disease: discovery and validation of biomarkers and clinical application. *Adv Chronic Kidney Dis* 2010;17:493–506.
25. Moyle PS, et al. Effect of common storage temperatures and container types on urine protein: creatinine ratios in urine samples of proteinuric dogs. *J Vet Intern Med* 2018;32:1652–1658.
26. Osatinsky R. ¿Qué es la electrophoresis capilar? [What is capillary electrophoresis?]. *Bioquim Patol Clin* 2007;71:60–66. Spanish.
27. Pereira M, et al. Development of dog immune system: from in uterus to elderly. *Vet Sci* 2019;6:83.
28. Schellenberg S, et al. The effects of hydrocortisone on systemic arterial blood pressure and urinary protein excretion in dogs. *J Vet Intern Med* 2008;22:273–281.
29. Schultze AE, Jensen RK. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular diseases. *Vet Clin Pathol* 1989;18:93–97.
30. Tappin SW, et al. Serum protein electrophoresis in 147 dogs. *Vet Rec* 2011;168:456.
31. Theodorescu D, et al. Pilot study of capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry as a tool to define potential prostate cancer biomarkers in urine. *Electrophoresis* 2005;26: 2797–2808.
32. Wätzig H, Günter S. Capillary electrophoresis—a high performance analytical separation technique. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:724–738.
33. Yalçın A, Çetin M. Electrophoretic separation of urine proteins of healthy dogs and dogs with nephropathy and detection of some urine proteins of dogs using immunoblotting. *Rev Med Vet* 2004;155:104–112.
34. Zaragoza C, et al. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Res* 2003;34: 137–151.
35. Zini E, et al. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am J Vet Res* 2004;65:964–971.

