

Padronização da avaliação da função renal de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora

Standardization of renal function evaluation in Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Federal University of Juiz de Fora's colony

Autores

Bárbara Bruna Abreu de Castro¹

Fernando Antonio Basile Colugnati^{1,2}

Marcos Antonio Cenedeze^{2,3}

Paulo Giovanni de Albuquerque Suassuna¹

Hélady Sanders Pinheiro^{1,2}

¹ Universidade Federal de Juiz de Fora.

² Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

³ Fundação Oswaldo Ramos/ Hospital do Rim e Hipertensão.

Data de submissão: 29/06/2013.

Data de aprovação: 25/12/2013.

Correspondência para:

Bárbara Bruna Abreu de Castro.

Centro de Biologia da Reprodução - Universidade Federal de Juiz de Fora.

Rua José Lourenço Kelmer, s/nº. Juiz de Fora, MG, Brasil. CEP: 36036-900.

E-mail: barbarabac@yahoo.com.br

Fundação Instituto Mineiro de Estudos e Pesquisas em Nefrologia (IMEPEN); Rede Mineira de Bioterismo 31/11 e Rede Mineira Toxifar 26/11 - FAPEMIG.

RESUMO

Introdução: Há grande interesse na utilização de modelos animais na pesquisa da fisiopatologia renal, que requer padronização dos parâmetros analisados. **Objetivo:** Padronizar a avaliação da função renal de ratos da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. **Métodos:** Foram utilizados 30 ratos Wistar e realizadas dosagens de creatinina (sérica e urinária), ureia sérica e proteinúria. Foram avaliados: o intervalo de coleta de urina nas gaiolas metabólicas (24 horas ou 12 horas); a necessidade de jejum de 12 horas; a necessidade de desproteinização das amostras de urina e soro para dosagens de creatinina; necessidade de desproteinização do soro de animais com injúria renal aguda (IRA) para leitura em espectrofotômetro e ELISA, além da comparação da proteinúria de 24 horas (PT 24 horas) com a relação proteína/creatinina (rP/C). Os resultados foram comparados pelos teste *t* de Student, correlação de Pearson, gráfico de Bland-Altman para concordância e modelo de regressão linear para estimar a PT 24 horas a partir da rP/C. **Resultados:** A diurese de 24 horas foi maior do que a de 12 horas, interferindo na depuração da creatinina. No grupo em jejum, houve menor ingestão hídrica e menor creatinina urinária. Houve grande variabilidade para o soro desproteinizado e as leituras realizadas nos dois equipamentos foram semelhantes. Houve forte correlação entre PT 24 horas e rP/C e foi gerada a equação: PT 24 horas = (8,6113 x rP/C) + 1,0869. **Conclusão:** Foi padronizada: coleta de urina em 24 horas sem jejum. A desproteinização não mostrou benefício. As dosagens foram realizadas com confiabilidade em espectrofotômetro. Foi gerada uma fórmula prática para estimar PT 24 horas por meio da rP/C.

Palavras-chave: creatinina; manejo de espécimes; proteinúria; roedores; testes de função renal.

ABSTRACT

Introduction: There is great interest in the use of animal models in the study of renal pathophysiology requires standardization of parameters. **Objective:** Standardize assessment of renal function in rats from in the Center for Reproductive Biology of Federal University of Juiz de Fora's colony. **Methods:** Thirty Wistar rats were used and performed measurements of creatinine (serum and urine), serum urea and proteinuria. Were evaluated: the urine collection interval in metabolic cages (24 hours or 12 hours), the need for 12-hour fast, the need of urine and serum deproteinization for creatinine measurement, need of serum deproteinization in animals with acute kidney injury to a spectrophotometer and ELISA, and the comparison of 24-hour proteinuria (PT 24 hours) with the protein/creatinine ratio (rP/C). Means were compared by the Student's *t* test, Pearson correlation, Bland-Altman plot for agreement and linear regression model to estimate PT 24 hours from rP/C. **Results:** The 24 hours urine output was greater than 12 hours, interfering with the creatinine clearance calculation. In the fasting group showed less water intake and lower urinary creatinine. There was great variability for the deproteinized whey and readings performed in the two devices were similar. There was a strong correlation between PT 24 hours and rP/C and the equation was generated: PT 24 hours = (8.6113 x rP/C) + 1.0869. **Conclusion:** Was standardized: 24-hour urine collection without fasting. The deproteinization showed no benefit. The measurements were performed with spectrophotometer reliability. It generated a practical formula for estimating PT 24 hours through rP/C.

Keywords: creatinine; kidney function tests; proteinuria; rodentia; specimen handling.

INTRODUÇÃO

A experimentação animal é uma ferramenta importante para o conhecimento da fisiopatologia de diversas doenças, considerando que sua utilização permitiu a descoberta e o avanço no desenvolvimento de tratamentos, métodos de prevenção e diagnóstico, relevantes para a saúde humana.¹ O uso de animais, respeitando os preceitos éticos, supera limitações existentes na experimentação humana e proporciona a investigação rápida de doenças, com eficácia e custos menores.²

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia com elevadas morbidade e mortalidade e vem apresentando aumento progressivo nas taxas de incidência e prevalência nos últimos anos. Entre 2000 e 2010, houve um aumento de 115% de pacientes em diálise no país, totalizando, em 2011, 91.314 doentes.³ A DRC caracteriza-se pela presença de lesão renal, que pode ser evidenciada pela redução da função renal, avaliada pela taxa de filtração glomerular (TFG), ou presença de proteinúria, ambos persistindo por três meses.⁴ No Brasil, segundo o Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia, no ano de 2009 mais de 77 mil pacientes iniciaram programa de hemodiálise como terapia de substituição da função renal³ e os gastos do Sistema Único de Saúde corresponderam a mais de 1,5 bilhão de reais neste mesmo ano.^{5,6}

A preocupação com a prevalência crescente e a gravidade da DRC, incentiva as pesquisas envolvendo modelos animais, com a finalidade de encontrar alternativas para o tratamento da doença, melhorar as condições de vida dos pacientes e reduzir sua mortalidade. Os protocolos experimentais para a utilização desses modelos devem ser bem definidos e efetuados a partir do conhecimento prévio dos procedimentos e dos parâmetros a serem estudados.² Tais práticas são fundamentais para a confiabilidade dos resultados experimentais, de forma que a análise e interpretação dos dados possibilitem sua utilização em benefício dos seres humanos.⁷

A avaliação laboratorial mais utilizada para mensurar a função renal é feita a partir da TFG, que pode ser realizada por métodos considerados padrão-ouro, mas que envolvem injeção de fármacos e a sua excreção.⁸ Na rotina clínica e de experimentação animal, estima-se a TFG por meio de métodos que dependem das dosagens de creatinina urinária,

creatinina sérica e fluxo urinário em 24 horas.⁹ Outra medida bastante utilizada na avaliação da função renal é a quantificação da proteinúria - excreção urinária de proteína - que pode ser avaliada pela técnica de microalbuminúria de 24 horas, proteinúria de 24 horas (PT 24 horas) ou pela relação proteína/creatinina (rP/C) ou albumina/creatinina em amostra isolada de urina.¹⁰ Para melhor atender os objetivos da pesquisa, é necessário adequar os procedimentos e técnicas utilizadas para aferir tais parâmetros e definir valores de referência para os animais normais.¹¹ O conhecimento desses valores contribui para a avaliação das modificações patológicas e para a avaliação dos resultados obtidos nos procedimentos experimentais.¹²

Considerando o interesse nos modelos experimentais de doença renal e a necessidade de ampliar os estudos de padronização biológica de modelos animais, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de padronizar a avaliação da função renal de ratos (*Rattus norvegicus*), da colônia do biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

MÉTODOS

ANIMAIS

Utilizamos 30 ratos machos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar* com 8 a 12 semanas. Os animais foram obtidos das colônias do Biotério do CBR na UFJF, onde os experimentos foram conduzidos. Acondicionamos os animais em gaiolas de polipropileno, providas de camas de maravalha e alojados em estantes climatizadas (Alesco Indústria e Comércio Ltda., Monte Mor, Brasil). A água e a ração peletizada (Nuvilab-CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda., Curitiba, Brasil) foram oferecidas *ad libitum* e temperatura ambiente mantida ao redor de 22 °C, com iluminação controlada automaticamente para acender às 6 horas e apagar às 18 horas. Nas gaiolas metabólicas, a ração foi oferecida em pó, de acordo com o delineamento experimental.

Os procedimentos estão de acordo com a lei federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, com a regulamentação do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal, e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, conforme protocolo nº 008/2011.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos, Grupo coleta de urina de 24 horas (G24, N = 6), Grupo coleta de urina de 12 horas (G12, N = 6), Grupo jejum de 12 horas (JE12, N = 6), Grupo desproteinização (D24, N = 6) e Grupo injúria renal (IR24, N = 6). O estudo foi dividido em quatro experimentos: coleta de urina, jejum, desproteinização e métodos de análise:

COLETA DE URINA

Esse experimento consistiu em determinar o intervalo de coleta de urina e avaliar a necessidade de manter os animais durante 24 horas nas gaiolas metabólicas. Foram coletadas urinas dos animais do grupo G24 durante 24 horas, com entrada às 08 horas e saída às 08 horas do dia seguinte, e receberam dieta padrão à vontade. Considerando o hábito noturno dos animais da espécie *Rattus norvegicus*, os animais do grupo G12 permaneceram nas gaiolas metabólicas durante 12 horas noturnas, das 20 horas às 08 horas do dia seguinte, também com dieta padrão à vontade. Com o objetivo de comprovar a predominância das atividades dos animais durante a noite e que as características da urina de 24 horas são as mesmas da urina de 12 horas, as dosagens de creatinina na urina e proteinúria dos grupos G24 e G12 foram comparadas. Foram realizados os cálculos de depuração da creatinina de 24 horas e também de 12 horas, quando necessário.

JEJUM

Para determinar a necessidade de período de jejum para coleta de sangue, os animais do grupo JE12 foram mantidos em jejum durante as 12 horas de permanência nas gaiolas metabólicas, com entrada às 20 horas e saída às 08 horas do dia seguinte. Foram realizados os testes de creatinina e ureia no soro dos grupos G12 (sem jejum) e JE12. Para avaliar a interferência das sobras de ração nos coletores de urina, foram determinadas dosagens de creatinina urinária e proteinúria do grupo JE12 e comparadas com o grupo G12. A depuração da creatinina de 12 horas também foi calculada.

DESPROTEINIZAÇÃO

Esse experimento avaliou a necessidade, ou não, de desproteinização das amostras de urina coletadas nos experimentos citados (G24, G12 e JE12), e também das amostras de soro coletadas nos experimentos acima, somadas as amostras de soro do grupo D24, num

total de 24 animais. Foram comparadas as médias das dosagens de creatinina nas amostras sem e com desproteinização,¹³ juntamente com os cálculos de depuração da creatinina utilizando as duas amostragens.

MÉTODOS DE ANÁLISE

PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE DOSAGEM DE CREATININA

Com objetivo de avaliar a necessidade de utilização de um método mais preciso de leitura (leitor de ELISA - *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) em soros de animais com disfunção renal, realizamos dosagens de creatinina em soro com e sem desproteinização do grupo IR24 em dois equipamentos: analisador automático pelo método espectrofotométrico (*Labmax Progress*, Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) e leitora de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA). No grupo IR24, foi induzida injúria renal aguda (IRA) pelo modelo experimental de cisplatina.¹⁴ Após 3 dias da aplicação da cisplatina, o sangue foi colhido para dosagem de creatinina.

COLETA DE URINA, PARÂMETROS BIOLÓGICOS E CONSUMO

Foi mensurado o volume total de diurese por meio da coleta de urina após a permanência nas gaiolas metabólicas. Todas as amostras de urina foram centrifugadas a 3.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA). As amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos (Eurotips Scientific, São Paulo, Brasil) mantidos a -8 °C até o momento da análise realizada no mesmo dia da coleta. Antes da coleta de sangue, foram avaliados: o peso dos animais em balança analítica, a quantidade de ração consumida e o volume de água ingerida, por meio das sobras nos recipientes das gaiolas metabólicas destinados à ração e a água.

COLETA DE SANGUE PARA ANÁLISE BIOQUÍMICA

Para coleta de sangue, os animais foram anestesiados com associação de cetamina (König S.A., Avellaneda, Argentina) na dose de 90 mg/kg e xilazina (König S.A., Avellaneda, Argentina) na dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal. O sangue foi coletado com o uso de punção cardíaca¹⁵ e centrifugado à 3000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada automática (Sorvall, Suwanee, EUA) para separação do soro e acondicionamento em tubos criogênicos. As amostras foram mantidas sob refrigeração (2 °C a 8 °C) até o momento da análise, realizada no mesmo dia da coleta. Após a punção cardíaca, os animais foram submetidos à ruptura do diafragma como procedimento complementar da eutanásia.

PROCEDIMENTO DE DESPROTEINIZAÇÃO

Na desproteinização, 100 µL da amostra foram diluídos em 200 µL de água destilada. Na solução foram adicionados 100 µL de tungstato de sódio (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) 10% m/v e 100 µL de ácido sulfúrico (Vetec, Duque de Caxias, Brasil) 1,84% v/v. Após homogeneização em agitador tipo Vortex (Cole Parmer, Chicago, EUA), a solução foi centrifugada durante 10 minutos a 9.000 rpm em microcentrífuga (Fanen, São Paulo, Brasil) e logo após retirado o sobrenadante utilizado para a análise.^{16,17}

INDUÇÃO DA IRA

A IRA foi induzida pela administração intraperitoneal de cisplatina 10 mg/Kg (Faulding, Rio de Janeiro, Brasil).¹⁴ A função renal foi avaliada pela dosagem de creatinina sérica, três dias após a administração da droga.

ANÁLISE BIOQUÍMICA

O equipamento utilizado para as todas as análises bioquímicas foi o *Labmax Progress*[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil). Outras avaliações das amostras de soro com e sem desproteinização do grupo IR24 foram realizadas em leitora de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, EUA) com filtro de comprimento de onda de 520 nm.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CREATININA

As determinações das concentrações de creatinina, tanto no soro, quanto na urina (diluição 1:25), foram realizadas com o uso de kits comerciais Creatinina K[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil), que utiliza um procedimento cinético otimizado de dois pontos, baseado na reação de Jaffé modificada.¹⁸ Para as dosagens, 50 µL da amostra de soro ou da urina diluída foram adicionados à 50 µL de picrato alcalino, misturados e aspirados para a cubeta do analisador automático, ajustado a zero em 510 nm, e então medidas as absorbâncias aos 30 e 90 segundos. Os resultados foram expressos em mg/dL e no caso da urina corrigidos pelo fator de diluição.

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE UREIA SÉRICA

Para determinação da ureia no soro, foi utilizado teste Ureia UV Liquiform[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil) que utiliza um sistema enzimático por fotometria em ultravioleta usando cinética de dois pontos. A ureia é hidrolisada pela urease, gerando amônia e dióxido de carbono. A reação da amônia

reduz a absorbância, que é proporcional à concentração de ureia na amostra. Foram aspirados 10 µL de soro para a cubeta do fotômetro previamente ajustado a 340 nm, e então medidas as absorbâncias aos 30 e 90 segundos. Os resultados foram calculados pela diferença de absorbância entre os dois tempos e expressos em mg/dL.

DETERMINAÇÃO DA PROTEINÚRIA

Para determinação da proteinúria foi utilizado o teste Sensiprot[®] (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, Brasil), por meio da reação de ponto final, na qual a 50 µL da amostra de urina diluída (1:5) é misturado a 100 µL de reagente de cor contendo pirogalol. O vermelho de pirogalol reage com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo de cor azul. A quantificação da proteinúria foi feita com o uso do método espectrofotométrico a partir da relação entre a absorbância em 600 nm da amostra e da solução padrão (50 mg de proteína/dL). Os resultados da concentração de proteinúria foram obtidos em mg/dL e corrigidos pelo fator de diluição. A quantificação da PT 24 horas foi expressa em miligrama (mg), calculada a partir do produto da sua concentração pelo volume total de 24 horas em dL. O valor da PT 24 horas dos grupos que permaneceram durante 12 horas nas gaiolas metabólicas foi calculado utilizando o valor de diurese multiplicado por dois.

Além do valor medido de proteinúria, a PT 24 horas foi estimada a partir da relação da concentração de proteína pela concentração de creatinina medidas em uma mesma amostra de urina de cada animal.¹⁹ As medidas de proteinúria obtidas pelos dois métodos foram correlacionadas para cada animal.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Os testes de Kurtosis e Skewness foram usados para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis. As médias foram comparadas pelo teste de *t* de *Student*. O grau de associação entre as variáveis (amostras usuais e amostras desproteinizadas) foi determinado pelo coeficiente de correlação de Pearson e o grau de concordância avaliado pelo teste de Bland-Altman. O modelo de regressão linear foi utilizado para calcular o fator de correção baseado no valor médio da razão entre as variáveis: rP/C e PT 24 horas, o grau de associação entre as

duas foi determinado pelo coeficiente de correlação de Pearson e o grau de concordância avaliado pelo teste de Bland-Altman. Todos os cálculos estatísticos foram feitos no programa SPSS 13.1® (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA) e a significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$.

RESULTADOS

No experimento Coleta de urina, o volume urinário e a média da depuração da creatinina do grupo G12 foram inferiores quando comparados aos do grupo G24. Todos os outros parâmetros não apresentaram diferenças entre os dois grupos (Tabela 1).

O experimento Jejum comparou os resultados do grupo G12 com os do grupo JE12; este permaneceu em jejum durante as 12 horas de coleta de urina nas gaiolas metabólicas. Com relação ao consumo, observou-se a diminuição da ingestão de água dos animais submetidos ao jejum. Já a média do volume de urina foi maior para esses animais (Tabela 2).

As médias das dosagens de creatinina no soro e ureia de G12 e JE12 não foram diferentes do ponto de vista estatístico. Porém, os valores de creatinina na urina dos animais do grupo G12 apresentaram-se mais altos, enquanto os valores de depuração da creatinina foram mais baixos quando comparados aos valores apresentados pelos animais do grupo JE12. Isso se deve à interferência da creatinina sérica que foi menor no grupo JE12, mesmo não apresentando diferença estatística. A diferença entre os valores de PT 24 horas foi significativa, entretanto, não houve diferença entre a rP/C dos dois grupos (Tabela 2).

No experimento Desproteïnização, foram utilizadas 18 amostras de urina coletadas dos animais dos

grupos G24, G12 e JE12. E, para as avaliações no soro, foram utilizadas 24 amostras sendo estas dos grupos G24, G12, JE12 e D24. Todas as amostras foram analisadas sem o processo de desproteïnização (amostras usuais) e com o processo de desproteïnização (amostras desproteïnizadas). Não houve diferença estatística entre os valores de creatinina na urina e depuração da creatinina utilizando amostras com e sem desproteïnização (Tabela 3). Houve forte correlação entre os valores de creatinina na urina, ($r = 0,957$, $p < 0,001$) (Figura 1A). Pelo gráfico de Bland-Altman, também não se observou evidência de viés na comparação entre creatinina na urina usual e a creatinina na urina desproteïnizada, uma vez que os dados individuais se distribuíram aleatoriamente abaixo e acima da linha média central (Figura 1B).

As médias das dosagens de creatinina no soro não foram diferentes entre as amostras usuais e as amostras desproteïnizadas, que apresentaram grande variabilidade (Tabela 3). Os valores de creatinina foram concordantes entre si ($r = 0,501$, $p = 0,013$) (Figura 1C), porém, pela análise de Bland-Altman, observou-se evidência de viés na comparação entre creatinina no soro usual e a creatinina no soro desproteïnizado (Figura 1D).

Devido à discrepância das dosagens de creatinina sérica nas amostras desproteïnizadas, foram realizadas novas dosagens em um grupo com IRA, que sabidamente apresentariam creatinina elevada no soro. Esse experimento foi chamado de Métodos de análise, em que foram realizadas duas análises: uma em analisador automático pelo método espectrofotométrico e outra em leitora de ELISA. Houve perda de dois animais do grupo IR24. Não houve diferença estatística

TABELA 1 PARÂMETROS AVALIADOS NOS GRUPOS G24 E G12, NO EXPERIMENTO COLETA DE URINA (COMPARAÇÃO DOS TEMPOS DE COLETA 24 HORAS OU 12 HORAS)

	Grupo G24 Urina de 24 horas N = 6	Grupo G12 Urina de 12 horas N = 6	<i>p</i>
Peso (g)	235,2 ± 28,8	237,0 ± 24,4	0,91
Consumo de ração (g)	19,7 ± 3,3	16,9 ± 2,6	0,14
Ingestão hídrica (ml)	23,5 ± 7,3	19,5 ± 10,2	0,45
Volume de urina (ml)	10,9 ± 2,2	4,7 ± 1,4	< 0,001
Creatinina na urina (mg/dL)	88,5 ± 11,1	97,4 ± 19,6	0,36
Creatinina no soro (mg/dL)	0,50 ± 0,07	0,62 ± 0,02	0,009
Depuração da creatinina (ml/min)	1,32 ± 0,2	0,98 ± 0,2	0,02
Proteinúria de 24 horas (mg/dL)	8,8 ± 5,3	10,4 ± 4,6	0,59
Relação proteína/creatinina	0,92 ± 0,6	1,16 ± 0,4	0,43

TABELA 2 PARÂMETROS AVALIADOS NOS GRUPOS G12 E JE12, NO EXPERIMENTO JEJUM QUE COMPARA NECESSIDADE DE JEJUM DE 12 HORAS

	G12 Sem jejum N = 6	JE12 Jejum de 12 horas N = 6	<i>p</i>
Peso (g)	237,0 ± 24,4	245,9 ± 17,5	0,48
Ingestão hídrica (ml)	19,5 ± 10,2	5,8 ± 2,6	0,01
Volume de urina (ml)	4,7 ± 1,4	7,9 ± 2,6	0,02
Creatinina na urina (mg/dL)	97,38 ± 19,61	67,28 ± 23,79	0,04
Creatinina no soro (mg/dL)	0,62 ± 0,02	0,53 ± 0,09	0,07
Depuração da creatinina (ml/min)	0,98 ± 0,17	1,29 ± 0,22	0,02
Proteinúria de 24 horas (mg/dL)	10,4 ± 4,6	15,2 ± 2,0	0,05
Relação proteína/creatinina	1,2 ± 0,4	1,6 ± 0,1	0,07
Ureia (mg/dL)	37,0 ± 5,9	30,9 ± 3,4	0,05

TABELA 3 DOSAGENS DE CREATININA NA URINA E SUA DEPURAÇÃO EM AMOSTRAS COM E SEM DESPROTEINIZAÇÃO. DOSAGENS DE CREATININA NO SORO E SUA DEPURAÇÃO EM AMOSTRAS COM E SEM DESPROTEINIZAÇÃO

	Amostras usuais	Amostras desproteinizadas	<i>p</i>
Creatinina na urina (mg/dL) (N = 18)	84,38 ± 22,02	79,82 ± 23,26	0,55
Depuração da creatinina (ml/min) (N = 18)	1,20 ± 0,17	1,13 ± 0,21	0,37
Creatinina no soro (mg/dL) (N = 24)	0,54 ± 0,08	0,79 ± 0,63	0,07
Depuração da creatinina (ml/min) (N = 24)	1,20 ± 0,17	1,24 ± 1,22	0,87

entre as amostras usuais e amostras desproteinizadas em nenhum dos equipamentos utilizados (Tabela 4). Também não apresentaram correlação: as amostras de soro usual e desproteinizadas analisadas por espectrofotometria ($r = 0,713$, $p = 0,287$) e as amostras de soro usual e desproteinizadas analisadas por ELISA ($r = 0,926$, $p = 0,074$). Na comparação dos resultados dos dois equipamentos, não houve correlação significativa e não foi encontrada diferença significativa, seja entre as amostras usuais ($r = 0,930$, $p = 0,70$) ou entre as amostras desproteinizadas ($r = 0,610$, $p = 0,390$).

Para padronizar as dosagens de proteinúria, foi calculada a PT 24 horas e a rP/C de todas as amostras de urina coletadas. A média de PT 24 horas foi de $11,92 \pm 6,58$ mg/dL e a média da rP/C foi de $1,26 \pm 0,72$. Houve forte correlação entre os valores de PT 24 horas e rP/C quando avaliados pela correlação de Pearson ($r = 0,94$, $p < 0,001$) (Figura 2A). O gráfico de Bland-Altman mostrou que a rP/C é sistemática e linearmente superestima a PT 24 horas (Figura 2B). Ainda assim, por meio do modelo de regressão, foi obtida uma equação que permitiu estimar a PT 24 horas utilizando a rP/C; $PT\ 24\ horas = (8,6113 + rP/C) + 1,0869$.

DISCUSSÃO

Diferentes metodologias são empregadas na coleta e processamento dos fluidos de animais experimentais e o refinamento tecnológico nas pesquisas científicas tem gerado uma redução importante no número de animais utilizados, reduzindo também a variabilidade dos resultados finais.² O presente estudo mostrou que fatores como a coleta de urina de 24 horas, o período de jejum antes da coleta de sangue e a preparação das amostras são procedimentos importantes e relevantes na avaliação da função renal e que devem ser padronizados para obtenção de resultados confiáveis.

A TFG é a medida mais utilizada para avaliação qualitativa e quantitativa da capacidade excretora do rim, e é mais fielmente obtida na prática clínica a partir da depuração da creatinina, realizada em urina coletada no período de exatas 24 horas.²⁰ O experimento Coleta de urina mostrou que a média do volume de urina dos ratos do grupo G24, foi de $10,9 \pm 2,2$ ml, concordante com valores descritos por outros autores, que variam de 8 a 11 ml.²¹⁻²³ O volume de diurese é influenciado pela variação da ingestão hídrica devido às mudanças de temperatura, umidade, estado de saúde e atividade sexual.^{22,24} Observou-se que no grupo G12

Figura 1. Análise do experimento Desproteínização. A: Correlação entre a creatinina na urina usual e a creatinina na urina desproteínizada. Retas e intervalo de confiança de 95% da regressão, N = 18; B: Gráfico de Bland-Altman para determinação do grau de concordância entre a creatinina na urina usual e a creatinina na urina desproteínizada, N = 18; C: Correlação entre a creatinina no soro usual e a creatinina no soro desproteínizado. Retas e intervalo de confiança de 95% da regressão, N = 24; D: Gráfico de Bland-Altman para determinação do grau de concordância entre a creatinina no soro usual e a creatinina no soro desproteínizado, N = 24.

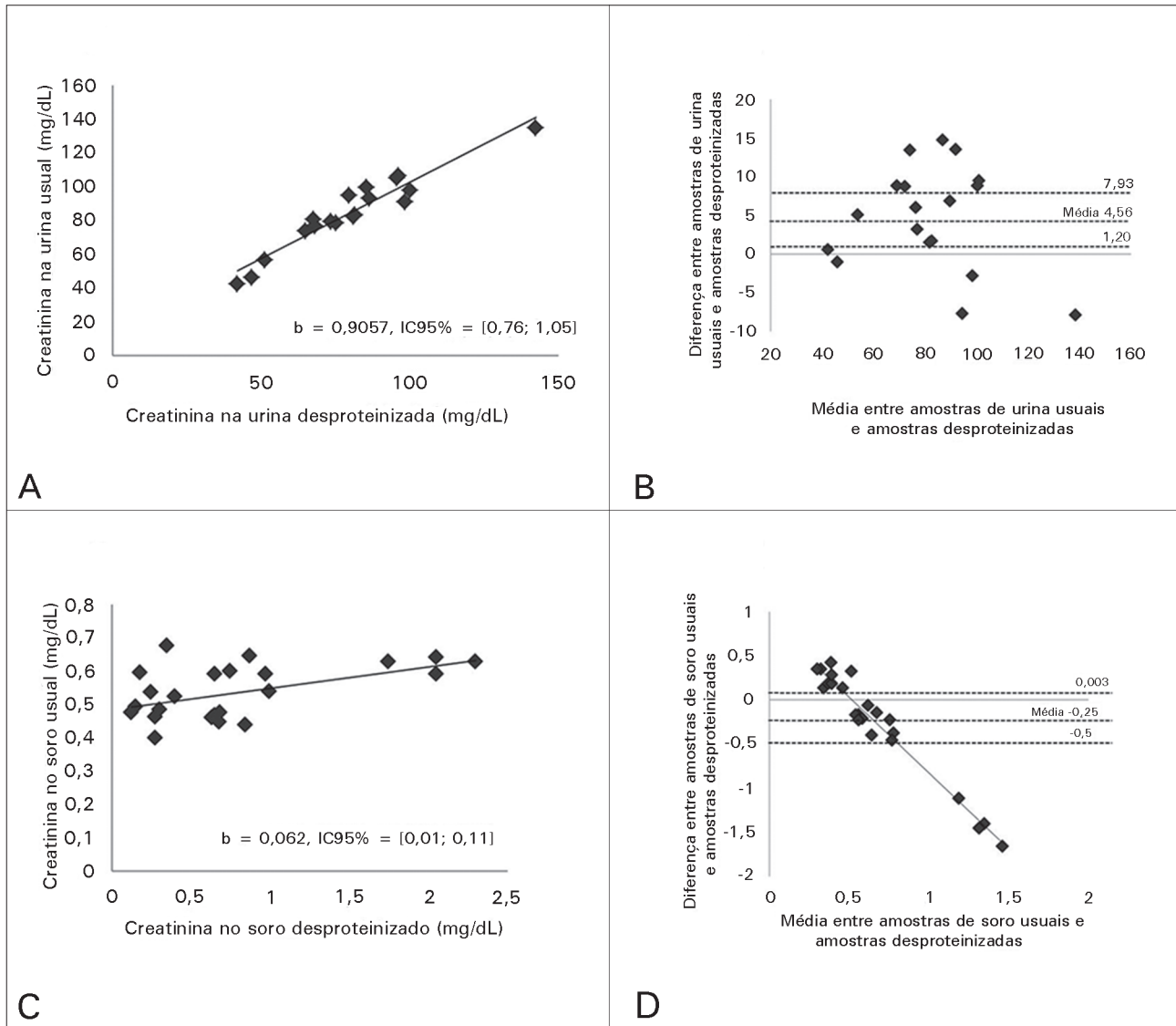


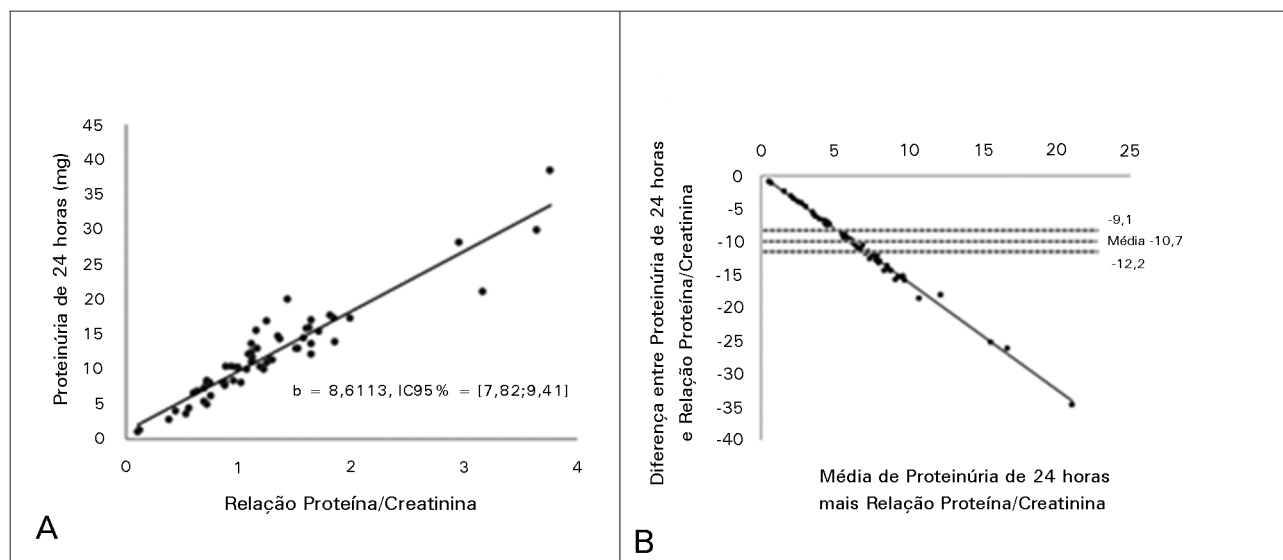
TABELA 4 DOSAGENS DE CREATININA NO SORO DO GRUPO IR24, EM AMOSTRAS USUAIS E DESPROTEÍNZADAS, ANALISADAS POR ANALISADOR AUTOMÁTICO PELO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO E PELA LEITORA DE ELISA

	Creatinina nas amostras usuais (mg/dL) N = 4	Creatinina nas amostras desproteínizadas (mg/dL) N = 4	p
Espectrofotometria	2,03 ± 0,42	2,29 ± 0,36	0,38
ELISA	1,83 ± 0,34	2,42 ± 0,37	0,06
p	0,49	0,63	

o volume de urina reduziu-se à metade devido à redução da permanência dos animais nas gaiolas metabólicas e à diminuição da ingestão hídrica com relação ao grupo G24. Mesmo tendo hábitos noturnos, cerca de 57% do volume de urina desses roedores pode ter

sido excretado durante o dia. Em um estudo utilizando ratos *Wistar* machos, resultados similares foram encontrados para o grupo controle, sendo relatada parte da diurese durante o dia ($4,6 \pm 0,5$ ml).²⁵ O consumo de ração e ingestão hídrica médios para ratos

Figura 2. Análise do experimento Métodos de análise - Estimativa da proteinúria de 24 horas. A: Correlação entre a proteinúria de 24 horas e a relação proteína/creatinina. Retas e intervalo de confiança de 95% da regressão, N = 59; B: Gráfico de Bland-Altman para determinação do grau de concordância entre a proteinúria de 24 horas e a relação proteína/creatinina, N = 59.



são, respectivamente, de 5 g e 10 ml para cada 100 g de peso do animal, existindo ainda forte correlação quanto mais alimento é consumido mais água é ingerida.²⁴ O consumo de ração dos grupos observados por 24 horas e 12 horas foi semelhante ao relatado previamente, mantendo inclusive o padrão de maior ingestão durante a noite.^{22,24,25}

A depuração da creatinina é realizada utilizando o fluxo urinário e os valores das dosagens de creatinina na urina e no soro.⁹ A concentração da creatinina em amostra de urina coletada em um período de 12 horas foi semelhante aos valores encontrados no grupo de 24 horas. Resultados de colônias brasileiras relatam valores em urina coletada por 24 horas variando em torno de 67,2 mg/dL em animais jovens a 75 mg/dL em ratos adultos, semelhantes aos encontrados neste estudo.^{11,17} Mesmo com a concentração da creatinina urinária semelhante, os animais do grupo G24 apresentaram depuração da creatinina superior aos do G12, consequência do menor volume urinário obtido, mesmo após a correção, com duplicação, pelo tempo de coleta, e da menor creatinina sérica. Porém, a diferença encontrada entre os valores de creatinina no soro dos grupos G24 e G12 não representa diferença do ponto de vista biológico, uma vez que os valores médios encontrados estão próximos aos valores descritos como normais. Estudos prévios encontraram valores de $0,83 \pm 0,07$ ml/min e de $0,74 \pm 0,01$ ml/min, na depuração da creatinina em ratos adultos, nos levando a supor

que tais variações podem ser decorrentes de fatores ambientais, estresse, fatores genéticos ou até mesmo de variáveis metodológicas.^{17,21}

A PT 24 horas dos dois grupos (G24 e G12) são semelhantes aos encontrados na literatura.^{26,27} Além disso, como não houve diferença entre a rP/C de um grupo para outro, sugere-se que os valores encontrados na urina de 12 horas podem ser usados na avaliação da proteinúria.

Mediante a redução da ingestão de sais, proteínas e carboidratos contidos na ração, ocorrem modificações nos mecanismos fisiológicos que regulam a homeostase hídrica, o que leva os animais a ingerirem menor volume de líquidos.²⁸ Os animais do grupo JE12 não foram alimentados durante um período prolongado de 12 horas, o que resultou na diminuição de aproximadamente 70% da ingestão de líquidos com relação ao grupo G12. Apesar disso, houve aumento significativo do volume de diurese dos animais submetidos ao jejum, sem caracterizar, porém, anormalidade, uma vez que a diurese ($7,9 \pm 2,6$ ml) e a ingestão hídrica ($5,8 \pm 2,6$ ml) são semelhantes aos descritos.^{11,14,15,21-23}

O número de horas de jejum é definido de acordo com o exame a ser realizado e essa necessidade decorre do fato de que a alimentação pode alterar a composição sanguínea momentaneamente induzindo um possível erro na leitura das amostras.²⁹ Dois exames muito empregados no monitoramento da função renal são as dosagens de creatinina e ureia no soro, que apresentam variações em função de fatores

fisiológicos, como ingestão e catabolismo proteico.³⁰ Apesar do jejum não ser claramente recomendado para a dosagem de creatinina no soro, foram observados valores maiores no grupo sem jejum, mas mantendo-se dentro da faixa de normalidade. Esta diferença não é representativa de detecção de disfunção renal, visto que foram encontrados na literatura valores semelhantes para animais de grupos controle. Em experimentos de padronização, o valor de referência de creatinina no soro dos animais normais foi de $0,50 \pm 0,07$ mg/dL, sendo os ratos machos adultos, mantidos por 12 a 15 horas de jejum.^{11,12} Em outros estudos, os animais normais apresentaram média de $0,60 \pm 0,10$ mg/dL³¹ e $0,60 \pm 0,02$ mg/dL³² de creatinina sérica, demonstrando que pequenas variações intraespécies e entre colônias podem existir.

O jejum também não influenciou os valores de ureia. Valores próximos aos encontrados neste estudo foram descritos na literatura, em estudos que submeteram ratos machos, adultos e saudáveis a 12 horas de jejum.^{12,32} Também foram encontrados na literatura valores mais altos para animais nessas mesmas condições de saúde, porém não submetidos ao jejum.³¹

As dosagens de creatinina sérica não foram significativamente alteradas pelo jejum, porém, a creatinina na urina foi inferior, o que alterou também os cálculos de depuração da creatinina. A hipótese é de que a ração presente nas gaiolas do grupo G12 possa ter contaminado os coletores de urina e terem sido lidas como creatinina. Já havia sido relatado que partículas de alimentos são derramadas enquanto os animais permanecem nas gaiolas metabólicas.³³ Foi relatado também o oferecimento da ração em forma de pó na tentativa de diminuir a contaminação dos coletores com partículas de alimento.²⁵ A ausência de ração durante as 12 horas noturnas para o grupo JE12 pode ser a causa da diminuição dos valores de creatinina na urina. Apesar disso, tais valores não caracterizaram alterações importantes do ponto de vista biológico de função renal, e foram semelhantes aos valores encontrados na literatura.^{11,17} O mesmo pode ser dito para os valores de PT 24 horas.

A dosagem de creatinina é um teste vantajoso, porém, os valores de creatinina sérica não aumentam significativamente até que a função seja consideravelmente comprometida.^{34,35} Além disso, existem algumas substâncias que podem ser erroneamente lidas como creatinina (corpos cromógenos); algumas dessas

normalmente estão presentes no sangue ou na urina, ou são encontradas apenas em estados de doença.³⁶

Diversas abordagens têm sido apresentadas na tentativa de reduzir as interferências sofridas pelos fluidos corporais.³⁷ Neste estudo foi avaliada a interferência de proteína no experimento Desproteínização. As amostras de urina usual apresentaram média mais alta de creatinina com relação às amostras de urina desproteínizada. Apesar de não haver diferença significativa entre as médias, foi observada redução de menos de 5 mg/dL de creatinina na urina usual para da urina desproteínizada, caracterizando a possível existência de substâncias proteicas interferentes na urina usualmente utilizada. Além disso, a correlação e a ausência de viés entre urina usual e urina desproteínizada permitiram supor que o procedimento de desproteínização eliminou tais interferentes e possibilitou mensurar dosagens mais fidedignas de creatinina na urina. Entretanto, não houve diferença do ponto de vista biológico, mostrando que tal interferência se comporta de maneira sistemática para todos os animais.

Em contrapartida, os resultados encontrados nas amostras de soro foram contrários aos das amostras de urina. Esperávamos que a desproteínização eliminasse as substâncias interferentes, sendo assim, o soro desproteínizado apresentaria valores mais baixos de creatinina, porém, isso não ocorreu. Não houve diferença significativa entre as amostras e a correlação foi positiva, porém, houve aumento das médias de creatinina, de amostras usuais em relação às amostras desproteínizadas. Esse aumento não foi linear para todas as amostras isoladamente, o desvio padrão foi diversas vezes mais alto, mostrando que o procedimento de desproteínização se comportou de maneira diferente para cada amostra. A diferença entre soro usual com relação ao soro desproteínizado para algumas amostras era positiva, em outras, era negativa, indicando que o procedimento de desproteínização não foi eficiente, produzindo resultados não comparáveis. Observou-se evidência de viés sistemático e linear na comparação entre creatinina no soro usual e do soro desproteínizado, revelando a ineficiência da desproteínização das amostras de soro. Em um estudo que também utilizou o método de desproteínização, foram encontrados valores mais baixos de creatinina sérica de ratos adultos normais ($0,36 \pm 0,02$ mg/dL).¹⁷ Quanto aos valores médios da depuração da creatinina, não houve diferença significativa entre amostras usuais

e desproteinizadas, provavelmente devido à falta de linearidade das amostras desproteinizadas, o desvio padrão foi muito mais alto para este grupo.

Após comprovar que a desproteinação em soro usual não foi linear, decidiu-se aplicar o método em soro de animais com IRA que sabidamente apresentariam creatinina sérica elevada, tendo em vista que, em condições de doença, as dosagens de creatinina podem sofrer ação de interferentes.³⁶

Foram utilizados dois equipamentos de leitura, o analisador automático pelo método espectrofotométrico e a leitora de ELISA, teoricamente com eficiência superior de capacidade de leitura. Os valores lidos, porém não foram diferentes, levando a crer que não haveria necessidade do uso do equipamento mais preciso. Os valores de creatinina encontrados nas amostras dos animais com IRA, analisados pelos dois aparelhos, estão de acordo com trabalhos que também utilizaram o modelo de IRA.^{14,38} Sendo assim, a desproteinação das amostras de soro não trouxe informação significativa na interpretação dos resultados das dosagens de creatinina.

Estudos em humanos tentam facilitar a forma de coleta de urina, propondo a coleta de amostra única e estimando a PT 24 horas por meio da rP/C. Nestes estudos e após anos de aplicação clínica, os valores são utilizados sem necessidade de correção.^{19,39} Em animais,^{27,40} como encontrado no presente estudo, verifica-se, porém, que a relação entre os valores não é a mesma. Aplicando o modelo de regressão linear, foi encontrada a relação matemática entre as duas variáveis, criando, assim, uma forma prática de estimar nestes animais a PT 24 horas a partir dos resultados de uma amostra de urina. Esta equação proporcionará maior bem-estar animal, pois permitirá a redução da permanência dos animais em gaiolas metabólicas. Permitindo, em alguns casos, a coleta pontual de urina em um período específico do dia sem que os animais sejam alimentados, evitando a contaminação pela ração.

Uma das limitações deste estudo foi a unidade amostral reduzida de 4 a 6 animais por grupo. Não havendo um consenso do número de animais para padronização de técnicas de avaliação, o tamanho da amostra foi baseado em relações matemáticas determinando o número de animais necessários para alcançar significância para $p < 0,05$. Outra limitação existente se refere às divergências entre estudos sobre a realização da técnica de desproteinação.

CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados foi possível concluir que, para os ratos da colônia do Centro de Biologia da Reprodução:

A avaliação da função renal deve ser realizada com a coleta da urina de 24 horas.

O jejum se mostrou desnecessário, assim como o procedimento de desproteinação.

Foi comprovada a viabilidade da leitura por espectrofotometria.

A partir dos valores de rP/C, foi proposta uma equação prática para estimar a PT 24 horas neste grupo de animais, permitindo a coleta pontual de urina e evitando a contaminação pela ração.

A definição da metodologia de avaliação da função renal possibilitará a produção de evidências científicas de melhor qualidade, além de aprimorar o número e o bem-estar dos animais envolvidos na experimentação.

REFERÊNCIAS

1. Simões RS, Kulay L Jr, Baracat EC. Importância da experimentação animal em ginecologia e obstetrícia. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2011;33:119-22.
2. Damy SB, Camargo RS, Chammas R, Figueiredo LFP. Aspectos fundamentais da experimentação animal - aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras* 2010;56:103-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000100024>
3. Moura LRQ. Sociedade Brasileira de Nefrologia [internet]. São Paulo: Sociedade Brasileira de Nefrologia [Acesso 07 Mai 2013]. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?censo>
4. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1-266.
5. Aurea AP, Caruccio AP, Ribeiro ALP, Conceição AMRC, Freitas A, Souza ER, et al. Estimativa do Custo do Procedimento de Hemodiálise II. Trabalho desenvolvido pelo DESID em atendimento à demanda específica de informação de custo referente ao procedimento de hemodiálise apresentada pela Secretaria de Atenção à Saúde, por meio da Coordenação-Geral da Média e Alta Complexidade; 02 Jul 2010. Nota Técnica nº 36/2010/DESD/SE/MS.
6. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DR. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise de 2010. *J Bras Nefrol* 2011;33:442-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000400009>
7. Goldenberg S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. *Acta Cir Bras* 2000;15:193-5. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502000000400001>
8. Medeiros FS, Sapienza MT, Prado ES, Agena F, Shimizu MH, Lemos FB, et al. Validation of plasma clearance of ⁵¹Cr-EDTA in adult renal transplant recipients: comparison with inulin renal clearance. *Transpl Int* 2009;22:323-31. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-2277.2008.00799.x>
9. Cholongitas E, Shusang V, Marelli L, Nair D, Thomas M, Patch D, et al. Review article: renal function assessment in cirrhosis - difficulties and alternative measurements. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:969-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03443.x>
10. Andrassy KM. Comments on 'KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease'. *Kidney Int* 2013;84:622-3. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2013.243>

11. Dantas JA, Ambiel CR, Cuman RKN, Baroni S, Bersani-Amado CA. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do biotério central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Acta Sci Health Sci* 2006;28:165-70.
12. Melo MGD, Dória GAA, Serafini MR, Araújo AAS. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena* 2012;8:1-6.
13. Unifesp-EPM. Dosagem de creatinina no soro/plasma utilizando placa de ELISA para leitura. *Disciplina de Nefrologia - Escola Paulista de Medicina*. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo. 2006. Código DN 009B.
14. Santos NAG. Efeito da cisplatina na função, estresse oxidativo e estado redox mitocondrial renal em ratos: efeito protetor da dimetilouréia [Tese de doutorado]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2006.
15. Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of laboratory animal management and welfare*. 3rd ed. Ames: Blackwell Publishing; 2003.
16. Martin ECO. Lesão renal aguda por glicerol: efeito antioxidante da *Vitis vinifera* L [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2007.
17. Silva WT. Efeito protetor do fitomedicamento *Vitis Vinifera* L na lesão renal aguda induzida pelo Tacrolimus [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2010.
18. Bartels H, Böhmer M. A kinetic method for measurement of creatinine in serum. *Med Lab (Stuttg)* 1973;26:209-15.
19. Shaw AB, Risdon P, Lewis-Jackson JD. Protein creatinine index and Albustix in assessment of proteinuria. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:929-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.287.6397.929>
20. El-Minshawy O, Saber RA, Osman A. 24-hour creatinine clearance reliability for estimation of glomerular filtration rate in different stages of chronic kidney disease. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2010;21:686-93.
21. Libório AB. Rosiglitazona, agonista do PPAR- γ "Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ ", reverte a nefrotoxicidade induzida pelo Tenofovir-DF [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.
22. Carvalho GD, Masseno APB, Zanini MS, Zanini SF, Porfírio LC, Machado JP, et al. Avaliação clínica de ratos de laboratório (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar): parâmetros sanitários, biológicos e fisiológicos. *Rev Ceres*. 2009;56:51-7.
23. Tanwar RS, Sharma SB, Singh UR, Prabhu KM. Attenuation of renal dysfunction by anti-hyperglycemic compound isolated from fruit pulp of *Eugenia jambolana* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Indian J Biochem Biophys* 2010;47:83-9.
24. Harkness JE, Wagner JE. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3a. ed. São Paulo: Roca; 1993.
25. Lecklin A, Etu-Seppälä P, Stark H, Tuomisto L. Effects of intracerebroventricularly infused histamine and selective H1, H2 and H3 agonists on food and water intake and urine flow in Wistar rats. *Brain Res* 1998;793:279-88. PMID: 9630675 DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00186-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00186-3)
26. Diekmann F, Rovira J, Carreras J, Arellano EM, Bañón-Maneus E, Ramírez-Bajo MJ, et al. Mammalian target of rapamycin inhibition halts the progression of proteinuria in a rat model of reduced renal mass. *J Am Soc Nephrol* 2007;18:2653-60. DOI: <http://dx.doi.org/10.1681/ASN.2007010087>
27. Pereira LV, Shimizu MH, Rodrigues LP, Leite CC, Andrade L, Seguro AC. N-acetylcysteine protects rats with chronic renal failure from gadolinium-chelate nephrotoxicity. *PLoS One* 2012;7:e39528. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0039528>
28. Toth LA, Gardiner TW. Food and water restriction protocols: physiological and behavioral considerations. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000;39:9-17.
29. Luciano E, Lima FB. Metabolismo de ratos diabéticos treinados submetidos ao jejum e ao exercício agudo. *Rev Cienc Biomed* 1997;18:47-60.
30. Pletsch F, Rotta LN. Cistatina C: um novo marcador de função renal. *NewsLab* 2010;103:118-32.
31. Rodrigues ER, Moreti DLC, Martins CHG, Kasai A, Stoppa MA, Alves EG, et al. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. [XI. *Chiococca alba* (L.) Hitchc]. *Rev Bras Pl Med* 2006;8:169-72.
32. Santos MRV, Souza VH, Menezes IAC, Bitencurt JL, Rezende-Neto JM, Barreto AS, et al. Parâmetros bioquímicos, fisiológicos e morfológicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) produzidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Sergipe. *Scientia Plena* 2010;6:1-6.
33. Brown RR, Price JM. Quantitative studies on metabolites of tryptophan in the urine of the dog, cat, rat, and man. *J Biol Chem* 1956;219:985-97.
34. Salgado JV, Neves FA, Bastos MG, França AK, Brito DJ, Santos EM, et al. Monitoring renal function: measured and estimated glomerular filtration rates - a review. *Braz J Med Biol Res* 2010;43:528-36. PMID: 20464341 DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500040>
35. Kerr MG. *Exames laboratoriais em medicina veterinária: bioquímica clínica e hematologia*. 2a. ed. São Paulo: Roca; 2003.
36. Delanghe, JR, Speeckaert MM. Creatinine determination according to Jaffe - what does it stand for? *NDT Plus*. 2011;4:83-6.
37. Srisawasdi P, Chaichanajarernkul U, Teerakanjana N, Vanavanan S, Kroll MH. Exogenous interferences with Jaffe creatinine assays: addition of sodium dodecyl sulfate to reagent eliminates bilirubin and total protein interference with Jaffe methods. *J Clin Lab Anal* 2010;24:123-33. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.20350>
38. Liu T, Meng Q, Wang C, Liu Q, Guo X, Sun H, et al. Changes in expression of renal Oat1, Oat3 and Mrp2 in cisplatin-induced acute renal failure after treatment of JBP485 in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;264:423-30. PMID: 22992436 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.019>
39. Solorzano GT, Silva MV, Moreira SR, Nishida SK, Kirsztajn GM. Urinary protein/creatinine ratio versus 24-hour proteinuria in the evaluation of lupus nephritis. *J Bras Nefrol* 2012;34:64-7. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002012000100010>
40. Correa-Costa M, Semedo P, Monteiro AP, Silva RC, Pereira RL, Gonçalves GM, et al. Induction of heme oxygenase-1 can halt and even reverse renal tubule-interstitial fibrosis. *PLoS One* 2010;5:e14298. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0014298>

Errata

O artigo "Padronização da avaliação da função renal de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar do biotério da Universidade Federal de Juiz de Fora", publicado na edição de abril de 2014 do *Jornal Brasileiro de Nefrologia* [J Bras Nefrol. 2014; 36: 139-49], sofreu alterações nas Figuras 1 e 2.