

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROTEÔMICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE DOENÇA
RENAL CRÔNICA NA URINA E SORO DE CÃES

SILVANO SALGUEIRO GERALDES

Botucatu - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

PROTEÔMICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE DOENÇA
RENAL CRÔNICA NA URINA E SORO DE CÃES

SILVANO SALGUEIRO GERALDES

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor

Orientadora: Prof^a. Ass. Dr^a. Priscylla
Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto

Botucatu - SP
2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Geraldes, Silvano Salgueiro.

Proteômica de potenciais biomarcadores de doença renal crônica na urina e soro de cães / Silvano Salgueiro Geraldes. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto
Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Insuficiência renal crônica.
3. Espectrometria de massa. 4. Proteômica. 5. Azotemia.
5. Rins. 6. Marcadores bioquímicos.

Palavras-chave: Azotemia; Espectrometria de massas; Proteoma; Rim.

Nome do Autor: Silvano Salgueiro Geraldes

Título: PROTEÔMICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE
DOENÇA RENAL CRÔNICA NA URINA E SORO DE CÃES

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Ass. Dr^a. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof^a. Ass. Dr^a. Alessandra Melchert

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ - UNESP - Botucatu/SP

Prof. Assoc. III. Júlio César Cambraia Veadó

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Ass. Dr. Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Membro

Departamento de Física e Biofísica

IBB - UNESP – Botucatu

Data da defesa: 21 de novembro de 2022.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que tornou tudo possível.

À minha família, minha esposa Ana Claudia, meus filhos Gustavo e Ana Beatriz e minha mãe Maria da Luz, que souberam tolerar os momentos em que precisei estar ausente me apoiando sem pestanejar.

Ao meu pai Antônio Silvano que não pôde esperar os acontecimentos futuros, descansando antes.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp Campus de Botucatu que me abriu as portas para que eu realizasse esse e outros estudos, dando condições para eu realizar minha pós-graduação nesta excelente instituição.

À Professora Fabiana Ferreira de Souza pela disponibilidade e pelo privilégio em obter seus ensinamentos sobre proteômica, sem o qual não seria possível o presente estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) pela realização da Espectrometria de Massas das amostras do estudo.

Agradeço ao amigo Reiner Silveira de Moraes, que em tão pouco tempo se tornou um grande amigo, vindo para agregar sem pedir nada em troca.

À minha orientadora Prof^a. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto, pelos ensinamentos, paciência e todas as oportunidades.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento da DRC em cães pela IRIS com base na concentração sérica de creatinina e SDMA e subestadiamento com base na proteinúria e pressão arterial sistólica.....	22
Tabela 2 -	Biomarcadores proteicos e enzimáticos do plasma/soro e urina com validação para a espécie canina, e/ou afetados em cães com DRC.....	26
Tabela 3 -	Média e desvio padrão dos resultados para a avaliação clínica (FC, FR, TR e PAS) e laboratorial (hemograma, bioquímicos séricos e urinálise) dos cães dos grupos GC, DRCI, DRCIII e DRCIV.....	34
Tabela 4 -	Proteínas em maior abundância identificadas na proteômica do soro de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....	36
Tabela 5 -	Proteínas em maior abundância identificadas na proteômica da urina de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama de Venn da quantidade de proteínas identificadas no soro de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV) obtidas em <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.....36
- Figura 2 - Diagrama de Venn da quantidade de proteínas identificadas na urina de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV) obtidas em <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.....36
- Figura 3 - *Vip score* gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância no soro, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....38
- Figura 4 - *Vip score* gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância na urina, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....39
- Figura 5 - Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro e urina dos cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....40
- Figura 6 - Comportamento das proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro dos cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....41
- Figura 7 - Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) na urina dos cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).....43

LISTA DE ABREVIACÕES

2D-PAGE	Eletroforese bidimensional em gel
AAP	Alanina aminopeptidase
ALP	Fosfatase alcalina
DRC	Doença renal crônica
DU	Densidade urinária
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblastos 23
GGT	Gama-glutamil transpeptidase
HAS	Hipertensão arterial sistólica
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IRA	Injúria renal aguda
IRIS	<i>International Renal Interest Society</i>
KIM-1	Molécula de injúria renal 1
MS	Espectrometria de massa
NAG	N-acetil- β -D-glucosaminidase
NGAL	Lipocaína associada à gelatinase neutrofílica
PAS	Pressão arterial sistólica
PD	Polidipsia
PU	Poliúria
RBP	Proteína ligante de retinol
RCP	Proteína C reativa
RPC	Razão proteína: creatinina urinária
SBP	Pressão arterial sistólica
SDMA	Dimetilarginina simétrica
TFG	Taxa de filtração glomerular
THP	Proteína de Tamm-Horsfall
TSR	Terapia de substituição renal
TXB2	Tromboxano B2

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1	3
1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Doença Renal Crônica	5
2.1.1 Definição e epidemiologia	5
2.1.2 Estadiamento e subestadiamento da DRC	21
2.1.3 Diagnóstico	23
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo geral	28
3.2. Objetivos específicos	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1. Aspectos éticos	29
2.2. Animais e design experimental	29
2.3. Avaliação clínica e exames laboratoriais	30
2.4. Preparação das amostras para proteômica	30
2.5. Análise proteômica	32
2.6. Análise estatística	33
5. RESULTADOS	34
5.1. Avaliação clínica e laboratorial	34
5.2. Proteômica	35
6. DISCUSSÃO	43
6.1 Avaliação clínica e laboratorial	43
6.2 Proteômica	45
7. CONCLUSÃO	61
Agradecimentos e apoio	62
8. BIBLIOGRAFIA	63
CAPÍTULO 2	89
Artigo Científico	89
Resumo	91
1. Introdução	91
2. Material e Métodos	94

2.1. Aspectos éticos	94
2.2. Animais e design experimental	94
2.3. Avaliação clínica e exames laboratoriais	95
2.4. Preparação das amostras para proteômica	95
2.5. Análise proteômica.....	97
2.6. Análise estatística	98
3. Resultados	98
3.1. Avaliação laboratorial	98
3.2. Proteômica	99
4. Discussão.....	103
4.1 Proteômica.....	103
6. Conclusão	116
Agradecimentos e apoio	116
Referências	116
SÚMULA CURRICULAR	131
1. Formação acadêmica/titulação	131
2. Participação em eventos	131
3. Artigos publicados.....	131
4. Resumos publicados em anais de congressos	134
5 Resumos expandido	138
6. Palestras ministradas.....	139
7. Colaboração em aulas	139
8. Treinamentos, cursos e estágios	140
9. Iniciação científica e bolsas.....	141

1 GERALDES, S.S. **PROTEÔMICA DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE**
2 **DOENÇA RENAL CRÔNICA NA URINA E SORO DE CÃES.** Botucatu – SP,
3 2022. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
4 Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

5 **RESUMO**

6 A proteômica do soro e urina representam uma possibilidade diagnóstica para a
7 doença renal crônica em cães, pela identificação de potenciais biomarcadores
8 de precocidade, já que, a morbidade e a mortalidade da doença renal crônica
9 estão relacionadas com a prevalência subestimada devido ao diagnóstico tardio.
10 O objetivo deste estudo foi identificar e analisar o proteoma sérico e urinário de
11 cães com doença renal crônica estádios I, III e IV, na busca de novos
12 biomarcadores de precocidade. Para o estudo foram selecionados 26 cães
13 divididos em quatro grupos: grupo controle e grupo da doença renal crônica
14 estágio I, III e IV respectivamente. Para a proteômica, as amostras foram
15 preparadas e submetidas a digestão *in gel* e espectrometria de massas. Os
16 dados foram analisados no *software online* MetaboAnalyst e o *exponentially*
17 *modified protein abundance index* foi usado como parâmetro quantitativo da
18 abundância proteica. Utilizou-se para a análise univariada a ANOVA e
19 multivariada a *principal component analysis* e a *partial least squares-discriminant*
20 *analysis*, sendo que a última foi usada para indicar o *variables in the projection*
21 *score*. Dentre os resultados tiveram destaque no soro dos cães com a doença
22 nos estádios I, III e IV as proteínas *Ig-like domain-containing protein*, *Vitronectin*,
23 *Serpin Family G member 1* e *Pentraxin*. As proteínas *Beta-1 metal-binding*
24 *globulin*, *Angiotensinogen*, *Gc-globulin*, *Ig-like domain-containing protein*,
25 *Vitronectin*, *Serpin Family G member 1*, *Uromodulin*, *Secretoglobin Family 1 A*
26 *member 1*, *Polymeric immunoglobulin receptor*, *Lyzozime*, *Cystatin domain*
27 *containing protein* e *Adipsin* tiveram destaque na urina dos cães com a doença
28 nos estádios I, III e IV. Tanto as proteínas destacadas no soro como urina se
29 mostraram como potenciais biomarcadores da doença renal crônica, da
30 progressão da doença renal crônica nos estádios estudados e ou do declínio da
31 função renal.

32 **Palavras-chave:** Espectrometria de massas, azotemia, proteoma, rim

33 GERALDES, S.S. **PROTEOMIC OF POTENTIAL BIOMARKERS OF CHRONIC**
34 **KIDNEY DISEASE IN URINE AND SERUM OF DOGS**. Botucatu – SP, 2022.
35 98p. Thesis (Doctorate) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,
36 Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

37

38 **ABSTRACT**

39 Serum and urine proteomics represent a possibility of diagnostic for chronic
40 kidney disease (CKD) in dogs based on the identification of potential biomarkers
41 of precocity, once morbidity and mortality of chronic kidney disease are related
42 to underestimated prevalence due to late diagnosis. The aim of this study was to
43 identify and analyze the serum and urinary proteome of dogs with chronic kidney
44 disease stages I, III and IV, aiming new early biomarkers . For the study, 26 dogs
45 were selected, allocated into four groups: control group, CKD stage I, II and III
46 respectively. For proteomics, samples were prepared and subjected to in-gel
47 digestion and mass spectrometry (ESI-Q ToF MS/MS). Data were analyzed using
48 the online MetaboAnalyst software and the exponentially modified protein
49 abundance index (emPAI) was used as the quantitative parameter of protein
50 abundance. For univariate analysis, ANOVA and multivariate principal
51 component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-
52 DA) were used. The PLS-DA was also used to indicate the variables in the
53 projection score. Among the proteomics results, stood out in the serum of chronic
54 kidney disease dogs stages I, III and IV, Ig-like domain-containing protein,
55 Vitronectin, Serpin Family G member 1 and Pentraxin. Beta-1 metal-binding
56 globulin, Angiotensinogen, Gc-globulin, Ig-like domain-containing protein,
57 Vitronectin, Serpin Family G member 1, Uromodulin, Secretoglobulin Family 1 A
58 member 1, Polymeric immunoglobulin receptor, Lysozyme, Cystatin domain
59 containing proteins protein and Adipsin were highlighted in the urine of dogs in
60 stage I, III and IV. Both proteins highlighted in serum and urine showed potential
61 as biomarkers of CKD, for the progression of CKD in the stages studied and or
62 decline of renal function.

63

64 **Keywords:** Mass spectrometry, azotemia, proteome, kidneys

65

66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97

98

99

CAPÍTULO 1

100 1. INTRODUÇÃO

101 A doença renal crônica (DRC) é causa de morbidade e mortalidade em
102 cães, com incidência variando entre 0,37 a 7,8% de acordo com diferentes
103 populações caninas estudadas (SOSNAR et al., 2003; LEES, 2004; O'NEILL et
104 al., 2013; RUDINSKY et al., 2018).

105 O diagnostico presuntivo da DRC nem sempre é sugerido nos estádios
106 iniciais da doença, uma vez que na DRC o diagnóstico clínico é muitas vezes
107 inespecífico e não patognomônico, visto a similaridade de alterações iniciais
108 como poliúria e polidipsia com outras enfermidades que também podem
109 repercutir em alterações no trato urinário. Portanto, a DRC é geralmente sugerida
110 e investigada quando há presença de sinais clínicos mais severos como êmese
111 e caquexia, que se apresentam geralmente nos estádios mais avançados da
112 doença (POLZIN, 2013).

113 O diagnóstico definitivo da doença é então baseado nas alterações da
114 bioquímica sérica e exames de imagem. A dosagem sérica de biomarcadores
115 convencionais da taxa de filtração glomerular (TGF), como creatinina e
116 dimetilarginina simétrica (SDMA), também contribuem para o diagnóstico e
117 estadiamento da doença (IRIS, 2019). Já os exames de imagem como a
118 ultrassonografia e a biópsia renal auxiliam no diagnóstico, complementando os
119 achados laboratoriais, clínicos e histórico do animal (SOVERI et al., 2014).

120 Outros biomarcadores endógenos plasmáticos e/ou séricos que avaliam
121 direta ou indiretamente a função renal foram estudados. Estes biomarcadores
122 incluem a cistatina C, fator de crescimento de fibroblastos 23 (*FGF-23*), lipocalina
123 associada à gelatinase neutrofílica (*NGAL*), proteína C reativa (*RCP*),
124 homocisteína e endotelina 1. Adicionalmente, biomarcadores urinários de dano
125 ou disfunção glomerular como a albumina, *RCP*, IgA, IgG, IgM, tromboxano B2
126 (*TXB2*) e transferrina (HOKAMP et al., 2016; HOKAMP e NABITY, 2016) também
127 foram descritos. Enzimas ou proteínas indicativas de dano ou disfunção tubular
128 também podem ser utilizadas como biomarcadores urinários. Os marcadores
129 enzimáticos são a clusterina, cistatina C, molécula de injúria renal (*KIM-1*),
130 *NGAL*, proteína ligante ao retinol (*RBP*) e proteína de Tamm-Horsfall (*THP*).
131 Enquanto isso, os marcadores urinários incluem a alanina aminopeptidase
132 (*AAP*), fosfatase alcalina (*ALP*), cauxina, gama-glutamil transpeptidase (*GGT*) e

133 N-acetil β -D-glucosaminidase (NAG). Apesar de muitos demonstrarem
134 importância no diagnóstico de doenças renais, alguns possuem limitação à
135 pesquisa (HOKAMP et al., 2016; HOKAMP e NABITY, 2016).

136 Devido as consequências da DRC e inabilidade dos cães em responder
137 adequadamente ao tratamento nos casos mais avançados, o diagnóstico
138 precoce viabiliza a instauração de intervenção terapêutica ainda nos estádios
139 iniciais da doença, minimizando sua progressão (BARTGES, 2012). Portanto, o
140 foco em estudos de novos biomarcadores precoces a partir de fluidos biológicos
141 tem ganhado espaço, não só para humanos, mas também para animais
142 (GHODASARA et al., 2017), porém estes estudos ainda são um desafio na
143 medicina veterinária (NABITY et al., 2011).

144 Deste modo, objetivou-se realizar um estudo proteômico da urina e soro de
145 cães CKD nos estágios I, III e IV, buscando estabelecer especificidades para
146 potenciais biomarcadores no soro e/ou urina em cada estágio, bem como
147 relacionar abundância de proteínas com a progressão da doença.

148 **2. REVISÃO DA LITERATURA**

149 **2.1 Doença Renal Crônica**

150 **2.1.1 Definição e epidemiologia**

151 Caracterizada pela perda progressiva e irreversível da massa renal
152 funcional, a DRC ocorre comumente em cães idosos, não eximindo, a ocorrência
153 em cães mais jovens (BARTGES, 2012; POCAR et al., 2019), cronologicamente
154 caracterizada quando presente por um período igual ou superior a três meses
155 (MARTELLO et al., 2020). Em termos estruturais, ambos os rins podem ser
156 acometidos, entretanto, quando apenas um rim é acometido com perda
157 expressiva de néfrons funcionais, o rim remanescente sofre hipertrofia, o que é
158 um mecanismo compensatório para manutenção da homeostasia (McGROOTY,
159 2008; POLZIN, 2011).

160 A DRC contribui para morbidade e mortalidade em cães (PELANDER et al.,
161 2015) com incidência variando de 0,5% a 1,5% em cães (BARTGES, 2012). Com
162 uma ampla faixa de variação baseada em estudos populacionais, a prevalência
163 da DRC na espécie é entre 0,37% a 7,8% (SOSNAR et al., 2003; O'NEILL et al.,

2013), porém ainda é considerada subestimada visto as dificuldades e inconstâncias na realização do diagnóstico da doença em estágios iniciais (PELANDER et al., 2015) e com mortalidade elevada quando nos estágios terminais ou quadros instáveis sem suporte dialítico (KOVESDY et al., 2009). Nos cães, assim como em humanos, a prevalência e severidade da DRC, aumenta nos estágios mais avançados da doença, onde há maior declínio da função renal, podendo culminar em efeitos deletérios como a acidose metabólica, catabolismo proteico com perda muscular, inflamação crônica e disfunção cardíaca (NAVANEETHAN et al., 2011).

Embora não haja um consenso relacionado à predisposição, a ocorrência de DRC em determinadas raças em detrimento de doenças renais genéticas é esperada, podendo variar dentro de populações caninas (CHU et al., 2017). Um estudo mostra que a raça Labrador Retriever foi apontada como a mais afetada pela DRC, seguida das raças Pastor Alemão e Pomerânia (REDDY et al., 2021), já em outro estudo a raça Boiadeiro de Berna foi relacionada com maior incidência e índice de mortalidade para doenças renais (PELANDER et al., 2015), porém outro estudo foi destacada a raça Boxer, os quais apresentaram aumento dos biomarcadores renais creatinina e SDMA desde os 2 meses de idade, porém com maior incidência nos cães geriátricos com mais de 10 anos (COYNE et al., 2020).

184

185 **2.1.2 Estadiamento e subestadiamento da DRC**

O estadiamento da DRC é baseado no *Guideline* desenvolvido pela *International Renal Interest Society* (IRIS) e aceitos pela *American and European Societies of Veterinary Nephrology and Urology*. O sistema de estadiamento e subestadiamento da DRC é apoiado em quatro pilares, sendo a concentração sérica de creatinina e (SDMA) considerados para o estadiamento, e a magnitude da proteinúria com base na razão proteína: creatinina urinária (RPC) e pressão arterial sistólica (PAS) para o subestadiamento (Tabela 1). Idealmente, o estadiamento do doente renal crônico é concomitante à realização do diagnóstico e tem por finalidade, facilitar a instituição do tratamento mais

adequado, bem como permitir a monitoração do paciente (POLZIN, 2011; IRIS, 2019).

A inclusão do SDMA no estadiamento da DRC considera sua maior sensibilidade para diagnosticar pacientes em estágios mais precoces da doença, visto que sofre menor alteração da concentração por perda de massa renal funcional, o qual juntamente com a creatinina sérica pode ser utilizado para determinar se o paciente pertence ao estágio I, II, III ou IV (POLZIN, 2013; IRIS, 2019).

Para a avaliação da proteinúria pela razão proteína:creatinina urinária, deve ser considerada a inatividade de sedimentos na urinálise, bem como cultura negativa e descarte de causas pré-renal e pós-renais. Dessa forma, a avaliação seriada com coleta de urina de duas a três vezes para repetição da RPC ao longo de pelo menos duas semanas deve ser realizada (POLZIN, 2011).

O subestadiamento com base na PAS é feito de acordo com o risco de danos em órgãos alvos. A avaliação da PAS para subestadiamento da DRC em cães é realizada a partir de mensurações seriadas. De acordo com a IRIS, a avaliação da PAS é realizada durante os retornos do paciente à clínica, sendo repetido pelo menos durante cinco avaliações seriadas. Essas avaliações podem ser intervaladas de pelo menos duas horas uma da outra, sendo importante considerar a acomodação do paciente (5-10 minutos) ao ambiente de mensuração da PAS (POLZIN, 2011; POLZIN, 2013; IRIS, 2019).

TABELA 1. Estadiamento da DRC em cães pela IRIS com base na concentração sérica de creatinina e SDMA e subestadiamento com base na proteinúria e pressão arterial sistólica.

Parâmetro	Estádio da DRC			
	I (não azotêmico)	II (azotemia branda)	III (azotemia moderada)	IV (azotemia severa)
Creatinina (mg/dL)	<1,4	1,4 – 2,8	2,9 – 5,0	>5,0
SDMA (µg/dL)	<18	18 - 35	36 - 54	>54
Não proteinúrico <0,2 Proteinúrico limítrofe 0,2 – 0,5 Proteinúrico >0,5				
Normotenso <140 Pré-hipertenso 140 – 159 Hipertenso 160 – 179 Hipertenso severo ≥ 180				

Fonte: Adaptado de IRIS (2019)

2.1.3 Diagnóstico

Na DRC em cães, o diagnóstico clínico é guiado pelos danos estruturais aos rins, redução da função ou ambos (PELANDER et al., 2019). Muitos animais com DRC apresentam sinais de cronicidade que direcionam o diagnóstico inicial, dentre os quais estão a redução de escore corporal, massa muscular e peso corpóreo (BARTGES, 2012). Para a avaliação da função renal, a TFG é um importante indicador de manutenção da homeostase do organismo e quando comprometida pode levar à desregulação do equilíbrio hídrico, levando ao aparecimento de sinais como poliúria e polidipsia, (LANGSTON, 2016; PRESSLER, 2013) além de sinais do trato gastrointestinal como hiporexia ou anorexia, vômito, halitose e estomatite ulcerativa podem estar presentes (BARTGES, 2012; O'NEILL et al., 2013). Logo, o diagnóstico precoce da DRC possibilita a adoção de medidas terapêuticas protetivas que beneficiam os cães (JACOB et al., 2002).

O diagnóstico da DRC geralmente se baseia na detecção da azotemia associada à exclusão de causas pré- e pós-renais. Bem como identificação de danos estruturais por meio de ultrassonografia e anormalidades na função renal acompanhadas pela avaliação laboratorial são ferramentas úteis para o diagnóstico da DRC em cães (POLZIN, 2013).

A ultrassonografia é o exame de imagem ideal para avaliação de danos renais estruturais, sendo uma ferramenta prática e em muitas vezes, a única utilizada para investigar a doença renal crônica (BUTUROVIC-PONIKVAR e VISNAR-PEROVIC 2003). Com o exame ultrassonográfico é possível a avaliação do tamanho dos rins, qualidade do parênquima e de parâmetros hemodinâmicos por meio da função Doppler que permite avaliar a microvasculatura e lesões parenquimatosas (HANAMURA et al., 2012).

Quando o exame ultrassonográfico não permite a identificação de injúria renal primária ou quando a causa não é diagnosticada na avaliação clínica, a biópsia renal se torna uma opção diagnóstica dentro da avaliação da doença renal crônica (BUTUROVIC-PONIKVAR e VISNAR-PEROVIC 2003). Embora útil no diagnóstico da DRC quando não identificada por métodos convencionais e menos invasivos, a biópsia renal é uma técnica incapaz ou pouco provável de

254 alterar o prognóstico, tratamento e evolução da DRC já diagnosticada (VADEN,
255 2005).

256 A avaliação da TFG é uma opção para acessar a função renal podendo ser
257 benéfica na avaliação de cães não azotêmicos e proteinúricos, e azotêmicos
258 limítrofes (WATSON et al., 2002). A avaliação da função renal através da TFG é
259 feita com base nas mensurações séricas de ureia e creatinina. Embora
260 apresente importância clínica sendo utilizada para o estadiamento da DRC em
261 cães, a creatinina excede os valores de referência para a espécie quando danos
262 renais expressivos já estão instalados (CORTADELLAS et al., 2008). O aumento
263 sérico da creatinina ocorre quando cerca de 75% da função renal é perdida,
264 sendo dessa forma, é inviável sua utilização para o diagnóstico da DRC no
265 estágio inicial (BRAUN et al., 2003; HOKAMP e NABITY, 2016).

266 Além da creatinina, o SDMA é um biomarcador sérico também utilizado no
267 estadiamento da DRC em cães. O SDMA é apontado como mais sensível e
268 capaz de identificar lesões renais precoces, elevando seus níveis antes da
269 creatinina. Além disso, não é influenciado pelo índice de massa muscular como
270 acontece com a creatinina (HALL et al., 2014; NABITY et al., 2015). Em estudo
271 realizado por DAHLEM et al. (2017), a avaliação do SDMA em cães com DRC
272 se mostrou útil no diagnóstico da doença, além de razão SDMA/creatinina
273 significativamente superior a cães com IRA.

274 Apesar da avaliação sérica de biomarcadores convencionais ser adotada
275 na rotina clínica, alterações laboratoriais como anemia normocítica
276 normocrômica, hiperfosfatemia, hipocalemia e hipocalcemia são utilizados para
277 determinar a conduta terapêutica do paciente com DRC e permitem acompanhar
278 a evolução da doença pelo estadiamento (McGROTTY, 2008). Da mesma forma,
279 a avaliação indireta da função renal através de alterações na urinálise possui
280 importância clínica no subestadiamento, acompanhamento e evolução da DRC
281 (IRIS, 2019).

282 A proteinúria pode ser avaliada por meio da razão proteína: creatinina
283 urinária, podendo indicar perda proteica persistente na urina oriunda de lesão
284 glomerular ou tubular. O aumento da magnitude da proteinúria está associado
285 com a progressão da DRC e por isso, o controle da PAS se faz importante na
286 redução da pressão intraglomerular e conseqüentemente, na redução da
287 magnitude da proteinúria existente. Logo, proteinúria e hipertensão arterial estão

288 associadas com prognóstico desfavorável para a DRC em cães, determinando a
289 importância da monitoração e tratamento destes parâmetros para acompanhar
290 a evolução da doença. Portanto quando se mantem aferições da PAS entre
291 períodos curtos de tempos, pode-se corrigir aumentos de pressão ainda em seu
292 início, evitando a consequente proteinúria (ROUDEBUSH et al., 2010; POLZIN,
293 2013).

294 Em estudo realizado por RUDINSKY et al. (2018), o risco de morte
295 prematura em cães azotêmicos com DRC foi associado às concentrações
296 aumentadas do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), fator este
297 associado à redução expressiva na taxa de filtração glomerular (TFG), taxa essa
298 ligada ao caráter de avanço progressivo da DRC.

299 A TFG é considerada o indicador mais sensível de decaimento da função
300 renal na DRC, refletindo a funcionalidade dos néfrons remanescentes com base
301 no *clearance* de marcadores de filtração glomerular (KERL e COOK, 2005;
302 POCAR et al., 2019). A determinação do *clearance* plasmático ou sérico do
303 ioexol é amplamente utilizada como forma de avaliar a TFG, permitindo o
304 estabelecimento de um diagnóstico precoce da DRC, antecedendo até mesmo
305 a instalação de um quadro de azotemia, contribuindo dessa forma para a
306 redução da mortalidade. No entanto, a determinação da TFG ainda é um desafio,
307 uma vez que o *clearance* do ioexol não fornece informações morfológicas e
308 específicas de cada rim (McKENNA et al. 2020).

309 Apesar do *clearence* do ioexol ser considerado padrão ouro para aferição
310 da TFG na medicina veterinária (BAKLOUTI, et al. 2021; JOONYOUNG, et al.
311 2020) e mais precisamente em cães, este ainda possui limitações quanto à sua
312 utilização na rotina clínica. Isso se deve a sua avaliação laboriosa, além da
313 necessidade de repetidas dosagens no sangue em momentos diferentes no
314 decorrer de horas, não sendo um método viável e, portanto, sua utilização é
315 geralmente destinada a pesquisas, dada a inviabilidade na prática clínica
316 (BAKLOUTI, et al. 2021).

317 Conforme apontado por HOKAMP e NABITY (2016), a avaliação dos níveis
318 séricos de ureia e creatinina apresenta limitações quanto ao diagnóstico precoce
319 da DRC, tornando necessária a busca por novos biomarcadores endógenos.
320 Além disso, a avaliação da urina se mostrou útil na identificação de lesões em
321 diferentes compartimentos do néfron, tornando-se uma alternativa na avaliação

322 precoce da DRC. Sendo assim, biomarcadores séricos e urinários têm sido
 323 discutidos e apresentados como promissores na avaliação diagnóstica da DRC
 324 em pequenos animais (Tabela 2).

325

326 TABELA 2. Biomarcadores proteicos e enzimáticos do plasma/soro e urina com
 327 validação para a espécie canina, e/ou afetados em cães com DRC.

Biomarcadores renais séricos e/ou plasmáticos		
Biomarcador Renal	Local de produção	Tipo de Biomarcador
Creatinina	Músculo	Marcador endógeno indireto da TFG
Cistatina C	Células nucleadas	Marcador endógeno indireto da TFG
SDMA	Células nucleadas	Marcador endógeno indireto da TFG
NGAL	Neutrófilos, rim, brônquios, estômago, intestino delgado, pâncreas, glândula prostática, timo	Marcador endógeno indireto da TFG
Proteína C-reativa	Hepatócitos	Marcador inflamatório
Homocisteína	Células nucleadas	Marcador endógeno indireto da TFG
Endotelina-1	Vasos sanguíneos, pulmão, outros tecidos incluindo a medula renal	Inflamação
Biomarcadores urinários de lesão/disfunção glomerular		
Biomarcador Renal	Local de produção	Tipo de Biomarcador
Albumina	Hepatócitos	Proteína de fase aguda negativa
Proteína C-reativa	Hepatócitos	Proteína de fase aguda positiva
IgG	Células plasmáticas no baço, linfonodos, medula óssea	Anticorpo e proteína de alto peso molecular
IgM	Células plasmáticas no baço, linfonodos, medula óssea	Anticorpo e proteína de alto peso molecular
Transferrina	Primariamente no fígado	Proteína transportadora de ferro
Biomarcadores urinários proteicos de lesão/disfunção tubular		
Biomarcador Renal	Local de produção	Tipo de Biomarcador
Clusterina	Túbulos renais	Glicoproteína
Cistatina C	Células nucleadas	Proteína de baixo peso molecular e inibidora de proteinase
KIM-1	Túbulos renais	Glicoproteína
NGAL	Neutrófilos, rim, brônquios, estômago, intestino delgado, pâncreas, glândula prostática, timo	Glicoproteína de baixo peso molecular
RBP	Primariamente no fígado e também outros órgãos como rim, pulmões, baço, cérebro, estômago, coração e músculo esquelético	Proteína carreadora de vitamina A
THP	Células epiteliais do ramo ascendente espesso da alça de Henle e túbulo contorcido distal	Glicoproteína
Biomarcadores urinários enzimáticos de lesão/disfunção tubular		
Biomarcador Renal	Local de produção	Tipo de Biomarcador
AAP	Enzima da borda em escova do túbulo renal	Enzima
ALP	Enzima da borda em escova do túbulo renal, túbulo contorcido proximal (alta	Enzima

	concentração), lisossomos tubulares	
NAG	Enzima lisossomal em túbulos renais proximais e outros tecidos, 2 formas renais (NAG-A e NAG-B circulam no sangue)	Enzima

328 NGAL, lipocaína associada à gelatinase neutrofílica; KIM-1, molécula de injúria renal 1; RBP,
 329 proteína ligante de retinol; THP, proteína de Tamm-Horsfall; AAP, alanina aminopeptidase; ALP,
 330 fosfatase alcalina; NAG, N-acetil- β -D-glucosaminidase

331 Fonte: Adaptada de HOKAMP e NABITY (2016)

332

333 Tanto o sangue como a urina permitem avaliações que direcionam o
 334 diagnóstico da DRC e permitem acompanhar a evolução de um animal suspeito
 335 para a doença. Para isso, NABITY et al. (2011) apontaram que métodos de
 336 diagnóstico não invasivos na DRC para detecção e monitoração de danos
 337 tubulointersticiais por meio da inabilidade de concentração da urina e ocorrência
 338 de azotemia são limitantes. Dessa forma, a análise proteômica tem angariado
 339 investimentos em ambas as escalas clínica e de pesquisa na busca por novos
 340 biomarcadores, auxiliando na compreensão da patogênese e diagnóstico de
 341 doenças em animais (CECILIANI et al., 2014; CECILIANI et al., 2016; DUPREE
 342 et al., 2020).

343

344 **3. OBJETIVOS**

345 **3.1. Objetivo geral**

346 Identificar e analisar o proteoma sérico e urinário de cães com DRC I, III e
347 IV, objetivando aquisição de novos biomarcadores precoces da DRC e que
348 permitam a diferenciação entre os estádios da doença.

349 **3.2. Objetivos específicos**

350 Mapear o proteoma sérico e urinário dos diferentes graus de cães com DRC
351 I, III e IV;

352 Identificar proteínas no soro e urina de cães com DRC I, III e IV como
353 potenciais biomarcadores na doença renal, assim como no diagnóstico precoce
354 e com a evolução da doença nos diferentes estádios;

355 Comparar e correlacionar o proteoma sérico e urinário de cães saudáveis e
356 com DRC I, III e IV.

357

358 4. MATERIAL E MÉTODOS

359 2.1. Aspectos éticos

360 Os aspectos éticos foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo
361 sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FMVZ –
362 UNESP, Botucatu/SP, sob protocolo nº 0087/2018.

363 Os tutores dos animais incluídos neste estudo assinaram o termo de
364 consentimento livre e esclarecido, estando em comum acordo para a utilização
365 de dados registrados.

366

367 2.2. Animais e design experimental

368 Os animais foram selecionados do atendimento clínico da rotina do Serviço
369 de Nefrologia e Urologia Veterinária da Clínica Médica de Pequenos Animais do
370 Hospital Veterinário da FMVZ – Unesp – Campus de Botucatu. Para o estudo
371 foram selecionados 26 cães de ambos os sexos, sem distinção de raça, peso
372 médio de $14,6 \pm 8,78$ kg e idade média de $7,5 \pm 4,37$ anos. Os cães foram
373 divididos em 4 grupos, sendo o grupo controle GC = 3 cães (soro: n = 3; urina: n
374 = 3) composto por animais hígidos; e outros 3 grupos compostos por cães com
375 doença renal crônica DRC divididos de acordo com o estadiamento da doença,
376 em DRCI = 12 cães (soro: n = 12; urina: n = 9), DRCIII = 3 cães (soro: n = 3;
377 urina: n = 3) e DRCIV = 8 cães (soro: n = 6; urina: n = 8). Além dos exames
378 necessários para o estadiamento da DRC, inclusão e exclusão dos animais, em
379 todos os grupos do estudo foi realizada a proteômica do soro e urina dos cães.

380 Nos grupos DRC os critérios de inclusão consideraram cães estabilizados,
381 estadiados e subestadiados de acordo com o grau da DRC descrito pela
382 *International Renal Interest Society - IRIS Staging of CKD* (IRIS, 2019) no
383 respectivo grupo de estudo, comprovados por exames de bioquímica sérica
384 (creatinina, Dimetilarginina simétrica - SDMA) e urinária (RPC), PAS e exame
385 ultrassonográfico (alterações compatíveis com o grau da doença). Não foram
386 incluídos no estudo cães que tivessem alteração em leucograma, presença de
387 nefrolitíase, diagnóstico de doença congênita ou presença de neoplasia.

388

2.3. Avaliação clínica e exames laboratoriais

No exame clínico aferiu-se a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), temperatura retal (TR) e pressão arterial sistólica (PAS). O exame ultrassonográfico foi conduzido para descartar qualquer alteração no GC e como exame complementar para confirmação da DRC.

Em todos os grupos, amostras de sangue e urina foram colhidas para realização de exames de hemograma, bioquímica, urinálise e proteômica, com os animais em jejum de 12 horas.

O sangue foi colhido por venopunção jugular e fracionado em 3 alíquotas. Para o hemograma uma alíquota foi depositada em tubo estéril com EDTA 10%.

A segunda e terceira alíquotas foram acondicionadas em tubo sem anticoagulante com gel separador e centrifugadas para obtenção de soro, sendo uma destinada à análise de SDMA, ureia, creatinina, fosforo, albumina, sódio e potássio, e a outra armazenado a -80 °C, até o momento da preparação para proteômica.

A amostra de urina (~20 mL) foi obtida por cistocentese e fracionada em três alíquotas. Uma alíquota (~9 mL) foi destinada à urinálise, a segunda (~1 mL) para a determinação da RPC e a última (10 mL) para proteômica. A alíquota destinada à proteômica foi imediatamente centrifugada a 1.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C, até o momento da preparação para proteômica.

2.4. Preparação das amostras para proteômica

As amostras de soro e urina destinadas a proteômica foram retiradas do armazenamento a -80 °C e descongeladas em banho de gelo.

Após descongelamento, as amostras de soro foram submetidas a depleção de albumina de acordo com Colantonio et al. 2005 com modificações. Para depleção de albumina, uma alíquota de soro foi levada a um tubo de 1,5ml, onde foi acrescida de 0,1 mol NaCl, após a inclusão foi homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, acrescentou-se álcool etílico (concentração final de 42%), as amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas por 60 minutos. A mistura resultante desse

421 processo anterior foi centrifugada a 10.000g por 45 minutos a 4 °C, resultando
422 em um pellet e um sobrenadante. O pellet (pellet 1) foi reservado e mantido no
423 mesmo tubo. O sobrenadante foi levado a outro tubo, onde seu pH foi ajustado
424 para 5,7 com acetato de sódio (pH 4,0). O sobrenadante com pH corrigido foi
425 incubado por 60 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi centrifugada a 10.000g por
426 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante desta segunda centrifugação foi
427 descartado e o pellet (pellet 2) foi unido ao pellet 1, então o pellet 1 e o pellet 2
428 já unidos, foram homogeneizados e eluídos com 50 mmol TRIS-HCl pH 7,4.

429 As amostras de urina, após o descongelamento, foram recentrifugadas a
430 10.000g por 30 minutos a 4 °C para separar sedimentos remanescentes da
431 primeira centrifugação anterior ao congelamento. O sobrenadante foi recolhido
432 e submetido a concentração por filtração (Amicon® Ultra-3 Centrifugal filter,
433 3kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 10.000g por 60 minutos a 4 °C
434 resultando em uma quantidade de aproximadamente 400 µl.

435 Após a preparação inicial das amostras de soro e urina, a mensuração da
436 concentração de proteína total foi efetuada pelo método de Bradford e a leitura
437 conduzida no nanoespectrofotômetro (UV – Vis – NanoDrop™ One/One c,
438 Delaware, EUA). As concentrações de proteína total foram determinadas de
439 acordo com uma curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas
440 de albumina bovina sérica (BSA).

441 Utilizando-se as concentrações de proteína total do passo anterior para os
442 cálculos, as amostras foram preparadas para corrida de eletroforese SDS-
443 PAGE, sob condições desnaturantes utilizando uma concentração de
444 poliacrilamidas de 12% no gel de separação. A corrida foi conduzida a 15 mA/gel
445 e voltagem máxima de 300 V e interrompida assim que as amostras atingiram o
446 gel de separação. O gel foi corado com Coomassie coloidal (NEUHOFF, et al.,
447 1988; LUO, et al., 2006) e descorado para observação das bandas únicas. As
448 bandas foram levadas a uma lâmina de vidro estéril, onde as bandas foram
449 individualizadas por animal e recortadas em fragmentos de aproximadamente 1
450 mm e direcionadas para a digestão triptica.

451 A digestão triptica foi realizada de acordo com Shevchenko et al. (1996),
452 com modificações por Carvalho et al. (2021). Os fragmentos foram transferidos
453 para microtubos e descorados (50% v/v acetonitrila [ACN] e 25 mM bicarbonato
454 de amônio). A seguir os fragmentos foram desidratados com ACN 100% e

455 realizada a redução e a alquilação. Uma segunda desidratação com 100 % de
456 ACN foi conduzida. Para a redução das pontes dissulfeto e alquilação foi usado
457 DTT e iodoacetamina, respectivamente. A digestão trípica foi realizada com
458 solução de 20 ng/ μ L de tripsina (1: 50 de enzima: substrato, V5111, Promega
459 trypsin, Promega Biotecnologia do Brasil LTDA, Brazil). A ação da tripsina foi
460 bloqueada, os peptídeos eluídos e o volume reduzido em concentrador a vácuo
461 (SPD1010 262 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Fisher Scientific Inc.,
462 Waltham, MA, USA), à temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas
463 a – 80 °C até o momento da análise proteômica.

464

465 2.5. Análise proteômica

466 As amostras foram diluídas (0,7 μ g/ μ L) em 0,1% de ácido fórmico,
467 centrifugadas e o sobrenadante separado para aplicação no espectrômetro de
468 massas (4,5 μ L). Para a separação foi utilizada uma coluna C18 (100 μ m x 100
469 mm) RP-nano UPLC (Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation,
470 Milford, MA, USA) acoplada ao espectrômetro de massas (Q-ToF, Micromass®
471 Q-ToF PREMIER® Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA),
472 com fonte *nanoelectrospray* utilizando um fluxo de 0,600 μ L/minuto. Um
473 gradiente (2-90%) de acetonitrila diluída em 0,1% ácido fórmico foi mantido por
474 45 minutos em uma voltagem de 3,5 kV, cone de voltagem de 30 V e temperatura
475 da fonte de 100 °C. O instrumento foi mantido em *top three*, e os espectros de
476 massa (MS) foram adquiridos seguidos por MS/MS dos 3 mais intensos. Após a
477 fragmentação (MS/MS), o íon foi mantido em uma lista de exclusão por 60
478 segundos para a análise dos peptídeos endógenos. Os parâmetros de procura
479 incluíram tripsina como protease, com 1 clivagem máxima perdida,
480 carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina
481 como modificação variável. Uma tolerância de 0,1 Da foi estabelecida para os
482 íons precursores (MS) e fragmentação (MS/MS), e massa molecular
483 monoisotópica.

484 Os espectros foram adquiridos pelo MassLynx™ v.4.1 software (Waters
485 Corporation, Milford, MA, USA) e os dados brutos convertidos em uma lista de
486 picos (.mgf, mascot generic format) sem adição dos *scans* e obtidos no banco

de dados UniprotSProt (<http://www.uniprot.org/>) taxonomia *Canis lupus familiaris*, usando os softwares Mascot version 2.3.02 e Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA).

Os resultados foram analisados no Protein Pilot Software 4.0 (AB Sciex, Framingham, USA) para validar os peptídeos MS/MS e identificar as proteínas. Então, os dados foram inseridos no UniprotKB (www.uniprot.org.br) e Phanter v.14.0 52 (www.pantherdb.org) para obter a ontologia gênica usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular.

O *exponentially modified protein abundance index* (emPAI) obtido do software Mascot Distiller (ISHIHAMA, et al., 2005) foi usado para determinar a quantidade de cada proteína nas amostras.

498

499 2.6. Análise estatística

As variáveis referentes aos exames clínico e laboratorial foram submetidas à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados pelo ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Tukey.

Os dados da proteômica foram normalizados por contagem única total para a retirada dos *ouliers* dividindo-se o valor do *emPai* da proteína de cada animal pela sua somatória em todas as amostras do grupo. As proteínas foram mantidas para análise quando 50% ou mais das amostras continha esta proteína, caso contrário foram excluídas do grupo e da análise. Então, os dados normalizados foram analisados no software MetaboAnalyst versão (MetaboAnalyst 3.0) por análise uni e multivariada. A análise univariada foi ANOVA *one-way* seguida pelo teste exato de Fisher, considerando-se $FDR > 0,05$. Já a análise multivariada foi baseada no *principal component analysis* (PCA) para descrever a separação dos grupos de acordo com as proteínas em uma matriz de escore. Também foi usado a *partial least squares analysis* (PLS-DA) que indica a relevância de cada proteína na caracterização dos grupos. O PSL-DA usado para calcular *variables in the projection score* (VIP score). As proteínas foram consideradas importantes no grupo no VIP score quando $\alpha > 2,0$. Os resultados da ANOVA *one-way* foram comparados com o VIP score.

518

519 **5. RESULTADOS**520 **5.1. Avaliação clínica e laboratorial**

521 Os parâmetros avaliados no exame físico (FC, FR, TR e PAS) dos cães
 522 dos grupos estudados não apresentaram diferença estatística (Tabela 3). Na
 523 avaliação laboratorial (hemograma, bioquímicos séricos e urinálise) dos cães
 524 foram evidenciadas diferenças significativas entre os grupos, para SDMA, ureia,
 525 creatinina e fósforo. Para estas avaliações, entre os grupos GC e DRCI não foi
 526 observada diferença significativa, embora observadas diferenças destes com os
 527 outros grupos (Tabela 3).

528
 529 **Tabela 3.** Média e desvio padrão dos resultados para a avaliação clínica (FC,
 530 FR, TR e PAS) e laboratorial (hemograma, bioquímicos séricos e urinálise) dos
 531 cães dos grupos GC, DRCI, DRCIII e DRCIV.

Parâmetros	Grupo			
	GC	DRCI	DRCIII	DRCIV
Avaliação clínica				
FC (bpm)	127.7 ± 16.1	121.4 ± 10.7	106.7 ± 2.3	104.0 ± 8.2
FR (mrm)	46.7 ± 18.9	37.1 ± 12.9	41.3 ± 16.2	38.1 ± 6.8
TR (°C)	38.5 ± 0.6	38.6 ± 0.6	37.7 ± 0.9	38.1 ± 0.2
PAS (mmHg)	123.3 ± 5.6	121.0 ± 10.2	113.3 ± 5.8	155.7 ± 31.5
Hemograma				
Hemácias (x10 ⁶)	6.0 ± 2.4	4.8 ± 1.8	3.4 ± 1.5	3.6 ± 0.9
Hematócrito (Vg/%)	40.7 ± 16.3	33.1 ± 12.9	23.7 ± 9.8	25.8 ± 7.4
Hemoglobina (g/dL)	14.0 ± 5.5	11.2 ± 4.4	7.8 ± 3.4	9.1 ± 2.7
Proteína Total (g/dL)	6.5 ± 0.3	7.8 ± 2.0	5.1 ± 0.2	7.7 ± 1.3
Plaquetas(x10 ³ /μL)	225 ± 67.8	276.1 ± 170.7	262.2 ± 152.3	319.9 ± 79.5
Leucócitos Totais (x10 ³ /μL)	8,766 ± 2,064	10,084 ± 3,362	9,966 ± 5,484	9,887 ± 2,457
Bioquímicos séricos				
SDMA (μg/dL)	8.7 ± 0.6 ^a	16.7 ± 1.0 ^a	47.3 ± 9.8 ^b	63.9 ± 8.8 ^c
Ureia (mg/dL)	31.7 ± 13.6 ^a	108.8 ± 72.1 ^a	153.7 ± 73.3 ^{ab}	203.4 ± 17.5 ^b
Creatinina (mg/dL)	1.0 ± 0.3 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	3.5 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.4 ^c
Fosforo (mg/dL)	3.5 ± 0.0 ^a	3.7 ± 1.3 ^a	8.1 ± 3.4 ^{ab}	11.4 ± 3.8 ^b
Albumina (g/dL)	3.4 ± 0.3	2.0 ± 1.1	1.8 ± 0.4	2.2 ± 0.3
Sódio (mEq/L)	146.0 ± 1.41	155.0 ± 4.42	154.7 ± 0.60	152.0 ± 4.34

Potássio (mEq/L)	3.7 ± 0.07	3.9 ± 1.11	4.5 ± 0.90	3.8 ± 0.80
Urinalise				
Densidade urinária	1,040 ± 0,012	1,022 ± 0.009	1,016 ± 0.003	1,011 ± 0.002
pH	5.80 ± 0.76	7.00 ± 1.29	7.20 ± 0.30	5.60 ± 0.51
RPC	0.30 ± 0.31	4.40 ± 6.11	10.20 ± 0.00	6.30 ± 1.16

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre os grupos (ANOVA, P < 0,05).

5.2. Proteômica

Na análise por espectrometria de massas foi identificado um total de 152 proteínas no soro (Figura 1) e 188 proteínas na urina (Figura 2), contudo o número variou nos grupos estudados.

Das 152 proteínas identificadas no soro, foram identificadas 66 proteínas no grupo GC, 116 no DRCI, 69 no DRCIII e 91 no DRCIV. Destas, 43 proteínas estavam presentes em todos os grupos (Figura 1). Por outro lado, das 188 proteínas identificadas na urina, 90 foram identificadas no grupo GC, 127 no DRCI, 84 no DRCIII e 95 no DRCIV, das quais 40 proteínas estavam presentes em todos os grupos (Figura 2).

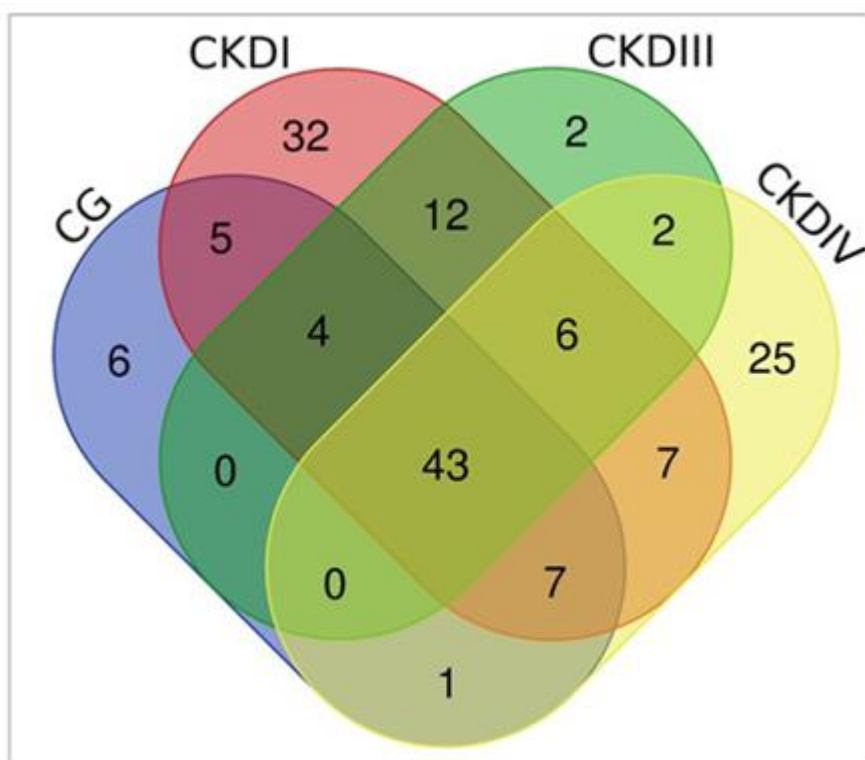


Figura 1. Diagrama de Venn da quantidade de proteínas identificadas no soro

de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV)
obtidas em <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

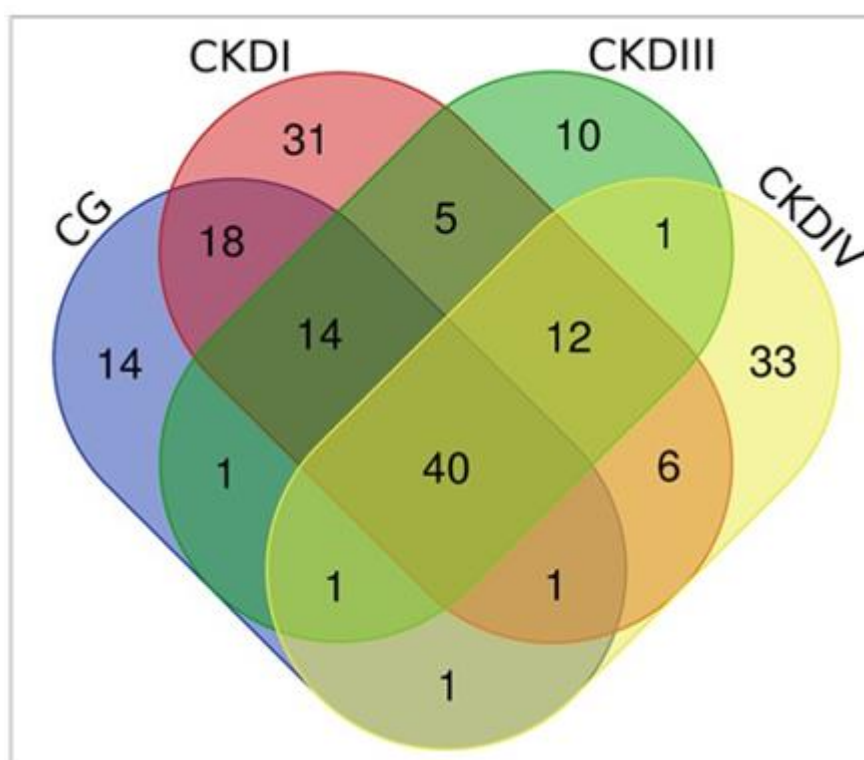


Figura 2. Diagrama de Venn da quantidade de proteínas identificadas na urina de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV) obtidas em <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

As proteínas identificadas por espectrometria de massas, quando submetidas a análise ANOVA *one way* identificaram 25 proteínas em maior abundância no soro (Tabela 4) e 23 na urina (Tabela 5) dos cães estudados.

Tabela 4. Proteínas em maior abundância identificadas na proteômica do soro de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

ID	Proteínas – Peak (mz/rt)	F value*	P value*	Fisher's LSD*
A0A8I3QZH6	Pentraxin	57,77	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIV - CONTR
A0A8I3S2L1	Glutathione peroxidase	24,72	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIV - CONTR
A0A8I3PB96	Ig-like domain-containing protein	17,57	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CKDI - CONTR
E2RE76	Apolipoprotein A-IV	16,60	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8I3RW25	Joining chain of multimeric IgA and IgM	16,06	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CKDIV; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3P0A5	Peptidase S1 domain-containing protein	14,51	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII

A0A8I3NFJ3	Gc-globulin	14,07	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8I3P629	Fetuin B	13,66	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
P49822	Albumin	11,87	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8I3PET9	Histidine rich glycoprotein	10,09	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8P0NT31	Uncharacterized protein	6,05	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3PQD6	Ig-like domain-containing protein	6,03	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII
P18649	Apolipoprotein E	5,97	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3Q620	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	5,91	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3PZP2	Ig-like domain-containing protein	5,91	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3S6D0	Ig-like domain-containing protein	5,91	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3SCR2	Ig-like domain-containing protein	5,91	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3S5D2	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	5,91	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3PB96	Ig-like domain-containing protein	5,76	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDIV - CKDI; CONTR - CKDI
A0A8P0NKP4	Insulin like growth factor binding protein acid labile subunit	4,56	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3PDF6	Paraoxonase	4,56	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3MF27	Plasminogen	4,56	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3Q044	Complement factor H	4,56	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3S0B7	Serpin family F member 1	4,29	0,02	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII
A0A8I3NLH3	Complement factor B	4,16	0,02	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CONTR - CKDIII

562 *ANOVA *one way* e análise *post-hoc*

563

564 **Tabela 5.** Proteínas em maior abundância identificadas na proteômica da urina
565 de cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

ID	Proteínas - Peak(mz/rt)	F value*	P value*	Fisher's LSD*
A0A8I3P8B2	Gelsolin	52,26	< 0,01	CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
G1K265	Lysozyme	41,45	< 0,01	CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3NFJ3	Gc-globulin	27,39	< 0,01	CONTR - CKDI; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8I3PB96	Ig-like domain-containing protein	23,53	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3Q3K3	Beta-1 metal-binding globulin	19,18	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3QNP3	Cystatin domain-containing protein	18,55	< 0,01	CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3RY54	Complement factor D	18,24	< 0,01	CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIV - CKDIII; CKDIII - CONTR
P49822	Albumin	17,57	< 0,01	CKDI - CKDIII; CKDI - CKDIV; CONTR - CKDIII; CONTR - CKDIV
A0A8I3P0A5	Peptidase S1 domain-containing protein	15,61	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3S6D0	Ig-like domain-containing protein	15,61	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
P01785	Ig heavy chain V region MOO	15,61	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
E2RN10	Beta-2-microglobulin	15,11	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3PB96	Ig-like domain-containing protein	14,94	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
P33703	Beta-2-glycoprotein 1	14,73	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3Q620	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	14,11	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
P25473	Clusterin	10,76	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3Q3G3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4	9,99	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR

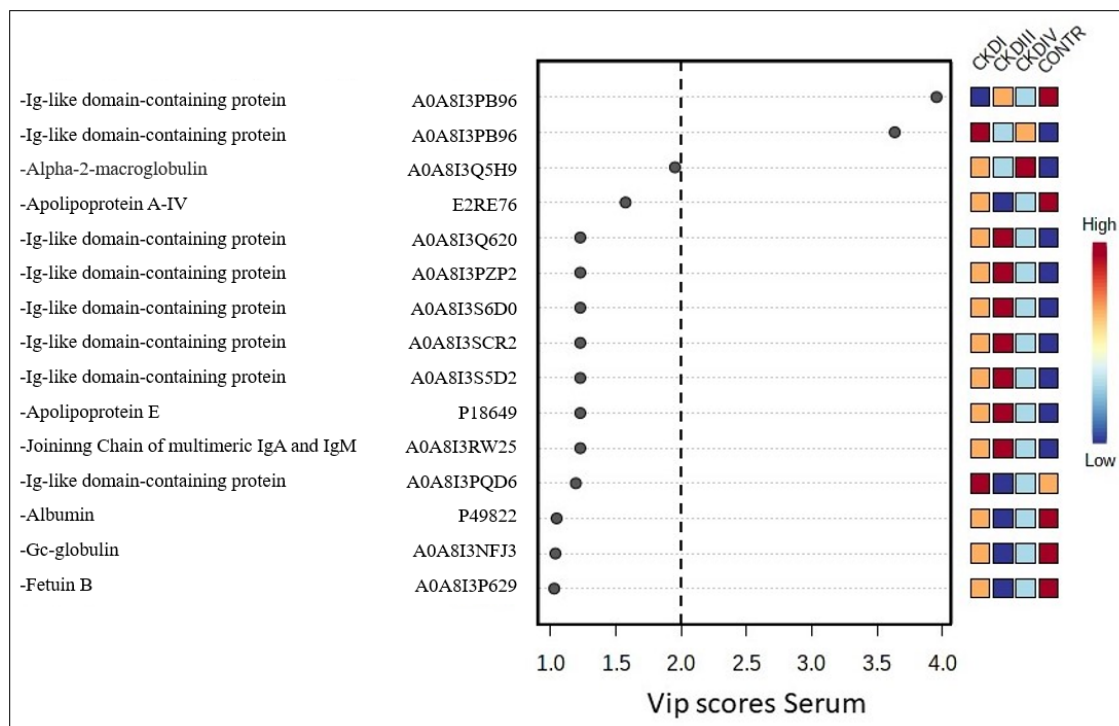
A0A8I3MSG4	Apolipoprotein A-I	8,35	< 0,01	CKDIII - CKDI; CKDIV - CKDI; CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3PAG4	Plasma retinol-binding protein	7,59	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3N4M8	Haptoglobin	6,71	< 0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3NB3J	Alpha-1-acid glycoprotein	5,67	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII; CKDIV - CONTR
A0A8I3RR88	Angiotensinogen	5,51	0,01	CKDI - CONTR; CKDIII - CONTR; CKDIV - CONTR
A0A8I3RVQ3	Amyloid beta precursor protein binding family B member 1	4,95	0,01	CKDI - CKDIII; CKDIV - CKDIII

566 *ANOVA *one way* e análise *post-hoc*

567

568 Entretanto quando as proteínas em maior abundância identificadas na
569 proteômica do soro e urina de cães dos grupos GC, DRCI, DRCIII e DRCIV foram
570 submetidas a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA)
571 pelo VIP score com $\alpha > 2,0$, observou-se, no soro, que a proteína contendo
572 domínio semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* - A0A8I3PB96) teve
573 destaque e Alfa-2-macroglobulina (Alpha-2-macroglobulin - A0A8I3Q5H9) se
574 apresentou limítrofe (Figura 3). Na urina, a Globulina beta-1 ligante ao metal
575 (*Beta-1 metal-binding globulin* - A0A8I3Q3K3), *Angiotensinogen* (A0A8I3RR88),
576 Gc-globulina (*Gc-globulin* - A0A8I3NFJ3) e Proteína contendo domínio
577 semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* - A0A8I3PB96) se destacaram
578 (Figura 4).

579



580

Figura 3. *Vip score* gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância no soro, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

Na análise do *Vip score* do soro, uma proteína foi encontrada em maior abundância no soro do grupo controle e também no soro do grupo DRCI, com $\alpha > 2,0$ (Figura 3). Na análise do *Vip score* da urina, duas proteínas foram encontradas em maior abundância na urina do grupo DRCIII, uma no grupo controle e uma no DRCI, com $\alpha > 2,0$ (Figura 4).

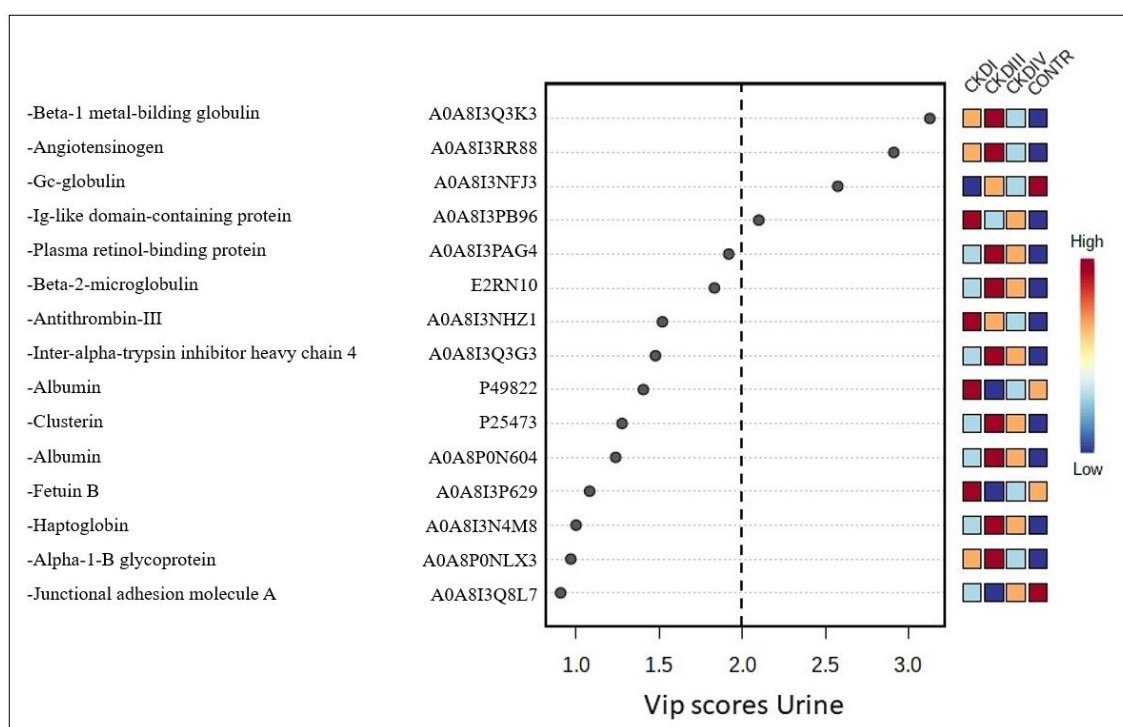


Figura 4. *Vip score* gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância na urina, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

As proteínas encontradas na urina e no soro foram ainda comparadas qualitativamente, sendo observada a presença das proteínas Vitronectina (*Vitronectina* - A0A8I3N025) e Serpina familia G membro 1 (Serpina familia G membro 1 - A0A8I3P8J2) em 100% no soro e 67% na urina dos cães no GC. Elas foram observadas em porcentagens variadas no soro e na urina em todos os grupos, exceto na urina no grupo DRCIV para ambas as proteínas e no soro do DRCIV para Serpina familia G membro 1. Em contrapartida, a Transferrina (*Transferrin* - A0A8P0TH07) não foi observada no soro do GC e no soro e urina do DRCI e DRCIII, porém presente em 67% da urina do GC, em 33% da urina e 25% do soro do DRCIV. Já a Proteína contendo domínio semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* - A0A8I3PB96) e Região V da cadeia pesada de Ig MOO (*Ig heavy chain V region MOO* - P01785), não foram observadas no soro e urina do grupo GC, já a segunda também não foi observada no soro do DRCIII e DRCIV, porém ambas foram presentes em porcentagens variadas nos demais grupos em soro e urina (Figura 5).

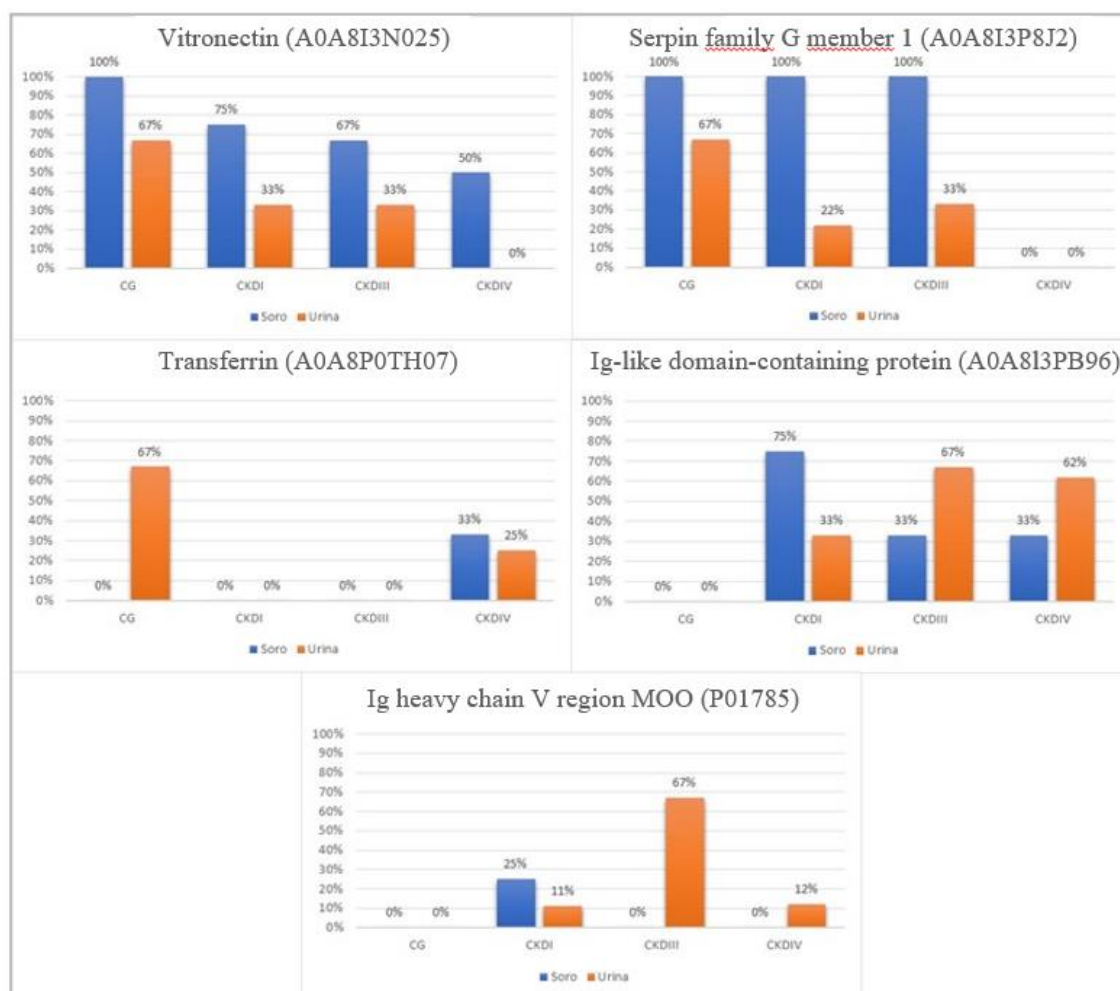
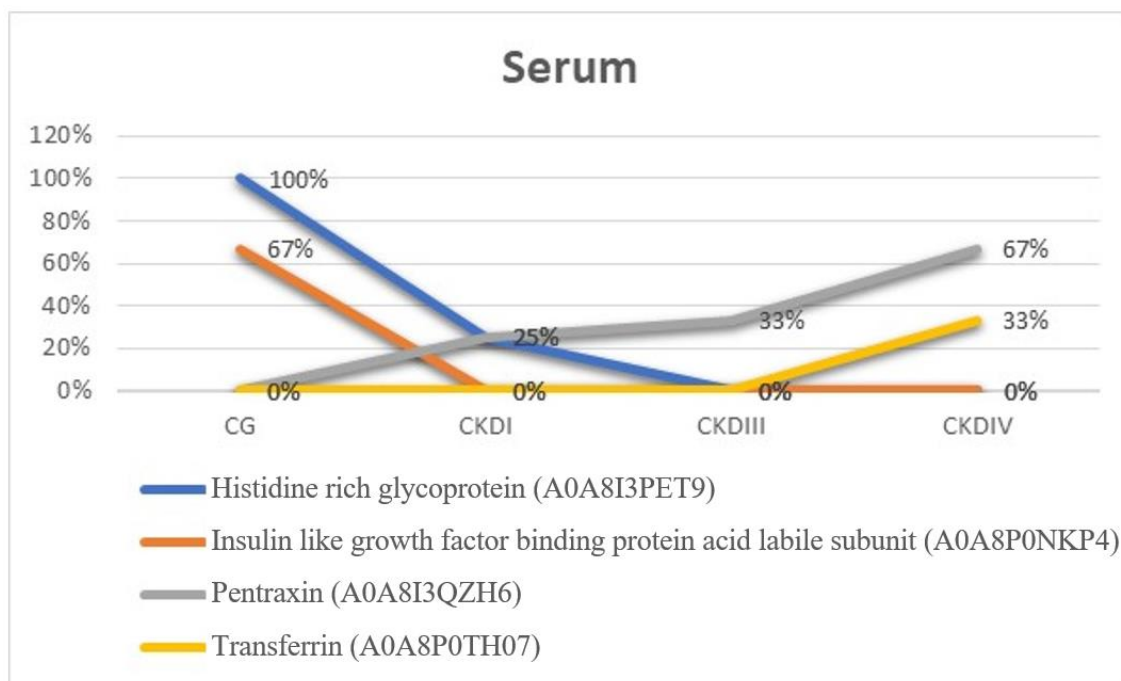


Figura 5. Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro e urina dos cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

621

Das proteínas do soro comparadas qualitativamente entre os grupos, a Glicoproteína rica em histidina (*Histidine rich glycoprotein* - A0A8I3PET9) e Subunidade lábil do ácido da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin like growth factor binding protein acid labile subunit* - A0A8P0NKP4) tiveram presença em mais de 100% e 67% no GC, a primeira estava presente em 25% no soro no DRCI e ambas não estavam presentes nos demais grupos. Em contrapartida a Transferrina (A0A8P0TH07) e a Pentraxina (Pentraxin – A0A8I3QZH6) não estavam presentes no GC, a Pentraxina teve comportamento crescente com o grau da DRC chegando a 67% no DRCIV e a Transferrina não estava presente nos estádios iniciais da DRC só estando presente no CKDIV apresentando 33% de presença (Figura 6).



633

Figura 6. Comportamento das proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro dos cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

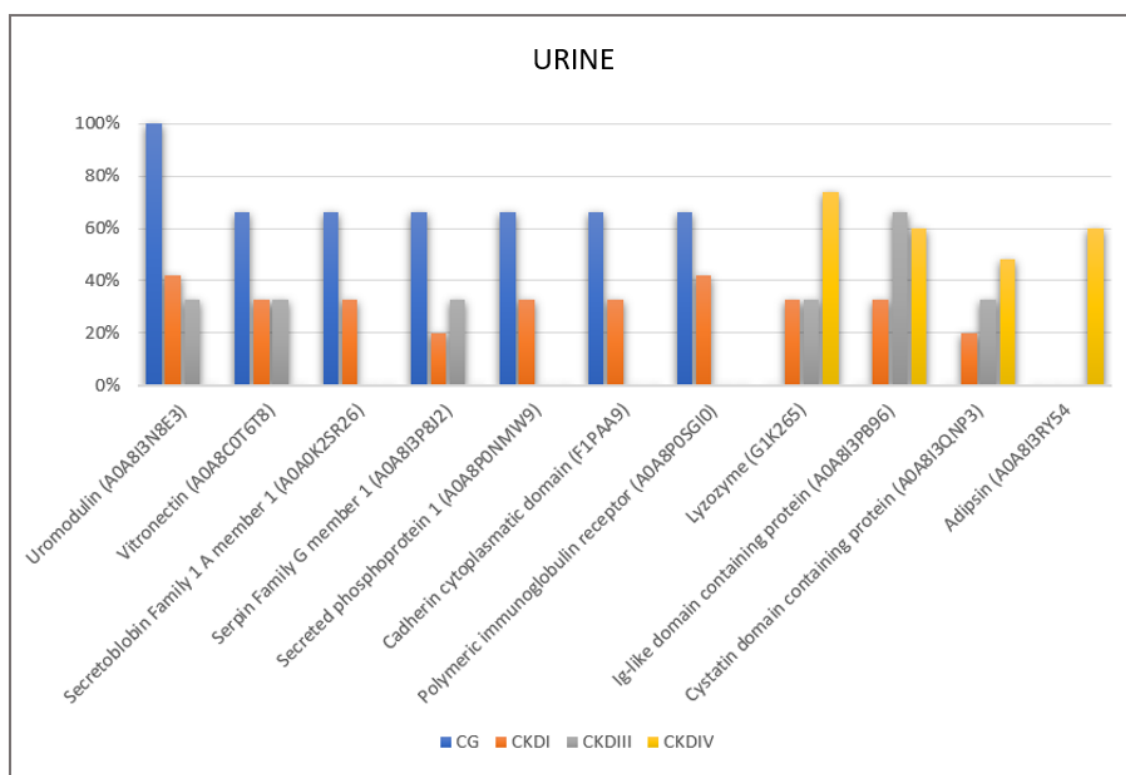
637

Nas proteínas que foram qualitativamente comparadas na urina entre os grupos, foi observado que as proteínas Uromodulina (*Uromodulin* -

639

640 A0A8I3N8E3), Vitronectina (*Vitronectin* - A0A8I3C0T6T8), Família da
 641 secretoglobina 1A membro 1 (*Secretoglobin family 1A member 1* -
 642 A0A0K2SR26), Serpina familia G membro 1 (Serpín Family G member 1 -
 643 A0A8I3P8J2), Fosfoproteína 1 secretada - *Secreted phosphoprotein 1* -
 644 A0A8P0NMW9), Caderina, domínio citoplasmático (*Cadherin, cytoplasmic*
 645 *domain* - F1PAA9), *Receptor de imunoglobulina polimérico* (*Polymeric*
 646 *immunoglobulin receptor* - A0A8P0SGI0) tinham presença de 67 a 100% no CG,
 647 porcentagem essa que decresceu com a progressão da doença, chegando a 0%
 648 no DRCIV. Por outro lado, as proteínas Lisosima (*Lysozyme* - G1K265), Proteína
 649 contendo domínio semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* -
 650 A0A8I3PB96) e Proteína contendo domínio de cistatina (*Cystatin domain-*
 651 *containing protein* - A0A8I3QNP3) não foram identificadas no CG, aumentando
 652 com a progressão de estágio da doença, variando de 50 a 75% no DRCIV. A
 653 Adipsina (*Adipsin* - A0A8I3RY54) foi identificada apenas em cães DRCIV (Figura
 654 7).

655



656

657 Figura 7. Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) na urina dos
 658 cães dos grupos GC (CG), DRCI (CKDI), DRCIII (CKDIII) e DRCIV (CKDIV).

659

660 6. DISCUSSÃO

661 6.1 Avaliação clínica e laboratorial

662 A concentração sérica de ureia e creatinina no DRCI estava dentro do
663 intervalo de referência para a espécie, diferente do observado nos estádios mais
664 avançados. Em cães acometidos pela DRC, o aumento de ureia e creatinina é
665 comumente observado nos estádios mais avançados da DRC, não sendo
666 esperado aumento nos cães DRCI (IRIS, 2019). O aumento da creatinina e/ou
667 da ureia, conforme observado nos grupos DRCIII e DRCIV é reflexo da
668 diminuição da TFG, condição comumente observada nos estádios avançados da
669 DRC. Tanto a ureia como a creatinina são utilizadas para direcionar a gravidade
670 do quadro clínico, prognóstico e evolução do tratamento (CORTADELLAS, et al.,
671 2008; IRIS, 2019). Além da creatinina, o SDMA também foi avaliado no nosso
672 estudo. Ambos são considerados biomarcadores séricos. Em estudo recente, foi
673 observada boa interação entre o SDMA e os estádios da DRC, sendo
674 demonstrado que em cães, o SDMA possui melhor correlação com a função
675 renal do que a creatinina, justificando assim a dosagem de ambos os
676 biomarcadores para avaliação da função renal e estadiamento de cães DRC
677 neste estudo (LE-SEUR et al., 2019).

678 Na avaliação da PAS dos cães DRC, foram observados maiores valores
679 nos cães do grupo DRCIV ($155,7 \pm 31,5$), conforme previsto no *guidelines* da
680 IRIS (IRIS, 2019). Apesar do valor médio de PAS nos cães DRCIV do estudo ser
681 considerada limítrofe ou pré hipertenso e o risco de lesão em órgão alvo seja
682 taxado como mínimo pelo *guidelines* da IRIS (IRIS, 2019). O acompanhamento
683 deste parâmetro utilizado para o subestadiamento da DRC é necessário para
684 que não evolua para hipertensão. Logo, apesar de não receberem fármacos anti-
685 hipertensivos, cães pré-hipertensos requerem maior frequência de
686 monitoramento não só da PAS, mas de toda a condição geral (ACIERNO, et al.,
687 2018). Sabe-se que a hipertensão pode estar presente em qualquer estágio da
688 DRC e que os níveis séricos de creatinina não estão diretamente relacionados à
689 PAS, diferentemente da proteinúria (ACIERNO, et al., 2018; MICHEL, et al.,
690 1997). Apesar dos animais DRCIV terem apresentado maiores valores de PAS

691 e creatinina quando comparados à DRCI e DRCIII, ambos parâmetros não
692 possuem correlação direta entre eles.

693 A persistência de níveis aumentados de proteína na urina, como observado
694 neste estudo em cães dos grupos DRC, não é considerada normal para a
695 espécie, mas quando presente é fortemente associada com a redução de
696 sobrevida, uma vez que proteínas circulantes deveriam ser bloqueadas pelo
697 glomérulo, seja pelo tamanho e/ou carga, proteinúria essa, não comumente
698 observado em cães DRC (HARLEY, et al., 2012). A proteinúria ainda culmina
699 com a perda de albumina, resultando em hipoalbuminemia com consequente
700 diminuição dos níveis de proteína total (POLZIN, 2011), condição observada nos
701 cães DRCIII do estudo e passível de ser indicativa de lesão glomerular
702 (WHERNER, et al., 2008). É sabido que a correlação entre hipertensão e
703 ocorrência de proteinúria em cães DRC possui importância na monitoração e
704 consequente tratamento da doença (ACIERNO, et al., 2018). Nesse estudo foi
705 observada a ocorrência de proteinúria na ausência de hipertensão, condição que
706 pode estar associada a lesão tubulointersticial que culmina com perda proteica,
707 condição menos esperada em casos de lesão glomerular (VADEN, et al., 2016).

708 De acordo com WEHNER et al. (2008), a redução da função renal de
709 excreção em cães pode estar associada com aumento da proteinúria ao passo
710 em que cães com redução branda da TFG tendem a ser normotensos, podendo
711 justificar os animais normotensos e proteinúricos encontrados no estudo. Na
712 avaliação da RPC, cães de todos os grupos DRC apresentaram razão
713 aumentada, com destaque para o DRCIII. Considerando que a extensão da
714 proteinúria e consequente RPC está relacionada com aumento da PAS,
715 esperava-se que o grupo DRCIV apresentasse maior RPC. Entretanto, acredita-
716 se que o n amostral de cada grupo tenha influenciado na magnitude da
717 proteinúria encontrada no grupo DRCIII quando comparado aos grupos DRCI e
718 DRCIV.

719 Ainda foi observada diminuição progressiva da densidade urinária com o
720 avanço dos estádios da doença, indicando a incapacidade dos rins em
721 concentrar a urina em detrimento da presença de lesão tubular, condição
722 frequentemente observada em cães com DRC (McGROTTY, 2008), o que
723 concorda com a prerrogativa da IRIS (IRIS, 2019), de que tanto proteinúria

724 quanto isostenúria já são observadas em cães DRC desde os primeiros estádios
725 da doença.

726 Na avaliação hematológica, a anemia observada desde o estágio inicial dos
727 grupos DRC deste estudo, pode ser visto em menor grau no início da doença.
728 esta alteração está relacionada com a deficiência na produção de eritropoetina
729 pelos rins, desnutrição, deficiência de ferro em detrimento da hiporexia. Tais
730 achados foram observados no nosso estudo. Outras causas podem ser
731 associadas com mecanismos inflamatórios, redução da vida útil eritrocitária por
732 injúrias metabólicas ou mecânicas, e devido aos efeitos antiproliferativos
733 induzidos pelas toxinas urêmicas (POLZIN, 2011; LIPPI, et al., 2021). De acordo
734 com KING et al. (1992), a severidade da anemia possui correlação positiva com
735 a concentração sérica de creatinina. Sendo assim, foi verificado no estudo que
736 com o aumento sérico da creatinina à medida que a DRC avança, existe uma
737 tendência ao agravamento da anemia, cenário fortemente evidenciado quando
738 se comparam os grupos DRCI com DRCIII e DRCI com DRCIV.

739 A hiperfosfatemia observada nos grupos DRCIII e DRCIV corrobora com a
740 literatura, na qual a retenção de fósforo ocorre devido diminuição da função
741 renal, sendo os rins, a principal via de excreção do fósforo. Logo, a elevação
742 sérica do fósforo é considerada como marcador de dano renal, condição
743 observada na DRC (POLZIN, 2011; MARTÍNEZ, et al., 2010).

744

745 **6.2 Proteômica**

746 De acordo com o VIP score considerando $\alpha > 2$, a Proteína contendo
747 domínio semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* - A0A8I3PB96) é
748 encontrada em maior concentração no soro de animais do grupo controle e
749 DRCI. Essa proteína é uma porção extracelular contida em todas as proteínas,
750 tendo essa porção extracelular, três domínios Ig-like (TRUEB et al., 2013). Um
751 estudo realizado por DACKOWSKI et al. (2002), investigaram o papel da
752 policistina-1 na tubulogênese e cistogênese a partir do uso de células epiteliais
753 renais da linhagem de células renais caninas Madin-Darby (MDCK). Para isso, o
754 estudo considerou mutações no gene PKD1 que codifica a policistina-1 na
755 doença renal policística e demonstrou que *domínios semelhantes de Ig* formam
756 fortes interações homofílicas e podem mediar a adesão entre células. Isso

757 confere que domínios similares a Ig contendo proteínas podem estar presentes
758 em diferentes patologias, assim como no glaucoma (JIANG et al., 2010),
759 cinomose (AVILA et al., 2015) e leptospirose (PALANIAPPAN et al., 2006; SILVA
760 et al., 2007), estando associados com funções distintas e, portanto, não
761 diretamente ligada à DRC de ocorrência natural.

762 Em seu estudo, TRUEB et al. (2013) demonstraram que o rim em
763 desenvolvimento expressa fatores de crescimento de fibroblastos (FGF) tipo 1,
764 7, 8, 9, 10, 12 e 20, além de receptores de fibroblastos (FGFR) contendo o
765 domínio Ig, sendo o FGFR 1 importante na formação do mesênquima
766 metanéfrico. O estudo demonstrou que o receptor do tipo 1 do fator de
767 crescimento de fibroblasto (FGFRL1) é um novo membro da família FGFR,
768 conhecido por interagir principalmente com FGF8, podendo levar a disgenesia
769 renal quando não expressado. Apesar de seu conhecimento associado à origem
770 de estruturas renais, infere-se que com a progressão da DRC, esses domínios
771 proteicos similares a Ig possam ser liberados com a perda da massa renal
772 funcional e, portanto, identificados na análise proteômica. Logo, devido a sua
773 inespecificidade, proteína contendo domínio semelhante a Ig não deve ser
774 utilizado como biomarcador em cães DRC.

775 A Alfa-2-macroglobulina (Alpha-2-macroglobulin - A0A8I3Q5H9) foi uma
776 proteína identificada abaixo, porém limítrofe a linha de corte do VIP score para
777 $\alpha > 2$ e mais abundante em DRCIV. Essa proteína, diferente dos domínios
778 proteicos similares a Ig parece ter utilidade como biomarcador renal em cães em
779 estágios avançados, porém não em quadros precoces. É uma das principais
780 antiproteases no plasma de vertebrados (REHMAN et al., 2013), sendo a única
781 proteína capaz de inibir proteases *in vivo* (BOER et al., 1993; NAVEAU et al.,
782 1994), independente da especificidade ou mecanismo catalítico (FELDMAN et
783 al., 1985). Funcionalmente, essa proteína atua no sequestro de proteinases
784 liberadas por granulócitos e outras células durante um processo inflamatório,
785 além de regular a atividade proteolítica extracelular resultante da fibrinólise e
786 coagulação (REHMAN et al., 2013), condição importante em cães com DRC.
787 Cães com síndrome nefrótica apresentam aumento sérico de Alfa-2-
788 macroglobulina e redução nos níveis de antitrombina III, ficando predispostos a
789 formação de trombos considerando o estado de hipercoagulabilidade instalado
790 (FELDMAN et al., 1985). Assim como em humanos, a dislipidemia, condição

791 verificada na síndrome nefrótica, pode ser encontrada na DRC em cães
792 (BEHLING-KELLY, 2014), mostrando a correlação positiva entre síndrome
793 nefrótica, DRC, aumento de Alfa-2-macroglobulina e risco trombótico.

794 Para a análise proteômica da urina de cães DRC considerando o VIP
795 score com $\alpha > 2$, as proteínas de maior destaque foram Globulina beta-1 ligante
796 ao metal ou serotransferrina, angiotensinogenio, Gc-globulina ou Proteína de
797 ligação à vitamina D, e Proteína contendo domínio semelhante a Ig. A Globulina
798 beta-1 ligante ao metal (*Beta-1 metal-binding globulin* - A0A8I3Q3K3) também
799 conhecida como serotranferrina é uma proteína associada ao transporte de ferro,
800 resposta de fase aguda e estimulação da proliferação celular (DAVALIEVA et al.,
801 2015). No presente estudo, cães DRCIII apresentaram maior abundância,
802 seguido de DRCI e CKDIV, demonstrando ausência de correlação direta dessa
803 proteína na urina com a progressão da doença.

804 A presença de serotransferrina na urina foi identificada em um modelo
805 experimental com ratos intoxicados com urânio, estando relacionada com a
806 perda de permeabilidade glomerular (MALARD et al., 2009). Adicionalmente, um
807 estudo com humanos correlacionou a transferrina urinária com proteinúria
808 glomerular (VARGHESE et al., 2007) e em cães, foi demonstrado a presença de
809 transferrina na urina de cães com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo
810 X (VINGE et al., 2010). Em gatos, um estudo demonstrou que a perda de
811 transferrina na urina antecede a de albumina e que, portanto, pode ser utilizada
812 como biomarcador renal de precocidade na DRC (MAEDA et al., 2015), condição
813 que pode ser considerada em cães DRC. Ainda, a concentração de transferrina
814 pode sofrer influência do estado nutricional, tendo redução sérica em pacientes
815 caninos em anorexia (NAKAJIMA et al., 2014), sendo uma possível justificativa
816 para o aumento da perda e identificação na urina em cães DRCIII e DRCIV
817 (BHAMARASUTA et al., 2021), condizendo parcialmente com o achado no
818 presente estudo.

819 A proteína angiotensinogênio (*angiotensinogen* - A0A8I3RR88) foi mais
820 abundante em cães DRCIII, depois DRCI e DRCIV, não demonstrando
821 correlação perfeita com a progressão da doença. No entanto, sabe-se com base
822 em um estudo em humano com DRC que o angiotensinogênio urinário é um
823 biomarcador potencial da atividade da angiotensina II intrarrenal, componente
824 envolvido com o processo de deterioração da função renal em pacientes renais

825 crônicos (YAMAMOTO et al., 2007), marcador este que possivelmente reflete a
826 deterioração renal nos cães avaliados no presente estudo, porém
827 momentaneamente limitado pelo pequeno número de amostras avaliadas para
828 animais DRCIII quando comparados a DRCI e DRCIV. Em complemento, um
829 estudo desenvolvido KOBORI e NAVAR (2011) apontou o angiotensinogênio
830 como biomarcador da hipertensão, vista sua capacidade de ativar o sistema
831 renina angiotensina aldosterona, condição verificada não só em humanos, mas
832 também em animais, a exemplo dos cães do presente estudo.

833 Ainda em relação ao angiotensinogênio urinário, um estudo desenvolvido
834 por KOBORI et al. (2008) demonstrou seu potencial como biomarcador de
835 severidade da DRC, estando positivamente correlacionado com a razão
836 albumina/creatinina urinária, fração de excreção do sódio, e razão
837 proteína/creatinina urinária, além de correlação negativa com a TFG.
838 Recentemente, um estudo com pacientes humanos demonstrou que maiores
839 níveis urinários desta molécula podem estar relacionados com o caráter
840 progressivo da DRC, podendo essa correlação ainda sofrer influência do índice
841 de massa corporal e albuminúria (SUH et al., 2022). Sendo assim, apesar da
842 inexistência de estudos em cães DRC, considera-se que o angiotensinogênio
843 possa atuar como biomarcador de função renal, progressão da DRC e ainda,
844 indiretamente, prognóstico.

845 A Gc-globulina também conhecida por Proteína de ligação à vitamina D
846 (*Vitamin D-binding protein* - A0A8I3NFJ3) foi mais abundante no grupo controle,
847 depois DRCIII, DRCIV e DRCI. Essa proteína se liga à megalina no lúmen dos
848 túbulos renais e evita a perda urinária de 25 hidroxivitamina D (NYKJAER et al.,
849 1999). Em humanos, pode ser encontrada na urina de indivíduos saudáveis
850 (CANDIANO et al., 2010), condizente com a maior concentração em cães do
851 grupo controle deste estudo. Por outro lado, CHACAR et al. (2017), em um
852 estudo com cães, não encontraram a presença de proteína de ligação à vitamina
853 D na urina de cães saudáveis. Um estudo desenvolvido com ratos e humanos,
854 demonstrou essa proteína como um biomarcador de dano tubulointersticial não
855 dependente de albuminúria em ratos e indicador de severidade de lesão renal
856 em humanos, estando associada com marcadores tubulares e inflamatórios,
857 apresentando resposta positiva com a implementação do tratamento
858 renoprotetor (MIRKOVIC et al., 2013). Nos animais deste estudo, cães em

estádios mais avançados da doença apresentaram maior abundância podendo indicar correlação com a progressão da doença, entretanto contrapondo o grupo controle que se destacou, trazendo assim, inconsistências.

Na estratificação de cães com DRC em diferentes estádios, cães DRCI e DRCII, a presença de proteína de ligação à vitamina D foi identificada em animais não proteinúricos ou proteinuricos borderline, diferente de cães em estádios mais avançados, como DRCIII e DRCIV, em que a redução na expressão da proteína de Tamm-Horsfall foi verificada (CHACAR et al., 2017). Logo, proteína de ligação à vitamina D foi associada com a detecção de injúria renal precoce, enquanto Tamm-Horsfall com progressão da doença linkada aos estádios mais avançados. Esses dados conferem com os achados na razão proteína/creatinina urinária nos cães do grupo controle que se apresentaram proteinuricos borderline. Por outro lado, contrapõe os achados em cães DRCI que se apresentaram proteinúricos.

A presença de proteína contendo domínio semelhante a Ig (*Ig-like domain-containing protein* - A0A8I3PB96) foi encontrada em maior abundância na urina de cães DRCI, DRCIV e DRCIII nessa ordem. Um estudo em cães com leishmaniose demonstrou que essa proteína pode se apresentar aumentada na urina de cães infectados quando comparados com grupo controle, podendo sua presença na urina estar associada com a capacidade de filtração glomerular (GONZÁLEZ et al., 2022), refletindo dano glomerular como apontado por KOVARIKOVA (2015). Quando considerados os cães DRC do presente estudo, considera-se não justificável tal correlação com quadro infeccioso, visto que na seleção, animais com comorbidades foram desconsiderados, sendo relevantes apenas aqueles com a DRC de ocorrência natural. Em seu estudo com cães DRC de ocorrência natural, HOKAMP et al. (2016) identificaram frações de excreção de IgM e IgG considerada proteínas de alto peso molecular, estando correlacionada com danos glomerulares, enquanto a creatinina sérica correlacionou-se com danos túbulo intersticiais. Embora no presente estudo, a causa primária da DRC não tenha sido investigada conforme determinado no estudo de HOKAMP et al. (2016), infere-se que cães DRC I, DRCIV e DRCIII nessa ordem possam ter apresentado danos glomerulares justificando a presença de proteína contendo domínio semelhante a Ig. Não menos importante,

o número de animais por grupo pode ter influenciado na ordem de abundância dessa proteína identificada pelo VIP score para $\alpha > 2$.

Na avaliação comparativa qualitativa de proteínas no soro e urina de cães foi observado comportamento relevante com a progressão da DRC para as proteínas Vitronectina (*Vitronectina* - A0A8I3N025) e *Serpin familia G membro 1* (Serpín Family G member 1 - A0A8I3P8J2). A vitronectina é uma glicoproteína de aderência multifuncional encontrada na circulação e em diferentes tecidos (PREISSNER, 1991), já tendo sido descrita como estando presente em tecido conjuntivo frouxo em tecidos renais a partir de avaliação por imunofluorescência (HAYMAN et al., 1983). A vitronectina e seu receptor podem apresentar papéis importante em processos fisiológicos e patológicos dos rins podendo se ligar a proteínas de membrana plasmática, regulando processos de adesão, migração, diferenciação, inflamação, reação imunológica e remodelamento tecidual (SCHVARTZ, 1999). Na DRC, a vitronectina é uma proteína da matriz extracelular que se acumula no interstício durante a fibrose renal (EDDY, 2009), tendo então relevância em pacientes humanos e caninos com DRC. A deposição de vitronectina já foi detectada em processos de fibrose e necrose (SEIFFERT, 1997; PREISSNER e SEIFFERT, 1998), podendo estar ligada com as reduções sérica e urinária verificada nos cães deste estudo, considerando o quadro de progressão da doença, bem como a possível instalação de processo fibrótico associado ao tecido renal na DRC. Um estudo demonstrou que a avaliação urinária dessa proteína é uma importante ferramenta para monitorar processos fibróticos em quadros de transplante renal (CARRERAS-PLANELLA et al., 2021). Adicionalmente, YOON et al. (2001) apontaram que os níveis de vitronectina reduzem com a idade, condição esta esperada em cães DRC, visto que, animais acometidos pela doença tendem em sua maioria apresentar idade mais avançada. Complementarmente, a redução pode estar associada com o acúmulo da proteína no interstício renal (LOPÉZ-GUISA et al., 2011). Logo, considerando o caráter fibrótico da DRC e o avanço dos estádios da doença, considera-se a *vitronectin* como potencial biomarcador não só em humanos, mas também, em cães.

A serpina familia G membro 1 é um inibidor da esterase do complemento I sendo expresso no fígado, rim, pulmão, coração e cérebro (BEINROHR et al.,

2007). Essa proteína pertence a uma família de proteínas envolvidas em processos inibitórios, de armazenamento e transporte, podendo ser encontrada em diversos tecidos no corpo, tendo sua maior concentração, extracelular. Ainda, o grupo ao qual está incluída a serpin família G membro 1, desempenha funções fisiológicas específicas importantes voltadas para o transporte hormonal, ligação a corticosteróides, coagulação e regulação da pressão sanguínea (HEIT et al., 2013), funções estas influenciadas em certo grau pela atividade renal. Conforme NI et al. (2022), a serpin família G membro 1 possui importante função da injúria renal aguda (IRA), promovendo a perpetuação de macrófagos anti-inflamatórios, prevenindo a IRA séptica, podendo assim, atuar como biomarcador de predição da resposta ao tratamento com altas doses de ascorbato.

Diferente do foco de muitos estudos, essa proteína não parece ter importância biológica na monitoração da DRC em humanos ou em cães pelo soro, visto que na avaliação qualitativa, os níveis séricos mantiveram um nível alto para os grupos GC, DRCI e DRCIII. Sabe-se que é uma glicoproteína de fase aguda, produzida no fígado e secretada na circulação (PALVIAINEN et al., 2012; SIDGEL et al., 2022), tendo importância para os rins com relação a proteção anti-apoptótica e anti-inflamatória na injúria por reperfusão ou isquemia renal (DAEMEN et al., 2000), condições estas não avaliadas no estudo. Enquanto isso, a avaliação urinária, demonstrou redução nos grupos DRC em comparação ao grupo controle. Embora certa discrepância tenha sido observada entre os grupos DRCI e DRCIII, e se considere a serpin família G membro 1, um biomarcador de IRA em humanos (METZGER et al., 2010), sugere-se que essa proteína possa também ter efeito na monitoração da progressão da DRC, embora estudos mais detalhados sejam necessários.

Na avaliação isolada qualitativa do soro de cães DRC deste estudo, duas proteínas demonstraram comportamento crescente com a progressão da doença entaxina (*Pentaxin* ou *Pentraxin* - A0A8I3QZH6) e Transferrina (*Transferrin* - A0A8P0TH07), enquanto outras duas demonstraram comportamento decrescente em estádios mais avançados Glicoproteína rica em histidina (*Histidine rich glycoprotein* - A0A8I3PET9) e subunidade lábil do ácido da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (*Insulin like*

958 *growth factor binding protein acid labile subunit* - A0A8P0NKP4). A Pentaxina
959 também conhecida como Pentraxina pertence a uma superfamília de pentraxinas
960 e família de pentraxina de ligação dependente de Ca^{2+} (UNIPROT, 2022),
961 dentre as quais a proteína C-reativa (Pentaxina curta) está inclusa (CASTELL
962 et al., 1990; TONG et al., 2007). Nos animais do presente estudo, os níveis
963 séricos de Pentraxina foram aumentando conforme a DRC progrediu, resultando
964 em maiores níveis séricos de Pentraxina em cães DRCIV. Na avaliação dos
965 níveis séricos de Pentraxina 3, um estudo demonstrou que em pacientes
966 humanos com DRC, os níveis plasmáticos mostraram-se elevados, aumentando
967 significativamente após sessão de hemodiálise, evidenciando o caráter
968 inflamatório do procedimento (BOEHME et al., 2007), recentemente evidenciado
969 também pela avaliação sérica da proteína C-reativa (AZEVEDO et al., 2022).
970 Embora os animais deste estudo não tenham sido submetidos a hemodiálise,
971 percebeu-se aumento progressivo de Pentraxina com o avanço do estágio da
972 doença.

973 Estudos com culturas celulares, demonstraram que as células mesangiais
974 e epiteliais tubulares sintetizam pentraxinas em resposta a um estímulo
975 inflamatório (BUSSOLATI et al., 2003; NAUTA et al., 2005), condição que pode
976 estar presente em pacientes humanos e animais com CKD. Em pacientes
977 humanos com DRC, a Pentraxina 3 plasmática aumentou com a redução da
978 TFG, tornando-se mais expressiva nos estádios mais avançados, mantendo
979 níveis menores nos indivíduos do grupo controle (TONG et al., 2007). Esse
980 achado condiz com os cães DRC do presente estudo, visto que cães DRCIV
981 apresentaram os maiores níveis, quando comparados com DRCIII, DRCI e GC,
982 respectivamente. Isso permite a inferência que em cães, assim como em
983 humanos, a progressão da DRC associada a redução da TFG, leva ao acúmulo
984 e respectivo aumento sérico de Pentraxina, podendo assim ser utilizado como
985 potencial biomarcador de progressão e avaliação da TFG em cães.

986 Qualitativamente, a Transferrina demonstrou comportamento nulo nos
987 grupos GC, DRCI e DRCIII, tendo sido identificada apenas em cães do grupo
988 DRCIV, levantando a hipótese de estar correlacionada apenas com estágio
989 terminal da doença. A transferrina sérica é um indicador bioquímico comumente
990 acessado para avaliar o status de ferro sérico no organismo, estando a

transferrina ligada ao transporte do íon ferro (BOHN, 2013). Na DRC, a concentração de transferrina está associada a perdas pela urina e também ao estado nutricional do paciente humano ou animal (BHAMARASUTA et al., 2021). Considerando a gravidade clínica de cães DRC em estádios terminais, espera-se que devido ao estado nutricional deficiente desses animais, os níveis séricos de Transferrina possam estar diminuídos. Assim, os cães DRCI (55%) e DRCIII (67%) do presente estudo apresentaram algum grau de desnutrição, entretanto não a ponto de justificar qualitativamente, a ausência de transferrina sérica como observado. O mesmo é válido para cães GC que não apresentavam nenhuma alteração clínica ou laboratorial. Por outro lado, a suplementação nutricional em cães desnutridos ou anoréxicos é elemento importante na viabilização de aumento no nível sérico de transferrina (NAKAJIMA et al., 2014), condição averiguada em cães DRCIV deste estudo. Assim, cães DRC podem apresentar níveis séricos reduzidos de transferrina por fatores extrarrenais, principalmente em estádios mais avançados (BHAMARASUTA et al., 2021) e que, portanto, a transferrina não pode ser considerada um biomarcador direto da função renal na DRC.

A proteína Glicoproteína rica em histidina apresentou comportamento qualitativo decrescente com a progressão da doença. Essa proteína é uma proteína plasmática envolvida com processos biológicos ligados ao sangue como coagulação e sistema imune (STEWART et al., 2009). Estudos demonstraram que a redução nos níveis de Glicoproteína rica em histidina causaram desregulação do sistema coagulação-fibrinólise, morfologia anormal de neutrófilos, anormalidades em células endoteliais e trombose imune, levando a falência de órgãos (WAKE, 2019; WAKE et al., 2016;). Embora não tenha sido foco do presente estudo, alterações na coagulabilidade podem ocorrer no paciente DRC, principalmente com o avançar da doença. Nos cães deste estudo, a progressão da doença resultou em níveis reduzidos da proteína sérica quando comparados com animais GC. Um estudo comparando cães saudáveis e com DRC de ocorrência natural demonstrou que cães com DRC frequentemente apresentam disfunções plaquetárias e estado de hipercoagulabilidade, condições que não podem ser atribuídas apenas a funções plaquetárias (DUDLEY et al., 2017). Dessa forma, a Glicoproteína rica em histidina pode ser

uma proteína que contribui para o estado de hipercoagulabilidade em cães com DRC, entretanto, não utilizada como biomarcador da DRC, vista sua utilização como biomarcador em diversas outras doenças (OIWA et al., 2022).

A Subunidade lábil do ácido da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) se demonstrou presente na avaliação sérica apenas de animais do grupo controle, não sendo identificada na avaliação qualitativa de animais do grupo DRCI, DRCIII e DRCIV. Essa proteína é conhecida como uma glicoproteína, cuja subunidade Subunidade lábil (ALS) produzida no fígado, pode circular no organismo em forma de complexos ou livre (BAXTER, 1988; BAXTER et al., 1989; KHOSRAVI et al., 1997). Em forma de complexos, a sua redução pode estar associada a deficiência de hormônio do crescimento (GH) e insensibilidade ao GH (ROSENFELD et al., 2007; DOMENÉ et al., 2009). Em crianças, a DRC provoca mudanças significativas no GH e no eixo fator de crescimento semelhante à insulina, resultando em retardo do crescimento. Nesse caso, as proteínas inibidoras de ligação a IGF aumentam, reduzindo os níveis de IGF-1 circulantes, que são a forma bioativa livre que se liga a Subunidade lábil do ácido, resultando então em menor nível sérico de Subunidade lábil do ácido da proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (MAHESH e KASKEL, 2008). Fazendo uma correlação com os cães do presente estudo, embora não tenha sido dosados os níveis de GH, infere-se que a redução sérica dessa proteína tenha correlação com alterações do eixo fator de crescimento semelhante à insulina, justificando os resultados encontrados em cães saudáveis. Por outro lado, a não identificação na avaliação qualitativa nos animais DRC carece de estudos mais detalhados, visto que, esperava-se uma redução, e não, ausência completa. Ainda, considerando as diversas funções associadas a fator de crescimento semelhante à insulina de ligação da proteína (IGFBP) como controle do desenvolvimento renal pela interação com IGF, regulação de proliferação celular, apoptose e diferenciação independente de IGF, o uso de IGFBP na doença renal é considerado escasso e não sistemático (WANG et al., 2021).

Na avaliação qualitativa da urina, diversas proteínas ganharam destaque no estudo com cães DRC, seja demonstrando aumento ou redução com a progressão da doença. Se destacaram as proteínas Uromodulina, *Família da*

1057 *secretoglobina 1A membro 1*, Fosfoproteína 1 secretada, *Caderina*, domínio
1058 *citoplasmático*, *Receptor de imunoglobulina polimérico*, *Lisosima*, Proteína
1059 contendo domínio de cistatina e Adipsina. A Uromodulina (*Uromodulin* -
1060 A0A8I3N8E3), também conhecida como Proteína Tamm-Horsfall, é a proteína
1061 mais abundantemente produzida nos rins e excretada na urina sob condições
1062 fisiológicas normais (RAMPOLDI et al., 2011), coincidindo precisamente com
1063 animais do GC do presente estudo, visto que com o avanço nos estádios, os
1064 níveis urinários foram reduzindo, chegando ao grupo DRCIV com percentual
1065 qualitativo próximo de zero. Funcionalmente, a Uromodulina está envolvida no
1066 balanço hídrico e eletrolítico, imunidade inata do rim, proteção contra infecções
1067 do trato urinário e proteção contra a formação de cálculos (UNIPROT, 2022).

1068 A Uromodulina é uma proteína que pode sofrer mutações no gene que a
1069 codifica e por isso levar à ocorrência de doenças renais associadas a
1070 uromodulina causando a retenção e agregação da forma mutante da proteína no
1071 retículo endoplasmático, levando a uma disfunção do ramo ascendente espesso
1072 da alça de Henle. Isso culmina com dificuldade de concentração da urina,
1073 hiperuricemia, além da redução urinária da uromodulina, podendo estar
1074 associada com defeitos na capacidade de transporte da proteína através da
1075 membrana tubular (RAMPOLDI et al., 2011). A retenção dessa proteína pode
1076 culminar em danos e necrose celular, levando a ocorrência de fibrose e
1077 inflamação, podendo assim, resultar em risco aumentado de ocorrência da DRC.
1078 O mecanismo envolvido na redução da excreção de uromodulina pode estar
1079 associado com o observado no presente estudo com cães DRC, entretanto, não
1080 se pode afirmar, visto a incredibilidade em relação aos cães terem ou não
1081 mutação no gene codificador da uromodulina.

1082 Ainda, não menos importante, VYLETAL et al. (2010) pontuou que os
1083 depósitos de uromodulina podem estar associados com infiltrado inflamatório,
1084 condição que pode estar presente na DRC. Da mesma forma, a excreção urinária
1085 de uromodulina está diretamente correlacionada com a TFG. Assim, infere-se
1086 que os cães DRC deste estudo, por terem redução da TFG, expressão menor
1087 proporção de uromodulina na urina. A utilização da uromodulina urinária como
1088 biomarcador da DRC levantou questionamentos em relação a sua precisão em
1089 um estudo realizado por PRAJCZER et al. (2010). Nesse estudo, realizado com

1090 77 pacientes humanos com DRC, 22% apresentaram níveis normais de
1091 uromodulina na urina, diferente dos achados do presente estudo, em que a
1092 avaliação qualitativa demonstrou redução apreciável da uromodulina urinária em
1093 cães DRC à medida que a doença progredia em comparação aos cães controle.
1094 Esse contraste, com foco no presente estudo, coincide com os achados em um
1095 estudo metabolômico e proteômico realizado em cães saudáveis e DRC por
1096 FERLIZA et al. (2020), concordando ainda com estudos prévios (RAILA et al.,
1097 2014). Logo, considera-se a uromodulina como possível biomarcador da DRC.

1098 A Família da secretoglobina 1A membro 1 (*Secretoglobin family 1A*
1099 *member 1* - A0A0K2SR26), também conhecida como Uteroglobina é uma
1100 proteína semelhante a citocina, imunomoduladora e dependente de esteróide
1101 (MIELE et al., 1994; MUKHERJEE et al., 1999), atuando como agente anti-
1102 inflamatório no trato respiratório e urogenital (DIERYNCK et al., 1995), podendo
1103 ser secretada pela mucosa epitelial de quase todos os órgãos de mamíferos, e
1104 assim, detectada no sangue (KIKUKAWA e MUKHERJEE, 1989; AOKI et al.,
1105 1996) e urina (BERNARD et al., 1989). Considerando o foco do presente estudo,
1106 a investigação de Uteroglobina na urina dos cães não foi até então relatada. Um
1107 estudo desenvolvido por LEE et al. (2004) demonstrou a importância da
1108 Uteroglobina na prevenção experimental de glomerulonefrite, evitando a
1109 deposição de imunoglobulina no glomérulo, reforçando sua capacidade
1110 imunomoduladora, condição também discutida por ZHENG et al. (1999). Essa
1111 proteína é demonstrada como importante na prevenção de doença renal
1112 causada pela deposição anormal de fibronectina e colágeno no glomérulo
1113 (MUKHERJEE et al., 1999), entretanto, não se tem na literatura, uma
1114 investigação acerca da correlação entre níveis urinários da proteína e
1115 progressão da doença. Pode-se afirmar com base nos achados do presente
1116 estudo, que a Uteroglobina está presente em cães do GC conforme demonstrado
1117 pela análise qualitativa. Por outro lado, acredita-se que esta possa ter alguma
1118 relação com a perda de massa renal funcional vista a redução expressiva ou nula
1119 na avaliação em cães DRCIII e DRCIV.

1120 A Fosfoproteína 1 secretada – (*Secreted phosphoprotein 1* -
1121 A0A8P0NMW9), também conhecida como osteopontina é uma proteína
1122 importante na formação de cálculos urinários, sendo conhecida como um dos

componentes orgânicos de cálculos urinários de cálcio conforme KOHRI et al. (2012). Nos cães do presente estudo, a proteína demonstrou-se presente em animais do grupo controle e reduzido em animais CKD1, estando ausente em CKD3 e CKD4, demonstrando aparente redução em estádios avançados da CKD em cães. KOHRI et al. (2012) pontuaram que a osteopontina tem duas ações diferentes no processo da formação de cálculos. A primeira ação é como um forte inibidor da nucleação, crescimento e agregação de cristais de oxalato de cálcio em experimentos in vitro e na urina, portanto, quando há osteopontina livre no lúmen tubular, esta atua na inibição do desenvolvimento de cristais. A segunda ação está relacionada com a aderência dos cristais às células epiteliais tubulares. Apesar de ser encontrada livre no lúmen tubular, a osteopontina geralmente não é detectada na forma livre. Isso se deve à forte atividade de ligação ao cálcio em vez de ácido oxálico e fosfato devido a sua forte ação iônica negativa. Conforme LIU et al. (2015), além de ser considerada um importante componente da matriz urinária de cálculos de oxalato de cálcio e ter efeito promotor na formação de cálculos, a osteopontina pode também ser expressada nos rins, tireoide, glândula mamária, trato gastrointestinal, timo, sistema imunológico e testículos. Apesar de ter sido considerada por LIU e colaboradores (2015) um bom biomarcador de inibição na formação de cálculos renais em cães suplementados com selênio orgânico, o uso da osteopontina como biomarcador de precocidade ou progressão da DRC em cães não é recomendado, vista a interferência de outras causas renais.

A *Caderina, domínio citoplasmático (Cadherin, cytoplasmic domain - F1PAA9)*, também conhecida como caderina-1 é uma proteína de adesão celular dependente de cálcio (UNIPROT, 2022). Esta proteína apresentou o mesmo comportamento da Fosfoproteína 1 secretada, estando ausente na urina de cães CKD3 e CKD4. Ela promove a adesão entre células e desempenha papel crítico em processos celulares como desenvolvimento e manutenção de tecidos, além de supressão tumoral (THOMAS e MEIGS, 2002). Estudos com cães não foram identificados. Entretanto, um estudo com humanos utilizou a caderina como auxiliar na identificação da progressão de carcinoma de células renais, para potencial diminuição do risco de metástase com interação do fator KMT5A, sendo utilizado como marcador da progressão de tumores (LIN et al., 2019).

1156 Logo, a caderina não aparenta demonstrar potencial como biomarcador para
1157 DRC, visto que sua utilização está vinculada a neoplasias, alterando assim, os
1158 níveis dessa proteína na presença da referida comorbidade.

1159 *Receptor de imunoglobulina polimérico (Polymeric immunoglobulin*
1160 *receptor - A0A8P0SGI0)* é uma proteína responsável pela mediação da
1161 passagem de polímeros de IgA e IgM da superfície basolateral para o lado apical
1162 de células epiteliais e a subsequente secreção nos fluidos da mucosa (WEI e
1163 WANG, 2021). Nos animais deste estudo, cães CKD3 e CKD4 apresentaram
1164 níveis expressivamente reduzidos quando comparados com cães CKD1 e CG.
1165 De acordo com HE et al. (2020), a proteína *Receptor de imunoglobulina*
1166 *polimérico* está associada com a disfunção renal. Para isso, um estudo
1167 desenvolvido por KRAWCZYK et al. (2019) em humanos, demonstrou que essa
1168 proteína está expressa no glomérulo e nos túbulos renais proximais, cuja qual,
1169 tem sua expressão tubular aumentada na DRC, culminando com níveis
1170 aumentados de IgA na urina de indivíduos com injúria renal. No presente estudo,
1171 a correlação entre IgA e a expressão de *Receptor de imunoglobulina polimérico*
1172 não foi avaliada. HE e colaboradores (2020) demonstraram que na urina de
1173 humanos, a proteína em contexto aumentou com a progressão da DRC, diferente
1174 do que foi encontrado no presente estudo. Sendo assim, acredita-se que a
1175 *Receptor de imunoglobulina polimérico* tenha comportamento contrário a aquele
1176 identificado em humanos. Ainda, questiona-se a influência da lesão glomerular
1177 em humanos e cães CKD em relação aos níveis presente da proteína em
1178 discussão na urina.

1179 A Lisosima (*Lysozyme - G1K265*) apresentou progressão na análise
1180 qualitativa com o avanço no estágio da DRC nos animais do presente estudo e
1181 ausência completa em cães do grupo controle. A Lisosima é uma proteína
1182 degradada principalmente nos rins, filtrada no glomérulo e depois reabsorvida
1183 nos túbulos proximais (HORPACSY et al., 1978), sendo essa capacidade de
1184 reabsorção limitada. Dessa forma, na doença renal, a Lisosima pode aparecer
1185 na urina em detrimento de dois possíveis cenários, podendo explicar a sua
1186 presença na urina de cães DRC do presente estudo. Primeiro pela disfunção
1187 tubular, impossibilitando a atividade de recaptação da proteína de dentro dos
1188 túbulos renais para a circulação peritubular, e segundo pela saturação da

capacidade de reabsorção devido ao limiar máximo ter sido atingido (BEETHAM e CATTELL, 1993). Um estudo desenvolvido por Biewenga e colaboradores em 1978, comparando cães saudáveis e cães com doenças renais, sem especificidade para DRC apenas, demonstrou que cães com TFG reduzida apresentaram maiores níveis de Lisosima na urina, enquanto cães saudáveis não apresentaram essa proteína na urina, coincidindo com os achados deste estudo, visto que cães com DRC tendem a apresentar TFG reduzida.

A presença dessa proteína na urina foi relatada também em cão com leucemia mieloide aguda sem falência renal, a partir da utilização da técnica de eletroforese, identificando proteinúria de origem tubular (TASCA et al., 2010). Logo, embora tenha importância no diagnóstico da DRC, é válido associar sua presença em quadros extrarrenais. Ainda, em cães com DRC de ocorrência natural, um estudo desenvolvido por KRALOVA et al. (2009), demonstrou que a ureia, creatinina e fósforo séricos possuem correlação positiva com o aumento sérico de Lisosima em cães com DRC. Dessa forma, altos níveis séricos de lisozima são esperados com a progressão da doença renal crônica, visto que conforme demonstrado pela IRIS (2019), maiores níveis de creatinina são esperados em cães com estádios mais avançados da doença, coincidindo fortemente com os achados do presente estudo. Essa teoria reforça os mecanismos envolvidos na patogenia da proteinúria renal apresentados por BEETHAM e CATTELL (1993), justificando a presença de Lisosima na urina de cães CKD e ausência na urina de cães saudáveis, ressaltando sua importância como potencial biomarcador de progressão da DRC em cães.

A Proteína contendo domínio de cistatina (*Cystatin domain-containing protein* - A0A8I3QNP3) possui completa similaridade com *Cystatin-C-like* (UNIPROT, 2022) e é considerada uma proteína inibidora das cisteíno-proteases. Em geral as cistatinas formam complexos com suas enzimas alvo na proteção dos tecidos do hospedeiro contra a destruição proteolítica (SHLIPAK et al., 2006). Nos animais do estudo, essa proteína demonstrou aumento com a progressão da CKD, estando ausente em cães do grupo controle e mais expressa em cães CKD4 quando comparados com CKD3 e CKD1, respectivamente. Fisiologicamente, a cistatina C é filtrada livremente no glomérulo e totalmente reabsorvida no túbulo contorcido proximal, sendo

1222 utilizada para avaliar a TFG, bem como tendo importância no que tange a
1223 capacidade de recaptação desta proteína a nível tubular (TENSTAD et al., 1996;
1224 WESTHUYZEN, 2006). Logo, infere-se que nos cães deste estudo, o avanço da
1225 CKD associado a incapacidade de reabsorção tubular, resultou em aumento
1226 progressivo dos níveis de proteína contendo domínio de cistatina na urina. Em
1227 estudo com cães com leishmaniose, a investigação da presença de cistatina C
1228 na urina foi performada e demonstrado que em cães com estádios mais
1229 avançados, a cistatina C aumentou, especificamente em cães com níveis séricos
1230 de creatinina maior que 1,4 md/dL (GARCÍA-MARTÍNEZ et al., 2015). Esse
1231 achado coincide com o encontrado no presente estudo, vista a progressão na
1232 avaliação qualitativa dos cães CKD quando comparados com aqueles do grupo
1233 controle. Ainda, os cães CKD dos estádios mais avançados como CKD3 e CKD4,
1234 demonstraram maior expressão qualitativa de Proteína contendo domínio de
1235 cistatina e também valores aumentados de ureia condizentes com o observado
1236 por GARCÍA-MARTÍNEZ et al. (2015), com creatinina de 3,5 mg/dL e 5,6 mg/dL
1237 para cães CKD3 e CKD4, respectivamente. Dessa forma, a proteína contendo
1238 domínio de cistatina pode ser apontada como potencial biomarcador de
1239 progressão da DRC e não de precocidade, visto seu comportamento similar a
1240 Cistatina C puramente, estando em níveis baixos na urina de indivíduos
1241 saudáveis conforme apontado por GRUBB (2001), coincidindo com cães sem
1242 CKD deste estudo.

1243 A Adipsina (*Adipsin* - A0A8I3RY54), também conhecida como Fator de
1244 complemento D foi expressa apenas em cães do grupo CKD4, hipotetizando
1245 possível correlação com estágio terminal da DRC. Esta é uma enzima essencial
1246 da rota alternativa do sistema complemento, cuja concentração sérica pode
1247 aumentar em cerca de 10 vezes em pacientes com doença renal em estágio
1248 terminal (PASCUAL et al., 1988). Essa proteína é inicialmente filtrada no
1249 glomérulo e catabolizada após reabsorção nos túbulos proximais, sendo o
1250 processo de reabsorção passível de saturação (SANDERS et al., 1986),
1251 podendo justificar seu aparecimento na urina em cães com lesões renais, assim
1252 como supracitado para a lisozima. A concentração sérica dessa proteína foi
1253 demonstrada por VOLANAKIS et al. (1985) como tendo correlação positiva com
1254 os níveis séricos de creatinina. Dessa forma, na avaliação dos diferentes

estádios da DRC, em função dos níveis de creatinina, espera-se que quanto mais avançado o estágio da doença, como nos estádios DRCIII e DRCIV em cães, maiores serão os níveis séricos do fator D do sistema complemento. Assim, considerando a saturação tubular e defeitos de transporte tubular em pacientes DRC, espera-se identificar seu aparecimento na urina, conforme visto em cães DRCIV do presente estudo. Em humanos com doença renal, MIYATA et al. (1990) demonstraram que a concentração do fator D na urina de indivíduos normais foi próxima de zero, enquanto em indivíduos com doença renal, os achados em urina foram significativos. Esses resultados confluem consideravelmente com os cães do estudo quando se considera os cães do grupo controle e estádios iniciais da DRC, ao passo em que o achado isolado da proteína em cães DRCIV apenas, podem ser justificados pelo estudo de PASCUAL et al. (1988) no que tange aos estádios terminais da doença. Assim sendo, a lisozima é cogitada como biomarcador de gravidade na DRC, não apresentando evidência de sua utilização como biomarcador em cães com DRC em estádios iniciais.

7. CONCLUSÃO

Mesmo com o número pequeno de proteínas destacadas, essas demonstraram relação com a função renal e consequentemente com a progressão da DRC. Portanto, a proteômica por espectrometria de massas é uma ferramenta viável para analisar o proteoma sérico e urinário de cães com DRC nos estádios I, III e IV, identificando as proteínas *Ig-like domain-containing protein*, *Serpin Family G member 1* e *Pentraxin* como potenciais biomarcadores séricos e as proteínas *Beta-1 Metal Binding Globulin*, *angiotensinogen*, *Gc-globulin*, *Vitronectin*, *Serpin Family G member 1*, *Secretoblobin Family 1 A member 1*, *Polymeric immunoglobulin receptor*, *Lysozyme*, *Cystatin domain containing protein* e *Complement Factor D* como potenciais biomarcadores urinários, tanto do declínio da função renal, como da diferenciação dos estádios I, III e IV da DRC.

1286 Agradecimentos e apoio

1287 O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
1288 Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de
1289 Financiamento 001. Agradecimento aos laboratórios de análises do Setor de
1290 Reprodução Animal da FMVZ – Unesp – Campus de Botucatu. Ao Laboratório
1291 Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e
1292 Materiais (CNPEM) pela realização da Espectrometria de Massas das amostras
1293 do estudo.

1294

8. BIBLIOGRAFIA

ACIERNO, M.J.; BROWN, S.; COLEMAN, A.E.; JEPSON, R.E.; PAPICH, M.; STEPIEN, R.L.; SYME, H.M. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.32, n.6, p.1803-1822, 2018.

AICHER, L.; WAHL, D.; ARCE, A.; GRENET, O.; STEINER, S. New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis.*, v.19, n.11, p.1998–2003, 1998.

AOKI, A.; PASOLLI, H.A.; RAID, M.; MEYER, M.; SCHULZ-KNAPPE, P.; MOSTAFAVI, H.; SCHEPKY, A.G.; ZNOTTKA, R.; ELIA, J.; HOCK, D.; BEIER, H.M.; FORSSMANN, W.G. Isolation of human uteroglobin from blood filtrate. *Molecular Human Reproduction*, v.2, n.7, p.489–497, 1996.

ARAUJO, M.S.; PAULO, O.L.O.H.; PARANZINI, C.S.; SCOTT, C.; CODOGNOTO, V.M.; DELL'AQUA, C.P.F.; PAPA, F.O.; SOUZA, F.F. Proteomic data of seminal plasma and spermatozoa of four purebred dogs. *Data in Brief.*, v.30, p.1-7, 2020.

AVILA, M.; KHOSRAVI, M.; ALVES, L.; ADER-EBERT, N.; BRINGOLF, F.; ZURBRIGGEN, A.; PLEMPER, R.K.; PLATTET, P. Canine distemper virus envelope protein interactions modulated by hydrophobic residues in the fusion protein globular head. *Journal of Virology*, v.89, n.2, p. 1445-1451, 2015.

AZEVEDO, M.G.P.; GERALDES, S.S.; SANT'ANNA, P.B.; BATISTA, B.P.; MAIA, S.R.; MORAES, R.S.; SCHMIDT, E.M.S.; SOUZA, F.F.; MELCHERT, A.; FERREIRA, J.C.P.; DADALTO, C.R.; GARCÍA, H.D.M.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C. C-reactive protein concentrations are higher in dogs with stage IV chronic kidney disease treated with intermitente hemodialysis. *PlosONE*, v.17, n.9, p.1-13, 2022.

BAKLOUTI, S.; CONCORDET, D.; BORROMEO, V.; POCAR, P.; SCARPA, P.;

- 1328 CAGNARDI, P. Population pharmacokinetic model of iohexol in dogs to estimate
1329 glomerular filtration rate and optimize sampling time. *Frontiers Pharmacology*,
1330 v.12, 2021.
- 1331
- 1332 BARBOSA, E.B.; VIDOTTO, A.; POLACHINI, G.M.; HENRIQUE, T.; MARQUI,
1333 A.B.T.; TAJARA, E.H. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de
1334 doenças humanas. *Revista da Associação Médica Brasileira.*, v.58, n.3, p.366-
1335 375, 2012.
- 1336
- 1337 BARTGES, J.W. Chronic kidney disease in dogs and cats. *The Veterinary Clinics*
1338 *of North America. Small Animal Practice.*, v.42, n.4, p.669-692, 2012.
- 1339
- 1340 BAXTER, R.C. Characterization of the acid-labile subunit of the growth hormone
1341 dependent insulin-like growth factor binding protein complex. *The Journal of*
1342 *Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.67, n.2, p.265–272, 1988.
- 1343
- 1344 BAXTER, R.C.; MARTIN, J.L.; BENIAC, V.A. High molecular weight insulin-like
1345 growth factor binding protein complex. Purification properties of the acidlabile
1346 subunit from human serum. *Journal of Biological Chemistry*, v.264, n.20,
1347 p.11843–11848, 1989.
- 1348
- 1349 BEETHAM, R.; CATTELL, W.R. Proteinuria: pathophysiology,significance and
1350 recommendations for measurement in clinicalpractice. *Annals of Clinical*
1351 *Biochemistry*, v.30, Pt.5, p.425–434, 1993.
- 1352
- 1353 BEHLING-KELLY E. Serum lipoprotein changes in dogs with renal disease.
1354 *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.28, n.6, p.1692-1698, 2014.
- 1355
- 1356 BEINROHR, L.; HARMAT, V.; DOBO, J.; LORINCZ, Z.; GAL, P.; ZAVODSZKY,
1357 P. C1 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparina
1358 potentiation and conformational disease. *Journal of Biological Chemistry*, v.282,
1359 n.29, p.21100–21109, 2007.
- 1360
- 1361 BENDIXEN, E. The use of proteomics in meat science. *Meat Science.*, v.71, n.1,

1362 p.138–149, 2005.

1363

1364 BERNARD, A.M., LAUWERYS, R.R., NOEL, A., VANDELEENE, B; LAMBERT,
1365 A. Urine protein 1: a sex-dependent marker of tubular and glomerular dysfunction.
1366 Clinical Chemistry, v.35, n.10, p.2141–2142, 1989.

1367

1368 BHAMARASUTA, C.; PREMRATANACHAI, K.; MONGKOLPINYOPAT, N.;
1369 YOTHAPAND, P.; VEJPATTARASIRI, T.; DISSAYABUTRA, T.; TRISIRIROJ, M.;
1370 SUTAYATRAM, S.; BURANAKARL, C. Iron status and erythropoiesis response
1371 to darbepoetin alfa in dogs with chronic kidney disease. Journal of Veterinary
1372 Medical Science, v.83, n.4, p.601–608, 2021.

1373

1374 BIEWENGA, W.J.; GRUYS, E.; GOUDSWAARD, J. Quantitation of lysosyme in
1375 the urine of the dog for the diagnosis of proximal tubular damage in renal disease.
1376 Tijdschr Diergeneeskd, v.103, n.20, p.1130-1138, 1978.

1377

1378 BLACKER, D.; WILCOX, M.A.; LAIRD, N.M.; RODES, L.; HORVATH, S.M.; GO,
1379 R.C.; PERRY, R.; WATSON, B.JR.; BASSETT, S.S.; MCINNIS, M.G.; ALBERT,
1380 M.S.; HYMAN, B.T.; TANZI, R.E. Alpha-2 macroglobulin is genetically associated
1381 with Alzheimer disease. Nature Genetics, v.19, n.4, p.357-360, 1998.

1382

1383 BOEHME, M.; KAEHNE, F.; KUEHNE, A.; BERNHARDT, W.; SCHRÖDER, M.;
1384 POMMER, W.; FISCHER, C.; BECKER, H.; MÜLLER, C.; SCHINDLER, R.
1385 Pentraxin 3 is elevated in haemodialysis patients and is associated with
1386 cardiovascular disease. Nephrology Dialysis Transplantation, v.22, n.8, p.2224–
1387 2229, 2007.

1388

1389 BOER, J.P.; CREASEY, A.A.; CHANG, A.; ABBINK, J.J.; ROEM, D.;
1390 EERENBERG, A.J.; HACK, C.E.; TAYLOR JR, F.B. Alpha-e-macroglobulin
1391 functions as na inhibitor of fibrinolytic clotting, and neutrophilic proteinases in
1392 sepsis: studies using a baboon model. Infection and Immunity, v.61, n.12, p.5035-
1393 5043, 1993.

1394

- 1395 BOHN, A.A. Diagnosis of disorders of iron metabolism in dogs and cats. The
1396 Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, v.43, n.6, p.1319–
1397 1330, 2013.
- 1398
- 1399 BRAGATO, N.; BORGES, N.C.; FIORAVANTI, M.C.S. B-mode and Doppler
1400 ultrasound of chronic kidney disease in dogs and cats. Veterinary Research
1401 Communications., v.41, n.4, p.307-315, 2017.
- 1402
- 1403 BRANDT, L.E.; EHRHART, E.J.; SCHERMAN, H.; OLVER, C.S.; BOHN, A.A.;
1404 PRENNI, J.E. Characterization of the canine urinary proteome. Veterinary
1405 Clinical Pathology., v.43, n.2, p.193–205, 2014.
- 1406
- 1407 BRAUN, J.P.; LEFEBVRE, H.P.; WATSON, A.D.J. Creatinine in the dog: a
1408 review. Veterinary Clinical Pathology., v.32, n.4, p.162-179, 2003.
- 1409
- 1410 BUSSOLATI, B.; PERI, G.; SALVIDIO, G.; VERZOLA, D.; MANTOVANI, A.;
1411 CAMUSSI, G. The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis
1412 and activates mesangial cells. Journal of Immunology, v.170, n.3, p.1466–1472,
1413 2003.
- 1414
- 1415 BUTUROVIC-PONIKVAR, J.; VISNAR-PEROVIC, A. Ultrasonography in chronic
1416 renal failure. European Journal of Radiology., v.46, n.2, p.115–122, 2003.
- 1417
- 1418 CANDIANO, G.; SANTUCCI, L.; PETRETTO, A.; BRUSCHI, M.; DIMUCCIO, V.;
1419 URBANI, A.; BAGNASCO, S.; GHIGGERI, G.M. 2D-electrophoresis and the
1420 urine proteome map: Where do we stand?. Journal of Proteomics, v.73, n.5,
1421 p.829-844, 2010.
- 1422
- 1423 CARRERAS-PLANELLA, L.; CUCCHIARI, D.; CAÑAS, L.; JUEGA, J.;
1424 FRANQUESA, M.; BONET, J.; REVUELTA, I.; DIEKMANN, F.; TACO, O.;
1425 LAUZURICA, R.; BORRÀS, F.E. Urinary vitronectin identifies patients with high
1426 levels of fibrosis in kidney grafts. Journal of Nephrology, v.34, n.3, p.861–874,
1427 2021.
- 1428

- 1429 CARVALHO, M.; SILVA, K.; ARISTIZABAL, V.; ORTIZ, P.; PARANZINI, C.;
1430 MELCHERT, A.; AMARO, J.; SOUZA, F. Effects of obesity and diabetes on
1431 sperm cell proteomics in rats. *Journal of Proteome Research*, v.20, n.5, p.2628–
1432 2642, 2021.
- 1433
- 1434 CASTELL, J.V.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J.; DAVID, M.; FABRA, R.;
1435 TRULLENQUE, R.; HEINRICH, P.C. Acute-phase response of human
1436 hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *V.12*,
1437 n.5, p.1179-1186, 1990.
- 1438
- 1439 CECILIANI, F.; ECKERSALL, D.; BURCHMORE, R.; LECCHI, C. Proteomics in
1440 veterinary medicine: Applications and trends in disease pathogenesis and
1441 diagnostics. *Veterinary Pathology.*, v.51, n.2, p.351–362, 2014.
- 1442
- 1443 CECILIANI, F.; ROCCABIANCA, P.; GIUDICE, C.; LECCHI, C. Application of
1444 post-genomic techniques in dog cancer research. *Molecular BioSystems.*, v.12,
1445 n.9, p.2665– 2679, 2016.
- 1446
- 1447 CHACAR, F.; KOGIKA, M.; SANCHES, T.R.; CARAGELASCO, D.;
1448 MARTORELLI, C.; RODRIGUES, C.; CAPCHA, J.M.C.; CHEW, D.; ANDRADE,
1449 L. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-
1450 binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs.
1451 *Physiological Reports.*, v.5, n.11, p.1–9, 2017.
- 1452
- 1453 CHU, C.P.; HOKAMP, J.A.; CIANCIOLO, R.E.; DABNEY, A.R.; BRINKMEYER-
1454 LANGFORD, C.; LEES, G.E.; NABITY, M.B. RNA-seq of serial kidney biopsies
1455 obtained during progression of chronic kidney disease from dogs with X-linked
1456 hereditary nephropathy. *Scientific Reports.*, v.7, n.16776, p.1-14, 2017.
- 1457
- 1458 COLANTONIO, D.A.; DUNKINSON, C.; BOVENKAMP, D.E.; VAN EYK, J.E.
1459 Effective removal of albumin from serum. *Proteomics*, v.5, n.15, p.3831-3835,
1460 2005.
- 1461
- 1462 CORTADELLAS, O.; FERNÁNDEZ del PALACIO, M.J.; TALAVERA, J.; BAYÓN,

- 1463 A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney
1464 disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.22, n.2, p.293-300, 2008.
- 1465
- 1466 COYNE, M.; SZLOSEK, D.; CLEMENTS, C.; McCRANN III, D.; OLAVESSEN, L.
1467 Association between breed and renal biomarkers of glomerular filtration rate in
1468 dogs. *Veterinary Record.*, v.187, n.10, p.1-11, 2020.
- 1469
- 1470 CRAVATT, B.F.; SIMON, G.M.; YATES III, J.R. The biological impact of mass-
1471 spectrometry-based proteomics. *Nature.*, v.450, n.71-72, p.991-1000, 2007.
- 1472
- 1473 CRUTCHFIELD, C.A.; THOMAS, S.N.; SOKOLL, L.J.; CHAN, D.W. Advances in
1474 mass spectrometry-based clinical biomarker discovery. *Clinical Proteomics.*,
1475 v.13, n.1, p.1-12, 2016.
- 1476
- 1477 DACKOWSKI, W.R.; LUDERER, H.F.; MANAVALAN, P.; BUKANOV, N.O.;
1478 RUSSO, R.J.; ROBERTS, B.L.; KLINGER, K.W.; IBRAGHIMOV-
1479 BESKROVNAYA, O. Canine PKD1 is a single-copy gene: genomic organization
1480 and comparative analysis. *Genomics*, v.80, n.1, p.105-112, 2002.
- 1481
- 1482 DAEMEN, M.A.; HEEMSKERK, V.H.; VAN'T VEER, C.; DENECKER, G.; WOFS,
1483 T.G.; VANDENABEELE, P.; BUURMAN, W.A. Functional protection by acute
1484 phase proteins α 1-acid glycoprotein and α 1-antitrypsin Against
1485 ischemia/reperfusion injury by preventing apoptosis and inflammation.
1486 *Circulation*, v.102, n.12, p.1420–1426, 2000.
- 1487
- 1488 DAHLEM, D.P.; NEIGER, R.; SCHWEIGHAUSER, A.; FRANCEY, T.;
1489 YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; STEINBACH, S.M.L. Plasma symmetric
1490 dimethylarginine concentration in dogs with acute kidney injury and chronic
1491 kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.31, n.3, p.799-804,
1492 2017.
- 1493
- 1494 DAVALIEVA, K.; KIPRIJANOVSKA, S.; KOMINA, S.; PETRUSEVSKA, G.;
1495 ZOGRAFSKA, C.C.; POLENAKOVIC, M. Proteomics analysis of urine reveals

- 1496 acute phase response proteins as candidate diagnostic biomarkers for prostate
1497 cancer. *Proteome Science*, v.13, n.1, 2015.
- 1498
- 1499 DIERYNCK, I.; BERNARD, A.; ROELS, H.; DE LEY, M. Potent inhibition of both
1500 human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein
1501 CC16. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.12, n.2,
1502 p.205–210, 1995.
- 1503
- 1504 DOMENÉ, H.M.; HWA, V.; ARGENTE, J.; WIT, J.M.; CAMACHO-HÜBNER, C.;
1505 JASPER, H.G.; POZO, J.; VAN DUYVENVOORDE, H.A.; YAKAR, S.;
1506 FOFANOVA-GAMBETTI, O.V.; ROSENFELD, R.G. Human acid-labile subunit
1507 deficiency: Clinical, endocrine and metabolic consequences. *Hormone Research*,
1508 v.72, n.3, p.126-141, 2009.
- 1509
- 1510 DUDLEY, A.; BYRON, J. K.; BURKHARD, M.J.; WARRY, E. Comparison of
1511 platelet function and viscoelastic test results between healthy dogs and dogs with
1512 naturally occurring chronic kidney disease. *American Journal of Veterinary*
1513 *Research*, v.78, n.5, p.589-600, 2017.
- 1514
- 1515 DUPREE, E.J.; JAYATHIRTHA, M.; YORKEY, H.; MIHASAN, M.; PETRE, B.A.;
1516 DARIE, C.C. A critical review of bottom-up proteomics: The good, the bad, and
1517 the future of this field. *Proteomes.*, v.8, n.3:14, p.1-26, 2020.
- 1518
- 1519 EDDY, A.A. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis.
1520 *Thrombosis and Haemostasis*, v.101, n.4, p.656-664, 2009.
- 1521
- 1522 ESCRIBANO, D.; CIHAN, H.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; LEVENT, P.;
1523 KOCATURK, M.; AYTUG, N.; CERÓN, J.J.; TVARIJONAVICIUTE, A.; YILMAZ,
1524 Z. Changes in serum proteins in dogs with Ehrlichia canis infection. *Microbial*
1525 *Pathogenesis.*, v.113, p.34–39, 2017.
- 1526
- 1527 FELDMAN, S.R.; GONIAS, S.L.; PIZZO, S.V. Model of alpha 2-macroglobulin
1528 structure and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*
1529 *USA*, v.82, n.17, p.5700-5704, 1985.

1530

1531 FENSELAU, C. A review of quantitative methods for proteomic studies. *Journal*
1532 *of Chromatography B.*, v.855, n.1, p.14-20, 2007.

1533

1534 FERLIZA, E.; ISANI, G.; DONDI, F.; ANDREANI, G.; VASYLYEVA, K.; BELLEI,
1535 E.; ALMEIDA, A.M.; MATZAPETAKIS, M. Urinary proteome and metabolome in
1536 dogs (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease, v.222, p.1-12,
1537 2020.

1538

1539 FRANCO-MARTÍNEZ, L.; HORVATIC, A.; GELEMANOVIC, A.; SAMARDZIJA,
1540 M.; MRLJAK, V.; CONTRERAS-AGUILAR, M.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.;
1541 DĄBROWSKI, R.; TVARIJONAVICIUTE, A. Changes in the salivary proteome
1542 associated with canine Pyometra. *Frontiers in Veterinary Science.*, v.7, n.277,
1543 p.1–7, 2020.

1544

1545 FRANCO-MARTÍNEZ, L.; TVARIJONAVICIUTE, A.; HORVATIC, A.;
1546 GUILLEMIN, N.; CERÓN, J.J.; ESCRIBANO, D.; ECKERSALL, D.; KOCATÜRK,
1547 M.; YILMAZ, Z.; LAMY, E.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; MRLJAK, V. Changes in
1548 salivary analytes in canine parvovirus: a high-resolution quantitative proteomic
1549 study. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.*, v.60,
1550 p.1–10, 2018.

1551

1552 GARCÍA-MARTÍNEZ, J.D.; MATINEZ-SUBIELA, S.; TVARIJONAVICIUTE, A.;
1553 CALDIN, M.; CERON, J.J. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at
1554 different stages of kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary*
1555 *Sciences*, v.99, p.204-207, 2015.

1556

1557 GHODASARA, P.; SADOWSKI, P.; SATAKE, N.; KOPP, S.; MILLS, P.C. Clinical
1558 veterinary proteomics: Techniques and approaches to decipher the animal
1559 plasma proteome. *The Veterinary Journal.*, v.230, p.6-12, 2017.

1560

1561 GOLIZEH, M.; LEE, K.; ILCHENKO, S.; ÖSME, A.; BENA, J.; SADYGOV, R.G.;
1562 KASHYAP, S.R.; KASUMOV, T.; KASUMOV, T. Increased serotransferrin and

- 1563 ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes. Free
1564 Radical Biology & Medicine, v.113, p.461–469, 2017.
- 1565
- 1566 GONZÁLEZ, M.A.; BARRERA-CHACÓN, R.; PEÑA, F.J.; FERNÁNDEZ-
1567 COTRINA, J.; ROBLES, N.R.; PÉREZ-MERINO, E.M.; MARTÍN-CANO, F.E.;
1568 DUQUE, F.J. Urinary proteome of dogs with renal disease secondary to
1569 leishmaniosis. Research in Veterinary Science, v.149, p.108–118, 2022.
- 1570
- 1571 GONZÁLEZ-AROSTEGUI, L.G.; RUBIO, C.P.; CERÓN, J.J.;
1572 TVARIJONAVICIUTE, A.; MUÑOZ-PRIETO, A. Proteomics in dogs: a systematic
1573 review. Research in Veterinary Science., v.143, p.107-114, 2022.
- 1574
- 1575 GRUBB, A.O. Cystatin C – Properties and use as diagnostic marker. Advances
1576 in Clinical Chemistry, v.35, p.63-99, 2000.
- 1577
- 1578 GUERRERA, I.C.; KLEINER, O. Application of mass spectrometry in proteomics.
1579 Bioscience Reports., v.25, n.1-2, p.71-93, 2005.
- 1580
- 1581 HALL, J.A.; YERRAMILLI, M.; OBARE, E.; YERRAMILLI, M.; JEWELL, D.E.
1582 Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and
1583 creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease.
1584 Journal of Veterinary Internal Medicine., v.28, n.6, p.1676–1683, 2014.
- 1585
- 1586 HAN, X.; ASLANIAN, A.; YATES III, J.R. Mass spectrometry for proteomics.
1587 Current Opinion in Chemical Biology., v.12, n.5, p.483-490, 2008.
- 1588
- 1589 HANAMURA, K.; TOJO, A.; KINUGASA, S.; ASABA, K.; FUJITA, T. The resistive
1590 index is a marker of renal function, pathology, prognosis, and responsiveness to
1591 steroid therapy in chronic kidney disease patients. International Journal of
1592 Nephrology., v.2012, n. p.1–9, 2012.
- 1593
- 1594 HARLEY, L.; LANGSTON, C. Proteinuria in dogs and cats. The Canadian
1595 Veterinary Journal, v.53, n.6, p.631-638, 2012.
- 1596

- 1597 HART, D.V.; WINTER, M.D.; CONWAY, J.; BERRY, C.R. Ultrasound appearance
1598 of the outer medulla in dogs without renal dysfunction. *Veterinary Radiology and*
1599 *Ultrasound.*, v.54, n.6, p.652-658, 2013.
1600
- 1601 HAYMAN, E.G.; PIERSCHBACHER, M.D.; OHGREN, Y.; RUOSLAHTI, E.
1602 Serum spreading factor (vitronectin) 'is present at the cell surface and in tissues.
1603 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.80, n.13, p.4003-
1604 4007, 1983.
1605
- 1606 HE, T.; SIWY, J.; METZGER, J.; MULLER, W.; MISCHAK.; SCHANSTRA, J.P.;
1607 ZURBIG, P.; JANKOWSKI, V. Associations of urinary polymeric immunoglobulin
1608 receptor peptides in the context of cardio-renal syndrome. *Nature Reports*, v.10,
1609 p.8291, 2020.
1610
- 1611 HEIT, C.; JACKSON, B.C.; MCANDREWS, M.; WRIGHT, M.W.; THOMPSON,
1612 D.C.; SILVERMAN, G.A.; NEBERT, D.W.; VASILIOU, V. Update of the human
1613 and mouse SERPIN gene superfamily. *Human Genomics*, v.7, n.1, p.1-14, 2013.
1614
- 1615 HERRINGTON, D.M.; MAO, C.; PARKER, S.J.; FU, Z.; YU, G.; CHEN, L.;
1616 VENKATRAMAN, V.; FU, Y.; WANG, Y.; HOWARD, T.D.; JUN, G.; ZHAO, C.F.;
1617 LIU, Y.; SAYLOR, G.; SPIVIA, W.R.; ATHAS, G.B.; TROXCLAIR, D.; HIXSON,
1618 J.E.; HEIDE, R.S.V.; WANG, Y.; EYK, J.E.V. Proteomic architecture of human
1619 coronary and aortic atherosclerosis. *Circulation.*, v.137, n.25, p.2741–2756,
1620 2018.
1621
- 1622 HOKAMP, J.A.; CIANCIOLO, R.E.; BOGGESE, M.; LEES, G.E.; BENALI, S.L.;
1623 KOVARSKY, M.; NABITY, M.B. Correlation of urine and serum biomarkers with
1624 renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic
1625 kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.30, n.2, p.591-601,
1626 2016.
1627
- 1628 HOKAMP, J.A.; NABITY, M.B. Renal biomarkers in domestic species. *Veterinary*
1629 *Clinical Pathology.*, v.45, n.1, p.28-56, 2016.
1630

- 1631 HORMAECHE, M.; CARRETÓN, E.; GONZALÉZ-MIGUEL, J.; GUSSONI, S.;
 1632 MONTOYA-ALONSO, J.A.; SIMÓN, F.; MORCHÓN, R. Proteomic analysis of the
 1633 urine of *Dirofilaria immitis* infected dogs. *Veterinary Parasitology*, v.203, n.1-2,
 1634 p.241-246, 2014.
- 1635
- 1636 HOPPACH, G.; ZINSMEYER, J.; SCHRODER, K.; MEBEL, M. Changes in
 1637 serum and urine lysozyme activity after kidney transplantation: influence of graft
 1638 function and therapy with azathioprine. *Clinical Chemistry*, v.24, n.1, p.74–79,
 1639 1978.
- 1640
- 1641 HUANG, Z.; MA, L.; HUANG, C.; LI, Q.; NICE, E.C. Proteomic profiling of human
 1642 plasma for cancer biomarker discovery. *Proteomics*, v.17, n.6, p.1-13, 2017.
- 1643 IRIS. International Renal Interest Society - Staging of CKD (modified 2019).
 1644 Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS>
 1645 [Staging_of_CKD_modified_2019.pdf](#) Acesso em: 01 fevereiro de 2022.
- 1646
- 1647 ISHIHAMA, Y.; ODA, Y.; TABATA, T.; SATO, T.; NAGASU, T.; RAPPAPORT, J.;
 1648 MANN, M. Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for
 1649 estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced
 1650 peptides per protein. *Molecular Cell Proteomics*, v.4, n.5, p.1265–1272, 2005.
- 1651
- 1652 JACOB, F.; POLZIN, D.J.; OSBORNE, C.A.; ALLEN, T.A.; KIRK, C.A.; NEATON,
 1653 J.D.; LEKCHAROENSUK, C.; SWANSON, L.L. Clinical evaluation of dietary
 1654 modification for treatment of spontaneous chronic renal failure in dogs. *Journal*
 1655 *of the American Veterinary Medical Association*, v.220, n.8, p.1163-1170, 2002.
- 1656
- 1657 JAY, N.L.; GILLIES, M. 2012. Proteomic analysis of ophthalmic disease. *Clinical*
 1658 *& Experimental Ophthalmology*, v.40, n.7, p.755–763, 2012.
- 1659
- 1660 JIANG, B.; HARPER, M.M.; KECOVA, H.; ADAMUS, G.; KARDON, R.H.;
 1661 GROZDANIC, S.D.; KUEHN, M.H. Neuroinflammation in advanced canine
 1662 glaucoma. *Molecular Vision*, v.16, p.2092-2108, 2010.
- 1663
- 1664 KERL, M.E.; COOK, C.R. Glomerular filtration rate and renal scintigraphy.

- 1665 Clinical Techniques in Small Animal Practice., v.20, n.1, p.31-38, 2005.
1666
- 1667 KHOSRAVI, M.J.; DIAMANDI, A.; MISTRY, J.; KRISHNA, R.G.; KHARE, A. Acid-
1668 Labile Subunit of Human Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein Complex:
1669 Measurement, Molecular, and Clinical Evaluation. The Journal of Clinical
1670 Endocrinology and Metabolism, v.82, n.12, p.3944-3951, 1997.
1671
- 1672 KIKUKAWA, T.; MUKHERJEE, A.B. Detection of a uteroglobin-like
1673 phospholipase A2-inhibitory protein in the circulation of rabbits. Molecular and
1674 Cellular Endocrinology, v.62, n.2, p.177–187, 1989.
1675
- 1676 KING, L.G.; GIGER, U.; MPHIL, D.D.; NAGODE, A. Anemia of chronic renal
1677 failure in dogs. Journal of Veterinary Internal Medicine, v.6, n.5, p. 264-270, 1994.
1678
- 1679 KOBORI, H.; NAVAR, G.L. Urinary Angiotensinogen as a Novel Biomarker of
1680 Intrarenal Renin-Angiotensin System in Chronic Kidney Disease. International
1681 Review of Thrombosis, v.6, n.2, p.108-116, 2011.
1682
- 1683 KOBORI, H.; OHASHI, N.; KATSURADA, A.; MIYATA, K.; SATOU, R.; SAITO,
1684 T.; YAMAMOTO, T. Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity
1685 of chronic kidney diseases. Journal of the American Society of Hypertension, v.2,
1686 n.5, p.349–354, 2008.
1687
- 1688 KOHRI, K.; YASUI, T.; OKADA, A.; HIROSE, M.; HAMAMOTO, S.; FUJII, Y.;
1689 NIIMI, K.; TAGUCHI, K. Biomolecular mechanism of urinary stone formation
1690 involving osteopontin. Urological Research, v.40, n.6, p.623-637, 2012.
1691
- 1692 KOVARIKOVA, S. Urinary biomarkers of renal function in dogs and cats: A
1693 review. Veterinarni Medicina, v.60, n.11, p.589–602, 2015.
1694
- 1695 KOVESDY, C.P.; GEORGE, S.M.; ANDERSON, J.E.; KALANTAR-ZADEH, K.
1696 Outcome predictability of biomarkers of protein-energy wasting and inflammation
1697 in moderate and advanced chronic kidney disease. The American Journal of
1698 Clinical Nutrition., v.90, n.2, p.407-414, 2009.

1699

1700 KRALOVA, S.; LEVA, L.; TOMAN, M. Polimorphonuclear function in naturally
1701 occurring renal failure in dogs. *Veterinari Medicina*, v.54, n.5, p.236-243, 2009.

1702

1703 KRAWCZYK, K.M.; NILSSON H.; NYSTROM, J.; LINDGREN, D.;
1704 LEANDERSSON, K.; SWARD, K.; JOHANSSON, M.E. Localization and
1705 regulation of polymeric Ig receptor in healthy and diseased human kidney. *The*
1706 *American Journal of Pathology*, v.189, n.10, p.1933-1944, 2019.

1707

1708 LE SEUR, A.N.V.; GERALDES, S.S.; MELCHERT, A.; TAKAHIRA, R.K.;
1709 COYNE, M.; MURPHY, R.; SZLOSEK, D.; OKAMOTO, P.T.C.G. Symmetric
1710 dimethylarginine concentrations in dogs with International Renal Interest Society
1711 stage 4 chronic kidney disease undergoing intermittent hemodialysis. *Journal of*
1712 *Veterinary Internal Medicine*, v.33, n.6, p.2635-2643, 2019.

1713

1714 LEE, D.S.; SEUNG, H.Y.; HYUN, L.K.; KWON, W.J.; CHUN, S.L.; CHAE, D.W.;
1715 KIM, S.; JUNG, S.L.; YON, S.K. Recombinant uteroglobin prevents the
1716 experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, v.66, n.3,
1717 p.1061–1067, 2004.

1718

1719 LEES, G.E. Early diagnosis of renal disease and renal failure. *The Veterinary*
1720 *Clinics of North America. Small Animal Practice.*, v.34, n.4, p.867-885, 2004.

1721 LIM, H-J.; CHOI, S.H. Assessment of individual renal function using 99mTc-
1722 MAG3 renography. *In vivo.*, v.36, n.1, p.206-211, 2022.

1723

1724 LIN, Z.Z.; MING, D.S.; CHEN, Y.B.; ZHANG, J.M.; CHEN, H.H.; JIANG, J.J.;
1725 ZHANG, Z.S. KMT5A promotes metastasis of clear cell renal cell carcinoma
1726 through reducing cadherin-1 expression. *Oncology Letters*, v.17, n.6, p.4907-
1727 4913, 2019.

1728

1729 LIPPI, I.; PERONDI, F.; LUBAS, G.; GORI, E.; PIERINI, A.; D'ADDETTA, A.;
1730 MARCHETTI, V. Erythrogram patterns in dogs with chronic kidney disease.
1731 *Veterinary Science*, v.8. n.7, p.1-9, 2021.

1732

- 1733 LIU, Y.; XU, H.; ZHONG, W.; SHEN, Q.; ZHUANG, T.; HUANG, K. Organic
1734 Selenium Alleviated the Formation of Ethylene Glycol-Induced Calcium Oxalate
1735 Renal Calculi by Improving Osteopontin Expression and Antioxidant Capability in
1736 Dogs. *Biological Trace Element Research*, v.168, n.2, p.392-400, 2015.
1737
- 1738 LOO, J.A.; DEJOHN, D.E.; DU, P.; STEVENSON, T.I.; LOO, R.R.O. Application
1739 of mass spectrometry for target identification and characterization. *Medicinal*
1740 *Research Reviews.*, v.19, n.4, p.307–319, 1999.
1741
- 1742 LÓPEZ, J.L. Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis.
1743 *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life*
1744 *sciences.*, v.849, n.1-2, p.190–202, 2007.
1745
- 1746 LÓPEZ-GUISA, J.M.; RASSA, A.C.; CAI, X.; COLLINS, S.J.; EDDY, A.A.
1747 Vitronectin accumulates in the interstitium but minimally impacts fibrogenesis in
1748 experimental chronic kidney disease. *American Journal of Physiology*, v.300, n.5,
1749 p.1244–1254, 2011.
1750
- 1751 LUO, T.; YANG, H.; LI, F.; ZHANG, X.; XU, X. Purification, characterization and
1752 cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp
1753 *Penaeus monodon*. *Developmental & Comparative Immunology*, v.30, n.7,
1754 p.607-617, 2006.
1755
- 1756 MAEDA, H.; SOGAWA, K.; SAKAGUCHI, K.; ABE, S.; SAGIZAKA, W.;
1757 MOCHIZUKI, S.; HORIE, W.; WATANABE, T.; SHIBATA, Y.; SATOH, M.;
1758 SANDA, A.; NOMURA, F.; SUZUKI, J. Urinary albumin and transferrin as early
1759 diagnostic markers of chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Medical*
1760 *Science*, v.77, n.8, p.937–943, 2015.
1761
- 1762 MAHESH, S.; KASKEL, F. Growth hormone axis in chronic kidney disease.
1763 *Pediatric Nephrology*, v.23, n.1, p.41–48, 2008.
1764

- 1765 MALARD, V.; GAILLARD, J.C.; BÉRENGUER, F.; SAGE, N.; QUÉMÉNEUR, E.
1766 Urine proteomic profiling of uranium nephrotoxicity. *Biochimica et Biophysica*
1767 *Acta - Proteins and Proteomics*, v.1794, n.6, p.882–891, 2009.
1768
- 1769 MARTELLO, E.; PERONDI, F.; CAPUCCHIO, M.T.; BIASATO, I.; BIASIBETTI,
1770 E.; COCCA, T.; BRUNI, N.; LIPPI, I. Efficacy of a new dietary supplement in dogs
1771 with advanced chronic kidney disease. *PeerJ.*, v.8, p.1-15, 2020.
1772
- 1773 MARTINÉZ, P.P.; CARVALHO, M.B. Participation of renal excretion of calcium,
1774 phosphorus, sodium and potassium on the homeostasis in healthy dogs and in
1775 dogs with chronic kidney disease. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.30, n.10,
1776 p.868-876, 2010.
1777
- 1778 McGROTTY, Y. Diagnosis and management of chronic kidney disease in dogs
1779 and cats. *In Practice.*, v.30, n.9, p.502-507, 2008.
1780
- 1781 McKENNA, M.; PELLIGAND, L.; ELLIOTT, J.; WALKER, D.; JEPSON, R. Clinical
1782 utility of estimation of glomerular filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary*
1783 *Internal Medicine.*, v.34, n.1, p.195-205, 2020.
1784
- 1785 METZGER, J., KIRCH, T., SCHIFFER, E., ULGER, P., MENTES, E., BRAND, K.,
1786 WEISSINGER, E.M., HAUBITZ, M., MISCHACK, H., HERGET-ROSENTHAL, S.
1787 Urinary excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic
1788 pattern of acute kidney injury. *Kidney International*, v.78, n.12, p.1252–1262,
1789 2010.
1790
- 1791 MICHELL, A.R.; BODEY, A.R.; GLEADHILL, A. Absence of hypertension in dogs
1792 with renal insufficiency. *Renal Failure*, v.19, n.1, p.61-68, 1997.
1793
- 1794 MIELE, L.; CORDELLA-MIELE, E.; MANTILE, G.; PERI, A.; MUKHERJEE, A.B.
1795 Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: The uteroglobin family of proteins.
1796 *Journal of Endocrinological Investigation*, v.17, p.679–692, 1994.
1797

- 1798 MIRKOVIĆ, K.; DOORENBOS, C.R.C.; DAM, W.A.; LAMBERS HEERSPINK,
1799 H.J.; SLAGMAN, M.C.J.; NAUTA, F.L.; KRAMER, A.B.; GANSEVOORT, R.T.;
1800 VAN DEN BORN, J.; NAVIS, G.; DE BORST, M.H. Urinary Vitamin D Binding
1801 Protein: A Potential Novel Marker of Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis.
1802 PLoS ONE, v.8, n.2, 2013.
- 1803
- 1804 MIYATA, T.; ODA, O.; INAGI, R.; SUGIYAMA, S.; MIYAMA, A.; MAEDA, K.;
1805 NAKASHIMA, I.; YAMANAKA, N. Molecular and functional identification and
1806 purification of complement component factor D from urine of patients with
1807 chronic renal failure. Molecular Immunology, v.27, n.7, p.637-644, 1990.
- 1808
- 1809 MUKHERJEE, A.B.; KUNDU, G.C.; MANTILE-SELVAGGI, G.; YUAN, C.J.;
1810 MANDAL, A.K.; CHATTPADHYAY, S.; ZHENG, F.; PATTABIRAMAN, N.;
1811 ZHANG, Z. Uteroglobin: A novel cytokine? Cellular and Molecular Life Sciences,
1812 v.55, n.5, p.771–787, 1999.
- 1813
- 1814 MURPHY, S.; ZWEYER, M.; MUNDEGAR, R.R.; SWANDULLA, D.;
1815 OHLENDIECK, K. Proteomic serum biomarkers for neuromuscular diseases.
1816 Expert Review of Proteomics., v.15, n.3, p.277–291, 2018.
- 1817
- 1818 NABITY, M.B.; LEES, G.E.; BOGGESS, M.M.; YERRAMILI, M.; OBARE, E.;
1819 YERRAMILI, M.; RAKITIN, A.; AGUIAR, J.; RELFORD, R. Symmetric
1820 dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the
1821 early detection of chronic kidney disease in dogs. Journal of Veterinary Internal
1822 Medicine., v.29, n.4, p.1036-1044, 2015.
- 1823
- 1824 NABITY, M.B.; LEES, G.E.; DANGOTT, L.J.; CIANCIOLO, R.; SUCHODOLSKI,
1825 J.S.; STEINER, J.M. Proteomic analysis of urine from male dogs during early
1826 stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular
1827 disease. Veterinary Clinical Pathology., v.40, n.2, p.222–236, 2011.
- 1828
- 1829 NAKAJIMA, M.; OHNO, K.; GOTO-KOSHINO, Y.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H.
1830 Plasma transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs

- 1831 with nutritional treatment. The Journal of Veterinary Medical Science, v.76, n.4,
1832 p.539–543, 2014.
- 1833
- 1834 NAUTA, A.J.; DE HAIJ, S.; BOTTAZZI, B.; MANTOVANI, A.; BORRIAS, M.C.;
1835 ATEN, J.; RASTALDI, M.P.; DAHA, M.R.; KOOTEN, C.V.; ROOS, A. Human
1836 renal epithelial cells produce the long pentraxin PTX3. Kidney International, v.67,
1837 n.2, p.543–553, 2005.
- 1838
- 1839 NAVANEETHAN, S.D.; SCHOLD, J.D.; ARRIGAIN, S.; JOLLY, S.E.; WEHBE,
1840 E.; RAINA, R.; SIMON, J.F.; SRINIVAS, T.R.; JAIN, A.; SCHREIBER JR, M.J.;
1841 NALLY JR, J.V. Serum bicarbonate and mortality in stage 3 and stage 4 chronic
1842 kidney disease. Clinical Journal of the American Society of Nephrology., v.6,
1843 n.10, p.2395-2402, 2011.
- 1844
- 1845 NAVEAU, S.; BENATTAR, C.; BEDOSSA, P.; CHAPUT, J.C. Alpha-2-
1846 Macroglobulin and Hepatic Fibrosis. Diagnostic Interest. Digestive Diseases and
1847 Sciences, v.39, n.11, p.2426-2432, 1994.
- 1848
- 1849 NEUHOFF, V.; AROLD, N.; TAUBER, D.; EHRHARDT, W. Improved staining of
1850 proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing with clear
1851 background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-
1852 250. Electrophoresis, v.9, n.6, p.255-262, 1988.
- 1853
- 1854 NI, Y.; WU, G.H.; CAI, J.J.; ZHANG, R.; ZHENG, Y.; LIU, J.Q.; YANG, X.H.;
1855 YANG, X.; SHEN, Y.; LAI, J.M.; YE, X.M.; MO, S.J. Tubule-mitophagic secretion
1856 of SerpinG1 reprograms macrophages to instruct anti-septic acute kidney injury
1857 efficacy of high-dose ascorbate mediated by NRF2 transactivation. International
1858 Journal of Biological Sciences, v.18, n.13, p.5168–5184, 2022.
- 1859
- 1860 NOBEN, J.P.; DUMONT, D.; KWASNIKOWSKA, N.; VERHAERT, P.; SOMERS,
1861 V.; HUPPERTS, R.; STINISSEN, P.; ROBBEN, J. Lumbar cerebrospinal fluid
1862 proteome in multiple sclerosis: characterization by ultrafiltration, liquid
1863 chromatography, and mass spectrometry. Journal of Proteome Research., v.5,
1864 n.7, p.1647–1657, 2006.

1865

1866 NOTOMI, M.K.; KOGIKA, M.M.; IKESAKI, J.Y.H.; MONTEIRO, G.P.R.;
1867 MARQUESI, M.L. Estudo retrospectivo de casos de insuficiência renal crônica
1868 em cães no período de 1999 a 2002. Brazilian Journal of Veterinary Research
1869 and Animal Science., v.43, p.12– 22, 2006.

1870

1871 NYKJAER, A.; DRAGUN, D.; WALTHER, D.; VORUM, H.; JACOBSEN, C.;
1872 HERZ, J.; MELSEN, F.; CHRISTENSEN, E.I.; WILLNOW, T.E. An endocytic
1873 pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin
1874 D₃. Cell, v.96, n.4, p.507-515, 1999.

1875

1876 O'NEILL, D.G.; ELLIOTT, J.; CHURCH, D.B.; McGREEVY, P.D.; THOMSON,
1877 P.C.; BRODBELT, D.C. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary
1878 practices: Prevalence, risk factors, and survival. Journal of Veterinary Internal
1879 Medicine., v.27, n.4, p.814-821, 2013.

1880

1881 O'REILLY, E.L.; HORVATIC, A.; KULES, J.; GELEMANOVIC, A.; MRLJAK, V.;
1882 HUANG, Y.; BRADY, N.; CHADWICK, C.C.; ECKERSALL, P.D.; RIDYARD, A.
1883 Faecal proteomics in the identification of biomarkers to differentiate canine
1884 chronic enteropathies. Journal of Proteomics., v.254, p.1-13, 2022.

1885

1886 OIWA, M.; KURODA, K.; KAWANOUE, N.; MORIMATSU, H. Histidine-rich
1887 glycoprotein as a novel predictive biomarker of postoperative complications in
1888 intensive care unit patients: a prospective observational study. BMC
1889 Anesthesiology, v.22, n.1, 2022.

1890

1891 PALANIAPPAN, R.U.M.; MCDONOUGH, S.P.; DIVERS, T.J.; CHEN, C.S.; PAN,
1892 M.J.; MATSUMOTO, M.; CHANG, Y.F. Immunoprotection of recombinant
1893 leptospiral immunoglobulin-like protein A against Leptospira interrogans serovar
1894 pomona infection. Infection and Immunity, v.74, n.3, p.1745–1750, 2006.

1895

1896 PALVIAINEN, M.; RAEKALLIO, M.; VAINIONPAA, M.; KOSONEN, S.; VAINIO,
1897 O. Proteomic profiling of dog urine after European adder (Vipera berus berus)

- 1898 envenomation by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Toxicon*, v.60,
1899 p.1228-1234, 2012.
- 1900
- 1901 PASCUAL, M.; STEIGER, G.; ESTREICHER, J.; MACON, K.; VOLANAKIS, J.E.;
1902 SCHIFFERLI, J.A. Metabolism of complement factor D in renal failure. *Kidney*
1903 *International*, v.34, p.529-536, 1988.
- 1904
- 1905 PELANDER, L.; HÄGGSTRÖM, J.; LARSSON, A.; SYME, H.; ELLIOTT J.;
1906 HEIENE.; LJUNGVALL. Comparison of the diagnostic value of symmetric
1907 dimethylarginine, cystatin C, and creatinine for detection of decreased glomerular
1908 filtration rate in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine.*, v.33, n.2, p.630-
1909 639, 2019.
- 1910
- 1911 PELANDER, L.; LJUNGVALL, I.; EGENVALL, A.; SYME, H.; ELLIOTT, J.;
1912 HAGGSTROM, J. Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000
1913 insured Swedish dogs. *Veterinary Record.*, v.176, n.25, p.1-7, 2015.
- 1914
- 1915 PERONDI, F.; LIPPI, I.; MARCHETTI, V.; BRUNO, B.; BORRELLI, A.; CITI, S.
1916 How ultrasound can be useful for staging chronic kidney disease in dogs:
1917 Ultrasound findings in 855 cases. *Veterinary Sciences.*, v.7, n.147, p. 1-8, 2020.
- 1918
- 1919 POCAR, P.; SCARPA, P.; BERRINI, A.; CAGNARDI, P.; RIZZI, R.; BORROMEO,
1920 V. Diagnostic potential of simplified methods for measuring glomerular filtration
1921 rate to detect chronic kidney disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal*
1922 *Medicine.*, v.33, n.5, p.2105-2116, 2019.
- 1923
- 1924 POLZIN, D.J. Chronic kidney disease in small animals. *The Veterinary Clinics of*
1925 *North America. Small Animal Practice.*, v.41, n.1, p.15-30, 2011.
- 1926
- 1927 POLZIN, D.J. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney
1928 disease in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.*,
1929 v.23, n.2, p.205-215, 2013.
- 1930

- 1931 PRAJCZER, S.; HEIDENREICH, U.; PFALLER, W.; KOTANKO, P.; LHOTTA, K.;
 1932 JENNINGS, P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease
 1933 progression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.25, n.6, p.1896–1903, 2010.
 1934
- 1935 PREISSNER, K.T. Structure and biological role of vitronectin. *Annual Review of*
 1936 *Cell Biology*, v.7, p.275-310, 1991.
 1937
- 1938 PREISSNER, K.T.; SEIFFERT, D. Role of vitronectin and its receptors in
 1939 haemostasis and vascular remodeling. *Thrombosis Research*, v.89, n.1, p.1–21,
 1940 1998.
- 1941 PRESSLER, B.M. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs
 1942 and cats. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice.*, v.43,
 1943 n.6, p.1193-1208, 2013.
 1944
- 1945 QIU, N.; LIU, W.; MA, M.; ZHAO, L.; LI, Y. Differences between fertilized and
 1946 unfertilized chicken egg white proteins revealed by 2-dimensional gel
 1947 electrophoresis-based proteomic analysis. *Poultry Science.*, v.92, n.3, p.782–
 1948 786, 2013.
 1949
- 1950 RAILA, J.; SCHWEIGERT, F.J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm-
 1951 Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal
 1952 disease. *Veterinary Clinical Pathology*, v.43, n.2, p.261–265, 2014.
 1953
- 1954 RAMPOLDI, L.; SCOLARI, F.; AMOROSO, A.; GHIGGERI, G.; DEVUYST, O.
 1955 The rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial
 1956 nephropathy to chronic kidney disease, v.80, p.338-347, 2011.
 1957
- 1958 REDDY, G.A.K.; LAKSHMI, K.; AMBICA, G.; KUMAR, A. Incidence of chronic
 1959 kidney disease in dogs. *The Pharma Innovation Journal.*, v.10, n.7, p.738-740,
 1960 2021.
 1961
- 1962 REHMAN, A.A.; AHSAN, H.; KHAN, F.H. Alpha-2-macroglobulin: A physiological
 1963 guardian. *Journal of Cellular Physiology*, v.228, n.8, p.1665-1675, 2013.
 1964

- 1965 ROSENFELD, R.G.; BELGOROSKY, A.; CAMACHO HÜBNER, C.; SAVAGE,
1966 M.O.; WIT, J.M.; HWA, V. Defects in growth hormone receptor signaling. Trends
1967 in Endocrinology & Metabolism, v.18, n.4, p.134–141, 2007.
- 1968
- 1969 ROUDEBUSH, P.; POLZIN, D.J.; ADMANS, L.G.; TOWELL, T.L.; FORRESTER,
1970 S.D. An evidence-based review of therapies for canine chronic kidney disease.
1971 British Small Animal Veterinary Association., v.51, n.1, p.244-252, 2010.
- 1972
- 1973 RUDINSKY, A.J.; HARJES, L.M.; BYRON, J.; CHEW, D.J.; TORIBIO, R.E.;
1974 LANGSTON, C.; PARKER, V.J. Factors associated with survival in dogs with
1975 chronic kidney disease. Journal of Veterinary Internal Medicine., v.32, n.1,
1976 p.1977-1982, 2018.
- 1977
- 1978 SANDERS PW, VOLANAKIS iE, ROSTAND SG, GALLA iH: Human complement
1979 protein D catabolism by the rat kidney. J Clin Invest 77:1299—1304, 1986
- 1980
- 1981 SCHIRLE, M.; BANTSCHKE, M.; KUSTER, B. Mass spectrometry-based
1982 proteomics in preclinical drug discovery. Chemistry & Biology., v.19, n.1, p.72–
1983 84, 2012.
- 1984
- 1985 SCHVARTZ, I.; SEGER, D.; SHALTIEL, S. Vitronectin. The International Journal
1986 of Biochemistry and Cell Biology, v.31, n.5, 1999.
- 1987
- 1988 SCHWEIGERT, F.J.; RAILA, J.; HAEBEL, S. Vitamin A excreted in the urine of
1989 canines is associated with a Tamm-Horsfall like protein. Veterinary Research.,
1990 v.33, n.3, p.299–311, 2002.
- 1991
- 1992 SEIFFERT, D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. Histology and
1993 Histopathology, v.12, n.3, p.787-797, 1997.
- 1994
- 1995 SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. Mass spectrometric
1996 sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Analytical Chemistry,
1997 v.68, n.5, p.850–858, 1996.
- 1998

- 1999 SHLIPAK, M.G.; PRAUGHT, M.L.; SARNAK, M.J. Update on cystatin C: new
2000 insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Current Opinion in*
2001 *Nephrology and Hypertension*, v.15, n.3, p.270-275, 2006.
- 2002
- 2003 SIDGEL, T.K.; BOADA, P.; KERWIN, M.; RASHMI, P.; GIERTSON, D.;
2004 ROSSETTI, M.; SUR, S.; MUNAR, D.; CIMINO, J.; AHN, R.; PICKERING, H.;
2005 SEN, S.; PARMAR, R.; FATOU, B.; STEEN, H.; SCHAENMAN, J.;
2006 BUNNAPRADIST, S.; REED, E.F.; SARWAL, M.M. Plasma proteome
2007 perturbation for CMV DNAemia in kidney transplantation. *BioRxiv*, 2022.
- 2008
- 2009 SILVA, É.F.; MEDEIROS, M.A.; MCBRIDE, A.J.A.; MATSUNAGA, J.; ESTEVES,
2010 G.S.; RAMOS, J.G.R.; SANTOS, C.S.; CRODA, J.; HOMMA, A.; DELLAGOSTIN,
2011 O.A.; HAAKE, D.A.; REIS, M.G.; KO, A.I. The terminal portion of leptospiral
2012 immunoglobulin-like protein LigA confers protective immunity against lethal
2013 infection in the hamster model of leptospirosis. *Vaccine*, v.25, n.33, p.6277–6286,
2014 2007.
- 2015
- 2016 SOSNAR, M.; KOHOUT, P.; RÔÎÂKA, M.; VRBASOVÁ, L. Retrospective Study
2017 of Renal Failure in Dogs and Cats Admitted to University of Veterinary and
2018 Pharmaceutical Sciences Brno during 1999–2001. *Acta Veterinaria Brno.*, v.72,
2019 n.4, p.593–598, 2003.
- 2020
- 2021 SOVERI, I.; BERG, U.B.; BJÖRK, J.; ELINDER, C.G.; GRUBB, A.; MEJARE, I.;
2022 STERNER, G.; BÄCK, S-E. Measuring GFR: a systematic review. *American*
2023 *Journal of Kidney Diseases.*, v.64, n.3, p.411-424, 2014.
- 2024
- 2025 SPERLING, K. From proteomics to genomics. *Electrophoresis.*, v.22, n.14,
2026 p.2835–2837, 2001.
- 2027
- 2028 STEWART, A.J.; BLINDAUER, C.A.; SADLER, P.J. Plasma fatty acid levels may
2029 regulate the Zn²⁺-dependent activities of histidine-rich glycoprotein. *Biochimie*,
2030 v.91, n.11–12, p.1518–1522, 2009.
- 2031

- 2032 SUH, S.H.; OH, T.R.; CHOI, H.S.; YANG, E.M.; KIM, C.S.; BAE, E.H.; MA, S.K.;
2033 OH, K.H.; JUNG, J.Y.; HYUN, Y.Y.; KIM, S.W. Urinary Angiotensinogen and
2034 Progression of Chronic Kidney Disease: Results from KNOW-CKD Study.
2035 Biomolecules, v.12, n.9, 2022.
2036
- 2037 SWINBANKS, D. Australia backs innovation, shuns telescope. Nature., v.378,
2038 n.653, p.653, 1995.
2039
- 2040 TASCA, S.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M. High sérum and urie lysozyme levels
2041 in a dog with acute myeloid leucemia. Journal of Veterinary Diagnostic
2042 Investigation, v.22, p.111-115, 2010.
2043
- 2044 TENSTAD, O.; ROALD, A.B.; GRUBB, A.; AUKLAND, K. Renal handling of
2045 radiolabelled human cystatin C in the rat. Scandinavian Journal of Clinical and
2046 Laboratory Investigation, v.56, n.5, p.409-414, 1996.
2047
- 2048 THOMAS, T.E.; FEDOR-CHAIKEN, M.; KAPLAN, D.D.; BRACKENBURY, R.;
2049 CASEY, P.J. Galpha12 and galpha13 negatively regulate the adhesive functions
2050 of cadherin. The Journal of Biological Chemistry, v.277, n.27, p.24594-24600,
2051 2002.
2052
- 2053 TONG, M.; CARRERO, J.J.; QURESHI, A.R.; ANDERSTAM, B.; HEIMBÜRGER,
2054 O.; BÁRÁNY, P.; AXELSSON, J.; ALVESTRAND, A.; STENVINKEL, P.;
2055 LINDHOLM, B.; SULIMAN, M.E. Plasma pentraxin 3 in patients with chronic
2056 kidney disease: Associations with renal function, protein-energy wasting,
2057 cardiovascular disease, and mortality. Clinical Journal of the American Society of
2058 Nephrology, v.2, n.5, p.889–897, 2007.
2059
- 2060 TRUEB, B.; AMANN, R.; GERBER, S.D. Role of FGFR1 and other FGF
2061 signaling proteins in early kidney development. Cellular and Molecular Life
2062 Sciences, v.70, n.14, 2013.
2063
- 2064 UNIPROT: the universal protein knowledgebase in 2021. Disponível em:
2065 <https://www.uniprot.org/> Acesso em: 15 de Fevereiro de 2022.

- 2066
2067 VADEN, S.L. Renal biopsy of dogs and cats. Clinical Techniques in Small Animal
2068 Practice., v.20, n.1, p.11-22, 2005.
2069
- 2070 VADEN, S.L.; ELLIOT, J. Management of proteinuria in dogs and cats with
2071 chronic kidney disease. Veterinary Clinics of North America Small Animal
2072 Practice, v.46, n.6, p.1115-1130, 2016.
2073
- 2074 VARGHESE, S.A.; POWELL, T.B.; BUDISAVLJEVIC, M.N.; OATES, J.C.;
2075 RAYMOND, J.R.; ALMEIDA, J.S.; ARTHUR, J.M. Urine biomarkers predict the
2076 cause of glomerular disease. Journal of the American Society of Nephrology,
2077 v.18, n.3, p.913–922, 2007.
2078
- 2079 VERMA, A.; AMBATIPUDI, K. Challenges and opportunities of bovine milk
2080 analysis by mass spectrometry. Clinical Proteomics., v.13, n.8, p.1-13, 2016.
2081
- 2082 VINGE, L.; LEES, G.E.; NIELSEN, R.; KASHTAN, C.E.; BAHR, A.;
2083 CHRISTENSEN, E.I. The effect of progressive glomerular disease on megalin-
2084 mediated endocytosis in the kidney. Nephrology Dialysis Transplantation, v.25,
2085 n.8, p.2458–2467, 2010.
2086
- 2087 VOGESER, M.; PARHOFER, K.G. Liquid chromatography tandem-mass
2088 spectrometry (LC-MS/MS) - technique and applications in endocrinology.
2089 Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes., v.115, n.9, p.559–570,
2090 2007.
2091
- 2092 VOLANAKIS, J.E.; BARNUM, S.R.; GIDDENS, M.; GALLA, J.H. Renal filtration
2093 and catabolism of complement protein D. The New England Journal of Medicine,
2094 v.312, n.7, p.395-399, 1985.
2095
- 2096 VYLETAL, P.; BLEYER, A.J.; KMOCH, S. Uromodulin biology and
2097 pathophysiology—an update. Kidney Blood Press Research, v.33, n.6, p.456–
2098 475, 2010.
2099

- 2100 WAKE, H.; MORI, S.; LIU, K.; MORIOKA, Y.; TESHIGAWARA, K.; SAKAGUCHI,
2101 M.; KURODA, K.; GAO, Y.; TAKAHASHI, H.; OHTSUKA, A.; YOSHINO, T.;
2102 MORIMATSU, H.; NISHIBORI, M. Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic
2103 Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation.
2104 EBioMedicine, v.9, p.180–194, 2016.
- 2105
- 2106 WAKE, H.; MORI, S.; LIU, K.; TAKAHASHI, H.K.; NISHIBORI, M. Histidine-rich
2107 glycoprotein inhibited high mobility group box 1 in complex with heparin-induced
2108 angiogenesis in matrigel plug assay. European Journal of Pharmacology, v.623,
2109 p.89–95, 2009.
- 2110
- 2111 WANG, S.; CHI, K.; WU, D.; HONG, Q. Insulin-Like Growth Factor Binding
2112 Proteins in Kidney Disease, Frontiers in Pharmacology, v.12, p.1-7, 2021.
- 2113
- 2114 WATSON, A.D.; LEFEBVRE, H.P.; CONCORDET, D.; LAROUTE, V.; FERRÉ,
2115 J-P.; BRAUN, J-P.; CONCHOU, F.; TOUTAIN, P-L. Plasma exogenous
2116 creatinine clearance test in dogs: Comparison with other methods and proposed
2117 limited sampling strategy. Journal of Veterinary Internal Medicine., v.16, n.1,
2118 p.22-33, 2002.
- 2119
- 2120 WEI, H.; WANG, J.Y. Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and IgM
2121 Transcytosis. International Journal of Molecular Sciences, v.22, n.5, p.1-19,
2122 2021.
- 2123
- 2124 WESTHUYZEN, J. Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired renal
2125 function. Annals of Clinical and Laboratory Science, v.36, n.4, p.387-394, 2006.
- 2126 WHERNER, A.; HARTMANN, K.; HIRSCHBERGER, J. Associations between
2127 proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal
2128 and non-renal diseases. Veterinary Record, v.162, n.5, p.141-147, 2008.
- 2129
- 2130 WINIARCZYK, D.; MICHALAK, K.; ADASZEK, L.; WINIARCZYK, M.;
2131 WINIARCZYK, S. Urinary proteome of dogs with kidney injury during babesiosis.
2132 BMC Veterinary Research., v.15, n.439, p.1-9, 2019.
- 2133

- 2134 YAMAMOTO, T.; NAKAGAWA, T.; SUZUKI, H.; OHASHI, N.; FUKASAWA, H.;
2135 FUJIGAKI, Y.; KATO, A.; NAKAMURA, Y.; SUZUKI, F.; HISHIDA, A. Urinary
2136 angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with
2137 deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *Journal of*
2138 *the American Society of Nephrology*, v.18, n.5, p.1558–1565, 2007.
- 2139
- 2140 YAMAMOTO, T.; NAKAGAWA, T.; SUZUKI, H.; OHASHI, N.; FUKASAWA, H.;
2141 FUJIGAKI, Y.; KATO, A.; NAKAMURA, Y.; SUZUKI, F.; HISHIDA, A. Urinary
2142 angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with
2143 deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *Journal of*
2144 *the American Society of Nephrology*, v.18, p.1558-1565, 2007.
- 2145
- 2146 YANG, W.; YU, X.C.; GUAN, X.; GUAN, X.R. Analysis on the relationship
2147 between urine transferring, CHD and coronary artery stenosis. *Cinics in*
2148 *Laboratory Medicine*, v.12, p.1560–1561, 2015.
- 2149
- 2150 YOON, S.; GINGRAS, D.; BENDAYAN, M. Alterations of vitronectin and its
2151 receptor α_v integrin in the rat renal glomerular wall during diabetes. *American*
2152 *Journal of Kidney Diseases*, v.38, n.6, p.1298–1306, 2001.
- 2153
- 2154 ZHANG, N.; AEBERSOLD, R.; SCHWILKOWSKI, B. ProbiD: a probabilistic
2155 algorithm to identify peptides through sequence database searching using
2156 tandem mass spectral data. *Proteomics.*, v.2, n.10, p.1406–1412, 2002.
- 2157
- 2158 ZHENG, F.; KUNDU, G.C.; ZHANG, Z.; WARD, J.; DeMAYO, F.; MUKHERJEE,
2159 A.B. Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in
2160 mice. *Nature Medicine*, v.5, n.9, p.1018-1025, 1999.
- 2161
- 2162 ZOU, L.; WANG, X.; GUO, Z.; SUN, H.; SHAO, C.; YANG, Y.; SUN, W.
2163 Differential urinary proteomics analysis of myocardial infarction using iTRAQ
2164 quantification. *Molecular Medicine Reports*, v.49, n.5, p.3972–3988, 2019.

2165

2166

2167

2168

2169

2170

2171

2172

2173

2174

2175

2176

2177

2178

2179

2180

2181

2182

2183

2184

2185

2186

2187

2188

2189

2190

2191

2192

CAPÍTULO 2

Artigo Científico

2193 **Revista:** Molecular & Cellular Proteomics¹

2194 **Guia de autores:** <https://www.mcponline.org/content/authorinfo>

2195

2196 **Article title:**

2197 Identificação de potenciais biomarcadores de doença renal crônica em urina e
2198 soro de cães

2199

2200 Identification of potential biomarkers of chronic kidney disease in urine and
2201 serum of dogs

2202

2203 **Authors:**

2204 Silvano Salgueiro Geraldês, Reiner Silveira de Moraes, Fabiana Ferreira de
2205 Souza, Alessandra Melchert, Adriano Sakai Okamoto, Priscylla Tatiana Chalfun
2206 Guimarães-Okamoto*

2207

2208 São Paulo State University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal
2209 Science, Botucatu, Brazil.

2210 *Correspondence: silvano.geraldes@unesp.br, Tel.: +55 14 38802238

2211

2212 **Email addresses:**

2213 silvano.geraldes@unesp.br (S.S.G); rs.moraes@unesp.br (R.S.M.);
2214 alessandra.melchert@unesp.br (A.M.); fabiana.f.souza@unesp.br (F.F.S.);
2215 adriano.okamoto@unesp.br (A.S.O) ; tatiana.okamoto@unesp.br (P.T.C.G.O.)

2216

2217

¹ Para manter a padronização da tese, a formatação recomendada pela revista foi efetuada, exceto a fonte (Times New Roman 12); figuras e tabelas que deveriam ser inseridas no final, foram colocadas no corpo do texto e abreviações já escritas em inglês.

2218 **Resumo**

2219 A proteômica do soro e urina representa uma possibilidade diagnóstica para a
2220 doença renal crônica em cães, pela identificação de potenciais biomarcadores
2221 de precocidade, já que, a morbidade e a mortalidade da doença renal crônica
2222 estão relacionadas com a prevalência subestimada devido ao diagnóstico tardio.
2223 O objetivo deste estudo foi identificar e analisar o proteoma sérico e urinário de
2224 cães com doença renal crônica estágio I, III e IV, na busca de novos
2225 biomarcadores precoces, da evolução e progressão da doença renal crônica.
2226 Para o estudo foram selecionados 26 cães divididos em quatro grupos, grupo
2227 controle, grupos da doença renal crônica estágio I, III e IV. Para a proteômica,
2228 as amostras foram preparadas e submetidas a digestão in gel e espectrometria
2229 de massas. Os dados foram analisados no *software online* MetaboAnalyst e o
2230 *exponentially modified protein abundance index* foi usado como parâmetro
2231 quantitativo da abundância proteica. Utilizou-se para a análise univariada a
2232 ANOVA e multivariada a *principal component analysis* e a *partial least squares-*
2233 *discriminant analysis*, sendo que a última foi usada para indicar o *variables in the*
2234 *projection score*. Dentre os resultados tiveram destaque no soro dos cães com a
2235 doença nos estádios I, III e IV as proteínas *Ig-like domain-containing protein*,
2236 *Vitronectin*, *Serpin Family G member 1* e *Pentraxin*. As proteínas *Beta-1 metal-*
2237 *biding globulin*, *Angiotensinogen*, *Gc-globulin*, *Ig-like domain-containing protein*,
2238 *Vitronectin*, *Serpin Family G member 1*, *Uromodulin*, *Secretoglobin Family 1 A*
2239 *member 1*, *Polymeric immunoglobulin receptor*, *Lyzozime*, *Cystatin domain*
2240 *containing protein* e *Adipsin* tiveram destaque na urina dos cães com a doença
2241 nos estádios I, III e IV. Tanto as proteínas destacadas no soro como urina se
2242 mostraram com potencial como biomarcadores da doença renal crônica, da
2243 progressão da doença renal crônica nos estádios estudados e ou do declínio da
2244 função renal.

2245

2246 **Palavras-chave:** Azotemia, proteinúria, rim, proteômica

2247

2248 **1. Introdução**

2249 A doença renal crônica (CKD) em cães, é raramente diagnosticada em seus

estágios iniciais, devido sua inespecificidade. Portanto, acredita-se que sua prevalência seja subestimada na espécie. Diante disso, acredita-se que este fato tenha influência no índice de mortalidade em cães nos estágios avançados da doença, pela tardia instituição de um tratamento específico [1,2]. Apesar da existência de exames como dosagem sérica de creatinina e Dimetilarginina Simétrica (SDMA), que direcionam o clínico a uma suspeita diagnóstica ou mesmo a gravidade e estadiamento da doença, estes exames são usualmente solicitados, somente quando o cão já apresenta sinais avançados da doença, além dos resultados da creatinina apenas se demonstrarem fora da normalidade quando cerca de 65% dos néfrons funcionais já estão perdidos e dos resultados de SDMA apresentarem influência em pacientes não estabilizados [3,4]. Dessa forma, a busca pela identificação e validação de métodos de diagnóstico precoces, entre estágio e úteis na rotina clínica de pequenos animais a partir de amostras de fácil obtenção, tem sido foco de estudos proteômicos na medicina veterinária.

Apesar da existência de diversos estudos proteômicos, utilizando fluidos biológicos de fácil obtenção como soro e urina, estes não são comumente utilizados na rotina clínica para CKD, devido limitações, custo ou mesmo inespecificidade na precocidade da doença [5]. Um estudo realizado por Nabity e colaboradores [3], analisou a proteômica da urina na injúria tubulointersticial em estágios precoces em cães machos com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X, identificando a proteína ligante do retinol como potencial biomarcador de precocidade. Mais tarde, outro estudo [6] comparou a proteômica da urina de cães e humanos por meio da análise de proteínas do complexo de exossomas e proteínas solúveis da urina, indicando potenciais biomarcadores de diagnóstico para doenças caninas por meio da similaridade entre proteínas previamente identificadas em urina de humanos com doenças renais, extrarrenais, hipertensão arterial sistêmica e neoplasia. No mesmo ano, Hormaeche e colaboradores [7] avaliaram a proteômica da urina de cães parasitados por *Dirofilaria immitis*, identificando a perda de proteínas que afetam o metabolismo do colesterol e transporte de O₂.

Recentemente, na Itália, a proteômica da urina de cães foi performada em cães com CKD, na qual as proteínas uromodulina, albumina e arginina esterase foram identificadas por SDS-PAGE e espectrometria de massas, entretanto sem

distinção entre potenciais biomarcadores em diferentes estágios da CKD [8]. Ainda em cães com CKD, um estudo conduzido por Pelander e colaboradores [9], identificou peptídeos representativos de fragmentos de colágeno I excretados na urina de cães CKD, indicando possível relação com processos fibrinóticos na doença.

A proteômica do soro de cães foi realizada em cães infectados por *Ehrlichia canis* possibilitando a identificação de alterações expressivas em proteínas de resposta da fase aguda da doença, proteínas de transporte da vitamina A e proteínas anti-inflamatórias [10]. No estudo de Franco-Martínez e colaboradores [11], a proteômica do soro foi estudada em cães experimentalmente infectados com *Leishmania infantum* nas fases subclínica e clínica da doença, sendo identificadas mais de 70 proteínas com possível valor diagnóstico da precocidade da doença. Além destes estudos, a aplicabilidade da proteômica sérica foi também alvo de estudos em cães com cardiomiopatia dilatada idiopática [12] e em cães pré e pós programa de controle de perda de peso [13].

A análise proteômica vem apresentando rápida evolução como método de detecção de biomarcadores de doenças em cães, sendo o método utilizado na análise, um fator desafiador na realização desse tipo de estudo [14]. Apesar do desenvolvimento da proteômica em doenças caninas, limitações ainda existem quanto à interpretação de dados proteômicos na medicina veterinária devido ao limitado banco de dados disponíveis para as diferentes espécies animais [5]. Apesar da existência de estudos proteômicos com potenciais biomarcadores da CKD, não houve relatos de estudos diferenciando os estágios da doença. Além de que, apenas um número limitado de proteínas parece ter sido estudado, não abrangendo o leque a um banco de dados de proteínas recente, uma vez que os bancos de dados são rotineiramente atualizados, sendo necessários estudos mais novos para que as atualizações dos bancos de dados sejam consideradas. Deste modo, objetivou-se com esse estudo identificar e analisar o proteoma sérico e urinário de cães com doença renal crônica estágio I, III e IV, na busca de novos biomarcadores precoces, da evolução e da progressão da doença renal crônica.

2315 **2. Material e Métodos**

2316 **2.1. Aspectos éticos**

2317 Os aspectos éticos foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo
2318 sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) – FMVZ –
2319 UNESP, Botucatu/SP, sob protocolo nº 0087/2018.

2320 Os tutores dos animais incluídos neste estudo assinaram o termo de
2321 consentimento livre e esclarecido, estando em comum acordo para a utilização
2322 de dados registrados.

2323

2324 **2.2. Animais e design experimental**

2325 Para o estudo foram selecionados 26 cães de ambos os sexos, sem
2326 distinção de raça, peso médio de $14,6 \pm 8,78$ kg e idade média de $7,5 \pm 4,37$
2327 anos. Os cães foram divididos em 4 grupos, sendo o grupo controle CG = 3 cães
2328 (soro: n = 3; urina: n = 3) composto por animais hígidos; e outros 3 grupos
2329 compostos por cães com doença renal crônica (CKD) divididos de acordo com o
2330 estadiamento da doença, em CKDI = 12 cães (soro: n = 12; urina: n = 9), CKDIII
2331 = 3 cães (soro: n = 3; urina: n = 3) e CKDIV = 8 cães (soro: n = 6; urina: n = 8).
2332 Em todos os grupos do estudo foi realizada a proteômica do soro e urina dos
2333 cães.

2334 Nos grupos CKD os critérios de inclusão consideraram cães estabilizados,
2335 estadiados e subestadiados de acordo com o grau da CKD descrito pela
2336 *International Renal Interest Society - IRIS Staging of CKD* [15] no respectivo
2337 grupo de estudo, comprovados por exames de bioquímica sérica (creatinina,
2338 Dimetilarginina simétrica - SDMA) e urinária (UPC), pressão arterial sistólica
2339 (SBP) e exame ultrassonográfico (alterações compatíveis com o grau da
2340 doença). Não foram incluídos no estudo cães que tivessem alteração em
2341 leucograma, presença de nefrolitíase, diagnóstico de doença congênita ou
2342 presença de neoplasia.

2343

2.3. Avaliação clínica e exames laboratoriais

No exame clínico aferiu-se a frequência cardíaca (HR), frequência respiratória (RF), temperatura e pressão arterial sistólica (SBP). O exame ultrassonográfico foi conduzido para descartar qualquer alteração no CG e como exame complementar para confirmação da CKD.

Amostras de sangue e urina foram colhidas para exames de hemograma, bioquímica, urinálise e proteômica, após jejum de 12 horas.

O sangue foi colhido por venopunção jugular e fracionado em 3 alíquotas. Para o hemograma uma alíquota foi depositada em tubo estéril com EDTA 10%.

A segunda e terceira alíquotas foram acondicionadas em tubo sem anticoagulante com gel separador e centrifugadas para obtenção de soro, sendo uma destinada à análise de SDMA, ureia, creatinina, fosforo, albumina, sódio e potássio, e a outra armazenado a -80 °C para proteômica.

A amostra de urina (~20 mL) foi obtida por cistocentese e fracionada em três alíquotas. Uma alíquota (~9 mL) foi destinada à urinálise, a segunda (~1 mL) para a determinação da UPC e a última (10 mL) para proteômica. A alíquota destinada à proteômica foi centrifugada a 1.000g por 10 minutos e o sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80 °C.

2.4. Preparação das amostras para proteômica

As amostras de soro e urina foram descongeladas em banho de gelo. As amostras de soro foram submetidas a depleção de albumina de acordo com Colantonio et al. [16] com modificações. Uma alíquota de soro foi acrescida de 0,1 mol NaCl, homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida, acrescentou-se álcool etílico (concentração final de 42%), e as amostras foram novamente homogeneizadas e incubadas por 60 minutos. A mistura resultante foi centrifugada a 10.000g por 45 minutos a 4 °C e o pellet (pellet 1) foi recolhido. O pH do sobrenadante foi ajustado para 5,7 com acetato de sódio (pH 4,0). O sobrenadante com pH corrigido foi incubado por 60 minutos a 4 °C. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 10.000g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi descartado e o pellet (pellet 2) foi homogeneizado com o pellet 1 e eluído com 50 mmol TRIS-HCl pH 7,4.

A urina foi recentrifugada a 10.000g por 30 minutos a 4 °C para separar qualquer sedimento. O sobrenadante foi recolhido e submetido a concentração por filtração (Amicon® Ultra-3 Centrifugal filter, 3kDa, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 10.000g por 60 minutos a 4° C.

Após a preparação inicial das amostras de soro e urina, a mensuração da concentração de proteína total foi efetuada pelo método de Bradford e a leitura conduzida no nanoespectrofotômetro (UV – Vis – NanoDrop™ One/One c, Delaware, EUA). As concentrações de proteína total foram determinadas de acordo com uma curva padrão confeccionada com concentrações conhecidas de albumina bovina sérica (BSA).

As amostras foram preparadas para corrida de eletroforese SDS-PAGE, sob condições desnaturantes utilizando uma concentração de poliacrilamidas de 12% no gel de separação. A corrida foi conduzida a 15 mA/gel e voltagem máxima de 300 V e interrompida quando as amostras atingiram o gel de separação. O gel foi corado com Coomassie coloidal [17,18] e descorado para observação das bandas únicas. Então, as bandas foram recortadas e digeridas com tripsina.

A digestão trípica foi realizada de acordo com Shevchenko et al. [19] com modificações por Carvalho et al. [20]. Os fragmentos foram transferidos para microtubos e descorados (50% v/v acetonitrila [ACN] e 25 mM bicarbonato de amônio). A seguir os fragmentos foram desidratados com ACN 100% e realizada a redução e a alquilação. Uma segunda desidratação com 100 % de ACN foi conduzida. Para a redução das pontes dissulfeto e alquilação foi usado DTT e iodoacetamina, respectivamente. A digestão trípica foi realizada com solução de 20 ng/μL de tripsina (1: 50 de enzima: substrato, V5111, Promega trypsin, Promega Biotecnologia do Brasil LTDA, Brazil). A ação da tripsina foi bloqueada, os peptídeos eluídos e o volume reduzido em concentrador a vácuo (SPD1010 262 Integrated SpeedVac Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), à temperatura ambiente. As amostras foram armazenadas a – 80 °C.

2.5. Análise proteômica

As amostras foram diluídas (0,7 µg/µL) em 0,1% de ácido fórmico, centrifugadas e o sobrenadante separado para aplicação no espectrômetro de massas (4,5 µL). Para a separação foi utilizada uma coluna C18 (100 µm x 100 mm) RP-nano UPLC (Waters® nanoACQUITY UPLC®, Waters Corporation, Milford, MA, USA) acoplada ao espectrômetro de massas (Q-Tof, Micromass® Q-Tof PREMIER® Mass Spectrometer, Waters Corporation, Milford, MA, USA), com fonte *nanoelectrospray* utilizando um fluxo de 0,600 µL/minuto. Um gradiente (2-90%) de acetonitrila diluída em 0,1% ácido fórmico foi mantido por 45 minutos em uma voltagem de 3,5 kV, cone de voltagem de 30 V e temperatura da fonte de 100 °µC. O instrumento foi mantido em *top three*, e os espectros de massa (MS) foram adquiridos seguidos por MS/MS dos 3 mais intensos. Após a fragmentação (MS/MS), o íon foi mantido em uma lista de exclusão por 60 segundos para a análise dos peptídeos endógenos. Os parâmetros de procura incluíram tripsina como protease, com 1 clivagem máxima perdida, carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Uma tolerância de 0,1 Da foi estabelecida para os íons precursores (MS) e fragmentação (MS/MS), e massa molecular monoisotópica.

Os espectros foram adquiridos pelo MassLynx™ v.4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA, USA) e os dados brutos convertidos em uma lista de picos (.mgf, mascot generic format) sem adição dos *scans* e obtidos no banco de dados UniprotSProt [21] (<http://www.uniprot.org/>) taxonomia *Canis lupus familiaris*, usando os *softwares* Mascot version 2.3.02 e Mascot Distiller MDRO version 2.4.0.0 (Matrix Science Inc, Boston, MA, USA).

Os resultados foram analisados no Protein Pilot Software 4.0 (AB Sciex, Framingham, USA) para validar os peptídeos MS/MS e identificar as proteínas. Então, os dados foram inseridos no UniprotKB [22] (www.uniprot.org.br) e Phanter v.14.0 52 [23] (www.pantherdb.org) para obter a ontologia gênica usando as categorias função molecular, processo biológico e componente celular.

O *exponentially modified protein abundance index* (emPAI) obtido do *software* Mascot Distiller [24] foi usado para determinar a quantidade de cada

2439 proteína nas amostras.

2440

2441 **2.6. Análise estatística**

2442 As variáveis referentes aos exames clínico e laboratorial foram submetidas
2443 à análise de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e analisados pelo
2444 ANOVA *one-way* seguido pelo teste de Tukey.

2445 Os dados da proteômica foram normalizados por contagem única total para
2446 a retirada dos *ouliers* dividindo-se o valor do emPai da proteína de cada animal
2447 pela somatória da mesma em todas as amostras do grupo. As proteínas foram
2448 mantidas para análise quando 50% ou mais das amostras continha esta proteína,
2449 caso contrário foram excluídas do grupo ou da análise. Então, os dados
2450 normalizados foram analisados no software MetaboAnalyst versão
2451 (MetaboAnalyst 3.0) por análise uni e multivariada. A análise univariada foi
2452 ANOVA *one-way* seguida pelo teste exato de Fisher, considerando-se FDR >
2453 0,05. Já a análise multivariada foi baseada no *principal component analysis*
2454 (PCA) para descrever a separação dos grupos de acordo com as proteínas em
2455 uma matriz de escore. Também foi usado a *partial least squares analysis* (PLS-
2456 DA) que indica a relevância de cada proteína na caracterização dos grupos. O
2457 PSL-DA usado para calcular *variables in the projection score* (VIP score). As
2458 proteínas foram consideradas importantes no grupo no VIP score quando $\alpha >$
2459 2,0. Os resultados da ANOVA *one-way* foram comparados com o VIP score.

2460

2461 **3. Resultados**

2462 **3.1. Avaliação laboratorial**

2463 Na avaliação clínica e laboratorial (hemograma, bioquímica sérica e
2464 urinálise) dos cães não foram evidenciadas diferenças significativas entre os
2465 grupos (Tabela 1), exceto para SDMA, ureia, creatinina e fósforo. Para estas
2466 avaliações, de maneira geral, os grupos CG e CKDI não apresentaram diferença
2467 estatística, embora observadas diferenças com os outros grupos.

2468

Tabela 1. Média e desvio padrão dos resultados para a avaliação clínica e laboratorial (hemograma, bioquímicos séricos e urinálise) dos cães dos grupos CG, CKDI, CKDIII e CKDIV.

Parameter	Group			
	CG	CKDI	CKDIII	CKDIV
Clinical evaluation				
HR (bpm)	127.7 ± 16.1	121.4 ± 10.7	106.7 ± 2.3	104.0 ± 8.2
RR (mrm)	46.7 ± 18.9	37.1 ± 12.9	41.3 ± 16.2	38.1 ± 6.8
Temperature (°C)	38.5 ± 0.6	38.6 ± 0.6	37.7 ± 0.9	38.1 ± 0.2
SBP (mmHg)	123.3 ± 5.6	121.0 ± 10.2	113.3 ± 5.8	155.7 ± 31.5
Complete blood count (CBC)				
RBCs (x10 ⁶)	6.0 ± 2.4	4.8 ± 1.8	3.4 ± 1.5	3.6 ± 0.9
Hematocrit (Vg/%)	40.7 ± 16.3	33.1 ± 12.9	23.7 ± 9.8	25.8 ± 7.4
Hemoglobin (g/dL)	14.0 ± 5.5	11.2 ± 4.4	7.8 ± 3.4	9.1 ± 2.7
Protein (g/dL)	6.5 ± 0.3	7.8 ± 2.0	5.1 ± 0.2	7.7 ± 1.3
Platelets (x10 ³ /μL)	225 ± 67.8	276.1 ± 170.7	262.2 ± 152.3	319.9 ± 79.5
Leukocytes (x10 ³ /μL)	8,766 ± 2,064	10,084 ± 3,362	9,966 ± 5,484	9,887 ± 2,457
Biochemical evaluation				
SDMA (μg/dL)	8.7 ± 0.6 ^a	16.7 ± 1.0 ^a	47.3 ± 9.8 ^b	63.9 ± 8.8 ^c
Urea (mg/dL)	31.7 ± 13.6 ^a	108.8 ± 72.1 ^a	153.7 ± 73.3 ^{ab}	203.4 ± 17.5 ^b
Creatinine (mg/dL)	1.0 ± 0.3 ^a	1.2 ± 0.3 ^a	3.5 ± 0.3 ^b	5.6 ± 0.4 ^c
Phosphorus (mg/dL)	3.5 ± 0.0 ^a	3.7 ± 1.3 ^a	8.1 ± 3.4 ^{ab}	11.4 ± 3.8 ^b
Albumin (g/dL)	3.4 ± 0.3	2.0 ± 1.1	1.8 ± 0.4	2.2 ± 0.3
Sodium (mEq/L)	146.0 ± 1.41	155.0 ± 4.42	154.7 ± 0.60	152.0 ± 4.34
Potassium (mEq/L)	3.7 ± 0.07	3.9 ± 1.11	4.5 ± 0.90	3.8 ± 0.80
Urine analysis				
Densidade urinária	1,040 ± 0,012	1,022 ± 0.009	1,016 ± 0.003	1,011 ± 0.002
pH	5.80 ± 0.76	7.00 ± 1.29	7.20 ± 0.30	5.60 ± 0.51

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente entre os grupos (ANOVA, P < 0,05)

3.2. Proteômica

Na análise por espectrometria de massas foi identificado um total de 152 proteínas no soro e 188 proteínas na urina, contudo o número variou nos grupos

estudados (Figura 1).

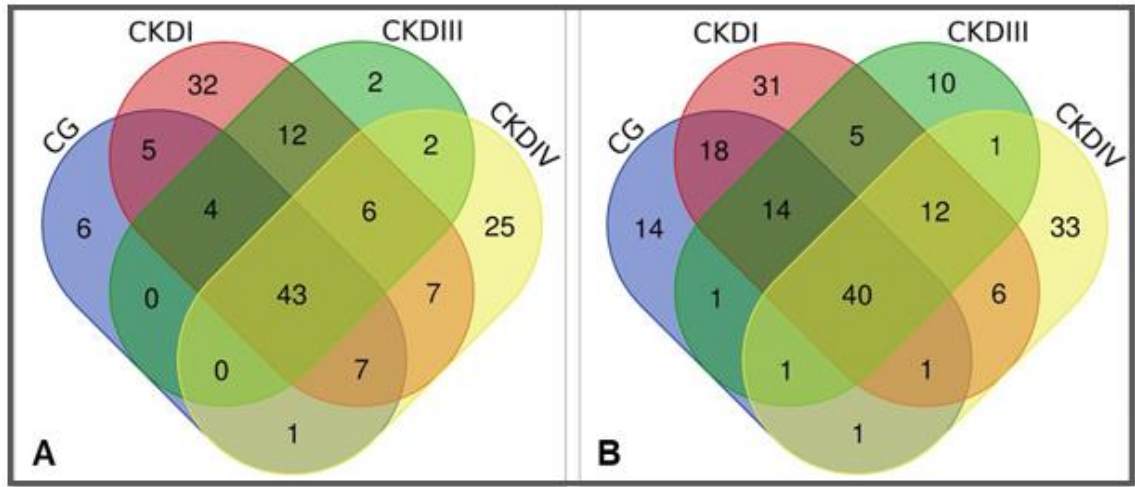


Figura 1. Diagrama de Venn da quantidade de proteínas encontradas no soro (A) e urina (B) de cães dos grupos CG, CKDI, CKDIII e CKDIV obtidas a partir de <https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

As proteínas em maior abundância identificadas na proteômica do soro e urina de cães dos grupos GC, CKDI, CKDIII e CKDIV foram submetidas a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). Uma proteína foi encontrada e destacada em maior abundância no soro do grupo controle e uma no grupo CKDI, estando acima da linha de corte, quando considerado VIP score com $\alpha > 2,0$ (Figura 2). Duas proteínas foram encontradas e destacadas em maior abundância na urina do grupo CKDIII, uma no grupo controle e uma no CKDI, estando acima da linha de corte, quando considerado VIP score com $\alpha > 2,0$ (Figura 3).

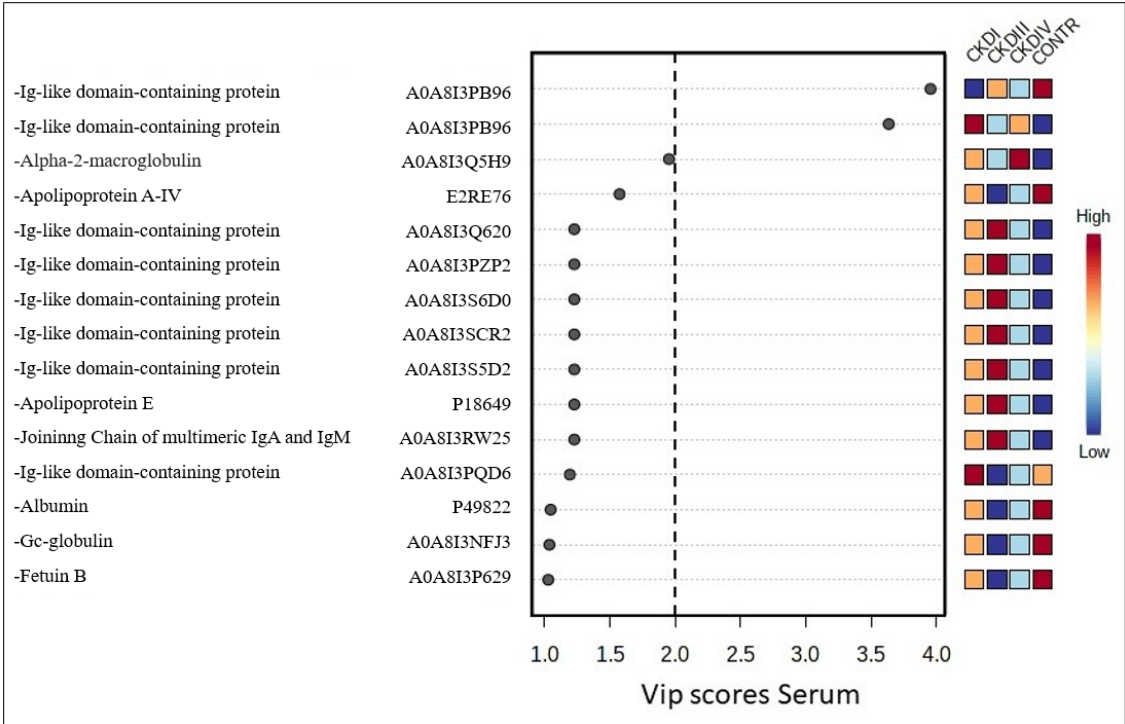


Figura 2. Vip score gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância no soro, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo CG, CKDI, CKDIII e CKDIV.

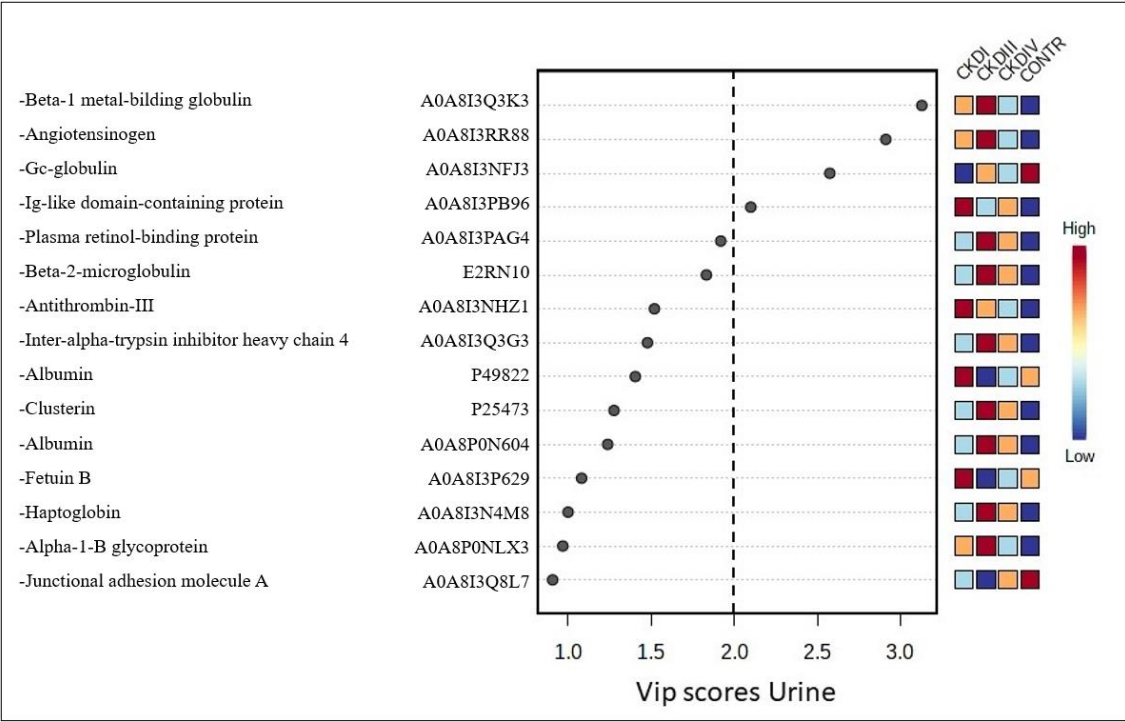


Figura 3. *Vip score* gerado pela análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), a partir das proteínas encontradas em maior abundância na urina, com destaque nas proteínas em que o $\alpha > 2,0$ (linha pontilhada). Caixas coloridas à direita indicam as concentrações relativas da proteína correspondente no grupo CG, CKDI, CKDIII e CKDIV.

As proteínas encontradas na urina e no soro foram ainda comparadas qualitativamente. Na comparação entre soro e urina, duas proteínas tiveram destaque nos grupos do estudados (Figura 4). Quando comparadas no soro ou urina independentemente, foi destacada uma proteína no soro (Figura 5) e 9 na urina (Figura 6).

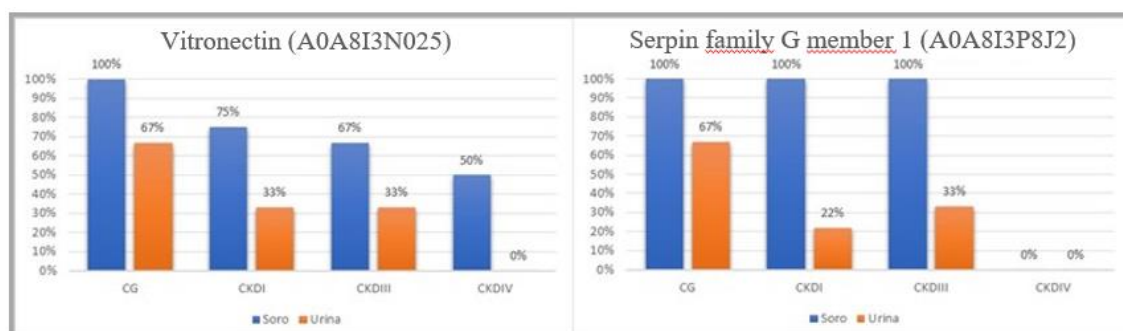


Figura 4. Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro e urina dos cães dos grupos CG, CKDI, CKDIII e CKDIV.

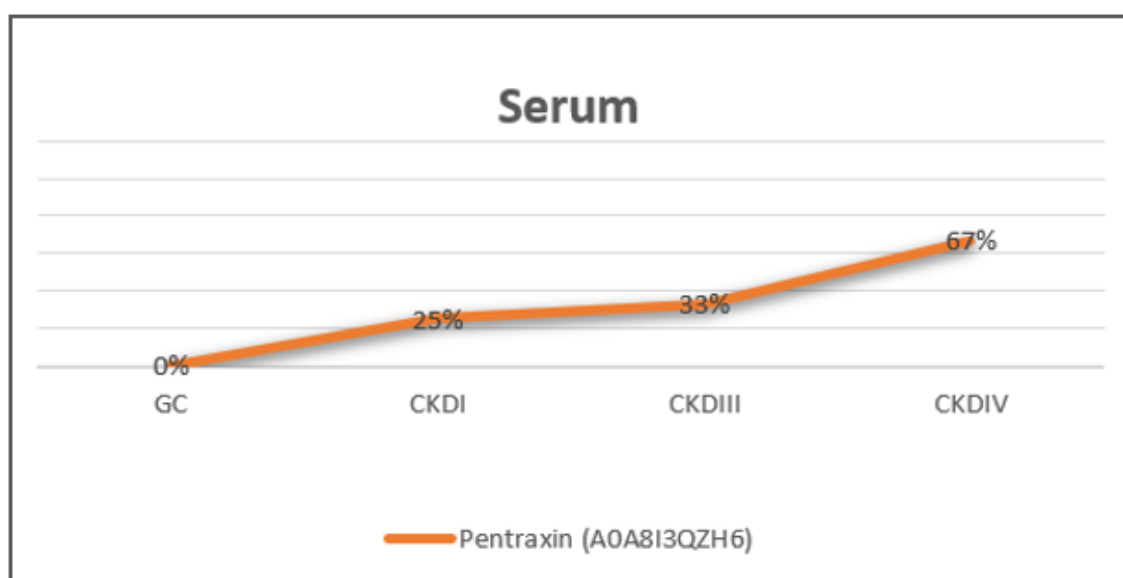


Figura 5. Comportamento das proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) no soro dos cães dos grupos (CG), (CKDI), (CKDIII) e (CKDIV).

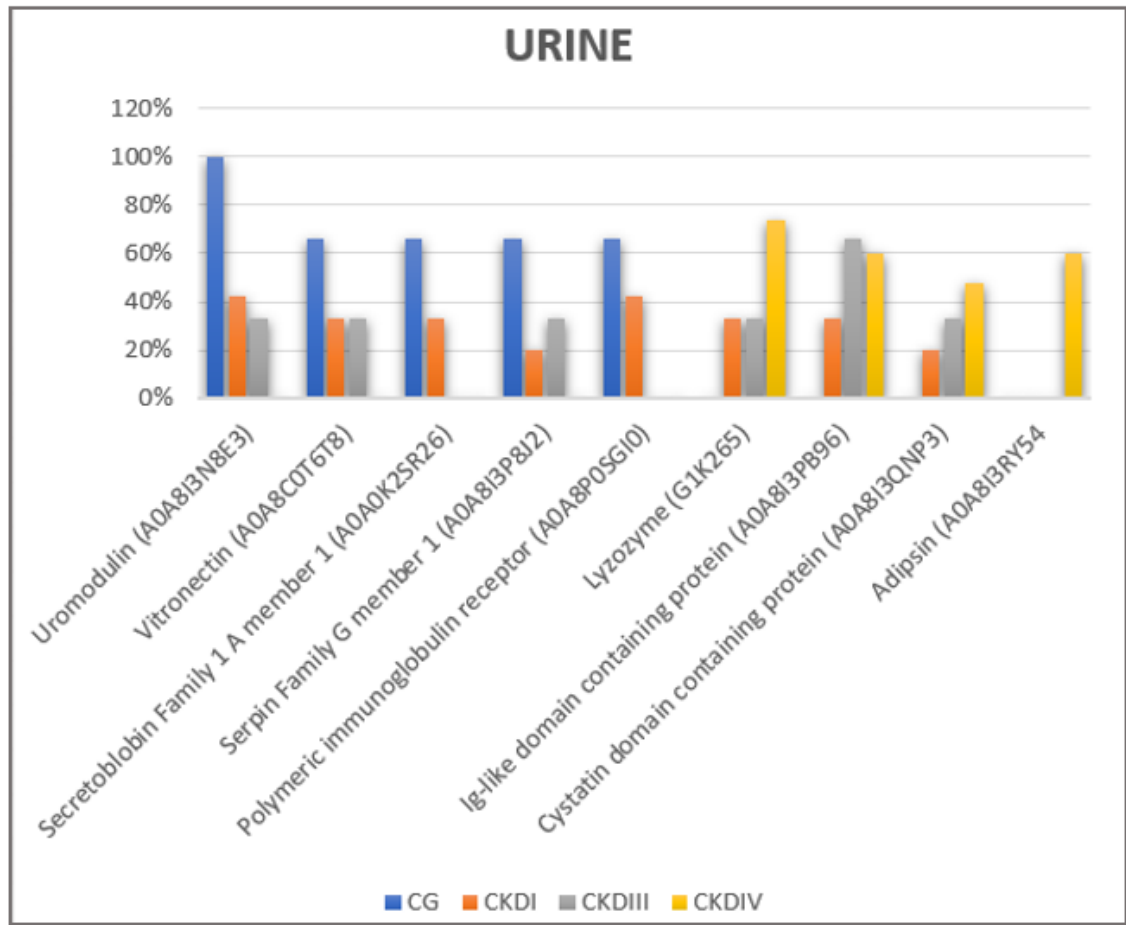


Figura 6. Proteínas destacadas qualitativamente pela presença (%) na urina dos cães dos grupos (CG), (CKDI), (CKDIII) e (CKDIV).

4. Discussão

4.1 Proteomica

A proteína *Ig-like domain-containing protein* (A0A8I3PB96) duplamente destacada no soro de animais do grupo controle e CKDI (Figura 2), é uma porção extracelular com três domínios Ig-like, contida em todas as proteínas [25]. DACKOWSKI e colaboradores [26], investigaram o papel da policistina-1 na tubulogênese e cistogênese a partir do uso de células epiteliais renais da linhagem de células renais caninas Madin-Darby (MDCK). Para isso, o estudo considerou mutações no gene PKD1 que codifica a policistina-1 na doença renal

policística e demonstrou que *Ig-like domains* formam fortes interações homofílicas e podem mediar a adesão entre células. Isso confere que domínios similares a Ig contendo proteínas que podem estar presentes em diferentes patologias, assim como no glaucoma [27], cinomose [28] e leptospirose [29,30], estando associados com funções distintas e, portanto, não diretamente ligada à CKD de ocorrência natural.

Outro estudo demonstrou que o rim em desenvolvimento expressa fatores de crescimento de fibroblastos (Fgf) tipo 1, 7, 8, 9, 10, 12 e 20, além de receptores (Fgfr) contendo o domínio Ig, sendo o Fgfr1 importante na formação do mesênquima metanéfrico. O estudo demonstrou que o receptor do tipo 1 do fator de crescimento de fibroblasto (FgfrL1) é um novo membro da família Fgfr, conhecido por interagir principalmente com Fgf8, podendo levar a disgenesia renal quando não expressado. Apesar de seu conhecimento associado à origem de estruturas renais, infere-se que com a progressão da CKD, esses domínios proteicos similares a Ig possam ser liberados com a perda da massa renal funcional e, portanto, identificados na análise proteômica [25].

Apesar de destacada no soro, a *Ig-like domain-containing protein* (A0A8I3PB96) também foi encontrada em maior abundância na urina de cães CKDI, CKDIV e CKDIII nessa ordem (Figura 3) e, em maior abundância no CKD III, CKDIV e CKDI nessa ordem (Figura 6). Um estudo associou o aumento dessa proteína na urina em cães com leishmaniose quando comparados com grupo controle, associando sua presença na urina com a capacidade de filtração glomerular [31], refletindo dano glomerular como apontado por KOVARIKOVA [32]. Quando considerados os cães CKD do presente estudo, considera-se não justificável tal correlação com quadro infeccioso, visto que na seleção, animais com comorbidades foram desconsiderados, sendo relevantes apenas aqueles com a CKD de ocorrência natural. Em seu estudo com cães CKD de ocorrência natural, HOKAMP e colaboradores [33] identificaram frações de excreção de IgM e IgG consideradas proteínas de alto peso molecular, estando correlacionada com danos glomerulares, enquanto a creatinina sérica correlacionou-se com danos túbulo intersticiais.

Embora no presente estudo, a causa primária da CKD não tenha sido investigada conforme determinado no estudo de HOKAMP e colaboradores [33], infere-se que cães CKDI, CKDIV e CKDIII possam ter apresentado danos

glomerulares justificando a presença de *Ig-like domain containing protein*. Não menos importante, o número de animais por grupo pode ter influenciado na ordem de abundância dessa proteína identificada pelo VIP score para $\alpha > 2$. Logo, devido a sua inespecificidade, mesmo destacadas múltiplas vezes entre os resultados obtidos, *Ig-like domain containing protein* não deve ser utilizado como biomarcador sérico em cães CKD, porém possibilitando sua utilização em urina, desde que os animais não tenham diagnóstico para leishmaniose. Com tudo, há necessidade de mais estudos como biomarcador na urina de cães CKD, com um maior n amostral, além da inclusão de um grupo CKDII.

A proteína *Beta-1 Metal Binding Globulin* (A0A8I3Q3K3) também conhecida como *serotransferrin* destacada na urina dos cães do grupo CKDIII (Figura 3), é uma proteína da família das transferrina associada ao transporte de ferro, resposta de fase aguda e estimulação da proliferação celular [34]. Um estudo com humanos, demonstrou que a *serotransferrin* na urina combinada à outras quatro proteínas podem ser utilizadas como biomarcadores de alta sensibilidade e especificidade para diagnosticar infarto do miocárdio [35], tendo também importância em patologias como estenose coronariana [36], diabetes mellitus tipo 2 [37] e no diagnóstico do câncer de próstata [34]. Mais recentemente, a *serotransferrin* foi desconsiderada na análise proteômica em pacientes humanos com câncer de próstata devido a sua abundância em amostras biológicas e falta de especificidade para o câncer.

A presença de *serotransferrin* na urina foi identificada em um modelo experimental com ratos intoxicados com urânio, estando relacionada com a perda de permeabilidade glomerular [38]. Adicionalmente, um estudo com humanos correlacionou a transferrina urinária com proteinúria glomerular [39] e em cães, foi demonstrado a presença de transferrina na urina de cães com nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X [40]. Em gatos, um estudo demonstrou que a perda de transferrina na urina antecede a de albumina e que, portanto, pode ser utilizada como biomarcador renal de precocidade na CKD [41], condição que pode ser considerada em cães CKD. Ainda, a concentração de transferrina pode sofrer influência do estado nutricional, tendo redução sérica em pacientes caninos em anorexia [42], sendo uma possível justificativa para o aumento da perda e identificação na urina em cães CKDIII e CKDIV [43], condizendo parcialmente com o achado no presente estudo. Com tudo, cães

CKDIII apresentaram maior abundância, seguido de CKDI e CKDIV, demonstrando ausência de correlação direta dessa proteína na urina com a progressão da doença, ou quem sabe havendo influência nos resultados do baixo n amostral.

A proteína *angiotensinogen* (A0A8I3RR88) foi mais abundante em cães CKDIII, depois CKDI e CKDIV, não demonstrando correlação perfeita com a progressão da doença, tendo seu comportamento semelhante a *serotransferrin* (Figura 3). No entanto, sabe-se com base em um estudo em humano com CKD que o *angiotensinogen* urinário é um biomarcador potencial da atividade da angiotensina II intrarrenal, componente envolvido com o processo de deterioração da função renal em pacientes renais crônicos [44], marcador este que possivelmente reflete a deterioração renal nos cães avaliados no presente estudo, porém momentaneamente limitado pelo pequeno número de amostras avaliadas para animais CKDIII quando comparados a CKDI e CKDIV. Em complemento, um estudo desenvolvido KOBORI e NAVAR [45] apontou o *angiotensinogen* como biomarcador da hipertensão, vista sua capacidade de ativar o sistema renina angiotensina aldosterona, condição verificada não só em humanos, mas também em animais, a exemplo dos cães do presente estudo, porém não específica da CKD, podendo estar presente em momentos em que a CKD não esteja presente.

Ainda em relação ao *angiotensinogen* urinário, um estudo desenvolvido por KOBORI e colaboradores [46] demonstrou seu potencial como biomarcador de severidade da CKD, estando positivamente correlacionado com a razão albumina/creatinina urinária, fração de excreção do sódio, e razão proteína/creatinina urinária, além de correlação negativa com a TFG. Recentemente, um estudo com pacientes humanos demonstrou que maiores níveis urinários desta molécula podem estar relacionados com o caráter progressivo da CKD, podendo essa correlação ainda sofrer influência do índice de massa corporal e albuminúria [47]. Sendo assim, apesar da escasses de estudos em cães CKD, considera-se que o *angiotensinogen* possa atuar como biomarcador de função renal, progressão da DRC e ainda, indiretamente, prognóstico.

A *Gc-globulin* também conhecida por *Vitamin D-binding protein* (A0A8I3NFJ3) foi mais abundante no grupo controle, depois CKDIII, CKDIV e

CKDI, não demonstrando uma sequência lógica na progressão da CKD (Figura 3). Essa proteína se liga à megalina no lúmen dos túbulos renais e evita a perda urinária de 25 hidroxivitamina D [48]. Em humanos, pode ser encontrada na urina de indivíduos saudáveis [49], condizente com a maior concentração em cães do grupo controle deste estudo. Por outro lado, CHACAR e colaboradores [50], em um estudo com cães, não encontraram a presença de *Vitamin D-binding protein* na urina de cães saudáveis. Um estudo desenvolvido com ratos e humanos, demonstrou essa proteína como um biomarcador de dano tubulointersticial não dependente de albuminúria em ratos e indicador de severidade de lesão renal em humanos, estando associada com marcadores tubulares e inflamatórios, apresentando resposta positiva com a implementação do tratamento renoprotetor [51]. Nos animais deste estudo, cães em estádios mais avançados da doença apresentaram maior abundância podendo indicar correlação com a progressão da doença, entretanto contrapondo o grupo controle que se destacou, trazendo assim, inconsistências.

Na estratificação de cães com CKD em diferentes estádios, cães CKDI e CKDII, a presença de *Vitamin D-binding protein* foi identificada em animais não proteinúricos ou proteinuricos borderline, diferente de cães em estádios mais avançados, como CKDIII e CKDIV, em que a redução na expressão da proteína de Tamm-Horsfall foi verificada [50]. Logo, *Vitamin D-binding protein* foi associada com a detecção de injúria renal precoce, enquanto Tamm-Horsfall com progressão da doença linkada aos estádios mais avançados. Esses dados conferem com os achados na razão proteína/creatinina urinária nos cães do grupo controle que se apresentaram proteinúricos borderline. Por outro lado, contrapõe os achados em cães CKDI que se apresentaram proteinúricos, entretanto não houve um grupo CKDII além do baixo n amostral dos outros grupos, o que poderia direcionar os resultados de forma mais constante.

Na avaliação comparativa qualitativa de proteínas no soro e urina de cães foi observado comportamento relevante com a progressão da CKD (Figuras 4 e 6) para a proteína *Vitronectin* (A0A8C0T6T8). A *vitronectin* é uma glicoproteína de aderência multifuncional encontrada na circulação e em diferentes tecidos [52], já tendo sido descrita como estando presente em tecido conjuntivo frouxo em tecidos renais a partir de avaliação por imunofluorescência [53]. A *vitronectin* e seu receptor podem apresentar papéis importante em processos fisiológicos e

patológicos dos rins podendo se ligar a proteínas de membrana plasmática, regulando processos de adesão, migração, diferenciação, inflamação, reação imunológica e remodelamento tecidual [54]. Na DRC, a *vitronectin* é uma proteína da matriz extracelular que se acumula no interstício durante a fibrose renal [55], tendo então relevância em pacientes humanos e caninos com CKD. A deposição de *vitronectin* já foi detectada em processos de fibrose e necrose [56, 57], podendo estar ligada com as reduções sérica e urinária verificada nos cães deste estudo, considerando o quadro de progressão da doença, bem como a possível instalação de processo fibrótico associado ao tecido renal na CKD. Um estudo demonstrou que a avaliação urinária dessa proteína é uma importante ferramenta para monitorar processos fibróticos em quadros de transplante renal [58]. Adicionalmente, YOON e colaboradores [59] apontaram que os níveis de *vitronectin* reduzem com a idade, condição esta esperada em cães CKD, visto que, animais acometidos pela doença tendem em sua maioria apresentar idade mais avançada. Complementarmente, a redução pode estar associada com o acúmulo da proteína no interstício renal. Logo, considerando o caráter fibrótico da CKD e o avanço dos estádios da doença, considera-se a *vitronectin* como potencial biomarcador não só em humanos, mas também, em cães, claramente demonstrado pela redução gradativa e pareada tanto no soro como urina nos grupos estudados.

Na avaliação comparativa qualitativa de proteínas no soro e urina de cães foi observado comportamento relevante com a progressão da CKD (Figuras 4 e 6) para a proteína *Serpin Family G member 1* (A0A8I3P8J2). A *Serpin Family G member 1* é um inibidor da esterase do complemento I sendo expresso no fígado, rim, pulmão, coração e cérebro [60]. Essa proteína pertence a uma família de proteínas envolvidas em processos inibitórios, de armazenamento e transporte, podendo ser encontrada em diversos tecidos no corpo, tendo sua maior concentração, extracelular. Ainda, o grupo ao qual está inclusa a *Serpin Family G member 1*, desempenha funções fisiológicas específicas importantes voltadas para o transporte hormonal, ligação a corticosteróides, coagulação e regulação da pressão sanguínea [61], funções estas influenciadas em certo grau pela atividade renal. Conforme NI e colaboradores [62], a *Serpin Family G member 1* possui importante função da injúria renal aguda (IRA), promovendo a

2705 perpetuação de macrófagos anti-inflamatórios, prevenindo a IRA séptica,
2706 podendo assim, atuar como biomarcador de predição da resposta ao tratamento
2707 com altas doses de ascorbato. Diferente do foco de muitos estudos, essa
2708 proteína não parece ter importância biológica na monitoração da CKD em
2709 humanos ou em cães pelo soro, visto que na avaliação qualitativa, os níveis
2710 séricos mantiveram um nível alto para os grupos CG, CKDI e CKDIII (Figura 5).
2711 Sabe-se que é uma glicoproteína de fase aguda, produzida no fígado e secretada
2712 na circulação [63,64], tendo importância para os rins com relação a proteção anti-
2713 apoptótica e anti-inflamatória na injúria por reperfusão ou isquemia renal [65],
2714 condições estas não avaliadas no estudo. Enquanto isso, a avaliação urinária,
2715 demonstrou redução nos grupos CKD em comparação ao grupo controle.
2716 Embora certa discrepância tenha sido observada entre os grupos CKDI e CKDIII,
2717 e se considere a *Serpin Family G member 1*, um biomarcador de IRA em
2718 humanos [66], sugere-se que essa proteína possa também ter efeito na
2719 monitoração da progressão da CKD, principalmente quando um processo
2720 inflamatório está presente, porém podendo sofrer influência negativa nos
2721 pacientes estabilizados, portanto estudos mais detalhados são necessários.

2722 Na avaliação isolada qualitativa do soro de cães CKD deste estudo, a
2723 proteína *Pentaxin* ou *Pentraxin* (A0A8I3QZH6) demonstrou comportamento
2724 crescente de acordo com a progressão da doença (Figura 5). A *Pentaxin* também
2725 conhecida como *Pentraxin* pertence a uma superfamília de pentraxinas e família
2726 de pentraxina de ligação dependente de Ca^{2+} [21], dentre as quais a proteína
2727 C-reativa (*pentraxin* curta) está inclusa [67, 68]. Nos animais do presente estudo,
2728 os níveis séricos de *Pentaxin* foram aumentando conforme a CKD progrediu,
2729 resultando em maiores níveis séricos de *Pentaxin* em cães CKDIV. Na avaliação
2730 dos níveis séricos de *Pentraxin* 3, um estudo demonstrou que em pacientes
2731 humanos com CKD, os níveis plasmáticos mostraram-se elevados, aumentando
2732 significativamente após sessão de hemodiálise, evidenciando o caráter
2733 inflamatório do procedimento [69], recentemente evidenciado também pela
2734 avaliação sérica da proteína C-reativa [70]. Embora os animais deste estudo não
2735 tenham sido submetidos a hemodiálise, além de se apresentarem estáveis sem
2736 indícios de processo inflamatório, percebeu-se aumento progressivo de
2737 *Pentraxin* com o avanço do estágio da doença.

Estudos com culturas celulares, demonstraram que as células mesangiais e epiteliais tubulares sintetizam pentraxinas em resposta a um estímulo inflamatório [71, 72], condição que pode estar presente em pacientes humanos e animais com CKD. Em pacientes humanos com CKD, a *pentraxin 3* plasmática aumentou com a redução da TFG, tornando-se mais expressiva nos estádios mais avançados, mantendo níveis menores nos indivíduos do grupo controle [68]. Esse achado condiz com os cães CKD do presente estudo, visto que cães CKDIV apresentaram os maiores níveis, quando comparados com CKDIII, CKDI e CG, respectivamente. Isso permite a inferência que em cães, assim como em humanos, a progressão da CKD associada a redução da TFG, leva ao acúmulo e respectivo aumento sérico de *Pentraxin*, podendo assim ser utilizado como potencial biomarcador de progressão e avaliação da TFG em cães.

Na avaliação qualitativa da urina, a *Serpin Family G member 1* (A0A8I3N8E3) também conhecida como Uromodulin mostrou declínio gradativo inverso a piora da CKD (Tabela 6). A *Uromodulin*, também conhecida como Tamm-Horsfall *protein*, é a proteína mais abundantemente produzida nos rins e excretada na urina sob condições fisiológicas normais [73], coincidindo precisamente com animais do CG do presente estudo, visto que com o avanço nos estádios, os níveis urinários foram reduzindo, chegando ao grupo CKDIV com percentual qualitativo próximo de zero. Funcionalmente, a *Uromodulin* está envolvida no balanço hídrico e eletrolítico, imunidade inata do rim, proteção contra infecções do trato urinário e proteção contra a formação de cálculos [21].

A *Uromodulin* é uma proteína que pode sofrer mutações no gene que a codifica e por isso levar à ocorrência de doenças renais associadas a *uromodulin* causando a retenção e agregação da forma mutante da proteína no reticulo endoplasmático, levando a uma disfunção do ramo ascendente espesso da alça de Henle. Isso culmina com dificuldade de concentração da urina, hiperuricemia, além da redução urinária da *uromodulin*, podendo estar associada com defeitos na capacidade de transporte da proteína através da membrana tubular [73], 2011). A retenção dessa proteína pode culminar em danos e necrose celular, levando a ocorrência de fibrose e inflamação, podendo assim, resultar em risco aumentado de ocorrência da CKD. O mecanismo envolvido na redução da excreção de *uromodulin* pode estar associado com o observado no presente

2771 estudo com cães DRC, entretanto, não se pode afirmar, visto a incredibilidade
2772 em relação aos cães terem ou não mutação no gene codificador da *uromodulin*.

2773 Ainda, não menos importante, VYLETAL e colaboradores [74] pontuou
2774 que os depósitos de *uromodulin* podem estar associados com infiltrado
2775 inflamatório, condição que pode estar presente na CKD. Da mesma forma, a
2776 excreção urinária de *uromodulin* está diretamente correlacionada com a TFG.
2777 Assim, infere-se que os cães CKD deste estudo, por terem redução da TFG,
2778 expressaram menor proporção de *uromodulin* na urina. A utilização da
2779 *uromodulin* urinária como biomarcador da DRC levantou questionamentos em
2780 relação a sua precisão em um estudo realizado por PRAJCZER e colaboradores
2781 [75]. Nesse estudo, realizado com 77 pacientes humanos com CKD, 22%
2782 apresentaram níveis normais de *uromodulin* na urina, diferente dos achados do
2783 presente estudo, em que a avaliação qualitativa demonstrou redução apreciável
2784 da *uromodulin* urinária em cães CKD à medida que a doença progredia em
2785 comparação aos cães controle. Esse contraste, com foco no presente estudo,
2786 coincide com os achados em um estudo metabolômico e proteômico realizado
2787 em cães saudáveis e CKD por FERLIZA e colaboradores [76], concordando
2788 ainda com estudos prévios [77]. Logo, considera-se a *uromodulin* como possível
2789 biomarcador da DRC.

2790 Ainda na avaliação qualitativa da urina a *Secretoglobin Family 1 A*
2791 *member 1* (A0A0K2SR26) esteve presente em parte nos animais saudáveis CKD
2792 I, porém ausente nos estádios avançados da doença (Figura 6). A *Secretoglobin*
2793 *Family 1 A member 1*, também conhecida como *Uteroglobin* é uma proteína
2794 semelhante a citocina, imunomoduladora e dependente de esteróide [78, 79],
2795 atuando como agente anti-inflamatório no trato respiratório e urogenital [80],
2796 podendo ser secretada pela mucosa epitelial de quase todos os órgãos dos
2797 mamíferos, e assim, detectada no sangue [81, 82] e urina [83]. Considerando o
2798 foco do presente estudo, a investigação de *Uteroglobin* na urina não cães não
2799 foi até então relatada. Um estudo desenvolvido por LEE e colaboradores [84]
2800 demonstrou a importância da *Uteroglobin* na prevenção experimental de
2801 glomerulonefrite, evitando a deposição de imunoglobulina no glomérulo,
2802 reforçando sua capacidade imunomoduladora, condição também discutida por
2803 ZHENG e colaboradores [85]. Essa proteína é demonstrada como importante na

2804 prevenção de doença renal causada pela deposição anormal de fibronectina e
2805 colágeno no glomérulo [79], entretanto, não se tem na literatura, uma
2806 investigação acerca da correlação entre níveis urinários da proteína e
2807 progressão da doença. Pode-se afirmar com base nos achados do presente
2808 estudo, que a *Uteroglobulin* está presente em cães do GC conforme demonstrado
2809 pela análise qualitativa. Por outro lado, acredita-se que esta possa ter alguma
2810 relação com a perda de massa renal funcional vista a redução expressiva ou nula
2811 na avaliação em cães CKDIII e CKDIV.

2812 *Polymeric immunoglobulin receptor* (A0A8P0SGI0) é uma proteína
2813 responsável pela mediação da passagem de polímeros de IgA e IgM da
2814 superfície basolateral para o lado apical de células epiteliais e a subsequente
2815 secreção nos fluidos da mucosa [86]. Nos animais deste estudo, cães CKD3 e
2816 CKD4 apresentaram níveis expressivamente reduzidos quando comparados
2817 com cães CKD1 e CG (Figura 6). De acordo com HE e colaboradores [87], a
2818 proteína *Polymeric immunoglobulin receptor* está associada com a disfunção
2819 renal. Para isso, um estudo desenvolvido por KRAWCZYK e colaboradores [88]
2820 em humanos, demonstrou que essa proteína está expressa no glomérulo e nos
2821 túbulos renais proximais, cuja qual, tem sua expressão tubular aumentada na
2822 DRC, culminando com níveis aumentados de IgA na urina de indivíduos com
2823 injúria renal. No presente estudo, a correlação entre IgA e a expressão de
2824 *polymeric immunoglobulin receptor* não foi avaliada. HE e colaboradores [87]
2825 demonstraram que na urina de humanos, a proteína em contexto aumentou com
2826 a progressão da CKD, diferente do que foi encontrado no presente estudo.
2827 Sendo assim, acredita-se que a *polymeric immunoglobulin receptor* tenha
2828 comportamento contrário a aquele identificado em humanos. Ainda, questiona-
2829 se a influência da lesão glomerular em humanos e cães CKD em relação aos
2830 níveis presente da proteína em discussão na urina.

2831 A *Lysozyme* (G1K265) apresentou progressão na análise qualitativa com
2832 o avanço no estágio da CKD nos animais do presente estudo e ausência
2833 completa em cães do grupo controle (Figura 6). A *Lysozyme* é uma proteína
2834 degradada principalmente nos rins, filtrada no glomérulo e depois reabsorvida
2835 nos túbulos proximais [89], sendo essa capacidade de reabsorção limitada.
2836 Dessa forma, na doença renal, a *Lysozyme* pode aparecer na urina em

2837 detrimento de dois possíveis cenários, podendo explicar a sua presença na urina
2838 de cães DRC do presente estudo. Primeiro pela disfunção tubular,
2839 impossibilitando a atividade de recaptação da proteína de dentro dos túbulos
2840 renais para a circulação peritubular, e segundo pela saturação da capacidade de
2841 reabsorção devido ao limiar máximo ter sido atingido [90]. Um estudo
2842 desenvolvido por Biewenga e colaboradores em 1978, comparando cães
2843 saudáveis e cães com doenças renais, sem especificidade para DRC apenas,
2844 demonstrou que cães com TFG reduzida apresentaram maiores níveis de
2845 *Lysozyme* na urina, enquanto cães saudáveis não apresentaram essa proteína
2846 na urina, coincidindo com os achados deste estudo, visto que cães com CKD
2847 tendem a apresentar TFG reduzida.

2848 A presença dessa proteína na urina foi relatada também em cão com
2849 leucemia mieloide aguda sem falência renal, a partir da utilização da técnica de
2850 eletroforese, identificando proteinúria de origem tubular [91]. Logo, embora tenha
2851 importância no diagnóstico da CKD, é válido associar sua presença em quadros
2852 extrarrenais. Ainda, em cães com DRC de ocorrência natural, um estudo
2853 desenvolvido por KRALOVA e colaboradores [92], demonstrou que a ureia,
2854 creatinina e fósforo séricos possuem correlação positiva com o aumento sérico
2855 de Lisozima em cães com CKD. Dessa forma, altos níveis séricos de lisozima
2856 são esperados com a progressão da doença renal crônica, visto que conforme
2857 demonstrado pela [15], maiores níveis de creatinina são esperados em cães com
2858 estádios mais avançados da doença, coincidindo fortemente com os achados do
2859 presente estudo. Essa teoria reforça os mecanismos envolvidos na patogenia da
2860 proteinúria renal apresentados por BEETHAM e CATTELL [90], justificando a
2861 presença de Lisozima na urina de cães CKD e ausência na urina de cães
2862 saudáveis, ressaltando sua importância como potencial biomarcador de
2863 progressão da CKD em cães.

2864 Qualitativamente ainda observou destaque na urina a proteína *Cystatin*
2865 *domain containing protein* (A0A8I3QNP3) (Figura 6). A *Cystatin domain*
2866 *containing protein* possui completa similaridade com *Cystatin-C-like* [21] e é
2867 considerada uma proteína inibidora das cisteíno-proteases. Em geral as
2868 cistatinas formam complexos com suas enzimas alvo na proteção dos tecidos do
2869 hospedeiro contra a destruição proteolítica [93]. Nos animais do estudo, essa

2870 proteína demonstrou aumento com a progressão da CKD, estando ausente em
2871 cães do grupo controle e mais expressa em cães CKD4 quando comparados
2872 com CKD3 e CKD1, respectivamente. Fisiologicamente, a cistatina C é filtrada
2873 livremente no glomérulo e totalmente reabsorvida no túbulo contorcido proximal,
2874 sendo utilizada para avaliar a TFG, bem como tendo importância no que tange a
2875 capacidade de recaptação desta proteína a nível tubular [94,95]. Logo, infere-se
2876 que nos cães deste estudo, o avanço da CKD associado a incapacidade de
2877 reabsorção tubular, resultou em aumento progressivo dos níveis de *Cystatin*
2878 *domain containing protein* na urina. Em estudo com cães com leishmaniose, a
2879 investigação da presença de cistatina C na urina foi performeda e demonstrado
2880 que em cães com estádios mais avançados, a cistatina C aumentou,
2881 especificamente em cães com níveis séricos de creatinina maior que 1,4 md/dL
2882 [96]. Esse achado coincide com o encontrado no presente estudo, vista a
2883 progressão na avaliação qualitativa dos cães CKD quando comparados com
2884 aqueles do grupo controle. Ainda, os cães CKD dos estádios mais avançados
2885 como CKD3 e CKD4, demonstraram maior expressão qualitativa de *Cystatin*
2886 *domain containing protein* e também valores aumentados de ureia condizentes
2887 com o observado por GARCÍA-MARTÍNEZ e colaboradores [96], com creatinina
2888 de 3,5 mg/dL e 5,6 mg/dL para cães CKD3 e CKD4, respectivamente. Dessa
2889 forma, a *Cystatin domain containing protein* pode ser apontada como potencial
2890 biomarcador de progressão da DRC e não de precocidade, visto seu
2891 comportamento similar a Cistatina C puramente, estando em níveis baixos na
2892 urina de indivíduos saudáveis conforme apontado por GRUBB [97], coincidindo
2893 com cães sem CKD deste estudo.

2894 A última, mas não menos importante proteína destacada qualitativamente
2895 na urina foi a *Complement Factor D* (A0A8I3RY54) também conhecida como
2896 *Adipsin*, expressada apenas em cães do grupo CKDIV (Figura 6), hipotetizando
2897 possível correlação com estágio terminal da CKD. Esta é uma enzima essencial
2898 da rota alternativa do sistema complemento, cuja concentração sérica pode
2899 aumentar em cerca de 10 vezes em pacientes com doença renal em estágio
2900 terminal [98]. Essa proteína é inicialmente filtrada no glomérulo e catabolizada
2901 após reabsorção nos túbulos proximais, sendo o processo de reabsorção
2902 passível de saturação [99], podendo justificar seu aparecimento na urina em

2903 cães com lesões renais, assim como supracitado para a lisozima. A
2904 concentração sérica dessa proteína foi demonstrada por VOLANAKIS e
2905 colaboradores [100] como tendo correlação positiva com os níveis séricos de
2906 creatinina. Dessa forma, na avaliação dos diferentes estádios da CKD, em
2907 função dos níveis de creatinina, espera-se que quanto mais avançado o estágio
2908 da doença, como nos estádios CKDIII e CKDIV em cães, maiores serão os níveis
2909 séricos do fator D do sistema complemento. Assim, considerando a saturação
2910 tubular e defeitos de transporte tubular em pacientes CKD, espera-se identificar
2911 seu aparecimento na urina, conforme visto em cães CKDIV do presente estudo.
2912 Em humanos com doença renal, MIYATA e colaboradores [101] demonstraram
2913 que a concentração do fator D na urina de indivíduos normais foi próxima de
2914 zero, enquanto em indivíduos com doença renal, os achados em urina foram
2915 significativos. Esses resultados confluem consideravelmente com os cães do
2916 estudo quando se considera os cães do grupo controle e estádios iniciais da
2917 CKD, ao passo em que o achado isolado da proteína em cães CKDIV apenas,
2918 podem ser justificados pelo estudo de PASCUAL e colaboradores [98] no que
2919 tange aos estádios terminais da doença. Assim sendo, a lisozima é cogitada
2920 como biomarcador de gravidade na CKD, não apresentando evidência de sua
2921 utilização como biomarcador em cães com CKD em estádios iniciais.

6. Conclusão

Na proteômica do soro e urina de cães foram destacadas 12 proteínas, demonstrando relação com a função renal e conseqüentemente com a progressão da DRC. Portanto, a proteômica por espectrometria de massas é uma ferramenta viável para analisar o proteoma sérico e urinário de cães com DRC nos estádios I, III e IV, identificando as proteínas *Ig-like domain-containing protein*, *Serpin Family G member 1* e *Pentraxin* como potenciais biomarcadores séricos e as proteínas *Beta-1 Metal Binding Globulin*, *angiotensinogen*, *Gc-globulin*, *Vitronectin*, *Serpin Family G member 1*, *Secretoblobin Family 1 A member 1*, *Polymeric immunoglobulin receptor*, *Lysozyme*, *Cystatin domain containing protein* e *Complement Factor D* como potenciais biomarcadores urinários, tanto do declínio da função renal, como da diferenciação dos estádios I, III e IV da DRC.

Agradecimentos e apoio

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)". Agradecimento aos laboratórios de análises do Setor de Reprodução Animal da FMVZ – Unesp – Campus de Botucatu. Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) pela realização da Espectrometria de Massas das amostras do estudo.

Referências

- [1] C.P. Kovesdy, S.M. George, J.E. Anderson, K. Kalantar-Zadeh, Outcome predictability of biomarkers of protein-energy wasting and inflammation in moderate and advanced chronic kidney disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 90 (2) (2009) 407-414. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27390>
- [2] L. Pelander, I. Ljungvall, A. Egenvall, H. Syme, J. Elliott, J. Haggstrom, Incidence of and mortality from kidney disease in over 600,000 insured Swedish

- 2953 dogs. Vet. Rec. 176 (25) (2015) 1-7. <https://doi.org/10.1136/vr.103059>
- 2954 [3] M.B. Nabity, G.E. Lees, L.J. Dangott, R. Cianciolo, J.S. Suchodolski, J.M.
 2955 Steiner, Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of
 2956 tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. Vet.
 2957 Clin. Pathol. 40 (2) (2011) 222–236. [https://doi.org/10.1111/j.1939-](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x)
 2958 [165X.2011.00307.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00307.x)
- 2959 [4] M.B. Nabity, Traditional Renal Biomarkers and New Approaches to
 2960 Diagnostics. Toxicol. Pathol. 46 (8) (2018) 999-1001.
 2961 <https://doi.org/10.1177/0192623318800709>
- 2962 [5] P. Ghodasara, P. Sadowski, N. Satake, S. Kopp, P.C. Mills, Clinical veterinary
 2963 proteomics: Techniques and approaches to decipher the animal plasma
 2964 proteome. Vet. J. 230 (2017) 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.022>
- 2965 [6] L.E. Brandt, E.J. Ehrhart, H. Scherman, C.S. Olver, A.A. Bohn, J.E. Prenni,
 2966 Characterization of the canine urinary proteome. Vet. Clin. Pathol. 43 (2) (2014)
 2967 193–205. <https://doi.org/10.1111/vcp.12147>
- 2968 [7] M. Hormaeche, E. Carretón, J. González-Miguel, S. Gussoni, J.A. Montoya-
 2969 Alonso, F. Simón, R. Morchón, Proteomic analysis of the urine of *Dirofilaria*
 2970 *immitis* infected dogs, Vet. Parasitol. 203 (1-2) (2014) 241-246.
 2971 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.025>
- 2972 [8] E. Ferlizza, G. Isani, F. Dondi, G. Andreani, K. Vasylyeva, E. Bellei, A.M.
 2973 Almeida, M. Matzapetakis, Urinary proteome and metabolome in dogs (*Canis*
 2974 *lupus familiaris*): the effect of chronic kidney disease. J. Proteome 222 (2020) 1-
 2975 9. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103795>
- 2976 [9] L. Pelander, V. Brunchaultb, B. Buffin-Meyer, J. Kleinb, B. Breuilb, P. Zürbigd,
 2977 P. Magalhãesd, W. Mullenf, J. Elliottg, H. Symeh, J.P. Schanstrab, J.
 2978 Häggströma, I. Ljungvalla, Urinary peptidome analyses for the diagnosis of
 2979 chronic kidney disease in dogs, Vet. J. 249 (2019) 73-79.
 2980 <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.05.010>
- 2981 [10] D. Escribano, H. Cihan, S. Martínez-Subiela, P. Levent, M. Kocaturk, N.
 2982 Aytug, J.J. Cerón, A. Tvarijonaviciute, Z. Yilmaz, Changes in serum proteins in
 2983 dogs with Ehrlichia canis infection. Microb. Pathog. 113 (2017) 34–39.
 2984 <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.10.024>
- 2985 [11] L. Franco-Martínez, M. Villar, A. Tvarijonaviciute, D. Escribano, L.J. Bernal,
 2986 J.J. Cerón, M.del.C. Thomas, L. Mateos-Hernández, F. Tecles, J. de la. Fuente,

- 2987 M.C. López, S. Martínez-Subiela, Serum proteome of dogs at subclinical and
 2988 clinical onset of canine leishmaniosis, *Transboundary Emerg. Dis.* 67 (1) (2020)
 2989 318-327. <https://doi.org/10.1111/tbed.13354>
- 2990 [12] P. Bilić, N. Guillemin, A. Kovačević, B.B. Ljubić, I. Jović, A. Galan, P.D.
 2991 Eckersall, R. Burchmore, V. Mrljak. Serum proteome profiling in canine idiopathic
 2992 dilated cardiomyopathy using TMT-based quantitative proteomics approach, *J.*
 2993 *Proteom.* 179 (2018) 110-121. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.007>
- 2994 [13] A. Tvarijonaviciute, A.M. Gutiérrez, I. Miller, E. Razzazi-Fazeli, F. Tecles, J.J.
 2995 Ceron, A proteomic analysis of serum from dogs before and after a controlled
 2996 weight-loss program, *Domest. Anim. Endocrinol.* 43 (4) (2012) 271-277.
 2997 <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2012.04.004>
- 2998 [14] L.G. González-arostegui, C.P. Rubio, J.J. Cerón, A. Tvarijonaviciute, A.
 2999 Muñoz-prieto, Proteomics in dogs: a systematic review. *Res. Vet. Sci.* 143 (2022)
 3000 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.12.026>
- 3001 [15] IRIS. International Renal Interest Society - Staging of CKD (modified 2019).
 3002 Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS>
 3003 *Staging_of_CKD_modified_2019.pdf* Acesso em: 01 fevereiro de 2022.
- 3004 [16] D.A. Colantonio, C. Dunkinson, D.E. Bovenkamp, J.E. Van Eyk, Effective
 3005 removal of albumin from serum, *Proteomics* 5 (15) (2005) 3831-3835.
 3006 <https://doi.org/10.1002/pmic.200401235>
- 3007 [17] V. Neuhoff, N. Arold, D. Tauber, W. Ehrhardt, Improved staining of proteins
 3008 in polyacrylamide gels including isoelectric focusing with clear background at
 3009 nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250,
 3010 *Electrophoresis* 9 (6) (1988) 255-262. <https://doi.org/10.1002/elps.1150090603>
- 3011 [18] T. Luo, H. Yang, F. Li, X. Zhang, X. Xu, Purification, characterization and
 3012 cDNA cloning of a novel lipopolysaccharide-binding lectin from the shrimp
 3013 *Penaeus monodon*, *Dev. Comp. Immunol.* 30 (7) (2006) 607-617.
 3014 <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.10.004>
- 3015 [19] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, Mass spectrometric sequencing
 3016 of proteins silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850-858.
 3017 <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
- 3018 [20] M. Carvalho, K. Silva, V. Aristizabal, P. Ortiz, C. Paranzini, A. Melchert, J.
 3019 Amaro, F. Souza, Effects of obesity and diabetes on sperm cell proteomics in

- 3020 rats, J. Proteome Res. 20 (2021) 2628–2642.
 3021 <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c01044>
- 3022 [21] UniProt. <https://www.uniprot.org/> (accessed January 16, 2022).
- 3023 [22] UniProtKB. <https://www.uniprot.org/help/uniprotkb> (accessed January 20,
 3024 2022)
- 3025 [23] Panther - Gene List Analysis. <http://www.pantherdb.org/> (accessed January
 3026 26, 2022).
- 3027 [24] Y. Ishihama, Y. Oda, T. Tabata, T. Sato, T. Nagasu, J. Rappsilber, M. Mann,
 3028 Exponentially Modified Protein Abundance Index (emPAI) for estimation of
 3029 absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per
 3030 protein, Mol. Cell. Proteomics 4 (2005) 1265–1272.
 3031 <https://doi.org/10.1074/mcp.M500061-MCP200>
- 3032 [25] Trueb, B.; Amann, R.; Gerber, S.D. Role of FGFR1 and other FGF signaling
 3033 proteins in early kidney development. Cellular and Molecular Life Sciences, v.70,
 3034 n.14, 2013.
- 3035 [26] Dackowski, W.R.; Luderer, H.F.; Manavalan, P.; Bukanov, N.O.; Russo, R.J.;
 3036 Roberts, B.L.; Klinger, K.W.; Ibraghimov-Beskrovnaya, O. Canine PKD1 is a
 3037 single-copy gene: genomic organization and comparative analysis. Genomics,
 3038 v.80, n.1, p.105-112, 2002.
- 3039 [27] Jiang, B.; Harper, M.M.; Kecova, H.; Adamus, G.; Kardon, R.H.; Grozdanic,
 3040 S.D.; Kuehn, M.H. Neuroinflammation in advanced canine glaucoma. Molecular
 3041 Vision, v.16, p.2092-2108, 2010.
- 3042 [28] Avila, M.; Khosravi, M.; Alves, L.; Ader-Ebert, N.; Bringolf, F.; Zurbriggen, A.;
 3043 Plemper, R.K.; Plattet, P. Canine distemper virus envelope protein interactions
 3044 modulated by hydrophobic residues in the fusion protein globular head. Journal
 3045 of Virology, v.89, n.2, p. 1445-1451, 2015.
- 3046 [29] Palaniappan, R.U.M.; McDonough, S.P.; Divers, T.J.; Chen, C.S.; Pan, M.J.;
 3047 Matsumoto, M.; Chang, Y.F. Immunoprotection of recombinant leptospiral
 3048 immunoglobulin-like protein A against *Leptospira interrogans* serovar pomona
 3049 infection. Infection and Immunity, v.74, n.3, p.1745–1750, 2006.
- 3050 [30] Silva, É.F.; Medeiros, M.A.; McBride, A.J.A.; Matsunaga, J.; Esteves, G.S.;
 3051 Ramos, J.G.R.; Santos, C.S.; Croda, J.; Homma, A.; Dellagostin, O.A.; Haake,
 3052 D.A.; Reis, M.G.; Ko, A.I. The terminal portion of leptospiral immunoglobulin-like

- 3053 protein LigA confers protective immunity against lethal infection in the hamster
3054 model of leptospirosis. *Vaccine*, v.25, n.33, p.6277–6286, 2007.
- 3055 [31] González, M.A.; Barrera-Chacón, R.; Peña, F.J.; Fernández-Cotrina, J.;
3056 Robles, N.R.; Pérez-Merino, E.M.; Martín-Cano, F.E.; Duque, F.J. Urinary
3057 proteome of dogs with renal disease secondary to leishmaniosis. *Research in*
3058 *Veterinary Science*, v.149, p.108–118, 2022.
- 3059 [32] Kovarikova, S. Urinary biomarkers of renal function in dogs and cats: A
3060 review. *Veterinarni Medicina*, v.60, n.11, p.589–602, 2015.
- 3061 [33] Hokamp, J.A.; Nabity, M.B. Renal biomarkers in domestic species.
3062 *Veterinary Clinical Pathology.*, v.45, n.1, p.28-56, 2016.
- 3063 [34] Davalieva, K.; Kiprijanovska, S.; Komina, S.; Petrusevska, G.; Zografska,
3064 C.C.; Polenakovic, M. Proteomics analysis of urine reveals acute phase response
3065 proteins as candidate diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Proteome*
3066 *Science*, v.13, n.1, 2015.
- 3067 [35] Zou, L.; Wang, X.; Guo, Z.; Sun, H.; Shao, C.; Yang, Y.; Sun, W. Differential
3068 urinary proteomics analysis of myocardial infarction using iTRAQ quantification.
3069 *Molecular Medicine Reports*, v.49, n.5, p.3972–3988, 2019.
- 3070 [36] Yang, W.; Yu, X.C.; Guan, X.; Guan, X.R. Analysis on the relationship
3071 between urine transferring, CHD and coronary artery stenosis. *Cinics in*
3072 *Laboratory Medicine*, v.12, p.1560–1561, 2015.
- 3073 [37] Golizeh, M.; Lee, K.; Ilchenko, S.; Ösme, A.; Bena, J.; Sadygov, R.G.;
3074 Kashyap, S.R.; Kasumov, T.; Kasumov, T. Increased serotransferrin and
3075 ceruloplasmin turnover in diet-controlled patients with type 2 diabetes. *Free*
3076 *Radical Biology & Medicine*, v.113, p.461–469, 2017.
- 3077 [38] Malard, V.; Gaillard, J.C.; Bérenguer, F.; SAGE, N.; Quéméneur, E. Urine
3078 proteomic profiling of uranium nephrotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta -*
3079 *Proteins and Proteomics*, v.1794, n.6, p.882–891, 2009.
- 3080 [39] Varghese, S.A.; Powell, T.B.; Budisavljevic, M.N.; Oates, J.C.; Raymond,
3081 J.R.; Almeida, J.S.; Arthur, J.M. Urine biomarkers predict the cause of glomerular
3082 disease. *Journal of the American Society of Nephrology*, v.18, n.3, p.913–922,
3083 2007.
- 3084 [40] Vinge, L.; Lees, G.E.; Nielsen, R.; Kashtan, C.E.; Bahr, A.; Christensen, E.I.
3085 The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis
3086 in the kidney. *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.25, n.8, p.2458–2467, 2010.

- 3087 [41] Maeda, H.; Sogawa, K.; Sakaguchi, K.; Abe, S.; Sagizaka, W.; Mochizuki,
3088 S.; Horie, W.; Watanabe, T.; Shibata, Y.; Satoh, M.; Sanda, A.; Nomura, F.;
3089 Suzuki, J. Urinary albumin and transferrin as early diagnostic markers of chronic
3090 kidney disease. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.77, n.8, p.937–943,
3091 2015.
- 3092 [42] Nakajima, M.; Ohno, K.; Goto-Koshino, Y.; Fujino, Y.; Tsujimoto, H. Plasma
3093 transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs with
3094 nutritional treatment. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.76, n.4,
3095 p.539–543, 2014.
- 3096 [43] Bhamarasuta, C.; Premratanachai, K.; Mongkolpinyopat, N.; Yothapand, P.;
3097 Vejpatarasiri, T.; Dissayabuttra, T.; Trisiriroj, M.; Sutayatram, S.; Buranakarl, C.
3098 Iron status and erythropoiesis response to darbepoetin alfa in dogs with chronic
3099 kidney disease. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v.83, n.4, p.601-608,
3100 2021.
- 3101 [44] Yamamoto, T.; Nakagawa, T.; Suzuki, H.; Ohashi, N.; Fukasawa, H.;
3102 Fujigaki, Y.; Kato, A.; Nakamura, Y.; Suzuki, F.; Hishida, A. Urinary
3103 angiotensinogen as a marker of intrarenal angiotensin II activity associated with
3104 deterioration of renal function in patients with chronic kidney disease. *Journal of*
3105 *the American Society of Nephrology*, v.18, n.5, p.1558–1565, 2007.
- 3106 [45] Kobori, H.; Navar, G.L. Urinary Angiotensinogen as a Novel Biomarker of
3107 Intrarenal Renin-Angiotensin System in Chronic Kidney Disease. *International*
3108 *Review of Thrombosis*, v.6, n.2, p.108-116, 2011.
- 3109 [46] Kobori, H.; Ohashi, N.; Katsurada, A.; Miyata, K.; Satou, R.; Saito, T.;
3110 Yamamoto, T. Urinary angiotensinogen as a potential biomarker of severity of
3111 chronic kidney diseases. *Journal of the American Society of Hypertension*, v.2,
3112 n.5, p.349–354, 2008.
- 3113 [47] Suh, S.H.; Oh, T.R.; Choi, H.S.; Yang, E.M.; Kim, C.S.; Bae, E.H.; Ma, S.K.;
3114 Oh, K.H.; Jung, J.Y.; Hyun, Y.Y.; Kim, S.W. Urinary Angiotensinogen and
3115 Progression of Chronic Kidney Disease: Results from KNOW-CKD Study.
3116 *Biomolecules*, v.12, n.9, 2022.
- 3117 [48] Nykjaer, A.; Dragun, D.; Walther, D.; Vorum, H.; Jacobsen, C.; Herz, J.;
3118 Melsen, F.; Christensen, E.I.; Willnow, T.E. An endocytic pathway essential for
3119 renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D₃. *Cell*, v.96, n.4,
3120 p.507-515, 1999.

- 3121 [49] Candiano, G.; Santucci, L.; Petretto, A.; Bruschi, M.; Dimuccio, V.; Urbani,
3122 A.; Bagnasco, S.; Ghiggeri, G.M. 2D-electrophoresis and the urine proteome
3123 map: Where do we stand?. *Journal of Proteomics*, v.73, n.5, p.829-844, 2010.
- 3124 [50] Chacar, F.; Kogika, M.; Sanches, T.R.; Caragelasco, D.; Martorelli, C.;
3125 Rodrigues, C.; Capcha, J.M.C.; Chew, D.; Andrade, L. Urinary Tamm-Horsfall
3126 protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early
3127 biomarkers of chronic kidney disease in dogs. *Physiological Reports.*, v.5, n.11,
3128 p.1–9, 2017.
- 3129 [51] Mirković, K.; Doorenbos, C.R.C.; Dam, W.A.; Lambers Heerspink, H.J.;
3130 Slagman, M.C.J.; Nauta, F.L.; Kramer, A.B.; Gansevoort, R.T.; Van D.B.J.; Navis,
3131 G.; De Borst, M.H. Urinary Vitamin D Binding Protein: A Potential Novel Marker
3132 of Renal Interstitial Inflammation and Fibrosis. *PLoS ONE*, v.8, n.2, 2013.
- 3133 [52] Preissner, K.T. Structure and biological role of vitronectin. *Annual Review of*
3134 *Cell Biology*, v.7, p.275-310, 1991.
- 3135 [53] Hayman, E.G.; Pierschbacher, M.D.; Ohgren, Y.; Ruoslahti, E. Serum
3136 spreading factor (vitronectin) 'is present at the cell surface and in tissues.
3137 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.80, n.13, p.4003-
3138 4007, 1983.
- 3139 [54] Schwartz, I.; Seger, D.; Shaltiel, S. Vitronectin. *The International Journal of*
3140 *Biochemistry and Cell Biology*, v.31, n.5, 1999.
- 3141 [55] Eddy, A.A. Serine proteases, inhibitors and receptors in renal fibrosis.
3142 *Thrombosis and Haemostasis*, v.101, n.4, p.656-664, 2009.
- 3143 [56] Seiffert, D. Constitutive and regulated expression of vitronectin. *Histology*
3144 *and Histopathology*, v.12, n.3, p.787-797, 1997.
- 3145 [57] Preissner, K.T.; Seiffert, D. Role of vitronectin and its receptors in
3146 haemostasis and vascular remodeling. *Thrombosis Research*, v.89, n.1, p.1–21,
3147 1998.
- 3148 [58] Carreras-Planella, L.; Cucchiari, D.; Cañas, L.; Juega, J.; Franquesa, M.;
3149 Bonet, J.; Revuelta, I.; Diekmann, F.; Taco, O.; Lauzurica, R.; Borràs, F.E.
3150 Urinary vitronectin identifies patients with high levels of fibrosis in kidney grafts.
3151 *Journal of Nephrology*, v.34, n.3, p.861–874, 2021.
- 3152 [59] Yoon, S.; Gingras, D.; Bendayan, M. Alterations of vitronectin and its receptor
3153 α_v integrin in the rat renal glomerular wall during diabetes. *American Journal of*
3154 *Kidney Diseases*, v.38, n.6, p.1298–1306, 2001.

- 3155 [60] Beinrohr, L.; Harmat, V.; Dobo, J.; Lorincz, Z.; GAL, P.; Zavodszky, P. C1
 3156 inhibitor serpin domain structure reveals the likely mechanism of heparina
 3157 potentiation and conformational disease. *Journal of Biological Chemistry*, v.282,
 3158 n.29, p.21100–21109, 2007.
- 3159 [61] Heit, C.; Jackson, B.C.; Mcandrews, M.; Wright, M.W.; Thompson, D.C.;
 3160 Silverman, G.A.; Nebert, D.W.; Vasiliou, V. Update of the human and mouse
 3161 SERPIN gene superfamily. *Human Genomics*, v.7, n.1, p.1-14, 2013.
- 3162 [62] Ni, Y.; Wu, G.H.; Cai, J.J.; Zhang, R.; Zheng, Y.; Liu, J.Q.; Yang, X.H.; Yang,
 3163 X.; Shen, Y.; Lai, J.M.; Ye, X.M.; Mo, S.J. Tubule-mitophagic secretion of
 3164 SerpinG1 reprograms macrophages to instruct anti-septic acute kidney injury
 3165 efficacy of high-dose ascorbate mediated by NRF2 transactivation. *International*
 3166 *Journal of Biological Sciences*, v.18, n.13, p.5168–5184, 2022.
- 3167 [63] Palviainen, M.; Raekallio, M.; Vainionpaa, M.; Kosonen, S.; Vainio, O.
 3168 Proteomic profiling of dog urine after European adder (*Vipera berus berus*)
 3169 envenomation by two-dimensional difference gel electrophoresis. *Toxicon*, v.60,
 3170 p.1228-1234, 2012.
- 3171 [64] Sidgel, T.K.; Boada, P.; Kerwin, M.; Rashmi, P.; Giertson, D.; Rossetti, M.;
 3172 SUR, S.; Munar, D.; Cimino, J.; AHN, R.; Pickering, H.; Sen, S.; Parmar, R.;
 3173 Fatou, B.; Steen, H.; Schaenman, J.; Bunnapradist, S.; Reed, E.F.; Sarwal, M.M.
 3174 Plasma proteome perturbation for CMV DNAemia in kidney transplantation.
 3175 *BioRxiv*, 2022.
- 3176 [65] daemen, M.A.; Heemskerk, V.H.; Van't Veer, C.; Denecker, G.; Wofs, T.G.;
 3177 Vandenabeele, P.; Buurman, W.A. Functional protection by acute phase proteins
 3178 α 1-acid glycoprotein and α 1-antitrypsin Against ischemia/reperfusion injury by
 3179 preventing apoptosis and inflammation. *Circulation*, v.102, n.12, p.1420–1426,
 3180 2000.
- 3181 [66] Metzger, J., Kirch, T., Schiffer, E., Ulger, P., Menten, E., Brand, K.,
 3182 Weissinger, E.M., Haubitz, M., Mischack, H., Herget-Rosenthal, S. Urinary
 3183 excretion of twenty peptides forms an early and accurate diagnostic pattern of
 3184 acute kidney injury. *Kidney International*, v.78, n.12, p.1252–1262, 2010.
- 3185 [67] Castell, J.V.; Gómez-Lechón, M.J.; David, M.; Fabra, R.; Trullenque, R.;
 3186 Heinrich, P.C. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-
 3187 phase protein synthesis by interleukin-6. *V.12*, n.5, p.1179-1186, 1990.

- 3188 [68] Tong, M.; Carrero, J.J.; Qureshi, A.R.; Anderstam, B.; Heimbürger, O.;
 3189 Bárány, P.; Axelsson, J.; Alvestrand, A.; Stenvinkel, P.; Lindholm, B.; Suliman,
 3190 M.E. Plasma pentraxin 3 in patients with chronic kidney disease: Associations
 3191 with renal function, protein-energy wasting, cardiovascular disease, and
 3192 mortality. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v.2, n.5, p.889–
 3193 897, 2007.
- 3194 [69] Boehme, M.; Kaehne, F.; Kuehne, A.; Bernhardt, W.; Schröder, M.; Pommer,
 3195 W.; Fischer, C.; Becker, H.; Müller, C.; Schindler, R. Pentraxin 3 is elevated in
 3196 haemodialysis patients and is associated with cardiovascular disease.
 3197 *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.22, n.8, p.2224–2229, 2007.
- 3198 [70] Azevedo, M.G.P.; Geraldles, S.S.; Sant'anna, P.B.; Batista, B.P.; Maia, S.R.;
 3199 Moraes, R.S.; Schmidt, E.M.S.; Souza, F.F.; Melchert, A.; Ferreira, J.C.P.;
 3200 Dadalto, C.R.; García, H.D.M.; Guimarães-Okamoto, P.T.C. C-reactive protein
 3201 concentrations are higher in dogs with stage IV chronic kidney disease treated
 3202 with intermitente hemodialysis. *PlosONE*, v.17, n.9, p.1-13, 2022.
- 3203 [71] Bussolati, B.; Peri, G.; Salvidio, G.; Verzola, D.; Mantovani, A.; Camussi, G.
 3204 The long pentraxin PTX3 is synthesized in IgA glomerulonephritis and activates
 3205 mesangial cells. *Journal of Immunology*, v.170, n.3, p.1466–1472, 2003.
- 3206 [72] Nauta, A.J.; DE Haij, S.; Bottazzi, B.; Mantovani, A.; borrias, M.C.; Aten, J.;
 3207 Rastaldi, M.P.; Daha, M.R.; Kooten, C.V.; Roos, A. Human renal epithelial cells
 3208 produce the long pentraxin PTX3. *Kidney International*, v.67, n.2, p.543–553,
 3209 2005.
- 3210 [73] Rampoldi, L.; Scolari, F.; Amoroso, A.; Ghiggeri, G.; Devuyst, O. The
 3211 rediscovery of uromodulin (Tamm-Horsfall protein): from tubulointerstitial
 3212 nephropathy to chronic kidney disease, v.80, p.338-347, 2011.
- 3213 [74] Vyletal, P.; Bleyer, A.J.; Kmoch, S. Uromodulin biology and
 3214 pathophysiology—an update. *Kidney Blood Press Research*, v.33, n.6, p.456–
 3215 475, 2010.
- 3216 [75] Prajczek, S.; Heidenreich, U.; Pfaller, W.; Kotanko, P.; Lhotta, K.; Jennings,
 3217 P. Evidence for a role of uromodulin in chronic kidney disease progression.
 3218 *Nephrology Dialysis Transplantation*, v.25, n.6, p.1896–1903, 2010.
- 3219 [76] Ferliza, E.; Isani, G.; Dondi, F.; Andreani, G.; Vasylyeva, K.; Bellei, E.;
 3220 Almeida, A.M.; Matzapetakis, M. Urinary proteome and metabolome in dogs
 3221 (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease, v.222, p.1-12, 2020.

- 3222 [77] Raila, J.; Schweigert, F.J.; Kohn, B. Relationship between urinary Tamm-
 3223 Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal
 3224 disease. *Veterinary Clinical Pathology*, v.43, n.2, p.261–265, 2014.
- 3225 [78] Miele, L.; Cordella-Miele, E.; Mantile, G.; Peri, A.; Mukherjee, A.B.
 3226 Uteroglobin and uteroglobin-like proteins: The uteroglobin family of proteins.
 3227 *Journal of Endocrinological Investigation*, v.17, p.679–692, 1994.
- 3228 [79] Mukherjee, A.B.; Kundu, G.C.; Mantile-Selvaggi, G.; Yuan, C.J.; Mandal,
 3229 A.K.; Chattopadhyay, S.; Zheng, F.; Pattabiraman, N.; Zhang, Z. Uteroglobin: A
 3230 novel cytokine? *Cellular and Molecular Life Sciences*, v.55, n.5, p.771–787, 1999.
- 3231 [80] Dierynck, I.; Bernard, A.; Roels, H.; DeLey, M. Potent inhibition of both
 3232 human interferon-gamma production and biologic activity by the Clara cell protein
 3233 CC16. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v.12, n.2,
 3234 p.205–210, 1995.
- 3235 [81] Kikukawa, T.; Mukherjee, A.B. Detection of a uteroglobin-like phospholipase
 3236 A2-inhibitory protein in the circulation of rabbits. *Molecular and Cellular*
 3237 *Endocrinology*, v.62, n.2, p.177–187, 1989.
- 3238 [82] Aoki, A.; Pasolli, H.A.; Raida, M.; Meyer, M.; Schulz-Knappe, P.; Mostafavi,
 3239 H.; Schepky, A.G.; Znotka, R.; Elia, J.; Hock, D.; Beier, H.M.; Forssmann, W.G.
 3240 Isolation of human uteroglobin from blood filtrate. *Molecular Human*
 3241 *Reproduction*, v.2, n.7, p.489–497, 1996.
- 3242 [83] Bernard, A.M., Lauwerys, R.R., Noel, A., Vandeleene, B; Lambert, A. Urine
 3243 protein 1: a sex-dependent marker of tubular and glomerular dysfunction. *Clinical*
 3244 *Chemistry*, v.35, n.10, p.2141–2142, 1989.
- 3245 [84] Lee, D.S.; Seung, H.Y.; Hyun, L.K.; Kwon, W.J.; Chun, S.L.; Chae, D.W.;
 3246 Kim, S.; Jung, S.L.; Yon, S.K. Recombinant uteroglobin prevents the
 3247 experimental crescentic glomerulonephritis. *Kidney International*, v.66, n.3,
 3248 p.1061–1067, 2004.
- 3249 [85] Zheng, F.; Kundu, G.C.; Zhang, Z.; Ward, J.; DeMayo, F.; Mukherjee, A.B.
 3250 Uteroglobin is essential in preventing immunoglobulin A nephropathy in mice.
 3251 *Nature Medicine*, v.5, n.9, p.1018-1025, 1999.
- 3252 [86] Wei, H.; Wang, J.Y. Role of Polymeric Immunoglobulin Receptor in IgA and
 3253 IgM Transcytosis. *International Journal of Molecular Sciences*, v.22, n.5, p.1-19,
 3254 2021.
- 3255 [87] He, T.; Siwy, J.; Metzger, J.; Muller, W.; Mischak.; Schanstra, J.P.; Zurbig,

- 3256 P.; Jankowski, V. Associations of urinary polymeric immunoglobulin receptor
3257 peptides in the context of cardio-renal syndrome. *Nature Reports*, v.10, p.8291,
3258 2020.
- 3259 [88] Krawczyk, K.M.; Nilsson H.; Nystrom, J.; Lindgren, D.; Leandersson, K.;
3260 Sward, K.; Johansson, M.E. Localization and regulation of polymeric Ig receptor
3261 in healthy and diseased human kidney. *The American Journal of Pathology*,
3262 v.189, n.10, p.1933-1944, 2019.
- 3263 [89] Horpacsy, G.; Zinsmeyer, J.; Schroder, K.; Mebel, M. Changes in serum and
3264 urine lysozyme activity after kidney transplan-tation: influence of graft function
3265 and therapy with azathio-prine. *Clinical Chemistry*, v.24, n.1, p.74–79, 1978.
- 3266 [90] Beetham, R.; Cattell, W.R. Proteinuria: pathophysiology, significance and
3267 recommendations for measurement in clinical practice. *Annals of Clinical*
3268 *Biochemistry*, v.30, Pt.5, p.425–434, 1993.
- 3269 [91] Tasca, S.; Furlanello, T.; Caldin, M. High sérum and urie lysozyme levels in
3270 a dog with acute myeloid leucemia. *Journal of Veterinary Diagnostic*
3271 *Investigation*, v.22, p.111-115, 2010.
- 3272 [92] Kralova, S.; Leva, L.; Toman, M. Polimorphonuclear function in naturally
3273 occurring renal failure in dogs. *Veterinarni Medicina*, v.54, n.5, p.236-243, 2009.
- 3274 [93] Shlipak, M.G.; Praught, M.L.; Sarnak, M.J. Update on cystatin C: new
3275 insights into the importance of mild kidney dysfunction. *Current Opinion in*
3276 *Nephrology and Hypertension*, v.15, n.3, p.270-275, 2006.
- 3277 [94] Tenstad, O.; Roald, A.B.; Grubb, A.; Aukland, K. Renal handling of
3278 radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scandinavian Journal of Clinical and*
3279 *Laboratory Investigation*, v.56, n.5, p.409-414, 1996.
- 3280 [95] Westhuyzen, J. Cystatin C: a promising marker and predictor of impaired
3281 renal function. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, v.36, n.4, p.387-394,
3282 2006.
- 3283 Wherner, A.; Hartmann, K.; Hirschberger, J. Associations between proteinuria,
3284 systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-
3285 renal diseases. *Veterinary Record*, v.162, n.5, p.141-147, 2008.
- 3286 [96] García-Martínez, J.D.; Matinez-Subiela, S.; Tvarijonaviciute, A.; Caldin, M.;
3287 Ceron, J.J. Urinary ferritin and cystatin C concentrations at different stages of
3288 kidney disease in leishmaniotic dogs. *Research in Veterinary Sciences*, v.99,
3289 p.204-207, 2015.

- 3290 [97] Grubb, A.O. Cystatin C – Properties and use as diagnostic marker. Advances
3291 in Clinical Chemistry, v.35, p.63-99, 2000.
- 3292 [98] Pascual, M.; Steiger, G.; Estreicher, J.; Macon, K.; Volanakis, J.E.; Schifferli,
3293 J.A. Metabolism of complement factor D in renal failure. Kidney International,
3294 v.34, p.529-536, 1988.
- 3295 [99] SANDERS PW, VOLANAKIS IE, ROSTAND SG, Galla IH: Human
3296 complement protein D catabolism by the rat kidney. J Clin Invest 77:1299—1304,
3297 1986.
- 3298 [100] Volanakis, J.E.; Barnum, S.R.; Giddens, M.; Galla, J.H. Renal filtration and
3299 catabolism of complement protein D. The New England Journal of Medicine,
3300 v.312, n.7, p.395-399, 1985.
- 3301 [101] Miyata, T.; Oda, O.; Inagi, R.; Sugiyama, S.; Miyama, A.; Maeda, K.;
3302 Nakashima, I.; Yamanaka, N. Molecular and functional identification and
3303 purification of complement component factor D from urine of patients with
3304 chronic renal failure. Molecular Immunology, v.27, n.7, p.637-644, 1990.
- 3305



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Câmpus de Botucatu



HISTÓRICO ESCOLAR EM ANDAMENTO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: **Medicina Veterinária**

CURSO: DOUTORADO

ATO DE AUTORIZAÇÃO DE FUNCIONAMENTO DO PROGRAMA: RESOLUÇÃO UNESP 36/81

ATO DE RECONHECIMENTO: PROGRAMA RECONHECIDO PELA PORTARIA MINISTERIAL Nº 609, DE 14/03/2019, PUBLICADA NO D.O.U. DE 18/03/2019.

1. IDENTIFICAÇÃO: Matrícula nº : MVB190179

Nome: **SILVANO SALGUEIRO GERALDES**

Filiação: ANTONIO SILVANO GERALDES e MARIA DA LUZ SALGUEIRO GERALDES

Naturalidade: SÃO PAULO / SP

Nacionalidade: BRASILEIRA

Data de Nascimento: 11/11/1978

CPF: 284.893.428-06

Cédula de Identidade 32.499.843-0 Órgão Emissor: SSP/SP

expedido em 17/04/2013

Título de Eleitor nº 2216191001/16

Zona: 053

expedido em 23/05/1997

Documento Militar nº 124811

2. CURSO SUPERIOR

Curso: MEDICINA VETERINÁRIA

Estabelecimento: FACULDADE DE CIÊNCIAS SOCIAIS E AGRÁRIA DE ITAPEVA

Cidade: ITAPEVA

Estado: SP

Data de Conclusão: 01/02/2013

3. DATA DE INÍCIO NO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: 06/03/2019

4. ORIENTADOR: PRISCYLLA TATIANA CHALFUN GUIMARÃES OKAMOTO

5. PROFICIÊNCIA EM LÍNGUAS: INGLÊS

Data da Aprovação:

6. DATA DA INTEGRALIZAÇÃO DE CRÉDITOS EM DISCIPLINAS: 03/11/2021

7. TÍTULO DO PROJETO DE PESQUISA: **ANÁLISE PROTEÔMICA DA URINA E SORO DE CÃES COM DOENÇA RENAL CRÔNICA**

8. DATA DO EXAME GERAL DE QUALIFICAÇÃO:

CONCEITO

9. DATA DA DEFESA:

CONCEITO:

10. TÍTULO OBTIDO:

11. ATIVIDADE COMPLEMENTAR:

12. SUSPENSÃO:

13. DESLIGAMENTO:

ATENÇÃO: Este é um documento oficial da Pós-graduação da UNESP, com autenticação eletrônica através da página <https://sistemas.unesp.br/academico/publico/documento.action>, que dispensa carimbo e assinatura.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu -
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n, 18618681, Botucatu - São Paulo

Página 1

3306

3307

HISTÓRICO ESCOLAR EM ANDAMENTO

Nome do Programa: MEDICINA VETERINÁRIA						
Curso: DOUTORADO						
Matrícula nº: MVB190179						
Nome: SILVANO SALGUEIRO GERALDES						
Disciplinas	Ano	Período letivo	Créditos	Carga Horária	Freq	Conceito
Aplicações do Exame Ultra-Sonográfico Abdominal na Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais - T	2019	1º Semestre	4	60	100	A
Citologia Aspirativa	2019	1º Semestre	4	60	93,8	A
Probióticos na Medicina Veterinária	2019	2º Semestre	2	30	100	A
Práticas Experimentais em Pesquisa em Animais Selvagens - T	2019	2º Semestre	3	45	100	A
Tópicos Especiais: Inteligência Emocional	2019	2º Semestre	1	15	100	A
Modelos Experimentais e Animais de Experimentação	2020	1º Semestre	4	60	100	A
Patologia Toxicológica Comparada	2020	1º Semestre	8	120	100	A
Tópicos Especiais: O uso do cérebro e controle das emoções na pós graduação.	2020	1º Semestre	2	30	100	A
Técnicas de Análise de Proteínas Aplicadas à Reprodução Animal - T	2020	2º Semestre	3	45	91,7	A
Utilização das Técnicas de Genômica e Proteômica Aplicadas à Pesquisa na Medicina Veterinária - T	2020	2º Semestre	4	60	100	A
Total de créditos em disciplinas			35	525		
Total de créditos em atividades complementares (*)						
Total de créditos em tese						
APROVEITAMENTO DO MESTRADO:						
Bioquímica e Citologia dos Líquidos do Organismo Animal						
Dermatologia de Pequenos Animais						
Doenças Infecciosas em Animais Domésticos com Programas Oficiais de Saúde Animal						
Enfermidades Infecto-Contagiosas de Cães: Etiopatogenia, Clínica, Diagnóstico, Tratamento e Profilaxia						
Enteropatógenos em Animais Domésticos						
Hemostasia Veterinária						
Problemas Dermatológicos de Pequenos Animais						
Tópicos Especiais: Medicina Interna de Pequenos Animais - Atualidades						
Tópicos Especiais: Nefrologia e Urologia de Pequenos Animais						
Tópicos Especiais: Técnicas Minimamente Invasivas de Contracepção Cirúrgica em Cães						
Virologia Básica						
Total de créditos em Aproveitamento do Mestrado			30	450		
TOTAL GERAL DE CRÉDITOS			65	975		
Regulamento do Programa aprovado pela RESOLUÇÃO UNESP 17, de 10/02/2012						
1 crédito correspondente a 15 horas de atividades programadas						
CONCEITOS:						
A - Excelente; B - Bom; C - Regular; D/R - Reprovado; J - Cancelamento						
OBS: AE - Disciplina cursada como aluno especial						
TP - Disciplina cursada no programa						
T - Disciplina cursadas fora do Programa						

ATENÇÃO: Este é um documento oficial da Pós-graduação da UNESP, com autenticação eletrônica através da página <https://sistemas.unesp.br/academico/publico/documento.action>, que dispensa carimbo e assinatura.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu -
Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n, 18618681, Botucatu - São Paulo

Página 2

3308

3309



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu

**A T E S T A D O**

Atestamos que SILVANO SALGUEIRO GERALDES, RA nº: MVB190179, RG nº 32.499.843-0, expedido pela SSP/SP, é discente regularmente matriculado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Curso de Doutorado, sob a orientação da Professora Doutora Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães Okamoto.

Atestamos, ainda, que o referido discente foi contemplado com a(s) bolsa(s):

Financiadora	Situação	Início	Término	Valor
CAPES - PROEX	Ativa	01/10/2019	30/06/2022	R\$ 2.200,00

Documento emitido às 10:46 do dia 03/03/2022
 Código de autenticidade: 078A-D07B-AFBC-0E29-FD52-C76F-265E-CFBD
 Documento válido até às 10:46 do dia 02/05/2022

ATENÇÃO: Este é um documento oficial da Pós-graduação da UNESP, com autenticação eletrônica através da página <https://sistemas.unesp.br/academico/publico/documento.action>, que dispensa carimbo e assinatura.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Câmpus de Botucatu -
 Rua Prof. Dr. Walter Mauricio Correa, s/n, 18618681, Botucatu - São Paulo

3310

3311

3312 **SÚMULA CURRICULAR**3313 **1. Formação acadêmica/titulação**

Ano	Título ou atividade	Instituição
2008	Graduação	Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva
2016 a 2018	Mestrado <i>strictu sensu</i>	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista
2019 a 2022	Doutorado (em andamento)	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista

3314

3315 **2. Participação em eventos**

3316 2.1 I Curso teórico-prático de Diálise Peritoneal e Hemodiálise Intermitente em
3317 Pequenos Animais, 2019. (Botucatu/SP). Organização.

3318

3319 2.2 I Workshop Internacional de Diálise Peritoneal, 2016. (Botucatu/SP).
3320 Organização e participação.

3321

3322 2.3 Congresso Paulista de Especialidades, 2014. (São Paulo/SP). Participação.

3323

3324 2.4 I Workshop Nefrologia de Pequenos Animais de Clínica Médica de Pequenos
3325 Animais: Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp – Campus de
3326 Botucatu – SP, 2016. (Botucatu/SP). Organização e participação.

3327

3328 **3. Artigos publicados**

3329

3330 3.1 PEREIRA, A. C. ; GERALDES, S. S. ; DE AZEVEDO, MARIA GABRIELA
3331 PICELLI ; MAIA, S. R. ; DA SILVA, GUSTAVO GOMES ; SOUZA, B. N. ;
3332 GARCIA, H. D. M. ; SOUZA, F. F. ; MELCHERT, A. ; BRANDAO, C. V. S. ;
3333 GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C.. Applicability of the drainage effectiveness of
3334 Blake drains and Tenckhoff catheters in the peritoneal dialysis of healthy rabbits

3335 (Oryctolagus cuniculus). Journal of Veterinary Emergency and Critical Care
3336 (Online), v. 32, p. 1, 2022.

3337

3338 3.2 PICELLI DE AZEVEDO, MARIA GABRIELA ; SALGUEIRO GERALDES,
3339 SILVANO ; BILBAU SANT`ANNA, PAULA ; POLONI BATISTA, BEATRIZ ;
3340 RODRIGUES MAIA, SUELLEN ; SILVEIRA DE MORAES, REINER ; MOREIRA
3341 DOS SANTOS SCHMIDT, ELIZABETH ; FERREIRA DE SOUZA, FABIANA
3342 ; MELCHERT, ALESSANDRA ; PINHEIRO FERREIRA, JOÃO CARLOS ;
3343 REZENDE DADALTO, CARMEL ; MOGOLLÓN GARCÍA, HENRY DAVID ;
3344 CHALFUN GUIMARÃES-OKAMOTO, PRISCYLLA TATIANA. C-reactive protein
3345 concentrations are higher in dogs with stage IV chronic kidney disease treated
3346 with intermittent hemodialysis. PLoS One, v. 17, p. e0274510, 2022.

3347

3348 3.3 SANT`ANNA, P. B.; TRINDADE, F. S.; GERALDES, S. S.; AZEVEDO, M. G.
3349 P.; HATAKA, A.; PAES, A. C.; MELCHERT, ALESSANDRA; GUIMARÃES-
3350 OKAMOTO, P. T. C. Comparison of urinary protein-to-creatinine ration, serum
3351 albumin, serum creatinine and systolic arterial blood pressure of glomerular injury
3352 cases in dogs with chronic kidney disease. SEMINA. CIÊNCIAS AGRÁRIAS
3353 (ONLINE), v. 42, p. 2339-2358, 2021.

3354

3355 3.4 GONSALVES, D. S.; GERALDES, S. S.; DUARTE, R. C. F.; CARVALHO, M.
3356 G.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; TAKAHIRA, R. K. Thrombin generation
3357 and thromboelastometry tests in dogs with chronic kidney disease. PESQUISA
3358 VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE), v. 40, p. 113-120, 2020.

3359

3360 3.5 ALFONSO, A.; LE SUEUR, A. N. V.; GERALDES, S. S.; GUIMARÃES-
3361 OKAMOTO, P. T. C.; TSUNEMI, M. H.; SANTANA, D. F.; RIBEIRO, V. R. F.;
3362 MELCHERT, A.; CHIACCHIO, S. B.; LOURENÇO, M. L. G. Heart Rate Variability
3363 and Electrocardiographic Parameters Predictive of Arrhythmias in Dogs with
3364 Stage IV Chronic Kidney Disease Undergoing Intermittent Haemodialysis.
3365 ANIMALS, v. 10, p. 1829, 2020.

3366

3367 3.6 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; ALBUQUERQUE, A. L. H.; GERALDES,
3368 S. S.; VIEIRA, A. N. L. S.; MELCHERT, A.; LOURENCO, M. L. G.; DADALTO, C.

3369 R.; ALEIXO, A. S. C.; AZEVEDO, M. G. P.; NASCIMENTO, D.; ROCHA, T. G.
 3370 Intermittent hemodialysis, an alternative treatment for ovine with acute-on-
 3371 chronic kidney disease. VETERINÁRIA E ZOOTECNIA, v. 27, p. 001, 2020.

3372

3373 3.7 LE SUEUR, A. N. V.; GERALDES, S. S.; MELCHERT, ALESSANDRA;
 3374 TAKAHIRA, R. K.; COYNE, M.; MURPHY, R.; SZLOSEK, D.;
 3375 GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C. Symmetric dimethylarginine concentrations in
 3376 dogs with International Renal Interest Society stage 4 chronic kidney disease
 3377 undergoing intermittent hemodialysis. JOURNAL OF VETERINARY INTERNAL
 3378 MEDICINE, v. 33, p. 2635, 2019.

3379

3380 3.8 GERALDES, S. S.; LE SUEUR, A. N. V.; SANT'ANA, P. B.; DE AZEVEDO,
 3381 M. G. P.; TAKAHIRA, R. K.; MELCHERT, A.; LOURENÇO, M. L. G.; MAMPRIM,
 3382 M. J.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C. The effect of intermittent hemodialysis
 3383 on the hematological and serum biochemistry profile in dogs with chronic kidney
 3384 disease. TOPICS IN COMPANION ANIMAL MEDICINE, v. 38, p. 100389, 2019

3385

3386 3.9 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; RAMOS, P. R. R.; MELCHERT,
 3387 A.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C. Lesão renal aguda e sepse - revisão de
 3388 literatura. MEDVEP. REVISTA CIENTÍFICA DE MEDICINA VETERINÁRIA.
 3389 PEQUENOS ANIMAIS E ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO, v. 15, p. 60-65, 2018.

3390

3391 3.10 MELCHERT, A.; BARRETTI, P.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C.;
 3392 CUADRADO, M.; CANEVESE S.R.; GERALDES, S.S.; SANT`ANNA, P.B.
 3393 Intradialytic Complications in Dogs with Acute Renal Failure Submitted to
 3394 Intermittent Hemodialysis. ASIAN JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY
 3395 ADVANCES, v. 12, p. 288-293, 2017.

3396

3397 3.11 DE MARCHI, P.N.; VIEIRA, A.N.L.S.; RIBEIRO, J.F.A.; GERALDES, S.S.;
 3398 RAMOS, P.R.; MELCHERT, A.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C. Use of
 3399 Nandrolone Decanoate in Treatment of Pure Red Cell Aplasia Secondary to
 3400 Diclofenac Administration: A Case Report. TOPICS IN COMPANION ANIMAL
 3401 MEDICINE, v. 32, p. 44-47, 2017.

3402

3403 3.12 MELCHERT, A.; GERALDES, S.S.; VIEIRA, A.N.L.S.; TAKAHIRA, R.K.;
 3404 RAMOS, P.R.; BARRETTI, P.; PADOVANI, C.R.; SANT'ANNA, P.B.; RIBEIRO,
 3405 J.F.A.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C. Intermittent hemodialysis in dogs with
 3406 chronic kidney disease stage III, CIENCIA RURAL, v. 47, p. 1-7, 2017.

3407

3408 3.13 GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C.; GERALDES, S.S.; RIBEIRO, J.F.A.;
 3409 VIEIRA, A.N.L.S.; PORTO, L.P.; BARRETTI, P.; LOURENÇO, M.L.G.;
 3410 MELCHERT, A. Reversal of acute kidney injury after peritoneal dialysis in a dog:
 3411 a case report. VETERINARY MEDICINA, v. 61, e.7, p. 399-403, 2016.

3412

3413 3.14 GUIMARÃES-OKAMOTO, P.T.C.; SILVA, M.C.L.; SEQUEIRA, J.L.;
 3414 HATAKA, A.; CHACAR, F.C.; GERALDES, S.S.; RIBEIRO, J.F.A.; MELCHERT,
 3415 A. Primary diffuse large B cell lymphoma in kidney with involvement of central
 3416 Nervous system and heart in a siamese cat. ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE,
 3417 v. 44, p. 1-4, 2016.

3418

3419 **4. Resumos publicados em anais de congressos**

3420

3421 4.1 MAIA, S. R.; GERALDES, S. S.; AZEVEDO, M. G. P.; MELCHERT, A.;
 3422 LOURENCO, M. L. G.; TAKAHIRA, R. K.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.
 3423 Troca plasmática terapêutica por centrifugação em cães: perspectiva futura para
 3424 o tratamento de glomerulopatias. In: Simpósio do Colégio Brasileiro de
 3425 Nefrologia e Urologia Veterinárias - CBNUV, 2021, São Paulo. Simpósio do
 3426 Colégio Brasileiro de Nefrologia e Urologia Veterinárias - CBNUV, 2021.

3427

3428 4.2 SOUZA, B. N.; PEREIRA, A. C.; GERALDES, S. S.; GUIMARAES-
 3429 OKAMOTO, P. T. C. Estudo comparativo da eficácia do dreno de blake e cateter
 3430 tenckoff na diálise peritoneal em coelhos. In: XXXIII Congresso de Iniciação
 3431 Científica da Unesp - FMVZ/Botucatu-SP, 2021, 2021, Botucatu. Congresso de
 3432 Iniciação Científica da Unesp, 2021.

3433

3434 4.3 MELCHERT, A.; GONSALVES, N. V.; GERALDES, S. S.; LOURENCO, M.
 3435 L. G.; GOLINO, D. V.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Renal function in obese

- 3436 cats - Symmetric Dimethylarginine (SDMA). In: 25th European Veterinary
3437 Congress (FECAVA), 2019, 2019, São Petesburgo. Abstracts. Prague:
3438 GUARANT International spol. s r.o, 2019. p. 645-645.
3439
- 3440 4.4 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.;
3441 SANT`ANNA, PAULA BILBAU; TAKAHIRA, R. K.; MELCHERT, A. Hematological
3442 profile of dogs with iris stage 4 chronic kidney disease undergoing intermittent
3443 hemodialysis. In: IRIS Renal Week, 2018, 2018, Davis. IRIS Renal Week, 2018.
3444
- 3445 4.5 MELCHERT, A.; FERNANDES, M. A. M.; LOURENCO, M. L. G.; ALEIXO, A.
3446 S. C.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; GERALDES, S. S.; CAVALCANTE, J.;
3447 TAKAHIRA, R. K. Biochemical and electrocardiographic profile in cats with
3448 obstructive feline lower tract disease. In: 43rd World Small Animal Veterinary
3449 Association Congress and 9th FASAVA Congress, 2018, 2018, Singapura.
3450 Proceedings of the 43rd World Small Animal Veterinary Association Congress
3451 and 9th FASAVA Congress, 2018. p. 677-677.
3452
- 3453 4.6 ALFONSO, A.; GERALDES, S. S.; VIEIRA, A. N. L. S.; GUIMARAES-
3454 OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; LOURENCO, M. L. G.
3455 Electrocardiographic parameters, P and QT dispersions in dogs with chronical
3456 kidney disease undergoing intermittent hemodialysis authors. In: ACVIM Forum,
3457 2018, 2018, Seattle. ACVIM Forum Research Report Program, 2018. p. 132-133.
3458
- 3459 4.7 ALFONSO, A.; VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; GUIMARAES-
3460 OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; LOURENCO, M. L. G. Pre and post
3461 electrocardiogram in dogs subimitted to intermittent hemodialysis. In: II MCAA
3462 Brazil-Europe Workshop and III Unesp-University of Glasgow, Scotland, UK,
3463 2018, 2018, Scotland. Proceedings of the II MCAA Brazil-Europe Workshop and
3464 III Unesp-University of Glasgow, 2018.
3465
- 3466 4.8 ALFONSO, A.; GERALDES, S. S.; VIEIRA, A. N. L. S.; GUIMARAES-
3467 OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; CHIACHIO, S. B.; LOURENCO, M. L. G.
3468 Parâmetros eletrocardiográficos, dispersões de onda P e intervalo QT em cães
3469 com doença renal crônica submetidos à hemodiálise intermitente. In: 42º World

- 3470 Small Animal Veterinary Association Congress, 2018, Campos do Jordão. 42º
3471 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2018.
3472
- 3473 4.9 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; TAKAHIRA, R. K.; RAMOS, P. R. R.;
3474 MELCHERT, A.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Serum creatinine, urea and
3475 albumin profile of dogs with chronic kidney disease stage 3 undergoing to
3476 intermittent hemodialysis. In: 42º World Small Animal Veterinary Association
3477 Congress, 2017, Copenhagen. 42º World Small Animal Veterinary Association
3478 Congress, 2017.
3479
- 3480 4.10 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; TAKAHIRA, R. K.; RAMOS, P. R.
3481 R.; MELCHERT, A.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Hematological profile of
3482 dogs with chronic kidney disease stage 3 undergoing intermittent hemodialysis.
3483 In: 42º World Small Animal Veterinary Association Congress, 2017, 2017. 42º
3484 World Small Animal Veterinary Association Congress, 2017.
3485
- 3486 4.11 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; RIBEIRO, J. F. A.; TAKAHIRA, R.
3487 K.; BRANDAO, F.; QUITZAN, J. G.; RAMOS, P. R. R.; GUIMARAES-OKAMOTO,
3488 P. T. C. Peritoneal Dialysis in a Dog Performed with a Blake Drain. In: 42º World
3489 Small Animal Veterinary Association Congress, 2017, Copenhagen. 42º World
3490 Small Animal Veterinary Association Congress, 2017.
3491
- 3492 4.12 SCHMIDT, E. M. S.; AZEVEDO, M. C.; RAHAL, S. C.; SANTOS, G.
3493 J.; GERALDES, S. S.; TAKAHIRA, R. K.; OLIVEIRA, R. M.; PROVIDELO, G. A.
3494 Relato de caso - Infecção por dirofilária renal em cães da região de
3495 Botucatu, estado de São Paulo. In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia
3496 Veterinária, 2016, Belem. XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária,
3497 2016.
3498
- 3499 4.13 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; VIEIRA, A. N. L. S.; ALVES, L.
3500 S.; GERALDES, S. S.; AMORIM, R. M.; MELCHERT, A. Síndrome Cerebelar em
3501 American Pit Bull Terrier - Relato de Caso. In: 37 Congresso Brasileiro da
3502 Anclivepa, 2016, Goiania - GO. 37 Congresso Brasileiro da Anclivepa, 2016.
3503

- 3504 4.14 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; MELCHERT, A.; BARRETI, P.;
3505 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Avaliação da Eficácia do Reuso dos
3506 Hemodializadores de Cães com Doença Renal Crônica Submetidos à
3507 Hemodiálise Intermitente. In: Congresso Medvep de Especialidades
3508 Veterinárias, 2015, Curitiba. Congresso Medvep de Especialidades, 2015.
3509
- 3510 4.15 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; GERALDES, S. S.;
3511 RIBEIRO, J. F. A.; VIEIRA, A. N. L. S.; ARAUJO, M. M. A. G. Hemodiálise
3512 Intermitente no Tratamento de Cão com Doença Renal Crônica em Fase Aguda.
3513 In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2014, Gramado. Congresso
3514 Brasileiro de Medicina Veterinária, 2015.
3515
- 3516 4.16 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; GERALDES, S. S.;
3517 RIBEIRO, J. F. A.; VIEIRA, A. N. L. S. Hemodiálise Intermitente em um Cão
3518 Hígido. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2014, Gramado.
3519 Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 2014.
3520
- 3521 4.17 GERALDES, S. S.; RIBEIRO, J. F. A.; SOUZA, F. B.; MELCHERT, A.;
3522 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Uso da Terapia de Substituição Renal na
3523 Redução da Uremia em um Cão com Doença Renal Crônica. In: Congresso
3524 Paulista das Especialidades, 2014, São Paulo. Congresso Paulista das
3525 Especialidades, 2014.
3526
- 3527 4.18 PORTO, L. P.; GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.;
3528 YAMAUTI, T. H. S.; DEMARCHI, P. N.; GERALDES, S. S.; RIBEIRO, J. F. A. .
3529 Comparação entre o comportamento alimentar e a relação homem-animal entre
3530 proprietários de cães obesos e normais, atendidos pelo Serviço de Clínica de
3531 Pequenos Animais-FMVZ-Unesp-Botucatu. In: Congresso Paulista de Clínicos
3532 Veterinários de Pequenos Animal, 2014, São Paulo. Congresso Paulista de
3533 Clínicos Veterinários de Pequenos Animal, 2014.
3534

3535 5 Resumos expandido

3536 5.1 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; GERALDES, S. S.;
3537 VIEIRA, A. N. L. S.; RIBEIRO, J. F. A. Modulação do potássio sérico em cães
3538 com doença renal crônica submetidos a hemodiálise intermitente. In: XIV
3539 Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais -
3540 CONPAVEPA - São Paulo - SP, 2016, São Paulo. XIV Congresso Paulista de
3541 Clínicos Veterinários de Pequenos Animais - CONPAVEPA - São Paulo - SP,
3542 2016.

3543

3544 5.2 VIEIRA, A. N. L. S.; GERALDES, S. S.; MELCHERT, A.; BARRETI, P.;
3545 GUIMARAES-OKAMOTO, P. T. C. Avaliação da Eficácia do Reuso dos
3546 Hemodializadores de Cães com Doença Renal Crônica Submetidos à
3547 Hemodiálise Intermitente. In: Congresso Medvep de Especialidades
3548 Veterinárias, 2015, Curitiba. Congresso Medvep de Especialidades, 2015.

3549

3550 5.3 GERALDES, S. S.; CERITELLO, G. F.; BRUNELLI, S. R. Produção de
3551 Frangos Caipira no Sistema Semi Intensivo. In: VIII Simpósio de Ciências
3552 Aplicadas da FAIT, 2011, Itapeva. VIII Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT,
3553 2011.

3554

3555 5.4 CERITELLO, G. F.; GERALDES, S. S.; ALMEIDA, F. M.; BARROS, L.
3556 B.; BRUNELLI, Sandra. Regina. . Importância da Raiva. In: VII Simpósio de
3557 Ciências Aplicadas da FAIT, 2010, Itapeva. VII Simpósio de Ciências Aplicadas
3558 da FAIT, 2010.

3559

3560 5.5 ELIAS, F. Q. S.; GERALDES, S. S.; SILVA, R. R. Pré-Diagnóstico e
3561 Prevenção da Parvovirose. In: V Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT, 2008,
3562 Itapeva. V Simpósio de Ciências Aplicadas da FAIT, 2008.

3563

3564 **6. Palestras ministradas**

3565 6.1 “Técnicas dialíticas: hemodiálise e diálise peritoneal” no Curso de
3566 Especialização em Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos, promovido pela
3567 ANCLIVEPA-SP (São Paulo/SP). 2019. Carga horária de 16 horas.

3568

3569 6.1 “Técnicas dialíticas: hemodiálise e diálise peritoneal” no Curso de
3570 Especialização em Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos, promovido pela
3571 ANCLIVEPA-SP (São Paulo/SP). 2018. Carga horária de 16 horas.

3572

3573 6.1 “Técnicas dialíticas: hemodiálise e diálise peritoneal” no Curso de
3574 Especialização em Nefrologia e Urologia em Cães e Gatos, promovido pela
3575 ANCLIVEPA-SP (São Paulo/SP). 2017. Carga horária de 16 horas.

3576

3577 **7. Colaboração em aulas**

3578 7.1 Aulas teórico-práticas "Hemodiálise Intermitente em Pequenos Animais",
3579 entre os períodos de (maio de 2014 à março de 2021), totalizando 40 aulas junto
3580 a disciplina "Clínica II e Prática Hospitalar e de Fazendas", aos alunos do 4 ano
3581 da Graduação em Medicina Veterinária, FMVZ-Unesp-Botucatu. Cargas horaria
3582 60 horas aula.

3583

3584 7.2 Aulas teórico-práticas “Princípios da Biofísica”. I, entre os períodos de (março
3585 de 2014 à maio de 2019), totalizando 12 aulas, junto a Disciplina de Biofísica,
3586 aos alunos do 1º ano de graduação em Medicina Veterinária, FMVZ-UNESP
3587 Botucatu. Carga horaria 24 horas aula.

3588

3589 7.3 Aulas práticas “Semiologia do trato urinário”, entre os períodos de março de
3590 2014 à dezembro de 2021, totalizando 16 aulas, junto a Disciplina de Semiologia
3591 Veterinaria, aos alunos do 3º ano de graduação em Medicina Veterinária, FMVZ-
3592 UNESP Botucatu. Carga horaria 32 horas aula.

3593

3594 **8. Treinamentos, cursos e estágios**

3595 8.1 Curso Prático de Dermatologia Veterinária, junto ao DEPARTAMENTO DE
3596 CLÍNICA VETERINÁRIA da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita
3597 Filho”, realizado no período de 01 de outubro de 2018 a 31 de janeiro de 2019.
3598 Carga horaria de 640 horas.

3599

3600 8.2 Curso Teórico “Isótopos Estáveis” junto ao Centro de Isótopos Estáveis.
3601 Instituto de Biociências de Botucatu - IBB - Universidade Estadual Paulista -
3602 Unesp, Brasil. 2016.Carga horaria de 4 horas.

3603

3604 8.3 Curso Prático de Nefrologia em pequenos animais junto ao
3605 DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA da Universidade Estadual
3606 Paulista “Julio de Mesquita Filho”, realizado no período de março de 2015 a
3607 agosto de 2016. Carga horaria de 2880 horas.

3608

3609 8.4 Curso Prático de Clínica Médica de Pequenos Animais, junto ao
3610 DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA da Universidade Estadual
3611 Paulista “Julio de Mesquita Filho”, realizado no período de 06 de janeiro de 2014
3612 a 06 de março de 2014. Carga horaria de 344 horas.

3613

3614 8.5 Estágio de Treinamento em Hemodiálise, junto a Unidade de Diálise do
3615 Hospital das Clínicas de Botucatu, realizado no período de 01 de fevereiro de
3616 2014 a 31 de maio de 2014.

3617

3618 8.6 Treinamento em Painéis de Reprocessamento de Dialisadores e Linhas,
3619 junto ao Centro de Diálise de Pequenos Animais – FMVZ-Unesp-Botucatu/SP,
3620 realizado no dia 03 de junho de 2014.

3621

3622 8.7 Treinamento Máquinas Novo Usuário Fresenius, junto ao Centro de Diálise
3623 de Pequenos Animais – FMVZ-Unesp-Botucatu/SP, realizado no dia 19 de maio
3624 de 2014. Carga horaria de 8 horas.

3625

3626 **9. Iniciação científica e bolsas**

3627 9.1 Bolsista Capes em andamento (Referente ao Doutorado) - Departamento de
3628 Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp – Campus de Botucatu – SP, 2016.
3629 (Botucatu/SP). Concedida de 2020 a 2022.

3630

3631 9.2 Treinamento Técnico Fapesp TT3 (Bolsista) – Referente projeto Efeitos da
3632 hemodiálise intermitente em fase precoce da doença renal crônica sobre o perfil
3633 clínico e laboratorial de cães atendidos no serviço de clínica médica de pequenos
3634 animais da FMVZ-Unesp-Botucatu - Departamento de Clínica Veterinária da
3635 FMVZ – Unesp – Campus de Botucatu – SP, 2013 a 2015 (Botucatu/SP).

3636

3637 9.3 Bolsista de iniciação científica – Núcleo de pesquisas (NUPES) Faculdade
3638 de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva – SP - FAIT, 2008 a 2012 (Itapeva/SP).