

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORNELAS

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA URINÁRIA DE CÃES SADIOS E COM
DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.**

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORNELAS

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA URINÁRIA DE CÃES SADIOS E COM
DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Abreu da Fonseca

Coorientador: Edvaldo Barros

VIÇOSA – MINAS GERAIS

2024

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

D713u
2024

Dornelas, Lorraine Rossi Signorelli Machado, 1987-
Caracterização proteômica urinária de cães saudáveis e com
diferentes estágios da doença renal crônica / Lorraine Rossi
Signorelli Machado Dornelas. – Viçosa, MG, 2024.
110 f.: il. (algumas color.).

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2024.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.232>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cães - Doenças. 2. Proteinúria. 3. Espectrometria de
massa. 4. Diagnóstico Precoce. I. Fonseca, Leandro Abreu da,
1980-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.7089616

LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORNELAS

**CARACTERIZAÇÃO PROTEÔMICA URINÁRIA DE CÃES SADIOS E COM
DIFERENTES ESTÁGIOS DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28/03/2024

Assentimento:



Documento assinado digitalmente
LORRAINE ROSSI SIGNORELLI MACHADO DORN
Data: 02/07/2024 11:02:11-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Lorraine Rossi Signorelli Machado Dornelas
Autora

Leandro Abreu da Fonseca

Orientador



Documento assinado digitalmente
LEANDRO ABREU DA FONSECA
Data: 02/07/2024 14:50:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

A Deus, razão da minha existência, meu salvador e sustentador. Agradeço por estar presente na minha vida em todos os momentos, especialmente ao longo da caminhada do doutorado, sustentando, direcionando e fortalecendo a cada passo. Agradeço a Deus pelas pessoas que colocou em meu caminho nesse tempo, por ter me presenteado com a vida da Antonella, maior presente, bênção, amor, responsabilidade e confiança que poderia receber.

A minha família e familiares, presentes que o Senhor me deu, obrigada por me amarem, apoiarem e ajudarem incondicionalmente. Louvo a Deus por tê-los em minha vida! Amo vocês! Aos meus amigos, pela parceria, apoio e ajuda, que contribuíram para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Viçosa, ao DVT, a pós-graduação, ao Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária, ao NUBIOMOL, ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, ao Hospital Veterinário, ao meu orientador (prof. Dr. Leandro Abreu da Fonseca), ao meu coorientador (Dr. Edvaldo Barros), aos demais professores, residentes, técnicos e colegas, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO

DORNELAS, Lorraine Rossi Signorelli Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2024. **Caracterização proteômica urinária de cães saudáveis e com diferentes estágios da doença renal crônica.** Orientador: Leandro Abreu da Fonseca. Coorientador: Edvaldo Barros.

A doença renal crônica (DRC) é uma doença comum, progressiva e irreversível em cães. A inflamação e a proteinúria estão relacionadas ao processo de progressão da DRC. A realização de estudos na busca por marcadores precoces e indicadores de grau e local de inflamação renal, a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico é de extrema relevância. Foram utilizadas 22 amostras de caninos com raça, idade e sexo aleatórios, portadores de DRC em diferentes estádios e 5 animais hígidos, para avaliar o perfil de proteínas da urina por nano LC-MS/MS. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: grupo C (GC) composto por animais hígidos (controle); grupo 1 (G1) composto por animais com DRC estágio I; grupo 2 (G2), composto por animais com DRC estágio II; grupo 3 (G3), composto por animais com DRC estágio III; e grupo 4 (G4), composto por animais com DRC estágio IV. Os objetivos deste estudo foram compreender a caracterização do perfil de proteínas urinárias em cães considerando o grau de acometimento renal, por meio da realização de uma revisão sistemática sobre o assunto e da identificação de proteínas urinárias por espectrometria de massas (nano LC-MS/MS) em animais saudáveis e com DRC nos estágios de I a IV, sugerindo, se pertinente, marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e prognóstico da DRC. Como resultado da revisão, observou-se proteínas com potencial para biomarcador, uma diversidade metodológica nos estudos descritos empregando proteômica urinária, além de importantes pontos de viés. Além disso, o experimento identificou 65 proteínas por meio da metodologia empregada, notando-se uma tendência ao aumento das proteínas de acordo com a gravidade da DRC, tendo destaque para haptoglobina e transferrina como possíveis biomarcadores e para o papel do sistema complemento na patogenia da doença, necessitando-se de futuros estudos para maior elucidação.

Palavras-chave: Proteinúria; Espectrometria de Massas; Nefropatia; Diagnóstico precoce.

ABSTRACT

DORNELAS, Lorraine Rossi Signorelli Machado, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2024. **Urinary proteomic characterization of healthy dogs and those with different stages of chronic kidney disease.** Advisor: Leandro Abreu da Fonseca. Co-supervisor: Edvaldo Barros.

Chronic kidney disease (CKD) is a common, progressive and irreversible disease in dogs. Addition and proteinuria are related to the progression process of CKD. Carrying out studies in the search for early markers and indicators of the degree and location of renal inflammation, in order to assist in diagnosis and prognosis, is extremely important. 22 samples from canines of random breed, age and sex, with CKD at different stages and 5 healthy animals, were used to evaluate the urine protein profile by nano LC-MS/MS. The animals were divided into five experimental groups: group C (CG) composed of healthy animals (control); group 1 (G1) composed of animals with stage I CKD; group 2 (G2), composed of animals with stage II CKD; group 3 (G3), composed of animals with stage III CKD; and group 4 (G4), composed of animals with stage IV CKD. The objectives of this study were to understand the characterization of the urinary protein profile in dogs considering the degree of renal involvement, by carrying out a systematic review on the subject and identifying urinary proteins by mass spectrometry (nano LC-MS/MS) in healthy animals and with CKD in advances from I to IV, indicating, if relevant, markers that can assist in the early diagnosis and prognosis of CKD. As a result of the review, proteins with biomarker potential were observed, methodological diversity was demonstrated in the studies described using urinary proteomics, in addition to important points of insight. Furthermore, the experiment identified 65 proteins through the methodology used, noting a tendency for proteins to increase according to the severity of CKD, highlighting haptoglobin and transferrin as possible biomarkers and the role of the complement system in the pathogenesis of CKD. disease, requiring future studies for greater elucidation.

Keywords: Proteinuria; Mass Spectrometry; Nephropathy; Early diagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 01 Diagrama de Fluxo Prisma (Adaptado) do processo de seleção dos artigos.....	23
Figura 02 Evolução do quantitativo dos estudos com o passar dos anos	29
Figura 03 Distribuição do emprego das técnicas nos estudos inseridos na revisão sistemática	31
Figura 04 Avaliação de risco de viés (RevMan 5)	42
Figura 05 Gráfico de risco de viés (RevMan 5)	42

CAPÍTULO 2

Figura 01 Diagrama de Venn das proteínas urinárias de cães com e sem DRC	70
Figura 02 Proteínas identificadas na análise geral dos dados e por grupo estudado (GC, G1, G2, G3 e G4), conforme suas abundâncias relativas	74
Figura 03 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com o componente celular identificado em cães com e sem DRC	81
Figura 04 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com a classe proteica identificada em cães com e sem DRC	82
Figura 05 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com a função molecular identificada em cães com e sem DRC	82
Figura 06 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com o processo biológico identificado em cães com e sem DRC	83
Figura 07 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com as vias identificadas em cães com e sem DRC	83
Figura 08 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com o componente celular identificado em cães saudios (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC	84

Figura 09 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com a função molecular identificada em cães saudios (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC	84
Figura 10 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com o processo biológico identificado em cães saudios (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC	85
Figura 11 Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (https://david.ncifcrf.gov/home.jsp), de acordo com as vias identificadas em cães saudios (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC	86
Quadro 01 Proteínas identificadas na ordem de abundância relativa geral e por grupo (GC, G1, G2, G3 e G4)	66

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 01 Estratégia de pesquisa empregadas nos bancos de dados (Pubmed, Scopus e Web of Science)	20
Tabela 02 Principais características das publicações que atenderam aos critérios de inclusão da revisão sistemática	24
Tabela 03 Outros exames complementares empregados nos estudos inseridos na revisão sistemática	30
Tabela 04 Biomarcadores urinários emergentes da doença renal crônica	32
Tabela 05 Características das amostras descritas pelos estudos	37

CAPÍTULO 2

Tabela 01 Caracterização das proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, separadas por eletroforese SDS-PAGE e identificadas por NANO LC-MS/MS, em ordem de abundância relativa	67
Tabela 02 Proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, identificadas diferencialmente em apenas um grupo estudado (GC, G1, G2, G3 e G4)	71
Tabela 03 Proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, identificadas de forma simultânea nos grupos estudados (GC, G1, G2, G3 e G4)	72

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. CAPÍTULO 1: ARTIGO I - Doença renal crônica de ocorrência natural em cães e proteínas urinárias:: revisão sistemática	15
2.1.RESUMO	16
2.2.ABSTRACT	17
2.3.INTRODUÇÃO	18
2.4.MÉTODOS	19
2.4.1. Estratégia de busca	19
2.4.2. Seleção e gestão de estudos relevantes.....	20
2.4.3. Extração de dados	21
2.5.RESULTADOS	21
2.5.1. Estudos selecionados	21
2.5.2. Descrição dos estudos incluídos	23
2.5.3. Identificação de proteínas comuns relatadas por dois ou mais estudos	31
2.5.4. Perfil da amostra utilizada	36
2.5.5. Risco de viés	41
2.6.DISSCUSSÃO	43
2.7.LIMITAÇÕES, ORIENTAÇÕES FUTURAS E CONCLUSÕES	50
2.8.AGRADECIMENTOS	51
2.9.CONFLITO DE INTERESSES	51
2.10. REFERÊNCIAS	52
3. CAPÍTULO 2: ARTIGO II - Caracterização do perfil de proteínas urinárias de cães saudáveis e com doença renal crônica de ocorrência natural em diferentes estágios	57
3.1.RESUMO	58
3.2.ABSTRACT	59
3.3.INTRODUÇÃO	60
3.4.MATERIAL E MÉTODOS	60
3.4.1. Animais e delineamento experimental	60

3.4.2. Coleta de amostras e metodologia laboratorial	61
3.4.3. Proteinograma urinário	61
3.4.4. Espectrometria de massas	62
3.4.4.1. Digestão enzimática e dessalinização das proteínas	62
3.4.4.2. Espectrometria de massas	63
3.4.4.3. Análise dos dados oriundos da espectrometria de massas	63
3.4.4.4. Classificação funcional das proteínas	64
3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.5.1. Caracterização das proteínas identificadas	64
3.5.2. Classificação funcional	81
3.6. CONCLUSÃO	90
3.7. AGRADECIMENTOS	91
3.8. FINANCIAMENTO	91
3.9. DECLARAÇÕES	91
3.9.1. Comitê de ética	91
3.9.2. Conflito de interesses	91
3.10. REFERÊNCIAS	91
4. CONCLUSÃO GERAL	99
REFERÊNCIAS	100

1. INTRODUÇÃO GERAL

Em 2022, a população pet no Brasil foi estimada em 167,6 milhões de animais, sendo 67,8 milhões de cães. O mercado pet gerou um faturamento no Brasil de aproximadamente R\$ 41,1 bilhões e no mundo US\$ 149,8 bilhões. É um mercado crescente, onde o Brasil representa o terceiro maior faturamento do mundo (ABINPET, 2024). Fatores como a nutrição com dietas equilibradas, vacinações que previnem precocemente doenças infectocontagiosas e avanços na medicina veterinária têm contribuído para a maior longevidade (DE NARDI et al., 2002), entretanto, a prevalência de doenças crônicas e/ou degenerativas como câncer e a doença renal crônica (DRC) vem crescendo anualmente.

A doença renal ocorre quando há surgimento de lesões micro ou macroscópicas (POLZIN, 2017). Caracteriza-se por ser uma doença de caráter crônico, pois seu decurso é longo (LUSTOZA; KOGIKA, 2003). A partir do momento que a lesão inicial ocorre, as alterações continuam a ocorrer de forma progressiva e irreversível (MATTA, 2000).

A prevalência global da DRC em cães tem uma considerável variação de 0.05–3.74% (O'NEILL et al., 2013) e estima-se que a mesma seja a terceira causa de óbito em cães (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). A incidência da DRC aumenta com a idade. Um estudo de distribuição da DRC em cães de acordo com a faixa etária demonstra que 18% dos cães possuíam menos de 4 anos de idade, 17% entre 4 e 7 anos, 20% entre 7 e 10 anos e 45% possuíam mais de 10 anos (POLZIN, 2017).

A causa de base, que muitas vezes não é persistente e dificilmente definida, pode afetar glomérulos, túbulos, tecido intersticial ou vascularização renal, entretanto, independentemente do local acometido, pode ocorrer a perda de função total do néfron (GRAUER, 2010). Embora iniciada por uma variedade heterogênea de fatores de risco, o resultado final da DRC em cães é a redução da taxa de filtração glomerular renal total e as consequências disso para a homeostase do organismo devido a perda de função renal (DUNAEVICH et al., 2020).

A evolução da DRC pode variar de meses até anos (GRAUER, 2010; POLZIN, 2017). As anormalidades funcionais ou estruturais em um ou ambos os rins necessitam estar presentes por no mínimo três meses (BARTGES, 2012; POLZIN, 2017), gerando uma perda permanente da quantidade de néfrons funcionais. Geralmente o declínio da função renal é progressivamente lento. Em alguns pacientes ocorre um declínio linear, enquanto em outros o padrão é

caracterizado por períodos de estabilidade seguido por episódios de declínio acentuado (POLZIN, 2017).

Mecanismos compensatórios como a hiperfiltração e a hipertensão intraglomerular contribuem para a progressão da DRC. O aumento da taxa de filtração glomerular individual do néfron (TFGIN) facilita a excreção de produtos residuais, mas tem efeitos negativos na sobrevivência a longo prazo dos néfrons remanescentes. A hiperfiltração é resultado do aumento do coeficiente de ultrafiltração glomerular, do aumento do volume por hipertrofia, por aumento do fluxo plasmático capilar glomerular e aumento da pressão capilar transglomerular devido à dilatação da arteríola aferente (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

Com a hiperfiltração há aumento do movimento de proteínas através dos capilares glomerulares para o espaço de Bowman e o mesângio, um processo conhecido como “tráfego de proteínas”. Essa elevação no tráfego de proteínas através dos glomérulos e o processamento de proteínas pelos túbulos renais causam reações negativas no mesângio, túbulos e interstício, contribuindo para nefrite tubulointersticial e glomeruloesclerose (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012; HARLEY; LANGSTON, 2012).

Não se sabe se a proteinúria é causa ou consequência da DRC (HARLEY; LANGSTON, 2012; POLZIN, 2017), mas o aumento da filtração de proteínas pelos glomérulos é tóxico para o rim, pois as proteínas plasmáticas são potencialmente tubulotóxicas (ZANDI-NEJAD et al., 2004; GRAUER, 2011a, 2011b; CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Uma carga excessiva de proteína pode desregular a endocitose de proteína mediada pelo receptor de cubilina e megalina pelas células tubulares proximais e predispor essas células à atrofia e apoptose. A reabsorção excessiva de proteínas e substâncias ligadas a proteínas, incluindo ácidos graxos, pode promover respostas de estresse celular que ativam uma variedade de genes que promovem citocinas pró-inflamatórias, autofagia e respostas imunes ativadas, consequentemente, a proteinúria gera um ciclo mal adaptativo de lesão tubular, degeneração epitelial e cicatrização no interstício adjacente (COWGILL et al., 2016).

Adicionalmente, as células tubulares possuem receptores para hormônios e fatores de crescimento, alguns dos quais são proteínas de baixo peso molecular (por exemplo, fator de crescimento semelhante à insulina 1 [IGF-1], fator de crescimento transformador β) que são filtrados excessivamente e captados pelas células tubulares proximais onde podem promover proliferação celular e deposição de matriz extracelular levando a dano tubulointersticial. Células tubulares sobrecarregadas com proteínas podem ativar o complemento, regular positivamente a formação de mediadores inflamatórios (como o fator de crescimento transformador beta) e vasoativos (por exemplo, proteína quimiotática de

monócitos-1, endotelina), que têm efeitos tóxicos potenciais no rim, contribuindo para fibrose (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

O aumento da filtração de proteínas séricas também ocorre no espaço mesangial, o que resulta na proliferação de células mesangiais e acúmulo de matriz celular mesangial, ambas contribuindo para o desenvolvimento da glomeruloesclerose. O acúmulo de lipídios no mesângio pode promover a proliferação de células mesangiais, produção excessiva de componentes da matriz mesangial, como colágeno e proteoglicanos e, finalmente, esclerose glomerular. Proteinúria e esclerose glomerular em néfrons remanescentes são resultados da hiperfiltração glomerular que podem levar à deterioração progressiva do tecido renal remanescente (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

O estresse celular estimula vias que levam à apoptose desregulada, respostas inflamatórias locais e/ou fibrose intersticial, contribuindo para DRC progressiva. Uma dessas respostas celulares mal-adaptativas está associada ao acúmulo de proteínas inadequadamente processadas ou desdobradas no retículo endoplasmático (RE), que levará a adaptações celulares para ajustar a tradução, translocação, dobramento e degradação das proteínas do RE como mecanismos de proteção, mas que simultaneamente promovem a autofagia celular (COWGILL et al., 2016).

Citocinas pró-inflamatórias e fibrogênicas são importantes no desenvolvimento e na progressão da DRC (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012). Quando ocorre uma lesão renal, seja glomerular ou tubular, independente da causa, há uma liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas e quimiocinas, gerando o recrutamento e acúmulo de células mononucleares no interstício renal. Os macrófagos e linfócitos T, desencadeiam uma resposta imune, ocasionando uma nefrite intersticial. As células tubulares sofrem lesão na sua membrana basal e uma transição epitelial mesenquimal, se transformando em fibroblastos intersticiais. A proliferação dos fibroblastos leva a formação de colágeno, que por sua vez lesiona os vasos e túbulos renais, levando a mais inflamação, e a uma progressiva deposição de matriz extracelular, que culmina em fibrose túbulo intersticial e glomerular, levando a uma perda dos néfrons (VIANNA et al., 2011; RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2015).

Além das citocinas e quimiocinas, durante a resposta inflamatória de fase aguda, o sistema imune natural responde ao processo infeccioso ou inflamatório produzindo uma série de proteínas inflamatórias, com atividade inespecífica, conhecidas por proteínas de fase aguda (PFAs) (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Estudo tem demonstrado o envolvimento do sistema complemento na patogênese das glomerulonefrites e túbulo nefrites, sendo possível observar depósito de complemento nos complexos imunes (EDELWEISS;

MEINE; SCROFERNEKER, 1997). Tanto a via clássica como a alternativa resultam na formação de um complexo de ataque à membrana, composto pelos componentes C5, C6, C7, C8 e C9, levando a lise das membranas celulares (ECKERSALL, 2008).

Na maioria dos casos o diagnóstico de DRC se dá por meio da verificação de uma elevação na concentração de creatinina sérica, contudo, valores acima dos intervalos de referência para espécie significam queda de no mínimo 75% da taxa de filtração glomerular (TFG) e dano ou perda de pelo menos 75% dos néfrons de ambos os rins. Dessa forma, o diagnóstico da DRC ocorre relativamente tarde no curso da doença (POLZIN, 2017).

A proteinúria vem sendo considerada um marcador precoce, sensível e indicador de prognóstico (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017). A urina é uma rica fonte de biomarcadores para várias doenças devido às alterações específicas que ocorrem em seu proteoma. Várias técnicas têm sido empregadas para estudos dos peptídeos e proteínas urinárias, incluindo eletroforese bidimensional combinada com espectrometria de massa (MS) e/ou identificação imunológica de proteínas, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e espectrometria de massa de desorção/ionização a laser aprimorada por superfície (SELDI-MS) (GOOD et al., 2010)

Os objetivos deste estudo foram compreender a caracterização do perfil de proteínas urinárias em cães considerando o grau de acometimento renal, por meio da realização de uma revisão sistemática sobre o assunto e da identificação de proteínas urinárias por espectrometria de massas (nano LC-MS/MS) em animais saudáveis e com DRC nos estágios de I a IV, sugerindo, se pertinente, marcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce e prognóstico da DRC.

2. CAPÍTULO 1

ARTIGO I

**Doença renal crônica de ocorrência natural em cães e proteínas urinárias:
revisão sistemática**

2.1.RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia com maior prevalência em idosos. Ela surge quando há lesões renais irreversíveis e progressivas, evoluindo de meses a anos. Na rotina clínica o diagnóstico ocorre tardiamente, havendo necessidade de biomarcadores precoces. A presença de proteinúria é típica na DRC e a avaliação das proteínas urinárias podem auxiliar no entendimento e diagnóstico da doença. Esta revisão sistemática foi realizada para analisar como a DRC influencia as proteínas urinárias, a fim de identificar prováveis metodologias e proteínas que possam contribuir no diagnóstico precoce da doença. Foi realizada uma busca eletrônica nas bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. Os seguintes termos foram utilizados na estratégia de busca em títulos e resumos: ‘dog or canine’ and ‘urin*’ and ‘prote*’ and ‘kidney or renal and disease or insufficiency’ and ‘chronic’. Dos estudos foram extraídas variáveis de interesse relacionadas às características do modelo experimental, métodos de pesquisa e recursos técnicos. A qualidade metodológica foi avaliada com a ferramenta de risco de viés do SYRCLE. Assim, foram selecionados 21 estudos avaliando proteínas urinárias na DRC. Observou-se grande heterogeneidade dos estudos, com diferenças relacionadas ao modelo experimental e aos métodos de coleta, conservação, análise e interpretação dos dados, bem como à precisão do relatório científico. Sendo assim, descreveu-se achados relevantes de cada estudo, as divergências entre eles e os importantes pontos de viés. Dentre as proteínas mais estudadas estão proteína transportadora de retinol, uromodulina e lipocalina associada à gelatinase neutrofílica. Estudos padronizados ainda são necessários para aquisição de maiores conhecimentos sobre a aplicabilidade de proteínas urinárias na rotina clínica diagnóstica.

Palavras-chave: Biomarcadores; urina; proteômica; nefropatia; canino.

2.2.ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a pathology with greater prevalence in the elderly. It appears when there is irreversible and progressive kidney damage, progressing over months to years. In clinical routine, diagnosis occurs late, requiring early biomarkers. The presence of proteinuria is typical in CKD and the evaluation of urinary proteins can help in understanding and diagnosing the disease. This systematic review was carried out to analyze how CKD influences urinary proteins, in order to identify likely methodologies and proteins that can contribute to the early diagnosis of the disease. An electronic search was carried out in the PubMed, Scopus and Web of Science databases. The following terms were used in the search strategy: 'dog or canine' and 'urin*' and 'prote*' and 'kidney or renal and disease or insufficiency' and 'chronic' in titles and abstracts. Variables of interest related to the characteristics of the experimental model, research methods and technical resources were extracted from the studies. Methodological quality was assessed with the SYRCLE risk of bias tool. Thus, 21 studies evaluating urinary proteins in CKD were selected. A great heterogeneity of studies was observed, with differences related to the experimental model and methods of data collection, conservation, analysis and interpretation, as well as the accuracy of the scientific report. Therefore, relevant findings from each study were described, the divergences between them and the important points of bias. Among the most studied proteins are retinol transport protein, uromodulin and lipocalin associated with neutrophil gelatinase. Standardized studies are still needed to acquire greater knowledge about the applicability of urinary proteins in routine clinical diagnosis.

Keywords: Biomarkers; urine; proteomics; nephropathy; canine.

2.3.INTRODUÇÃO

Os cães são companheiros benéficos para saúde e bem-estar dos seres humanos, pois estimulam a liberação de ocitocina, o que reduz stress, melhora convívio social (BORGI; CIRULLI, 2016), estimula exercício físico (WOHLFARTH et al., 2013), auxilia aprendizagem (HALL; GEE; MILLS, 2016) e terapias (BERRY et al., 2013), diminui eventos cardiovasculares (LEVINE et al., 2013), aumenta imunidade (CHARNETSKI; RIGGERS; BRENNAN, 2004) e sobrevida (KRAMER; MEHMOOD; SUEN, 2019). O aumento da sobrevida humana reflete positivamente na sobrevida dos cães, elevando a prevalência das doenças crônicas e degenerativas. Por isso, cães podem ser empregados como modelo translacional para estudo das condições crônicas que comumente ocorrem em populações humanas (HOFFMAN et al., 2018).

A doença renal crônica (DRC) é uma patologia que acomete qualquer idade, embora apresente maior prevalência em idosos, sendo o avanço da idade um importante fator de risco. A doença surge quando há lesões em um ou ambos os rins por no mínimo três meses, gerando perda de néfrons funcionais (POLZIN, 2017). A partir do momento que a lesão inicial ocorre, as alterações são progressivas e irreversíveis (MATTA, 2000), evoluindo de meses a anos (GRAUER, 2010; POLZIN, 2017).

Geralmente o diagnóstico da DRC ocorre de forma tardia, pois os métodos não invasivos disponíveis na maioria dos países, são pouco sensíveis e/ou inespecíficos para o diagnóstico precoce e entendimento do processo da doença (HOKAMP et al., 2016). Sendo assim, há uma necessidade urgente de biomarcadores preditivos precoces de DRC, permitindo melhora no prognóstico, pois diagnósticos tardios e imprecisos prejudicam o emprego de terapias eficazes em tempo hábil (DEVARAJAN, 2008).

A presença de proteinúria é típica na DRC (BROWN, 2007). Embora a relação proteína: creatinina urinária (UPC) pareça ser um indicador precoce, ela não diferencia danos renais glomerulares e tubulares (HOKAMP et al., 2016; DORNELAS et al., 2021).

Não se sabe se a proteinúria é causa ou consequência da DRC (HARLEY; LANGSTON, 2012; POLZIN, 2017), pois com a hiperfiltração que ocorre como mecanismo compensatório, há aumento do movimento de proteínas através dos capilares glomerulares para o espaço de Bowman e o mesângio. Essa elevação no tráfego de proteínas e o processamento de proteínas pelos túbulos renais contribuem para nefrite tubulointersticial e glomeruloesclerose (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012; HARLEY; LANGSTON, 2012). Desta forma, existe uma relação inversa entre o nível de proteinúria e a sobrevida, justificando a necessidade de um

diagnóstico adequado de proteinúria e a adoção de estratégias de tratamento antiproteinúrico, a fim de reduzir a taxa de perda proteica e o consequente dano renal (ZANDI-NEJAD et al., 2004; GRAUER, 2011a, 2011b).

Cerca de 70% do total de proteínas urinárias é originado nos rins e trato urinário, enquanto o restante é referente aos peptídeos circulantes e pequenas proteínas transportadas no sangue e filtradas/secretadas na urina. Assim, a urina é um material rico em moléculas com potencial para tornarem-se biomarcadores para doenças renais, além de refletir alterações sistêmicas (SCHANSTRA; MISCHAK, 2015).

Esta é a primeira revisão sistemática que avalia as proteínas urinárias na DRC de ocorrência natural em cães. Estudos sobre proteínas urinárias na DRC de ocorrência natural na espécie canina são escassos, com alto grau de heterogeneidade de metodologias e resultados. Por conseguinte, o objetivo deste artigo foi avaliar a influência da DRC nas proteínas urinárias por meio de revisão sistemática, a fim de identificar prováveis metodologias e proteínas que possam contribuir no diagnóstico precoce da doença, visando o uso como ferramenta de auxílio diagnóstico na avaliação dos pacientes. Além disso, sua realização buscou identificar potenciais dificuldades ou falhas metodológicas dos artigos publicados na área para auxiliar no desenvolvimento de estudos futuros.

2.4.MÉTODOS

2.4.1. ESTRATÉGIA DE BUSCA

As diretrizes Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) (Moher et al., 2009) foram utilizadas como base para o desenvolvimento desta revisão sistemática. Extensa pesquisa eletrônica foi realizada para publicações de estudos que respondessem ao seguinte questionamento: qual o efeito da DRC nas proteínas urinárias em cães. A pesquisa foi realizada utilizando as bases de dados PubMed, Scopus e Web of Science. Os termos utilizados e a estratégia de busca encontram-se detalhados na tabela 01.

A data da última busca foi definida em 08 de junho de 2021. Não foram aplicadas restrições de idioma ou data de publicação. As listas de estudos obtidas nas bases de dados foram baixadas e enviadas para uma ferramenta de suporte à revisão sistemática, o StArt (State of the Art through Systematic Review), que serviu de apoio ao planejamento, execução e sumarização dos dados, tornando a revisão mais ágil, precisa e replicável.

Tabela 01. Estratégia de pesquisa empregadas nos bancos de dados (Pubmed, Scopus e Web of Science).

Banco de dados	Estratégia de pesquisa empregada
PubMed	("dog"[Title/Abstract] OR "canine"[Title/Abstract]) AND "urin*" [Title/Abstract] AND "prote*" [Title/Abstract] AND ("kidney"[Title/Abstract] OR "renal"[Title/Abstract]) AND (("disease"[Title/Abstract] OR "failure"[Title/Abstract]) AND "chronic"[Title/Abstract])
Scopus	(TITLE-ABS (dog OR canine)) AND (TITLE-ABS (urin*)) AND (TITLE-ABS (prote*)) AND (TITLE-ABS (kidney OR renal)) AND (TITLE-ABS (disease OR failure AND chronic))
Web of Science	TI=(disease OR failure AND chronic) AND AB=(disease OR failure AND chronic) AND TI=(kidney OR renal) AND AB=(kidney OR renal) AND TI=(prote*) AND AB=(prote*) AND TI=(urin*) AND AB=(urin*) AND TI=(dog OR canine) AND AB=(dog OR canine)

2.4.2. SELEÇÃO E GESTÃO DE ESTUDOS RELEVANTES

Os estudos foram selecionados em três etapas consecutivas e de acordo com os critérios de elegibilidade pré-determinados pelos autores. Primeiramente, após a eliminação das duplicatas, os títulos e resumos de todos os artigos eletrônicos foram selecionados para avaliar sua elegibilidade. Em segundo lugar, os artigos que atenderam ou foram considerados como satisfazendo os critérios foram recuperados como textos completos. Na etapa final, todos os estudos que apresentavam o resultado de interesse foram selecionados.

Os estudos foram considerados elegíveis se atendessem aos seguintes critérios de inclusão: (1) estudos que contemplem cães domésticos com DRC; (2) estudos que tenham realizado a avaliação laboratorial das proteínas urinárias em cães com DRC e (3) estudos com avaliação laboratorial das proteínas urinárias em cães saudáveis. Enquanto isso, os critérios de exclusão foram revisão de literatura, capítulo de livro, consenso médico, resumos em anais, relato de caso, literatura cinzenta, tese e dissertações (1); outras afecções e/ou em outros órgãos (2); DRC secundária (3); nefropatia congênita/hereditária (4); modelos animais que não fossem cães (5); estudos realizados em pacientes humanos; tratamento medicamentoso/dieta (6); prognóstico (7); apenas controle (8); presença de sedimento urinário ativo (9); ausência de identificação/detalhamento das proteínas urinárias (10).

2.4.3. EXTRAÇÃO DE DADOS

Como regra, o trabalho foi realizado por dois revisores independentes (LRSMD e GCLE). Os artigos foram selecionados por título e resumo, e cada revisor apresentou uma lista completa dos artigos selecionados para compará-los e discutir não conformidades. Quaisquer divergências foram resolvidas com discussão orientada por consenso, não sendo necessário consultar uma terceira pessoa.

Todos os dados extraídos dos artigos foram inseridos em uma planilha Excel (tabela suplementar 1), incluindo as seguintes informações: título do artigo; autores; ano; país; periódico; DOI; fator de impacto; tipo de publicação; critérios de inclusão; pioneirismo; classificação do estudo; objetivo; tempo de duração; número de cães envolvidos e divisão dos grupos; caracterização dos grupos; estadiamento conforme preconizado pela sociedade internacional de interesse renal (IRIS); peso; idade; sexo; status reprodutivo; raça; histopatológico renal; dimetilarginina simétrica (SDMA); cistatina C; número de coletas; método de coleta; temperatura e tempo de armazenamento e processamento das amostras; momento do dia que a urina foi coletada; número de ciclos de congelamento e descongelamento; exclusão de amostras com sedimento urinário ativo; realização de cultura bacteriana; adição de inibidor de protease; tipo de amostra (sobrenadante ou sedimento); gama glutamil transferase (GGT) urinário; UPC; descrição da metodologia para avaliação das proteínas urinárias; técnicas proteômicas (eletroforese/espectrometria de massas/imunodiagnóstico); testes de validação; método de caracterização/identificação das proteínas urinárias, método de quantificação das proteínas urinárias; réplica técnica ou biológica; software de leitura/identificação das proteínas urinárias, normalização dos resultados em relação as concentrações de creatinina urinária, indicação de proteína(s) como marcador; principais achados/conclusões; limitações do estudo.

Para esta revisão, todos os artigos foram avaliados usando uma análise de risco de viés, realizada de acordo com o Centro de Revisão Sistemática para Experimentação com Animais de Laboratório (SYRCLE) (HOOIJMANS et al., 2014), com adaptações.

2.5.RESULTADOS

2.5.1. ESTUDOS SELECIONADOS

A busca resultou em 231 registros identificados nos bancos de dados utilizados para a pesquisa. Não foram incluídos estudos adicionais a partir das listas de referências. Houve

remoção de duplicidades (n=63) e foram realizadas exclusões por meio da leitura de título e resumo (n= 147 artigos), sendo excluídos 210 artigos.

O texto completo dos 21 artigos restantes foi avaliado para elegibilidade da revisão seguindo os critérios pré-determinados pelos autores. Após a leitura completa e minuciosa, verificou-se que 21 artigos cumpriam os critérios de elegibilidade e foram incluídos. Um fluxograma do processo de busca e seleção é demonstrado na figura 1.

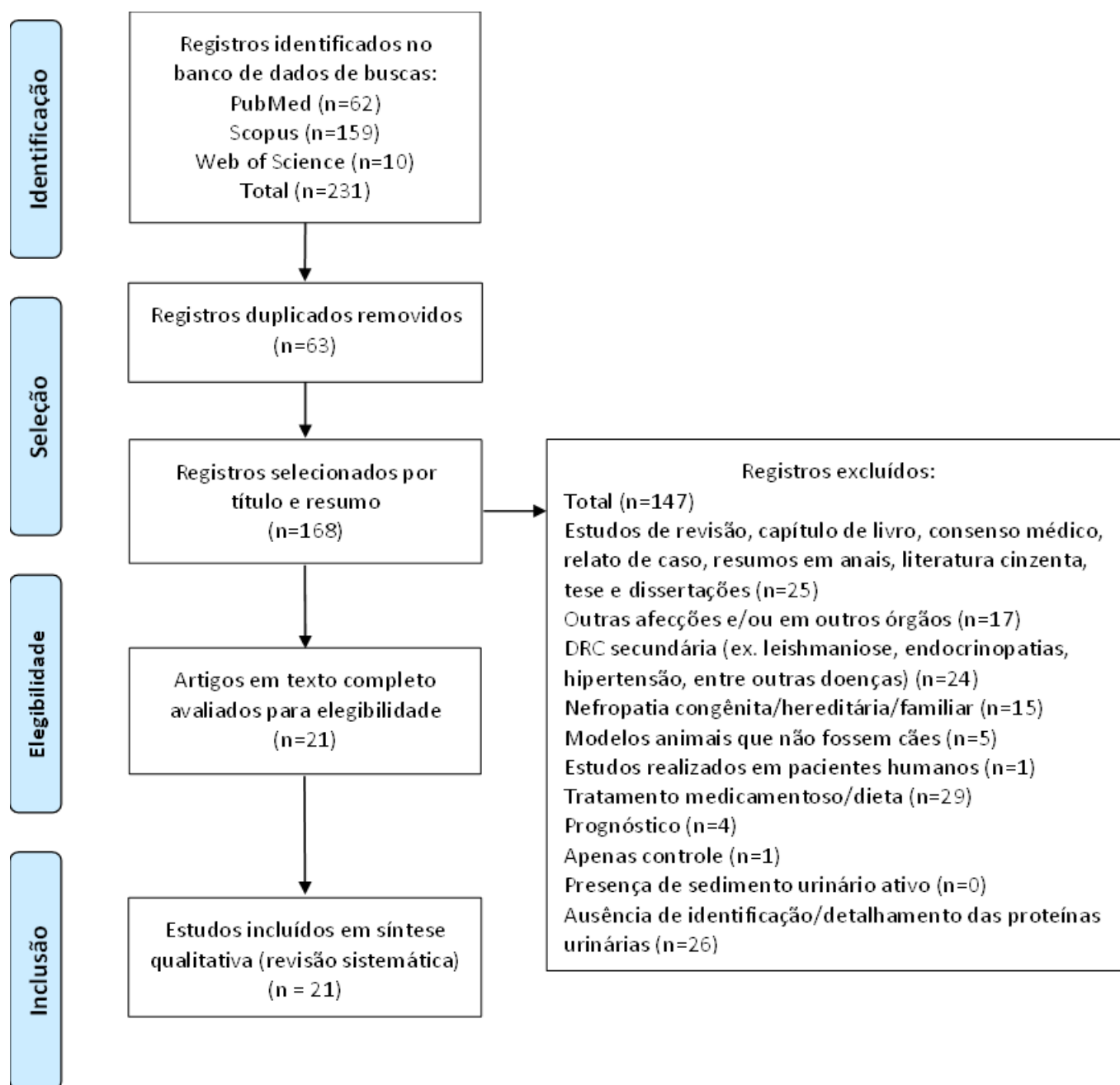


Figura 01. Diagrama de Fluxo Prisma (Adaptado) do processo de seleção dos artigos. Fonte: Dados da pesquisa.

2.5.2. DESCRIÇÃO DOS ESTUDOS INCLUÍDOS

As principais características das publicações foram resumidas na tabela 02 e encontram-se de forma completa na tabela suplementar 1.

Tabela 02. Principais características das publicações que atenderam aos critérios de inclusão da revisão sistemática.

Referências	País	Duração do estudo	Amostragem (n amostral): divisão dos grupos	Estadiamento IRIS realizado? Ano	Estadiamento IRIS empregado?	Técnica empregada		
						Espectrometria de massas	Eletroforese	Imunodiagnóstico
Raila, et al., 2003	Alemanha	NM	38: DRC (n=17) e cães controle (n=21)	Não	Não	Retinol e ésteres de retinil: cromatografia líquida de alta eficiência com gradiente modificado de fase reversa.		RBP e THP: ELISA
Forterre et al., 2004	Alemanha	NM	28: Cães saudáveis (n=12) e DRC (n=16).	Não	Não	SELDI-TOF MS	SDS-PAGE	RBP e THP: Western blotting
Smets et al., 2010	Bélgica	NM	30: Cães saudáveis [2 grupos de acordo com a idade: grupo de cães jovens (1–3 anos) (n=10) e grupo de cães idosos saudáveis (7 anos) (n=10)]. Cães com DRC (n = 10)	Sim. 2005	Sim			uALB e uPCR: ELISA sanduíche específicos para cães; uRBP: kit de ELISA humano
Raila et al., 2010	Alemanha	NM	64: grupo A (n = 8), não azotêmico (creatinina plasmática < 125 µmol/L) e não proteinúrico (UPC < 0,2) com taxa de P-Cl _{Cr} > 90 mL/min/m ² ; grupo B (n=26), não azotêmico e não proteinúrico com taxa de P-Cl _{Cr} de 50 a 89 mL/min/m ² ; grupo C (n=7), não azotêmico, mas proteinúrico com taxa de P-Cl _{Cr} de 53 a 98 mL/min/m ² ; grupo D (n=8), azotêmico e	Não	Não			uRBP: 2-site ELISA; uAlb: ELISA sanduíche de duplo anticorpo

			proteinúrico limítrofe com taxa de P-Cl _{Cr} 22 a 45 mL/min/m ²); e grupo E (n=15), azotêmico e proteinúrico (P-Cl _{Cr} não avaliado).				
Jaturakan et al., 2013	Tailandia	NM	51: grupo controle saudável (concentração de creatinina plasmática < 1,4 mg/dl sem ITU (n=9), grupo DRC moderada (1,4 < PCr < 5,0 mg/dl) (DRC estágio II+III) (n=12), grupo DRC grave (PCr > 5,0 mg/dl) (DRC estágio IV) (n=17) e grupo ITU (n=13).	Sim. NM (possivelmente 2013).	Sim	SDS-PAGE	
Steinbach et al., 2014	Alemanha	Novembro/2010 - Novembro/2011.	108 cães: 18 cães controle sadios, 17 cães com DRC, e 48 cães com IRA (25 cães foram excluídos).	Não	Não	NGAL: ELISA sanduíche	
Raila et al., 2014	Alemanha	NM	63: dividido em 5 grupos de acordo com a PCr, UPC e taxas de depuração de creatinina plasmática exógena (P-Cl _{Cr}): Grupo A (cães controles saudáveis; n = 8), não azotêmicos e não proteinúricos cães, com taxas de P-Cl _{Cr} > 90 mL/min/m ² ; grupo B (n = 25), cães não azotêmicos e não proteinúricos com taxas de P-Cl _{Cr} reduzidas (51–89 mL/min/m ²); grupo C (n = 7), cães não azotêmicos, mas proteinúricos, com taxas	Não	Não	SDS-PAGE	THP: Western blot

			de P-Cl _{Cr} 53–98 mL/min/m ² ; grupo D (n = 8), cães azotêmicos e proteinúricos limítrofes (taxas de P-Cl _{Cr} : 22–45 mL/min/m ²); e grupo E (n = 15), cães azotêmicos e proteinúricos (não testados para P-Cl _{Cr}).			
Hokamp et al., 2016	Estados Unidos	Janeiro/ 2008 - Setembro/2013.	Inicialmente 203 (excluídos 23): DRC (n=165), lesão renal aguda (LRA) (n=5), ambos DRC e LRA (n=3), ou informações insuficientes disponíveis para determinar a cronicidade da doença renal (n= 7).	Sim. Informação incerta.	Sim	uIgG, uIgM, uRBP, uNGAL e uNAG: ELISA
Chacar et al., 2017	Brasil	NM	49: grupo controle (n=9); DRC (n=40): estágio 1 (n=10), estágio 2 (n=10), estágio 3 (n=10) e estágio 4 (n=10).	Sim. 2015.	Sim	SDS-PAGE uAlb, uVDBP, uRBP e uTHP: western blotting
Hokamp et al., 2018	Estados Unidos	Janeiro/ 2008 - Setembro/2014	Inicialmente 275 cães (excluídos 57): cães DRC (n=207) e cães saudáveis (n=11).	Não	Não	NuPAGE
Heilmann et al., 2018	Alemanha	Material de estudos ou arquivos anteriores [2–87 meses	125: pancreatite (n = 24), EPI (n = 29), CH (n = 11) ou DRC-P (n = 61; para mensuração das concentrações de α 1-PI urinária n=30).	Não	Não	α 1-PI urinário: radioimunoensaio
Pelander et al., 2019	Suécia	NM	50: DRC (n=25) e cães saudáveis (n=25).	Sim. 2019.	Não	CE-MS
Szczepankiewicz, B. et al.	Polônia	NM	36: Grupo Controle (n=8), Grupo Coração (n=22) e Grupo Rim (n=6).	Sim. 2017.	Não	LC-MS-MRM

Kim et al., 2019	Estados Unidos	Agosto/ 2014 - abril/2016.	119: cães controles saudáveis (n=20), cães com azotemia pré-renal (n=22), cães com DRC estável (n=19), cães com DRC progressiva (n=30) e cães com LRA (n=27).	Não	Não	NGAL: ELISA sanduíche
Yi et al., 2020	República da Coreia	Abril/2019 - outubro/ 2019.	37: Controle (n=10) e DRC (estágios 1, 2, 3 e 4) (n=27). Para identificar as associações entre a concentração de alfa-klotho solúvel e a idade, os cães dos grupos controle e DRC foram classificados em diferentes grupos com base na idade: (1) igual ou inferior a 2 anos (n = 3); (2) 3 a 8 anos (n = 10); (3) 9 a 15 anos (n = 12); e (4) 16 anos ou mais (n = 12).	Sim. 2019.	Sim	Alfa klotho urinário: ELISA sanduíche quantitativo
Winiarczyk, 2020	Polônia	NM	22: grupo 1 (DRC) (n=12) e Grupo 2 (cães saudáveis) (n=10).	Sim, mas não mencionam o ano e não descrevem nas referências. Baseado nos valores, possivelmente IRIS 2017.	Apenas pacientes do estágio 3.	uIgG, uRBP e uTHP: ELISA sanduíche
Hezzell et al., 2020	Estados Unidos	Outubro/ 2014 - novembro/2017.	23: DRC [n=11; IRIS estágio 2 (n=5) e IRIS estágio 3(n=6)] e 12 cães controle saudáveis.	Sim. Embora o link do acesso encaminhe para a última atualização, ela não está compatível com os valores	Sim. Estágios 2 e 3 apenas.	Cistatina B urinária, NGAL e clusterina: ELISA

				descritos no artigo.			
Thanaboonnipat et al., 2020	Tailândia	Setembro/2017 - dezembro/2017.	30: Cães saudáveis (HD; n=15) e cães DRC (DRC; n=15). DRC IRIS Estágio 2 (n=8) e Estágio 3 (n=7).	Sim. 2017.	Sim. Estágios 2 e 3 apenas.		uPIIINP: ELISA em sanduíche duplo
Patitucci et al., 2020	Brasil	NM	33: Grupo controle (cães saudáveis) (n=5), grupos DRC (n=28) [Grupo 1 (n=8), Grupo 2 (n=6), Grupo 3 (n=9) e Grupo 4 (n=5)].	Sim. 2010.	Sim		SDS-PAGE
Ferlizza et al., 2020	Itália	NM	50: saudáveis (n = 22) e DRC (n=28).	Sim. 2019.	Não	ESI-QTOF/MS	NuPAGE
Dornelas et al., 2021	Brasil	NM	27: Grupo Controle (n=5), G1(estágio 1) (n=3), G2 (estágio 2) (n=10), G3 (estágio 3) (n=4) e G4 (estágio 4) (n=5).	Sim. 2019.	Sim		SDS-PAGE

*uNAG foi realizado por ensaio colorimétrico (reação enzimática) (SMETS et al., 2010). Abreviaturas: NM, não mencionado; LRA, lesão renal aguda; IRA, insuficiência renal aguda; DRC, doença renal crônica; EPI, insuficiência pancreática exócrina; UPC, razão proteína creatinina urinária; PCr, creatinina plasmática; ITU, infecção do trato urinário; DRC-P, DRC proteinúrica; uNAG, N-acetil-β-D-glucosaminidase urinária; NGAL, lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; RBP, proteína transportadora de retinol; THP, proteína de Tamm-Horsfall; PCR, proteína C reativa; IgG, imunoglobulina G; IgM, imunoglobulina M; uVDBP, proteína de ligação à vitamina D urinária; α1-PI, Inibidor de α1-proteinase; sSDMA, dimetilarginina simétrica urinária; uPIIINP, Propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo III urinário; uAlb, albumina urinária; IRIS, Sociedade Internacional de Interesse Renal; P-CICr, clearance (depuração) de creatinina; SELDI-TOF-MS, Espectrometria de massa de tempo de voo com dessorção a laser aprimorada por superfície; SDS-PAGE, Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio; NuPAGE, eletroforese em géis de poliacrilamida pré-moldados; CE-MS, eletroforese capilar acoplado a espectrometria de massa; LC-MS-MRM, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com monitoramento de múltiplas reações; ESI-QTOF/MS, espectrometria de massa de tempo de voo quadrupolo de ionização por eletrospray; ELISA, ensaio de imunoabsorção enzimática.

Os trabalhos selecionados foram publicados de 2003 a 2021, sendo notada uma elevação do quantitativo de estudos nos últimos 5 anos. Em 2020 houve o maior número de publicações (figura 02). A minoria (8/21) deles descreve o período adotado para avaliação dos pacientes.

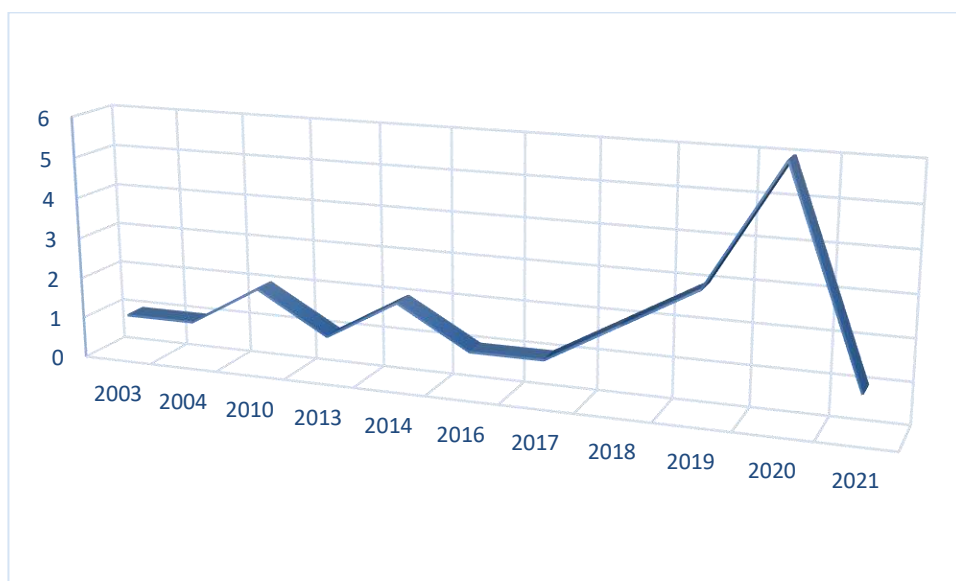


Figura 02. Evolução do quantitativo dos estudos com o passar dos anos.

Os estudos foram realizados principalmente na Alemanha (6/21), seguidos dos Estados Unidos (4/21), Brasil (3/21), Polônia (2/21), Tailândia (2/21), Bélgica (1/21), Itália (1/21), República da Coreia (1/21) e Suécia (tabela 02).

Aproximadamente 60% apresentavam um n amostral total de até 50 indivíduos, divididos em grupos contendo pelo menos um grupo de pacientes com DRC. As idades e raças dos cães foram diversas. Em relação ao estadiamento da IRIS, 52,4% (11/21) não aplicaram na divisão dos grupos e 38% não estagiaram os pacientes na avaliação clínica dos doentes renais. Dos que aplicaram a IRIS, diferentes foram as atualizações empregadas e nem todos utilizaram todos os estágios no estudo (tabela 02).

Em relação aos testes diagnósticos atualmente descritos como possibilidade da avaliação precoce da DRC, como a SDMA e Cistatina C, a minoria das publicações relatam o emprego destes (tabela 03). O histopatológico foi realizado em apenas 5 estudos (RAILA et al., 2003a; HOKAMP et al., 2016, 2018; HEILMANN et al., 2018; PELANDER et al., 2019b), sendo que em três não foi empregado na avaliação dos resultados (RAILA et al., 2003a; HEILMANN et al., 2018; PELANDER et al., 2019b). A avaliação da GGT urinária não foi realizada em nenhum estudo, enquanto a UPC foi utilizada como base em todos.

Tabela 03. Outros exames complementares empregados nos estudos inseridos na revisão sistemática.

Referências	Histopatológico	SDMA	Cistatina C	GGT urinário	UPC
Raila, et al., 2003	Sim. Apenas para diagnóstico.	Não	Não	Não	Sim
Forterre et al., 2004	Não	Não	Não	Não	Sim
Smets et al., 2010	Não	Não	Não	Não	Sim
Raila et al., 2010	Não	Não	Não	Não	Sim
Jaturakan et al., 2013	Não	Não	Não	Não	Sim
Steinbach et al., 2014	Não	Não	Não	Não	Sim
Raila et al., 2014	Não	Não	Não	Não	Sim
Hokamp et al., 2016	Sim. As biópsias renais foram processadas rotineiramente para LM e eletrônica de transmissão TEM por um único patologista. O dano glomerular foi avaliado com LM e TEM, e o dano de TI foi avaliado com LM.	Não	Não	Não	Sim
Chacar et al., 2017	Não	Não	Não	Não	Sim
Hokamp et al., 2018	Sim. LM e microscopia eletrônica de transmissão TEM.	Não	Não	Não	Sim
Heilmann et al., 2018	Sim. Apenas para diagnóstico.	Não	Não	Não	Sim
Pelander et al., 2019	Sim. Para caracterização dos beagles saudáveis de uma instituição de pesquisa sueca.	Não	Não	Não	Sim
Szczepankiewicz, B. et al.	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Kim et al., 2019	Não	Não	Não	Não	Sim
Yi et al., 2020	Não	Sim	Não	Não	Sim
Winiarczyk, 2020	Não	Não	Não	Não	Sim
Hezzell et al., 2020	Não	Sim	Sim	Não	Sim
Thanaboonipat et al., 2020	Não	Não	Não	Não	Sim
Patitucci et al., 2020	Não	Não	Não	Não	Sim
Ferlizza et al., 2020	Não	Não	Não	Não	Sim
Dornelas et al., 2021	Não	Não	Não	Não	Sim

Abreviaturas: LM, microscopia óptica; TEM, microscopia eletrônica de transmissão; GGT, gama glutamil transferase; UPC, relação proteína creatinina urinária; SDMA, dimetilarginina simétrica urinária.

Os trabalhos foram categorizados de acordo com as técnicas empregadas para avaliação das proteínas: eletroforese (tabela suplementar 02), espectrometria de massas (tabela suplementar 03) e imunodiagnóstico (tabela suplementar 04). Aproximadamente 67% (14/21) empregaram técnicas de imunodiagnóstico, seguidos de 38% (8/21) baseou-se no uso da eletroforese, enquanto 24% (5/21) aplicou técnicas de espectrometria de massas (figura 03).

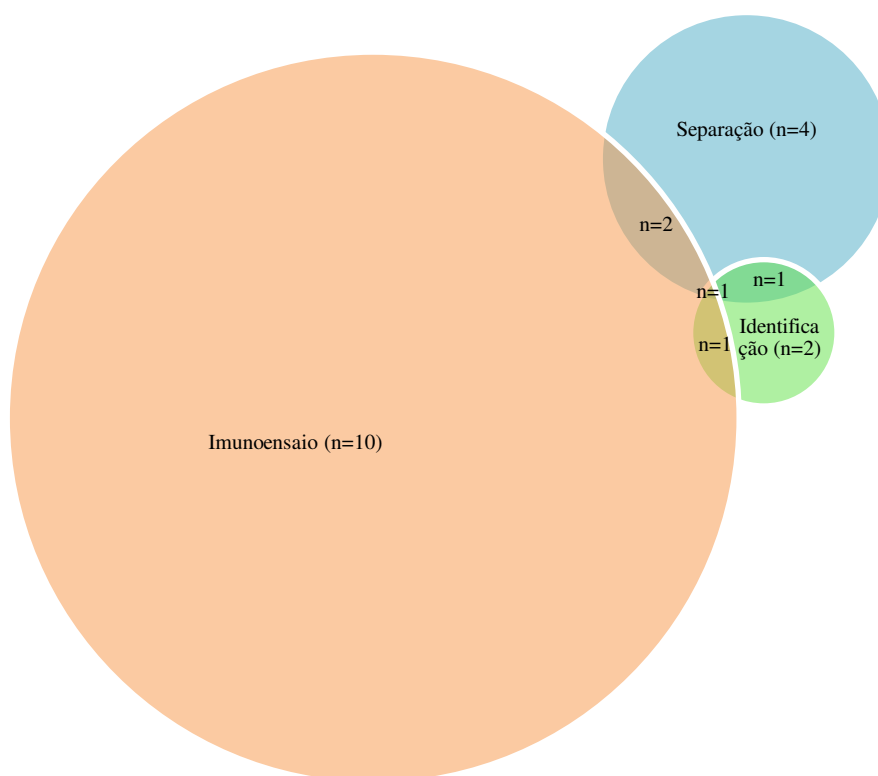


Figura 03. Distribuição do emprego das técnicas nos estudos inseridos na revisão sistemática.

2.5.3. IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS COMUNS RELATADAS POR DOIS OU MAIS ESTUDOS

As principais proteínas associadas com a fisiopatologia da DRC e que, possivelmente poderão ser aplicadas como auxílio no diagnóstico da doença encontram-se listadas na tabela 04. Proteína transportadora de retinol (RBP), proteína de Tamm-Horsfall (THP), lipocalina associada a gelatinase neutrofílica (NGAL), N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) e imunoglobulina G (IgG) são as proteínas mais aludidas por dois ou mais estudos em ordem decrescente, embora algumas possuam divergências, como ocorre na IgG que, embora citada

por dois autores, não apresentaram resultados semelhantes relacionados ao seu emprego como biomarcador da DRC.

Tabela 04. Biomarcadores urinários emergentes da doença renal crônica.

Biomarcador	Associações observadas	G	TP	TD	Validade*
RBP	<ul style="list-style-type: none"> RBP podem ser um marcador apropriado para uso no diagnóstico de proteinúria tubular em cães (Raila, J. et al., 2003). o RBP presente apenas em cães doentes e indicando o acometimento da função dos túbulos renais proximal (Forterre, S. et al., 2004). Houve uma diferença altamente significativa entre cães saudáveis e com DRC, (P <0,0001), sendo indicado como marcador de dano tubular. uRBP/c correlacionou-se com o estágio IRIS (r = 0,72, P <0,0001) (Smets et al., 2010). O aumento da excreção esteve associado ao aumento da excreção de proteína urinária. Sua excreção não foi afetada pela taxa de P-CiCr e, portanto, não têm valor diagnóstico como marcadores para a detecção precoce da taxa de P-CiCr reduzida em cães não azotêmicos, embora seja indicador de recaptção de proteínas nos túbulos proximais em cães com DRC (Raila et al., 2010). uRBP/c e RBP_FE correlacionaram-se mais fortemente com TI do que com dano glomerular. No entanto, também se correlacionaram moderadamente com o dano glomerular. RBP_FE demonstrou aumento significativamente progressivo com estágios IRIS mais elevados (Hokamp et al., 2016). uRBP não foi observada na urina dos cães controle. Entre os cães com DRC dos estágios 1 ou 2, uRBP foi detectada naqueles sem proteinúria ou com proteinúria limítrofe. Desta forma, a determinação da expressão urinária de uRBP pode fornecer informações importantes, pois pode ser aplicada como marcador de lesão renal precoce (estágio 1 ou 2 da DRC) (Chacar et al., 2017). O nível médio de uRBP/c foi significativamente maior em cães com DRC do que cães saudáveis, indicando dano tubular proximal direto induzido por causas associadas à DRC (Winiarczyk, 2020). 		X		Dano tubular proximal: alto Marcador precoce: conflitante e Aumento progressivo com os estágios da IRIS: moderado
THP	<ul style="list-style-type: none"> Cães com DRC apresentaram redução da uTHP:c, o que apontava para disfunção dos túbulos distais (Raila et al., 2003). THP estava presente na urina de todos os cães saudáveis, mas a maioria dos cães afetados tinha pouco ou nenhuma THP na urina, refletindo a integridade da função do túbulo distal (Forterre et al., 2004). A quantificação de THP na urina de cães sugere dano renal e pode ser útil como marcador diagnóstico para caracterizar a gravidade do dano ao longo do néfron sob condições azotêmicas e proteinúricas moderadas a severas, assim, baixas concentrações de uTHP/c sugerem que a doença renal indicada por azotemia e 			X	Dano tubular distal: alto Marcador de progresso: moderado Marcador precoce: conflitante e

	<p>proteinúria está relacionada à disfunção tubular em cães. Entretanto, o uso de uTHP/c como marcador precoce de disfunção renal em cães permanece questionável (Raila et al., 2014).</p> <ul style="list-style-type: none"> No grupo do estágio 4, o THP urinário foi indetectável ou menor do que no grupo controle. Assim, a baixa expressão urinária de THP pode estar associada a doença renal em estágio avançado (estágio 3 ou 4 da DRC) e serve como marcador da progressão da DRC em cães (Chacar et al., 2017). O valor médio de uTHP/c em cães saudáveis foi maior do que nos animais doentes, supondo que a diminuição da expressão urinária de THP reflete dano ao ramo espesso da alça de Henle e túbulos contorcidos distais, ou a perda de néfrons, portanto, a baixa expressão urinária de THP pode atuar como um marcador de doença tubular renal progressiva (Winiarczyk, 2020). Amostras de urina de cães saudáveis apresentaram elevadas concentrações de THP ($11,9 \pm 2,3$ mg/dL), enquanto que cães com DRC apresentaram uma concentração significativamente menor de THP ($P < 0,0001$) em comparação com cães saudáveis, sugerindo a THP como um biomarcador promissor e precoce de disfunção renal em cães (Ferlizza et al., 2020). 			
Ésteres de retinil	<ul style="list-style-type: none"> A razão da concentração de ésteres de retinil urinário à concentração de creatinina não diferiram entre os grupos (Raila et al., 2003). 			Baixo
Retinol	<ul style="list-style-type: none"> Razão retinol:creatinina significativamente mais alta na urina de cães com DRC (Raila et al., 2003). 		X	Baixo
NAG	<ul style="list-style-type: none"> Houve uma diferença altamente significativa entre cães saudáveis e com DRC para uNAG/c ($P < 0,0001$), sendo indicado como marcador de dano tubular (Smets et al., 2010). uNAG/c não aumentou com os estágios mais elevados da DRC. Individualmente, foi mais significativamente associados à doença tubular primária. Em combinação com uIgM/c, apresentou maior sensibilidade (75%) e especificidade (78%) para detecção de ICGN, podendo ser mais adequado como marcador de dano glomerular em cães com nefropatias proteinúricas e ajudar no diagnóstico não invasivo de ICGN em cães (Hokamp et al., 2016). 	X	X	Dano tubular: Moderado ou Dano glomerular, utilizado em conjunto com uIgM: fraco
PCR	<ul style="list-style-type: none"> A uPCR não foi detectada nos cães saudáveis e o aumento da relação uPCR/c estava presente em 3 de 10 cães com DRC. Não houve uma diferença significativa entre cães saudáveis e com DRC para uPCR ($P = 0,07$), entretanto, a presença de uPCR em cães com DRC pode ser um achado interessante, pois para que a PCR apareça na urina, sua concentração plasmática deve estar aumentada pela resposta inflamatória e a barreira glomerular deve estar suficientemente danificada para permitir a filtração da proteína HMW, o que justificaria a elevação nos 3 cães com DRC (Smets et al., 2010). 		X	Baixo

NGAL	<ul style="list-style-type: none"> • A concentração plasmática de NGAL foi significativamente maior em cães com IRA em comparação com cães com DRC (P = 0,027), podendo ser útil para diferenciar IRA de DRC em cães com azotemia renal, especialmente ao usar um ponto de corte >37,4 ng/mL (sensibilidade 65 % e especificidade 82%) (Steinbach et al., 2014). • NGAL_FE demonstrou aumento significativamente progressivo com estágios IRIS mais elevados (Hokamp et al., 2016). • Cães saudáveis apresentaram uNGAL/C menor que cães com DRC estável, progressiva e IRA. Cães com DRC progressiva apresentaram uNGAL/C significativamente maior do que cães com DRC estável, consistente com a presença de lesão renal ativa promovendo DRC progressiva. Os achados sugerem que o aumento da uNGAL/C pode servir como um marcador útil da progressão da DRC em cães. (Kim et al., 2019). • A uNGAL/c (P < 0,001) diferiu significativamente entre animais saudáveis e com DRC (estágios 2 e 3), encontrando-se elevada nos animais doentes. Essa proteína é encontrada em células tubulares renais, e a detecção na urina provavelmente está associada a lesão tubular ativa ou necrose. (Hezzell et al., 2020). 	X	Diferir DRC e saudáveis : moderado Diferir DRC e IRA: baixo Marcador de progressão: moderado
IgG	<ul style="list-style-type: none"> • uIgG/c não aumentou com estágios mais elevados da DRC. uIgG/c foi mais significativamente associado à doença tubular primária (Hokamp, J.A., et al., 2016). • uIgG foram indetectáveis em cães saudáveis, enquanto demonstraram elevação em cães com DRC. O aumento do nível de uIgG geralmente é um efeito do aumento da permeabilidade glomerular (Winiarczyk, 2020). 	X X	conflitantes
IgM	<ul style="list-style-type: none"> • Em combinação com a uNAG/c, uIgM/c apresentou maior sensibilidade (75%) e especificidade (78%) para detecção de glomerulonefrite mediada por imunocomplexos, embora individualmente tenha apresentado resultados satisfatórios, podendo ser útil no diagnóstico. IgM_FE correlacionou-se moderadamente com dano de TI, embora tenha sido observada uma correlação mais forte com dano glomerular (Hokamp et al., 2016). 	X X	baixo
VDBP	<ul style="list-style-type: none"> • uVDBP não foi observada na urina dos cães controle. Entre os cães com DRC dos estágios 1 ou 2, uVDBP foi detectada naqueles sem proteinúria ou com proteinúria limítrofe. Desta forma, a determinação da expressão urinária de uVDBP pode fornecer informações importantes, pois pode ser aplicada como marcador de lesão renal precoce (estágio 1 ou 2 da DRC) (Chacar et al., 2017). 	X	baixo
α1-PI urinária	<ul style="list-style-type: none"> • Em cães com DRC-P, a concentração de α1-PI urinária e UPC estão moderadamente correlacionadas (p = 0.48; 95% CI 0.13–0.72; P = 0.008) A correlação inversa entre α1-PI sérico e urinário sugere que a perda tubular renal é um mecanismo provável para essa diminuição de α1-PI sérico. No entanto, os níveis variáveis observados neste grupo indicam que a perda renal de α1-PI está presente de forma inconsistente ou que o aumento da síntese de α1-PI compensa a perda renal em cães com DRC-P (Heilmann et al., 2018). 	X	baixo

Peptídeo tríptico de podocina	<ul style="list-style-type: none"> O nível de detecção foi visivelmente maior nos grupos com DRC quando comparado ao controle, sendo detectada podocitúria em 33,3% dos cães. No entanto, as grandes variações individuais fizeram a diferença estatisticamente não significativa. A podocina não foi encontrada nas amostras de urina de cães saudáveis (Szczepankiewicz et al., 2019). 	X		baixo
Alfa klotho	<ul style="list-style-type: none"> A mediana da urKl/c (UrKl/Cr) para todos os cães com DRC foi menor (5,85 pg/gCr, 0,08 a 82,28) do que a dos cães controle (13,16 pg/gCr, 5,75 a 34,84). UrKl/c foi significativamente menor nos cães estágio 3 do que no grupo controle (p = 0,001) e no grupo DRC estágio 1 (p = 0,003). Desta forma, urKl/Cr foi diminuído em cães com DRC avançada. Além disso, apresentou correlação negativa com as concentrações de sSDMA, nitrogênio ureico, creatinina e fósforo. Esses achados suportam a possibilidade de que o klotho esteja associado à DRC e suas consequências clínicas, incluindo distúrbio ósseo mineral associado a DRC, em cães. Assim, sugere-se que UrKl/Cr possa ser biomarcador (Yi et al., 2020). 	X	X	baixo
Cistatina B	<ul style="list-style-type: none"> A relação cistatina B/creatinina urinária (P = 0,005) diferiu significativamente entre animais saudáveis e com DRC (estágios 2 e 3), encontrando-se elevada nos animais doentes. Essa proteína é encontrada em células tubulares renais, e a detecção na urina provavelmente está associada a lesão tubular ativa ou necrose. (Hezzell et al., 2020). 		X	baixo
Clusterina	<ul style="list-style-type: none"> A relação clusterina/creatinina urinária (P = 0,019) diferiu significativamente entre animais saudáveis e com DRC (estágios 2 e 3), encontrando-se elevada nos animais doentes. É uma proteína que possui propriedades protetoras, antiapoptóticas e antifibróticas e é regulada positivamente em resposta à lesão epitelial tubular em cães (Hezzell et al., 2020). 		X	baixo
Propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo III urinário	<ul style="list-style-type: none"> as concentrações médias do uPIIINP em cães com DRC foram significativamente maiores do que saudáveis e a razão média de uPIIINP/c de cães com DRC estágio 3 (IRIS) foi significativamente maior do que a de cães DRC estágio 2, assim, o uPIIINP/c pode ser um biomarcador promissor para uma avaliação complementar da fibrose renal na DRC canina (Thanaboonnipat et al., 2020). 	X	X	baixo

*Alto: associação significativa em ≥ 3 estudos independentes; moderado: associação significativa em 2–3 estudos independentes; baixo: associação significativa em um estudo; conflitantes: diferenças não resolvidas em relatórios independentes – nenhuma utilidade como biomarcador está implícita (MISCHAK et al., 2015). Abreviaturas: IRA, insuficiência renal aguda; DRC, doença renal crônica; TFGe, taxa de filtração glomerular estimada; NAG, N-acetil- β -D-glucosaminidase; uNAG/c, razão entre N-acetil- β -D-glucosaminidase e creatinina urinária; NGAL, lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; uNGAL/c, razão entre NGAL e creatinina urinária; RBP, proteína transportadora de retinol; uRBP/c, razão proteína transportadora de retinol/creatinina urinária; IRIS, Sociedade Internacional de Interesse Renal; P-CICr, clearance (depuração) de creatinina; RBP_FE, fração de excreção da proteína transportadora de retinol; THP, proteína de Tamm-Horsfall; uTHP:c, razão proteína de Tamm-Horsfall:creatinina urinária; ICGN, glomerulonefrite mediada por imunocomplexos; PCR, proteína C reativa; uPCR/c, razão proteína C reativa/creatinina urinária; HMW, proteína de alto peso molecular; IgG, imunoglobulina G; uIgG/c, razão imunoglobulina G/creatinina urinária; IgM, imunoglobulina M; uIgM/c, razão imunoglobulina M/creatinina urinária; IgM_FE, fração de excreção da imunoglobulina M; TI, túbulointersticial; uVDBP, proteína de ligação à vitamina D urinária; DRC proteinúrica, DRC-P; $\alpha 1$ -PI, Inibidor de $\alpha 1$ -proteínase; urKl/c, razão Alfa klotho/ creatinina urinária; sSDMA, dimetilarginina simétrica urinária; uPIIINP, Propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo III urinário; G, glomerular; TP, túbulo proximal; TD, túbulo distal.

2.5.4. PERFIL DA AMOSTRA UTILIZADA

Em relação as amostras, a maioria das avaliações das proteínas urinárias são realizadas no sobrenadante urinário. Uma exceção é a avaliação da podocina urinária na análise do sedimento (SZCZEPANKIEWICZ et al., 2019). Grande parte das amostras (71,4%) foram armazenadas a -80°C , entretanto, 47,6% dos estudos não mencionam o tempo de armazenamento das amostras e os que mencionam citam um intervalo de 1 mês a 7 anos, sendo 54,5% (6/11) realizadas num prazo menor de 4 meses. 86% das amostras não mencionam os ciclos de descongelamento, enquanto dois relatam descongelar a amostra uma única vez para evitar os ciclos de descongelamento (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017) e um trabalho descongelou cada amostra por até 5 vezes (HOKAMP et al., 2016). Sobre a adição de inibidores de protease, apenas um estudo menciona o uso nas amostras (WINIARCZYK, 2020).

Embora 14/21 estudos informem a exclusão das urinas com sedimento urinário ativo, apenas 8/21 realizam cultura bacteriana. As amostras com sedimento ativo de um dos estudos foram incluídas num grupo específico de infecção do trato urinário (JATURAKAN et al., 2013) e as demais não mencionam se a exclusão dessas amostras era um critério do estudo. Em relação a realização de réplicas técnicas, 10 não realizaram e dos 11 que realizaram, 7 foram em duplicata.

Os métodos de coleta, momento do dia e número de coletas estão demonstradas na tabela 05.

Tabela 05. Características das amostras descritas pelos estudos.

Tipo	Método de coleta	Momento da coleta	Nº de coletas	Tempo de estocagem	Temperatura de armazenamento	Número de descongelamento	Inibidor de protease	Urocultura	Exclusão das amostras com sedimento urinário ativo	Réplica técnica ou biológica relatada?	Referências
SOB	C	NM	U	3 meses	-20°C	NM	Não	Sim (cães com bactérias no sedimento)	Sim	RT: RBP e THP. Triplicata	Raila, et al., 2003
NM	CAT	NM	U	3 meses	-20°C	NM	Não	Não	NM	RT. Aliquotas da mesma amostra aplicadas em 8 diferentes spots	Forterre et al., 2004
SOB	C	manhã	U	NM	-80°C	NM	Não	Sim	Sim	RT: validação dos testes de albumina e NAG.	Smets et al., 2010
SOB	ME	1ª manhã	U	≤ 4 meses após coleta	-80°C	NM	Não	Não	Sim	Não	Raila et al., 2010
NM	ME/CAT	NM	U	NM	NM	NM	Não	Não	Não (grupo com ITU)	Não	Jaturakan et al., 2013
SOB	NM	24 horas após apresentação ou após azotemia	U	NM	-80°C	NM	Não	Sim	Sim	RT. Duplicata.	Steinbach et al., 2014
SOB	ME	1ª manhã	Única	≤ 4 meses após a coleta.	-80°C	Não	Não	Não	Sim	RT. Duplicata.	Raila et al., 2014

SOB	NM	NM	Única	NM	-80°C	≤5 por amostra.	Não	Sim	Sim	RT. Duplicata.	Hokamp et al., 2016
SOB	C/CAT	NM	U	≤ 1 ano.	-80°C	Não	Não	Sim	Sim	Não	Chacar et al., 2017
SOB	C/CAT/ME	NM	U	DRC: 2 semanas e -1 meses (90% em até 3 meses). Cães saudáveis: máximo 6 meses. Cães controle saudáveis máximo 5 anos	-80°C	NM	Não	Sim	Sim	RT: géis executados em duplicata. Para determinar a repetibilidade do procedimento de eletroforese em gel e padrões de bandas de proteínas, 10 amostras foram selecionadas aleatoriamente para representar a gama de padrões de bandas observados em cães com DRC de ocorrência natural. As amostras foram executadas em três dias diferentes, randomizando a localização da lane de amostra para cada corrida.	Hokamp et al., 2018
NM	NM	NM	NM	2 -87 meses (mediana, 26 meses)	-20 ou -80°C	NM	Não	NM	NM	Não	Heilmann et al., 2018

SOB	C/ME	NM	U	NM	-70°C	NM	Não	Sim	Sim	NM	Pelander et al., 2019
SED	ME	1ª manhã	U	1 mês	-80°C	NM	Não	Não	NM	Não	Szczepankiewicz, B. et al.
SOB	C/ME	Na apresentação (todos os grupos) ou até 36 horas após a apresentação para cães hospitalizados. Urina coletada antes da fluidoterapia.	U	Não descrito com precisão. NGAL estável a 4°C até 7 dias e a -80°C até 11 meses	-80°C	NM	Não	Sim	Sim	RT: amostras em que as medições de NGAL estavam acima do limite superior de detecção. Duplicata.	Kim et al., 2019
SOB	C/CAT	NM	U	NM	-80°C	NM	Não	NM	NM	Não	Yi et al., 2020
SOB	NM	1/2 manhã	UPC: 2 Demais marcadores: U	NM	-80°C	NM	Sim	Não	NM	Não	Winiarczyk, 2020
SOB	C	NM	U	2-27 meses	-80°C	NM	Não	Não	Sim	RT. Duplicata.	Hezzell et al., 2020
NM	NM	NM	U	NM	-20°C/-80°C	NM	Não	Não	Sim	RT. Duplicata.	Thanaboonnipat et al., 2020
SOB	C	NM	Única	NM	-20°C	NM	Não	Não	Sim	Não	Patitucci et al., 2020
SOB	C	NM	Única	Bioquímica da urina em 24h nas alíquotas refrigeradas (+4 °C)	-80 °C para análise proteômica e	NM	Não	Não	NM	RB: dois grupos experimentais. Não RT.	Ferlizza et al., 2020

				ou em até 7 dias a - 20 °C.	metabol ômica.							
SOB	C	NM	Única	NM	-20°C	NM	Não	Não	Sim	Não	Dornelas et al., 2021	

Abreviaturas: SOB, sobrenadante; SED, sedimento; C, cistocentese; CAT, cateterização; ME, micção espontânea; NM, não mencionado; U, única; ITU, infecção do trato urinário; RB, réplica biológica; RT, réplica técnica; RBP, proteína transportadora de retinol; THP, proteína de Tamm-Horsfall; NAG, N-acetil-β-D-glucosaminidase; ; NGAL, lipocalina associada à gelatinase neutrofílica; UPC, relação proteína creatinina urinária; DRC, doença renal crônica.

2.5.5. RISCO DE VIÉS

O resumo do risco de viés nos estudos inseridos nesta revisão está demonstrado nas figuras 04 e 05. A ocultação e a aleatoriedade da alocação não foram aplicadas aos tipos de estudos, bem como a à avaliação dos resultados aleatórios, uma vez que os relatórios incluídos nesta revisão foram estudos clínicos observacionais, onde intervenções não são adotadas.

A alta proporção de pontuações “pouco claras” indica relatos inadequados/incompletos da maioria dos itens analisados. Em relação à geração de sequências aleatórias, foi identificado um “alto risco” em todos que utilizaram abordagem não aleatória no processo de atribuição, ou seja, os critérios foram baseados no julgamento do investigador após avaliação clínica dos pacientes e/ou avaliação dos resultados dos testes laboratoriais. Da mesma forma, as características na linha de base de todos os estudos foram classificadas como “alto risco”, pois não realizaram o pareamento dos indivíduos entre os grupos existentes e não possuíam características comparáveis entre os grupos.

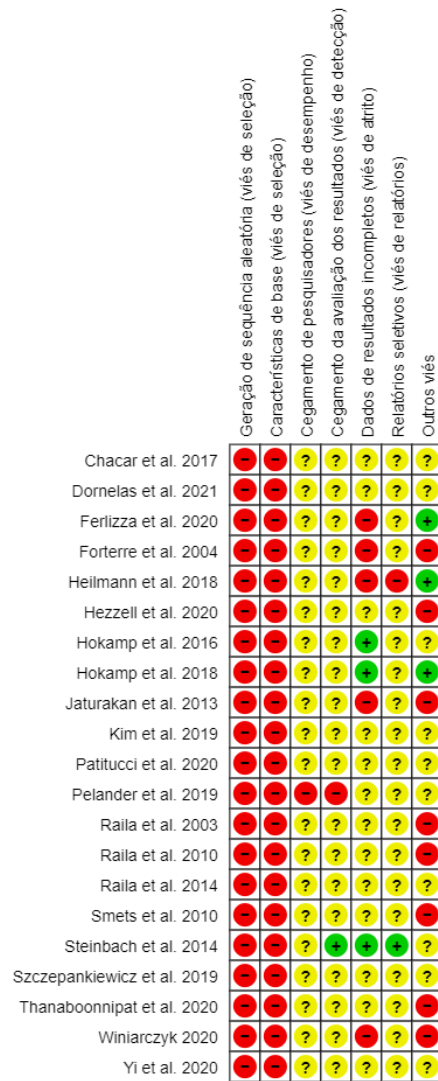


Figura 04. Avaliação de risco de viés (RevMan 5). Vermelho: alto risco; verde: baixo risco; amarelo: pouco claras.

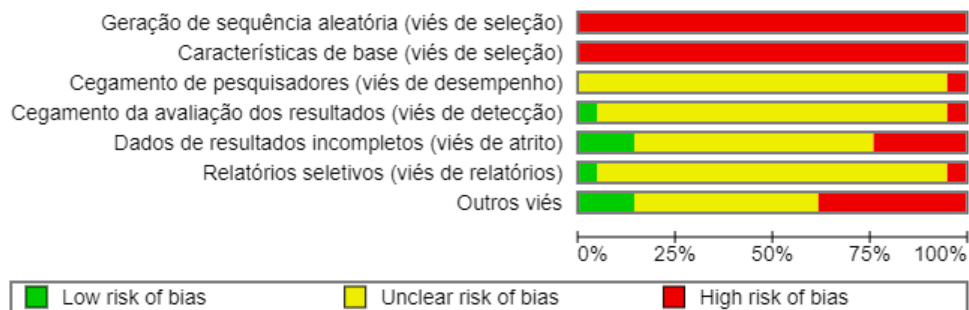


Figura 05. Gráfico de risco de viés (RevMan 5).

Outra fonte de viés foi o cegamento dos pesquisadores, ou seja, de quem realizava as análises laboratoriais e da avaliação dos resultados avaliador, que foi classificado como “pouco claro” em todos os estudos, pois não informaram se o pesquisador e o avaliador possuíam

conhecimento dos resultados, embora um cite que houve cegamento em ambos os casos para coorte de validação independente dos modelos peptídicos identificados como potenciais marcadores para diferenciação de cães saudáveis e com DRC (PELANDER et al., 2019b).

As perdas e exclusões foram adequadamente abordadas por três artigos (STEINBACH et al., 2014; HOKAMP et al., 2016, 2018), refletindo em “baixo risco”. Muitos mencionam critérios de exclusão, não deixando claro o quantitativo de animais excluídos (RAILA et al., 2003a, 2010b; SMETS et al., 2010a; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017; KIM et al., 2019; PELANDER et al., 2019b; SZCZEPANKIEWICZ et al., 2019; HEZZELL et al., 2020b; PATITUCCI et al., 2020; THANABOONNIPAT et al., 2020; YI et al., 2020; DORNELAS et al., 2021), quanto outros não mencionam os critérios e nem o quantitativo excluído, possuindo “alto risco” (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; JATURAKAN et al., 2013; HEILMANN et al., 2018; FERLIZZA et al., 2020; WINIARCZYK, 2020). Um estudo (STEINBACH et al., 2014) detalhou todos os resultados mencionados pelos critérios de seleção, exclusão e avaliação dos pacientes estudados e foi classificado como “baixo risco”, enquanto um outro não demonstrou resultado da proteína urinária de interesse (ca1-PI urinária), apenas correlacionando com outros exames realizados (HEILMANN et al., 2018). Embora o referido estudo seja classificado como uma comunicação curta (short communication), a ausência da demonstração de um resultado de interesse para o estudo torna-o de “alto risco”. Nos demais, o detalhamento dos resultados foi insuficiente, sendo “pouco claros” na apresentação dos resultados de seleção ou exclusão dos pacientes, principalmente de urinálise, hematologia, bioquímica sérica e imagem.

Outros problemas que poderiam resultar em alto risco de viés foram mencionados em oito estudos (RAILA et al., 2003a, 2010b; FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; SMETS et al., 2010a; JATURAKAN et al., 2013; HEZZELL et al., 2020a; THANABOONNIPAT et al., 2020; WINIARCZYK, 2020), como, número reduzido de animais avaliados, estudo livre de influência/interesses e rotatividade de diferentes profissionais processando as amostras de urina no laboratório.

2.6.DISCUSSÃO

Em cães, existe revisão sistemática abordando proteômica em amostras de plasma, urina, saliva e soro em pacientes saudáveis e com diversas patologias (GONZÁLEZ-AROSTEGUI et al., 2022). Atualmente, nesta espécie, existem poucas revisões abordando o comportamento das proteínas em amostras e doenças específicas.

Estudos do proteoma nos permite identificar o conjunto de proteínas expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinado momento, quantificá-las e observar suas modificações pós-transducionais. A pesquisa qualitativa, quantitativa e a elucidação estrutural destas moléculas são fundamentais para a compreensão do funcionamento dos sistemas biológicos e para aplicação em novos métodos diagnósticos (EMIDIO et al., 2015).

Proteínas e peptídeos urinários originam-se por: filtração glomerular, secreção tubular, células epiteliais liberadas do rim e do trato urinário, exossomos secretados e secreções seminais. A urina é uma rica fonte de biomarcadores para várias doenças devido as alterações específicas que ocorrem em seu proteoma (GOOD et al., 2010). Pelos motivos citados, justifica-se o crescente quantitativo de artigos de avaliação das proteínas urinárias em busca de biomarcadores precoces da DRC em cães observados nesta revisão.

Apesar da elevação do quantitativo de publicações, não há amplo emprego do estadiamento da IRIS como objeto de estudo e entendimento dos biomarcadores em cada fase, que poderia auxiliar na elucidação da progressão e diagnóstico precoce. Também não existe uniformidade do estadiamento nos poucos estudos em que a IRIS foi empregada, dificultando a comparação dos resultados. Isso ocorre devido as periódicas atualizações do estadiamento da doença de acordo com a evolução no conhecimento (IRIS, 2023), sendo um desafio na busca do conhecimento em cada estágio.

Embora artigos recentes demonstrem que a SDMA (NABITY et al., 2015; HALL et al., 2016) e a Cistatina C (GHYS et al., 2014; MIYAKAWA et al., 2021) sejam promissores marcadores precoces da DRC, notou-se pouca utilização nas pesquisas. Na maioria dos casos, o diagnóstico ocorre tardiamente pelos níveis séricos de creatinina (POLZIN, 2017). Embora o histopatológico seja considerado padrão ouro para diagnóstico da DRC, ele não é empregado rotineiramente devido ao potencial risco para os pacientes com DRC (MISCHAK, 2015), sendo um procedimento invasivo e oneroso. Isso reforça a necessidade do conhecimento de novos biomarcadores precoces, que possam ser rotineiramente aplicados.

Na avaliação das proteínas urinárias em cães com DRC nota-se que não há uma uniformidade nas técnicas utilizadas (tabela 02). A análise proteômica de fluidos corporais é desafiadora, pois contém elevada quantidade de proteínas que podem ser modificadas de várias formas. Devido à complexidade dessa análise, uma série de variáveis precisam ser consideradas, incluindo preparação e manuseio de amostras, pré-fracionamento de proteínas, depleção de afinidade de proteínas altamente abundantes, separação cromatográfica multidimensional, quantificação de proteínas, análise de dados e critérios de pesquisa de banco de dados. Compreender a natureza e limitação inerente dessas etapas necessárias, auxilia no entendimento

da melhor abordagem e ferramentas para análise de um proteoma, possibilitando a descoberta de biomarcadores (HU; LOO; WONG, 2006).

Nessa revisão, observou-se que as principais técnicas aplicadas nos estudos enquadraram-se no imunodiagnóstico, sendo que alguns empregam kits comerciais de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) aplicados para humanos (RAILA et al., 2003b, 2010a; SMETS et al., 2010a; WINIARCZYK, 2020) baseados em proteínas previamente estudadas, e outros, baseam-se exclusivamente em kits ELISA comercialmente disponíveis para cães (STEINBACH et al., 2014; HOKAMP et al., 2016; KIM et al., 2019; HEZZELL et al., 2020a; THANABOONNIPAT et al., 2020; YI et al., 2020).

A eletroforese foi a segunda técnica mais amplamente empregada, sendo a eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio (SDS-PAGE) unidimensional a principal observada. A eletroforese permite realizar separações de proteínas de amostras complexas, porém, a análise detalhada com a identificação dessas proteínas foi possível com a espectrometria de massas devido suas limitações (exemplo, baixa reprodutibilidade, principalmente para proteínas hidrofóbicas, básicas e com massas moleculares muito elevadas ou muito pequenas) (FURLANI et al., 2020).

Estudos aplicaram a eletroforese, avaliando o padrão de bandas e classificando, principalmente, em proteínas de baixo e alto peso molecular, identificando o local da lesão renal em tubular e glomerular, respectivamente (JATURAKAN et al., 2013; CHACAR et al., 2017; HOKAMP et al., 2018; FERLIZZA et al., 2020; PATITUCCI et al., 2020; DORNELAS et al., 2021). Além da localização, a eletroforese possibilitou avaliar o grau de lesão (HOKAMP et al., 2018; DORNELAS et al., 2021) de acordo com a classificação proposta previamente (HOKAMP et al., 2018), sendo observado que com o avançar dos estágios, existe o agravamento das lesões e um padrão misto de lesão tubular e glomerular predominantemente em todos os estágios (DORNELAS et al., 2021). Quando existe uma disfunção glomerular, independente da fisiopatologia subjacente, a passagem anormal das proteínas plasmáticas através da barreira glomerular contribui para a ocorrência de lesões tubulares, o que promove ciclos viciosos de degeneração epitelial tubular e cicatrizes glomerulares, que culminam na progressão da lesão renal (ZOJA; ABBATE; REMUZZI, 2015), justificando os achados anteriormente mencionados.

Ainda, a eletroforese pode ser aplicada com intuito de pré-separação na abordagem de amostras complexas, como a urina. Essa separação é um ponto importante para redução da complexidade na análise proteômica (ISHIHAMA, 2005; EMIDIO et al., 2015), seja em gel uni ou bidimensional, o sequenciamento de bandas nítidas separadas por peso molecular

aumenta a faixa dinâmica de análise de misturas de proteínas à medida que os peptídeos produzidos pela clivagem tríptica em gel de cada banda são sequenciados. Dividir a análise em 10 a 20 fatias de gel aumenta a profundidade da análise, número de proteínas identificadas e modificações pós-traducionais. A eletroforese auxilia na remoção de impurezas de baixo peso molecular, que podem ser prejudiciais para o sequenciamento espectrométrico de massa (SHEVCHENKO et al., 2007). Com o objetivo de pré-separação para posterior espectrometria de massas, autores aplicaram a técnica para auxiliar na identificação de THP, albumina (ALB) e arginina esterase (FERLIZZA et al., 2020). Possuindo o intuito de excisão das bandas identificadas na eletroforese, pesquisadores empregaram a técnica anterior a realização do western blotting (FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017).

A literatura relata que várias técnicas têm sido empregadas para avaliação dos peptídeos e proteínas urinárias, incluindo eletroforese bidimensional combinada com espectrometria de massa e/ou identificação imunológica de proteínas, cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) e espectrometria de massa de dessorção/ionização a laser aprimorada por superfície (SELDI-MS) (GOOD et al., 2010)

Um estudo de proteômica aplicado para amostras complexas comparou espectrometria de massas em tandem usando espectrômetros de massas ionização/dessorção de matriz assistida por laser/tempo de “voo” (MALDI-TOF), espectrometria de massa de tempo de voo quadrupolo de ionização por eletrospray (ESI-QTOF) e ionização por eletrospray-ion (ESI-Ion). Cada espectrômetro de massas apresenta uma particularidade de configuração. Isso confere maior sensibilidade em alguns e maior acurácia em outros. A tecnologia de quadrupolo e tempo de voo (QTOF) é uma plataforma com acurácia mediana, enquanto o ion trap com alta sensibilidade. Além disso, os espectrômetros apresentam diferentes resoluções. O espectrômetro de massa de armadilha de íons apresenta resolução atingível aproximadamente quatro vezes menor quando comparado com os instrumentos tempo de voo (TOF) (MALDI-TOF, ESI-QTOF) (HELLER et al., 2003).

Nesta revisão, foi detectada diversidade de proteínas analisadas em relação à aplicabilidade como promissores marcadores. Até o momento, os estudos com alta validade existentes possuem consenso nos resultados apenas relacionando a aplicabilidade da proteína para reconhecimento da localização do local da lesão renal, sendo que a maioria indica lesão tubular proximal (tabela 04). Dos marcadores descritos, ésteres de retinil e retinol (RAILA et al., 2003a), proteína C reativa (PCR) (SMETS et al., 2010a), imunoglobulina M (IGM) (HOKAMP et al., 2016), proteína de ligação à vitamina D urinária (VDBP) (CHACAR et al.,

2017), α 1-PI urinária (HEILMANN et al., 2018), peptídeo tríptico de podocina (SZCZEPANKIEWICZ et al., 2019), alfa klotho (YI et al., 2020), cistatina B, clusterina (HEZZELL et al., 2020a) e propeptídeo amino-terminal do procolágeno tipo III urinário (uPIIINP) (THANABOONNIPAT et al., 2020) foram estudados uma única vez. Destes, apenas a VDBP, principal proteína transportadora de vitamina D e seus metabólitos na circulação (DE BRITO GALVAO et al., 2013), demonstrou ser um marcador precoce da DRC, indicando lesão tubular proximal (CHACAR et al., 2017), entretanto, mais pesquisas são necessárias para elucidação de sua praticabilidade e confiabilidade.

Outros marcadores bem estudados apresentaram resultados conflitantes. RBP e THP são proteínas estudadas por vários autores e possuem resultados divergentes sobre sua utilização como marcadores precoces. A RBP urinária origina-se do plasma filtrado e surge na urina secundária à diminuição da reabsorção devido à lesão tubular (NABITY et al., 2012), vem sendo estudada há anos e foi apontada como teste precoce de lesão tubular em 1987 (BERNARD et al., 1987). Apesar de ter sido observado o aumento com o avançar dos estágios da IRIS (SMETS et al., 2010a; HOKAMP et al., 2016) e ter sido descrita como marcador precoce (CHACAR et al., 2017), os estudos demonstram dados divergentes em relação a precocidade, pois existem relatos de não apresentar valor diagnóstico para detecção precoce (RAILA et al., 2010a).

A THP urinária é uma proteína com função não completamente compreendida, sintetizada nas células epiteliais do ramo ascendente espesso da alça de Henle e no túbulo contorcido distal (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014), mencionada como indicador de lesão tubular distal (RAILA et al., 2003a; FORTERRE; RAILA; SCHWEIGERT, 2004; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017; FERLIZZA et al., 2020; WINIARCZYK, 2020) e progressão da DRC (CHACAR et al., 2017; WINIARCZYK, 2020). Embora possua dados atuais demonstrando ser marcador precoce (FERLIZZA et al., 2020), trabalhos prévios discordam (CHACAR et al., 2017) ou mencionam que sua precocidade permanece questionável (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014). Desta forma, existe uma deficiência de resultados de alta validade relacionados a biomarcadores precoces aplicáveis na rotina clínica.

A NGAL urinária, proteína encontrada em células tubulares (HEZZELL et al., 2020a), é uma das mais precoces e mais robustamente induzidas no rim após lesão aguda isquêmica ou nefrotóxica em modelos animais (DEVARAJAN, 2008). Na DRC a razão entre NGAL e creatinina urinária (UNGAL/C) apresentou-se significativamente maior na presença de lesão renal ativa (KIM et al., 2019; HEZZELL et al., 2020a) ou necrose (HEZZELL et al., 2020a), sendo indicadora de progressão (HOKAMP et al., 2016; KIM et al., 2019).

A discriminação entre cães saudáveis e aqueles com DRC por meio da identificação de marcadores peptídicos urinários caninos foi observada em 2019, onde identificou-se 5.398 peptídeos diferentes por meio da eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS), sendo que a comparação da urina canina de cães saudáveis e cães com DRC identificou 133 peptídeos excretados diferencialmente. Esses 133 peptídeos foram combinados em um modelo de máquina de vetor de suporte (SVM) (133P). Informações de sequência foram obtidas para 35 dos 133 peptídeos e a maioria deles eram fragmentos de colágeno. Todos os 35 peptídeos estavam presentes em cães com DRC. Esses 35 peptídeos foram combinados num segundo modelo SVM (35P), que separou significativamente cães saudáveis e cães com DRC. O modelo 133P previu DRC com uma sensibilidade de 80% e uma especificidade de 80%. O modelo 35P previu DRC com sensibilidade de 70% e especificidade de 80% (PELANDER et al., 2019b). Em humanos, o modelo CKD273 é um conhecido classificador baseado no proteoma urinário humano, descoberto e validado em estudos transversais e longitudinais para avaliar e prever a progressão da DRC (GOOD et al., 2010; ARGILÉS et al., 2013; SCHANSTRA; MISCHAK, 2015; CRITSELIS; HEERSPINK, 2016;). Esse modelo foi implementado em estudos que empregam coortes de mais de 1.000 pacientes e, atualmente, está disponível comercialmente como um teste de diagnóstico *in vitro* para detecção precoce de DRC (PONTILLO; MISCHAK, 2017).

Algumas considerações na interpretação dos resultados obtidos devem ser referidas. Conhecer a proteína alvo é fundamental para auxílio da seleção e conservação da amostra, assim como realizado na avaliação da podocina urinária no sedimento urinário, visto que essa proteína é melhor avaliada nesse tipo de amostra (SZCZEPANKIEWICZ et al., 2019). Entretanto, conforme demonstrado pelos demais estudos desta revisão, quando o objetivo é uma avaliação geral das proteínas urinárias, independente da técnica empregada, o sobrenadante pode ser a amostra de eleição.

Conhecer o alvo do estudo é importante na seleção da utilização dos inibidores de protease. Nessa revisão, apenas um artigo mencionou o uso (WINIARCZYK, 2020). Apesar de não existir um protocolo de coleta, conservação e processamento de amostras para proteômica urinária na medicina veterinária, na medicina humana existe um protocolo padrão provisório para coleta e processamento de amostras de urina proposto pelo Projeto Human Kidney and Urine Proteome do HUPPO, que recomenda a adição de inibidores de protease para amostras de urinas proteinúricas, mas não para urina normal (<http://www.hkupp.org/Urine%20collection%20Documents.htm>). A adição de inibidores de protease também é recomendada quando o objetivo da amostra é a análise de exossomos,

conforme descrito no protocolo da EuroProt ([http://www3.niddk.nih.gov/intramural/UroProt/collection -storage.shtml](http://www3.niddk.nih.gov/intramural/UroProt/collection_storage.shtml)) e confirmado por estudos (ZHOU et al., 2006).

A urina contém proteases, tais como metalopeptidases de matriz, aminopeptidases e catepsinas que degradam proteínas (solúveis). Autores demonstraram que a ALB em amostras de urina sob armazenamento se degrada com o tempo, principalmente em amostras sob condições de pH baixo ($\text{pH} < 5$), confirmando a atividade das proteases urinárias endógenas, presentes e ativas em amostras de urina humana armazenadas. O ajuste para pH neutro ou a adição de inibidores de protease podem ser úteis para preservação de amostras (KANIA et al., 2010). As alterações nos peptídeos relacionadas a ausência de inibidor de proteases foram dependentes da amostra, com muitas urinas não exibindo degradação aparente. O uso dos inibidores poderia ser indicado sempre que possível devido à imprevisibilidade da atividade proteolítica, porém sua utilização deve ser equilibrada com as contribuições da aplicação nas amostras como rotina, devendo considerar prós e contra. Soluções/comprimidos de inibidor de protease são caros, tóxicos e podem interferir na análise, por exemplo, competindo com proteínas em chips SELDI, dependendo da química da superfície ou ligando-se/introduzindo modificações em proteínas (HEPBURN et al., 2015). Desta forma, uma validação cuidadosa de quaisquer análises relacionadas a proteínas específicas deveria envolver estudos de estabilidade, ao invés de apenas apoiar a adição rotineira de inibidor de protease.

Sobre a temperatura de armazenamento, quando se trata da análise de exossomos urinários o armazenamento a -80°C é recomendado, pois há perda proteica na temperatura -20°C (ZHOU et al., 2006). Da mesma forma, quando analisadas amostras de urina de pacientes pediátricos humanos com diabetes a -20°C e a -70°C por 6-8 meses, NAG, ALB e RBP foram subestimadas após armazenamento a -20°C (SCHULTZ et al., 2000). A avaliação de ALB urinária sofreu degradação em 27,5% das amostras armazenadas por 12 meses a -20°C quando comparadas com as armazenadas a -70°C (KANIA et al., 2010). Embora na medicina veterinária, existam limitações nas pesquisas relacionadas a temperatura, tempo de armazenamento e ciclos de descongelamento, um estudo demonstrou que após armazenadas por 4 meses a -20°C , a concentração de ALB não foi afetada, e a concentração de RBP mostrou uma diminuição leve e clinicamente irrelevante, enquanto a atividade de NAG foi significativamente menor em comparação com amostras frescas. Após armazenamento por 12 meses a -80°C , as concentrações de ALB e RBP não sofreram alterações quando comparadas a amostras frescas, mas a atividade NAG teve severa diminuição (SMETS et al., 2010b).

Os resultados da revisão demonstram que, apesar da maioria (71,4%) dos estudos mencionarem que as urinas ficam armazenadas a -80°C , o restante não permanece armazenado a essa temperatura, além de não haver uniformidade em relação ao tempo que permanecem estocadas e o quantitativo de ciclos de descongelamento cada amostra sofre. Tais condições podem afetar os resultados quantitativamente e qualitativamente, prejudicando a detecção de proteínas urinárias, vez que podem sofrer degradação e os resultados não refletirem a realidade.

Embora 14/21 estudos mencionem a exclusão das urinas com sedimento urinário ativo, apenas 8/21 realizaram cultura bacteriana. As amostras com sedimento ativo de um dos estudos foram incluídas num grupo específico de infecção do trato urinário (JATURAKAN et al., 2013) e as demais não mencionam se a exclusão dessas amostras era um critério do estudo. A presença de bactérias na urina pode trazer confusão em relação a origem da proteinúria e interferir na aplicabilidade da avaliação das proteínas urinárias no diagnóstico da DRC, pois o grau e o padrão da proteína urinária de acordo com o peso molecular não permite a distinção da DRC e da infecção do trato urinário em cães (JATURAKAN et al., 2013). Em relação a realização de réplicas técnicas, 10 estudos não realizaram e dos 11 que realizaram, 7 foram em duplicata, o que interfere na confiabilidade e realização das avaliações estatísticas dos resultados.

2.7.LIMITAÇÕES, ORIENTAÇÕES FUTURAS E CONCLUSÕES

A análise de viés dos estudos inseridos nessa revisão revelou a ausência da aplicação de características fundamentais, como geração de sequência aleatória e características de base (pareamento entre os animais dos grupos), aumentando o risco de viés. Considerando que os estudos foram aplicados a casuística da rotina clínica, dificulta a execução da aleatoriedade dos casos, entretanto, vale refletir sobre a possibilidade de parear os animais do controle em relação aos grupos clínicos de interesse objetivando-se a maior confiabilidade de comparação entre os grupos estudados. Ademais, muitos registros forneceram dados de resultados não claros, incompletos e informações insuficientes dos resultados dos exames complementares realizados, o que afetou a precisão dos resultados.

No geral, a evidência dos estudos mostrou uma grande heterogeneidade dos resultados, provavelmente pelas diferenças do quantitativo amostral, de casuística, de critérios de divisão dos grupos, da aplicação ou não do estadiamento de IRIS de diferentes atualizações, o que impossibilitou a realização da meta análise e, portanto, da comparação dos dados estatisticamente. Este tipo de comparação deve ser evitado, pois gera evidências que pressupõem uma aparente validade externa (generalização), que na verdade não pode ser

suportada pelo conjunto de dados disponível. Nesse sentido, identificamos que cada estudo apresentou diferenças importantes relacionadas ao modelo experimental e aos métodos de coleta, conservação, análise e interpretação dos dados, bem como à precisão do relatório científico. Os elementos de viés metodológico observados estão associados a variabilidade nos resultados da pesquisa, interferindo diretamente na qualidade da evidência.

A heterogeneidade dos estudos foi uma limitação, pois dificulta a comparação dos dados. Considerando as limitações analíticas descritas, foi desenvolvida uma revisão sistemática qualitativa que demonstra os achados relevantes de cada estudo, as divergências entre eles e os importantes pontos de viés.

Desta forma, este estudo fornece uma revisão crítica dos estudos de proteômica urinária em cães com DRC de ocorrência espontânea. Observa-se uma evolução nas abordagens metodológicas para avaliação do proteoma urinário, auxiliando no conhecimento a respeito da composição urinária de animais sadios e doentes. Embora seja notável a dificuldade de comparação dos dados devido a diversidade metodológica, pequena amostragem e riscos de viés, as proteínas RBP, THP e NGAL foram as mais estudadas até o momento, apesar de não haver consenso em todos os resultados.

Espera-se, portanto, contribuir para pesquisas futuras sobre possíveis marcadores, alertar a respeito da necessidade de uma padronização metodológica e sobre como evitar os elementos de viés que prejudicam a qualidade da evidência, cooperando para a ampliação do conhecimento nesta área.

2.8.AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Medicina Veterinária, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da Universidade Federal de Viçosa pela disponibilização das instalações para a condução dos experimentos e análise dos dados.

2.9.CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

2.10. REFERÊNCIAS

ARGILÉS, À. et al. CKD273, a New Proteomics Classifier Assessing CKD and Its Prognosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

BERNARD, A. M. et al. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. **Clinical chemistry**, v. 33, n. 6, p. 775–779, 1987.

BERRY, A. et al. Use of assistance and therapy dogs for children with autism spectrum disorders: A critical review of the current evidence. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 2, p. 73–80, 2013.

BORGI, M.; CIRULLI, F. Pet face: Mechanisms underlying human-animal relationships. **Frontiers in Psychology**, v. 7, n. MAR, p. 1–11, 2016.

BROWN, S. A. **Diagnosing Renal Disease**. The North American Veterinary Conference. Orlando, 2007. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20073120124>. Acesso em: 1 ago. 2020.

CHACAR, F. et al. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2017.

CHARNETSKI, C. J.; RIGGERS, S.; BRENNAN, F. X. Effect of petting a dog on immune system function. **Psychological Reports**, v. 95, n. 3 II, p. 1087–1091, 2004.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e gato**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

CRITSELIS, E.; HEERSPINK, H. L. Utility of the CKD273 peptide classifier in predicting chronic kidney disease progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 2, p. 249–254, 2016.

DE BRITO GALVAO, J. F. et al. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 134–162, 2013.

DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 68, n. SUPPL. 241, p. 89–94, 2008.

DORNELAS, L. R. S. M. et al. Application of serum and urinary electrophoresis as an aid tool for evaluating dogs at different stages of chronic kidney disease. **Comparative Clinical Pathology**, 2021.

EMIDIO, N. et al. Proteômica : uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, p. 101–111, 2015.

FERLIZZA, E. et al. Urinary proteome and metabolome in dogs (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease. **Journal of proteomics**, v. 222, p. 103795, jun. 2020.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 16, n. 4, p. 271–277, 2004.

FURLANI, I. L. et al. Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis. **Quimica Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GHYS, L. et al. Cystatin C: A New Renal Marker and Its Potential Use in Small Animal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 4, p. 1152–1164, 2014.

GONZÁLEZ-AROSTEGUI, L. G. et al. Proteomics in dogs: a systematic review. **Research in Veterinary Science**, v. 143, p. 107–114, 2022.

GOOD, D. M. et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2424–2437, 2010.

GRAUER, G. F. Insuficiência renal aguda e doença renal crônica. In: MOSBY (Ed.). **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: NELSON, R.W.; COUTO, C.G, 2010. p. 648–662.

GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011a.

GRAUER, G. F. Introduction: proteinuric renal disease. **Topics in companion animal medicine**, v. 26, n. 3, p. 119–120, 2011b.

HALL, J. et al. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 794–802, 2016.

HALL, S. S.; GEE, N. R.; MILLS, D. S. Children reading to dogs: A systematic review of the literature. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–22, 2016.

HARLEY, L.; LANGSTON, C. Proteinuria in dogs and cats. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 6, p. 631–638, 2012.

HEILMANN, R. M. et al. Serum $\alpha(1)$ -proteinase inhibitor concentrations in dogs with exocrine pancreatic disease, chronic hepatitis or proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary journal**, v. 236, p. 68–71, 2018.

HELLER, M. et al. Trypsin catalyzed 16O-to-18O exchange for comparative proteomics: Tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-ion trap mass spectrometers. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 7, p. 704–718, 2003.

HEPBURN, S. et al. An analysis of the impact of pre-analytical factors on the urine proteome: Sample processing time, temperature, and proteolysis. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 9, n. 5–6, p. 507–521, 2015.

HEZZELL, M. J. et al. Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Journal**, v. 255, p. 105420, 2020a.

HEZZELL, M. J. et al. Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary journal**, v. 255, p. 105420, 2020b.

HOFFMAN, J. M. et al. The companion dog as a model for human aging and mortality. **Aging Cell**, v. 17, n. 3, 2018.

HOKAMP, J. A. et al. Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 591–601, 2016.

HOKAMP, J. A. et al. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary clinical pathology**, v. 47, n. 3, p. 425–434, 2018.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 1, p. 43, 2014.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p. 6326–6353, 2006.

IRIS. **International Renal Interest Society**. Reino Unido International Renal Interest Society (IRIS) Ltd., , 2023. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/>>

ISHIHAMA, Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 73–83, 2005.

JATURAKAN, O. et al. SDS-PAGE Electrophoresis for Urinary Protein Analysis in Dogs with Chronic Kidney Disease and Urinary Tract Infection. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. 75–83, mar. 2013.

KANIA, K. et al. Urinary proteases degrade albumin: Implications for measurement of albuminuria in stored samples. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 151–157, 2010.

KIM, Y. M. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with stable or progressive kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 654–661, 2019.

KRAMER, C. K.; MEHMOOD, S.; SUEN, R. S. Dog ownership and survival: A systematic review and meta-analysis. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 12, n. 10, p. 1–8, 2019.

LEVINE, G. N. et al. Pet ownership and cardiovascular risk: A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, n. 23, p. 2353–2363, 2013.

MATTA, G. C. **Da doença renal ao renal crônico**. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, 2000.

MISCHAK, H. et al. Proteomic biomarkers in kidney disease: Issues in development and implementation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 4, p. 221–232, 2015.

MISCHAK, H. Pro: Urine proteomics as a liquid kidney biopsy: No more kidney

punctures! **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 4, p. 532–537, 2015.

MIYAKAWA, H. et al. Evaluation of the progression of non-azotemic proteinuric chronic kidney disease in dogs. **Research in veterinary science**, v. 138, p. 11–18, maio 2021.

NABITY, M. B. et al. Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 282–293, 2012.

NABITY, M. B. et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1036–1044, 2015.

PATITUCCI, L. T. et al. Electrophoretic analysis (sds-page) of canine urinary proteins according to the stage of chronic kidney disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1185–1196, 2020.

PELANDER, L. et al. Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. **Veterinary journal**, v. 249, p. 73–79, jul. 2019.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4693–4734.

PONTILLO, C.; MISCHAK, H. Urinary peptide-based classifier CKD273: Towards clinical application in chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 10, n. 2, p. 192–201, 2017.

RAILA, J. et al. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 7, p. 874–879, 2003a.

RAILA, J. et al. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 7, p. 874–879, 2003b.

RAILA, J. et al. of Albumin and Retinol-Binding Protein in Dogs. **Animals**, v. 71, n. 11, p. 1387–1394, 2010a.

RAILA, J. et al. Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 71, n. 11, p. 1387–1394, nov. 2010b.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 261–265, jun. 2014.

SCHANSTRA, J. P.; MISCHAK, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 5, p. 713–725, 2015.

SCHULTZ, C. J. et al. Freezing method affects the concentration and variability of urine proteins and the interpretation of data on microalbuminuria. The Oxford Regional Prospective Study Group. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 17, n. 1,

p. 7–14, jan. 2000.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

SMETS, P. M. Y. et al. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010a.

SMETS, P. M. Y. et al. Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 6, p. 896–902, 2010b.

STEINBACH, S. et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 2, p. 264–269, 2014.

SZCZEPANKIEWICZ, B. et al. Evaluation of tryptic podocin peptide in urine sediment using LC-MS-MRM method as a potential biomarker of glomerular injury in dogs with clinical signs of renal and cardiac disorders. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 1–16, 2019a.

SZCZEPANKIEWICZ, B. et al. Evaluation of Tryptic Podocin Peptide in Urine Sediment Using LC-MS-MRM Method as a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Dogs with Clinical Signs of Renal and Cardiac Disorders. **Molecules**, v. 24, n. 17, ago. 2019b.

THANABOONNIPAT, C. et al. Renal ultrasonographic shear-wave elastography and urinary procollagen type III amino-terminal propeptide in chronic kidney disease dogs. **Veterinary World**, v. 13, n. 9, p. 1955–1965, 2020.

WINIARCZYK, D. Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction in dogs with chronic kidney disease. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 9, p. 525–528, 2020.

WOHLFARTH, R. et al. Dogs motivate obese children for physical activity: key elements of a motivational theory of animal-assisted interventions. **Frontiers in Psychology**, v. 4, n. October, p. 1–7, 2013.

YI, H. J. et al. Investigation on urinary and serum alpha klotho in dogs with chronic kidney disease. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 246, jul. 2020.

ZANDI-NEJAD, K. et al. Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? **Kidney International**, v. 66, n. 92, p. 76–89, 2004.

ZHOU, H. et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. **Kidney International**, v. 69, n. 8, p. 1471–1476, 2006.

ZOJA, C.; ABBATE, M.; REMUZZI, G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 5, p. 706–712, 2015.

3. CAPÍTULO 2

ARTIGO II

Caracterização do perfil de proteínas urinárias de cães saudáveis e com doença renal crônica de ocorrência natural em diferentes estágios

3.1.RESUMO

A doença renal crônica (DRC) é uma doença comum, progressiva e irreversível em cães. A inflamação e a proteinúria estão relacionadas ao processo de progressão da DRC. A realização de estudos na busca por marcadores precoces e indicadores de grau e local de inflamação renal, a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico é de extrema relevância. O objetivo desse estudo foi caracterizar o perfil de proteínas urinárias em cães com diferentes estágios da DRC de ocorrência natural, por meio da espectrometria de massas. O estudo foi realizado por meio da análise de 5 animais hígidos e 22 amostras de caninos portadores de DRC estratificados conforme as diretrizes da IRIS 2019, de raça, idade e sexo aleatórios e, para avaliar o perfil de proteínas urinária por nano LC-MS/MS. Como resultado, um quantitativo total de 65 proteínas foram detectadas na caracterização geral das proteínas urinárias. Identificou-se menor quantitativo de proteínas no grupo controle quando comparada aos demais estágios, sendo que as proteínas se elevaram progressivamente em direção aos estágios avançados da DRC. A haptoglobina foi a proteína que demonstrou maior precocidade, pois esteve presente desde o estágio inicial da DRC (estágio 1 da IRIS 2019). A transferrina foi a segunda proteína mais abundante na avaliação geral dos dados, estando presente a partir do estágio 2 da IRIS. As proteínas do complemento e a via do complemento também apresentaram destaque, reforçando seu papel na instalação e progressão da DRC. Estudos quantitativos estatísticos com maior amostragem são recomendados para confirmação da importância das proteínas identificadas e melhor compreensão da classificação funcional observada neste estudo de caracterização urinária em cada estágio da DRC de ocorrência natural.

Palavras-chave: espectrometria de massas; biomarcadores urinários; diagnóstico precoce.

3.2.ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is a common, progressive and irreversible disease in dogs. Inflammation and proteinuria are related to the progression process of CKD. Carrying out studies in the search for early markers and indicators of the degree and location of renal inflammation, in order to assist in diagnosis and prognosis, is extremely important. The objective of this study was to characterize the profile of urinary proteins in dogs with different stages of naturally occurring CKD, using mass spectrometry. The study was carried out through the analysis of 5 healthy animals and 22 samples from canines with CKD stratified according to the IRIS 2019 guidelines, of random breed, age and sex, and to evaluate the urinary protein profile by nano LC-MS/ MS. As a result, a total of 65 proteins were detected in the general characterization of urinary proteins. A lower quantity of proteins was identified in the control group when compared to the other stages, with proteins progressively increasing towards the advanced stages of CKD. Haptoglobin was the protein that demonstrated the greatest precocity, as it was present from the initial stage of CKD (stage 1 of IRIS 2019). Transferrin was the second most abundant protein in the overall data evaluation, being present from stage 2 of IRIS onwards. Complement proteins and the complement pathway were also highlighted, reinforcing their role in the onset and progression of CKD. Statistical quantitative studies with larger samples are recommended to confirm the importance of the identified proteins and better understand the functional classification observed in this urinary characterization study in each stage of naturally occurring CKD.

Keywords: mass spectrometry; urinary biomarkers; early diagnosis.

3.3.INTRODUÇÃO

Atualmente, os avanços na medicina veterinária, nutrição com dietas equilibradas e vacinações que previnem precocemente doenças infectocontagiosas têm contribuído para a maior longevidade dos cães (DE NARDI et al., 2002), entretanto, o aumento da sobrevivência dos cães tem refletido na elevação da prevalência das doenças crônicas e degenerativas (HOFFMAN et al., 2018).

Dentre as doenças com relativa frequência na rotina clínica dos cães e gatos está a doença renal crônica (DRC), que surge quando ocorrem lesões que afetam a função ou a estrutura de um ou ambos os rins, instituindo-se uma enfermidade irreversível e progressiva. A incidência da DRC aumenta juntamente com a idade, acometendo principalmente cães idosos. No momento do diagnóstico, grande parte dos cães estão inseridos nos estágios III ou IV da DRC (POLZIN, 2017), pois os métodos rotineiramente utilizados na prática clínica são insuficientes para um diagnóstico precoce, gerando consequências graves pela detecção tardia da doença (FIORAVANTI; MENESES, 2011).

A inflamação está envolvida no início e progressão da DRC, sendo possível detectar mediadores inflamatórios no plasma e na urina nos estágios iniciais (RAJ; PECOITS-FILHO; KIMMEL, 2015). Além disso, a proteinúria tem sido estudada como um biomarcador promissor de doença renal progressiva, uma vez que a filtração de proteínas plasmáticas potencialmente tóxicas é responsável pelas correlações observadas entre a proteinúria e a progressão (JEPSON, 2016).

A presença de proteinúria na ausência de achados compatíveis com hemorragia e/ou inflamação, é fortemente indicativa de lesão glomerular e/ou extravasamento (MEUTEN, 2012). A avaliação das proteínas urinárias por meio de estudos de proteômica tem sido considerada uma ferramenta útil para diagnóstico precoce e avaliação da progressão da DRC (PELANDER, 2018). Desta forma, esse estudo tem o objetivo de caracterizar o perfil de proteínas urinárias em cães com diferentes estágios da DRC de ocorrência espontânea, por meio da cromatografia líquida em nanoescala acoplada à espectrometria de massa em tandem (nano LC-MS/MS).

3.4.MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1. ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Este estudo foi composto por 27 amostras de sangue e urina de caninos com raça, idade e sexo aleatórios, atendidos durante a rotina no Hospital Veterinário da Universidade Federal

de Viçosa (UFV). A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA) da UFV (CEUA/UFV nº 18/2021). Os animais foram recrutados em experimento prévio realizado em 2018 (CEUA/UFV nº 94/2017), após o consentimento dos proprietários.

Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais, sendo o grupo controle (GC) composto por 5 animais hígidos e os demais grupos compostos por animais portadores de DRC de ocorrência natural estratificados conforme as diretrizes da IRIS 2019: grupo 1 (G1) composto por 3 animais com DRC estágio I; grupo 2 (G2), composto por 10 animais com DRC estágio II; grupo 3 (G3), composto por 4 animais com DRC estágio III; e grupo 4 (G4), composto por 5 animais com DRC estágio IV.

Os animais do GC foram caracterizados após avaliação clínica, laboratorial [hemograma completo, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose, proteína total, albumina, globulina, urinálise e relação proteína creatinina urinária (UPC)] e ultrassonográfica para exclusão de patologias. Os pacientes com DRC foram avaliados clinicamente e laboratorialmente (hemograma completo, ureia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina, glicose, proteína total, albumina, globulina, urinálise e UPC) para exclusão de pacientes com possíveis comorbidades.

3.4.2. COLETA DE AMOSTRAS E METODOLOGIA LABORATORIAL

Os dados dos animais e amostras analisadas pertencem a experimento anterior (DORNELAS et al., 2021). O sobrenadante urinário permaneceu armazenado a -20°C até a data de análise. Urinas com sedimento ativo (ex.: hematúria e/ou piúria) foram excluídas com o intuito de evitar a interferência na interpretação da origem da proteinúria (VIENTÓS-PLOTTS et al., 2018; JILLINGS et al., 2019).

3.4.3. PROTEINOGRAMA URINÁRIO

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do sobrenadante urinário, realizou-se corrida eletroforética das respectivas amostras em mini gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita previamente (LAEMMLI, 1970). Para a corrida, utilizou-se o sistema vertical de eletroforese (MINI PROTEAN TETRA CELL® BIO-RAD), com gel de empilhamento 4% e gel de resolução 14%.

O marcador padrão de peso molecular¹ como referência, foi aplicado em cavidade pré-estabelecida. O processo de eletroforese ocorreu sob 80 Volts constantes. As proteínas foram fixadas pela submersão do gel em solução de fixação [ácido acético 10% (v/v), etanol 50% (v/v) e água 40% (v/v)] e reveladas por meio de solução de coloração de azul de Coomassie R-250.

Após o processo de revelação das proteínas, o mini gel foi digitalizado no equipamento ImageScanner III (GE Healthcare, Suécia) em modo de transparência e com a resolução de 300 dpi, cujas imagens foram armazenadas nos formatos (*.tif) e (*.png). Em seguida, o mini gel permaneceu em solução de armazenamento (solução aquosa de ácido acético 5 %), até o processo de digestão enzimática.

3.4.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

3.4.4.1. Digestão enzimática e dessalinização das proteínas

O processo de digestão enzimática foi realizado conforme protocolo descrito anteriormente (SHEVCHENKO et al., 2006), com algumas modificações. Com base na quantidade, intensidade e representatividade das bandas, três réplicas biológicas constituintes de cada grupo foram escolhidas e suas lines fracionadas em 15 frações de, aproximadamente, 4 mm de altura. Cada fração foi processada individualmente durante a digestão enzimática. Para proteólise, aplicou-se 70 µL de solução de tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência V5111 (Promega Corporation, EUA), na concentração final de 25ng/µL em solução de ativação (bicarbonato de amônio 40mM, pH 8,0, e acetonitrila 10%). As amostras contendo os peptídeos foram concentradas em sistema de centrifugação a vácuo.

Após digestão, foi realizada dessalinização dos peptídeos trípticos por meio de micro colunas de fase reversa C18 modelo ZTC18S096 (Millipore, USA), as quais doravante serão denominadas fase estacionária. O processo de dessalinização foi realizado conforme instruções do fabricante. O volume total da solução de peptídeos recuperado foi levado ao sistema de centrifugação a vácuo para serem concentrados. As amostras foram secas e armazenadas em freezer -20 °C até a análise por espectrometria de massas.

¹Marcador Sigma Marker 6.5 – 200kDa.

3.4.4.2. Espectrometria de Massas

Os peptídeos constituintes do fracionamento das lines foram analisados por nano LC-MS, por meio do cromatógrafo líquido de ultra alto desempenho – UHPLC NanoAcquity (Waters, EUA), contendo uma coluna trap modelo nanoAcquity UPLC® 2G-V/MTrap 5 µm Symmetry® C18 180 µm x 20 mm, em uma taxa de fluxo de 7 µL/min., durante 3 minutos. A separação dos peptídeos ocorreu por uma coluna nanoAcquity UPLC® 1.8µm HSS T3 75 µm x 200 mm, operando com uma taxa de fluxo de 0,2 µL/min. A fase móvel do processo cromatográfico teve como solventes a água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente A) e a acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (solvente B). A separação cromatográfica totalizou 240 minutos de análise cromatográfica.

Os peptídeos eluídos foram automaticamente injetados em espectrômetro de massas modelo MAXIS 3G (Bruker Daltonics, Alemanha), atuando no modo online, com uma fonte de ionização CaptiveSpray. Os peptídeos foram analisados por meio de método apropriado para análise proteômica (IE_captive_nov2019), com o fluxo de gás de secagem de 3 L/min, temperatura da fonte de ionização de 150 °C e voltagem de transmissão de 2 kV. Os dados brutos foram convertidos em uma lista de massas na extensão *mzXML (Extensible Mark-up Language), por meio do aplicativo CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), a qual foi submetida à identificação por meio do software PEAKS.

3.4.4.3. Análise dos dados oriundos da espectrometria de massas

As listas de massas com extensão *mzXML foram confrontadas contra o banco de dados de proteínas da espécie *Canis lupus familiaris* (download em 19/08/2021, com 45.351 entradas), depositado no Uniprot Consortium.

A comparação foi realizada pelo aplicativo PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (MA et al., 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina não considerando a ocorrência de clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável. Tolerância de erro para o íon parental de 20 ppm e de 0,6 Da para os fragmentos, considerando a análise de íons com carga +2, +3 e +4. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentassem, pelo menos, dois peptídeos únicos com FDR (False Discovery Rate) menor que um por cento.

As proteínas identificadas como “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST (ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local), versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados de proteínas não redundantes (nr) do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCBI) apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

A massa molecular, o ponto isoelétrico, a composição de aminoácidos e outros parâmetros físico-químicos foram calculados por meio da ferramenta ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>), disponível na plataforma Swiss Bioinformatics Resource Portal – Expasy (GASTEIGER et al., 2005). Todos os parâmetros foram calculados com base na sequência de aminoácidos teórica de cada proteína identificada.

A abundância relativa das proteínas foi estimada pela relação entre a soma dos espectros de massa (MS2) dos peptídeos correlacionados a cada proteína identificada e o total de espectros de (MS2) detectados na amostra, com os valores expressos em percentual (CAMUS et al., 2019).

3.4.4.3.1. Classificação funcional das proteínas

Todas as proteínas identificadas em cada estágio da doença foram classificadas usando o Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>) de acordo com suas anotações de ontologia gênica (GO) e as vias metabólicas da enciclopédia de genes e genomas de Kyoto (KEGG) (SUN et al., 2020).

3.5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS IDENTIFICADAS

Este estudo foi o primeiro que caracterizou o perfil de proteínas urinárias em pacientes caninos com DRC considerando cada estágio proposto pelas diretrizes da Sociedade Internacional de Interesse Renal (IRIS) 2019 (INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY, 2019). Aprender sobre a origem das proteínas encontradas na urina (isto é, produção local ou sistêmica) e como elas foram geradas possibilita uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos associados à doença (KLEIN et al., 2014), sendo assim, em relação a DRC, quanto maior for o conhecimento a respeito do comportamento das proteínas

em cada estágio da doença, maiores informações são alcançadas para realização do necessário diagnóstico precoce.

A Espectrometria de Massas possibilita determinar as massas moleculares, auxiliando na determinação da identidade de uma espécie. O acoplamento da cromatografia líquida a espectrometria de massas tem resultado numa ferramenta analítica versátil e de grande potencial na análise qualitativa e quantitativa (LANÇAS, 2009; SIMON et al., 2014). Estudos das proteínas urinárias por meio de métodos de proteômica avaliaram a injúria renal secundária a doenças infecciosas, como babesiose (WINIARCZYK et al., 2019; BILIĆ et al., 2023), leishmaniose (GONZÁLEZ et al., 2022) e dirofilariose (HORMAECHE et al., 2014), e doenças de causas congênitas, como a nefropatia hereditária ligada ao cromossomo X (XLHN) (NABITY et al., 2011), verificando proteínas diferencialmente presentes entre grupo de animais saudáveis e grupo(s) de animais doentes.

A avaliação do perfil de proteínas urinárias foi realizada em cães saudáveis (BRANDT et al., 2014). Por meio de espectrometria de massas, avaliou-se as proteínas urinárias em caninos (PELANDER et al., 2019a) e felinos (FERLIZZA et al., 2015) com DRC, entretanto, os autores não avaliaram cada estágio da doença.

Por meio da metodologia utilizada, detectou-se 65 diferentes proteínas urinárias em cães com DRC em diferentes estágios (G1, G2, G3 e G4) e animais saudáveis (GC) (quadro 01 e tabela 01). Outras pesquisas das proteínas urinárias por meio de ferramentas de proteômica em humanos (LIAO et al., 2018) e cães (BRANDT et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2022) apresentaram um quantitativo maior do que o encontrado neste estudo, porém as técnicas empregadas foram diferentes, assim como preparo e conservação das amostras de urina.

Quadro 01. Proteínas identificadas na ordem de abundância relativa geral e por grupo (GC, G1, G2, G3 e G4).

Proteínas	Geral	GC	G1	G2	G3	G4
Albumina	21,4	32,6	32,1		31,9	21,9
Globulina de ligação de metal beta-1	8,2			10,4	10,9	8,5
Haptoglobina [Clivado em: Cadeia alfa da haptoglobina; Cadeia beta da haptoglobina]	5,9		1,3	10,1	7,1	4,6
Proteína não caracterizada (E2RCC8)	5,4			13,2		7,1
Proteína não caracterizada (H9GWR8)			2,9			
Proteína não caracterizada (J9P9J6)		3,9				
Queratina, citoesqueleto 10 tipo I	5	10,1	23,8	4,3	2,2	2
C3-beta-c	4,5			6,6	4,8	5
Membro A 1 da família Serpina	3,6			5,5	4,7	3,2
Queratina, citoesqueleto 1 tipo II	3,2	7,4	13,2	2,9	1,5	1,2
Gc-globulina	3			4,3	3,8	3
Plasminogênio	2,6			3,3	3,3	2,9
Membro 1 da Família B de ligação à proteína precursora beta amiloide	2		1,1	2,2	2,8	3,2
Antitrombina-III	2,4			3,1	3,4	2,1
Peptidase S1 domain-containing protein (A0A5F4CI30)		4,6	4,4			
Peptidase S1 domain-containing protein (A0A5F4BR33)	2,2	4,6		2,6		2,1
Alfa-1-B glicoproteína	2,1	4,9	1,3	2,2	2,1	1,5
Proteína contendo o domínio SERPINA	2,1			4,2	2,1	1,7
Queratina 75	1,7		6,8	1,6		1,6
Alfa-1 glicoproteína ácida	1,7			3,6	1,6	1,4
Angiotensina 1-10	1,7		1,6	2	1,7	1,8
Alfa-2-glicoproteína 1 rica em leucina	1,6			2,2	1,4	2,1
Uromodulina	1,4	14,8	2,7			
Cadeia pesada 4 do inibidor de inter-alfa-tripsina	1,2			1,9	1,4	1,1
Anafilatoxina C4a	1,1			1,3	1,1	1,4
Transtirretina	1,1			1,6	1,1	1,2
C3/C5 convertase	1			2,4		1,3
Proteína contendo domínio IF rod						1,6
Proteína de ligação ao retinol no plasma						1,3
Cininogênio 1					1	1,2
Beta-2-microglobulina						1,2
Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal						1,1
Alfa fetoproteína				1	1,3	1,1
Lisozima C, isoenzima do baço						1
Beta-2-glicoproteína 1				1,1		1
Apolipoproteína A-IV						1
Membro F 1 da família Serpina						1
Cadeia alfa do fibrinogênio					1,3	
Pentaxina				1,2		
MOO Região V da cadeia pesada de Ig				1,1		
Proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP)				1		
Apolipoproteína A-I			5,7			
Heparan sulfato proteoglicano 2			2,4			
Desoxirribonuclease-1		4,4				
Pepsina A		4,4				
Proteína 8 associada à remodelação da matriz		3,5				
Proteína de ligação a galectina-3		1,8				
Molécula de adesão juncional 1		1,6				
Receptor 1 de hialuronano endotelial de vasos linfáticos (LYVE1)		1,4				
Outros	13,9		0,8	3,1	7,3	6,7
Total %	100	100	100	100	100	100

Tabela 01. Caracterização das proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, separadas por eletroforese SDS-PAGE e identificadas por NANO LC-MS/MS, em ordem de abundância relativa.

Número de acesso	Nome das proteínas	Cobertura (%)	Número de peptídeos	Nº do espectro de peptídeos	Abundância relativa (%)
P49822	Albumina	44,74%	26	1590	21,4%
J9P430	Globulina de ligação de metal beta-1	33,47%	25	609	8,2%
P19006	Haptoglobina [Cleaved into: Haptoglobin alpha chain; Haptoglobin beta chain]	42,25%	14	437	5,9%
E2RCC8	Proteína não caracterizada (cadeia pesada de imunoglobulina IGH-15)	26,85%	11	401	5,4%
F1PYU9	Queratina, citoesqueleto 10 tipo I	15,32%	9	372	5,0%
F1PGM1	C3-beta-c	16,35%	25	334	4,5%
F1PCE5	Membro A 1 da família Serpina (A1A, A1AT, AAT, alfa-1 antitripsina)	19,00%	8	269	3,6%
Q6EIY9	Queratina, citoesqueleto 1 tipo II	10,02%	6	235	3,2%
F1P841	Gc-globulina (proteína de ligação sérica à vitamina D (DBP))	22,78%	10	224	3,0%
F1Q421	Plasminogênio	8,74%	8	195	2,6%
F1PZR4	Membro 1 da Família B de ligação à proteína precursora beta amilóide	12,71%	9	181	2,4%
E2RES2	Antitrombina-III	21,51%	12	176	2,4%
A0A5F4BR33	Proteína contendo domínio de peptidase S1	13,09%	3	167	2,2%
F1PCK2	Alfa-1-B glicoproteína	16,67%	7	155	2,1%
F1PH87	Proteína contendo o domínio SERPINA	23,58%	10	155	2,1%
L7N095	Queratina 75	10,09%	6	129	1,7%
F6Y713	Alfa-1 glicoproteína ácida	16,59%		127	1,7%
F1PAL5	Angiotensina 1-10	12,62%	6	124	1,7%
E2R833	Alfa-2-glicoproteína 1 rica em leucina	24,86%	9	117	1,6%
J9P678	Uromodulina	13,51%	7	101	1,4%
H9GWY3	Cadeia pesada 4 do inibidor de inter-alfa-tripsina	10,81%	10	88	1,2%
A0A5F4D5S2	Anafilatoxina C4a	7,06%	11	81	1,1%
E2R5U8	Transtirretina	34,69%	5	80	1,1%
E2RS75	C3/C5 convertase	4,98%	5	73	1,0%

E2QZ19	Alfa fetoproteína	13,25%	8	70	0,9%
P33703	Beta-2-glicoproteína 1	11,30%	4	60	0,8%
A0A5F4D923	Cininogênio 1	24,01%	8	51	0,7%
E2R5J0	Pentaxina	12,90%	4	50	0,7%
F1Q4D9	Proteína de ligação ao retinol no plasma	11,61%	3	50	0,7%
P81709	Lisozima C, isoenzima do baço	26,92%	4	41	0,6%
E2R7W6	Proteína contendo domínio IF rod	11,94%	6	40	0,5%
P01785	MOO Região V da cadeia pesada de Ig	27,35%	3	39	0,5%
E2RN10	Beta-2-microglobulina	21,60%	3	38	0,5%
F1PDJ5	Apolipoproteína A-I	19,55%	5	36	0,5%
E2R9B6	Fetuina B	5,46%	2	36	0,5%
F1PYX9	Membro G 1 da família Serpina	6,64%	3	31	0,4%
Q6EIZ1	Queratina, tipo II do citoesqueleto 2 epidérmico	8,53%	6	29	0,4%
J9NSF9	Fragmento 1 do peptídeo de ativação	4,93%	4	28	0,4%
A0A5F4CI30	Proteína contendo domínio de peptidase S1	6,77%	2	26	0,3%
F1PBL4	Cadeia alfa do fibrinogênio	3,90%	4	26	0,3%
Q767J3	Desoxirribonuclease-1	6,34%	2	25	0,3%
Q9GMY6	Pepsina A	6,74%	2	25	0,3%
A0A5S6CZL3	Apolipoproteína A-IV	12,69%	5	25	0,3%
A0A5F4CK29	Membro F 1 da família Serpina	17,54%	7	25	0,3%
J9P9J6	Proteína não caracterizada (Região constante da cadeia pesada de IgA, parcial)	5,60%	2	22	0,3%
A0A5F4D1U1	Proteína 8 associada à remodelação da matriz	9,61%	3	20	0,3%
H9GWR8	Proteína não caracterizada (cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 isoforma X34)	10,92%	2	18	0,2%
A0A5F4CJ24	Fator de despolimerização de actina	4,73%	3	17	0,2%
E2QW61	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP)	3,95%	2	17	0,2%
J9NUI6	Alfa-1-microglobulina	16,33%	4	17	0,2%
E2QZQ1	Proteína não caracterizada (inibidor da anidrase carbônica isoforma X2)	4,58%	4	17	0,2%
J9NRJ0	Heparan sulfato proteoglicano 2	0,70%	2	15	0,2%

A0A5F4BUM0	Alfa-amilase	8,96%	3	15	0,2%
A0A5F4CRH0	Ceruloplasmina	3,01%	3	14	0,2%
E2RKQ6	Proteína de ligação a galectina-3	4,83%	2	10	0,1%
F1PBK6	Anidrase carbônica	6,90%	2	10	0,1%
F1PP71	Molécula de adesão juncional 1	9,51%	2	9	0,1%
A0A5F4DC46	Proteína contendo domínio de endostatina	6,58%	2	9	0,1%
E2R6A0	Receptor 1 de hialuronano endotelial de vasos linfáticos (LYVE1)	6,17%	2	8	0,1%
F1PR54	Lactotransferrina (LTF, lactoferrina)	3,25%	3	8	0,1%
P60524	Subunidade beta da hemoglobina	17,12%	2	8	0,1%
A0A5F4BRT0	Proteína contendo domínio de peptidase S1	3,23%	2	7	0,1%
F1P6B7	Anexina	6,96%	2	7	0,1%
A0A5F4DFF1	Proteína não caracterizada (alfa-2-macroglobulina)	2,15%	3	6	0,1%
A0A5F4BRW9	Trombospondina 1 (THBS1)	1,43%	2	6	0,1%
	Total			7431	100%

Em relação as proteínas presentes nas amostras deste estudo, foram avaliados: percentual de cobertura, sequência de peptídeos, peso molecular, potencial isoeletrônico (pI), score e número de espectros dos peptídeos (tabela suplementar 01).

As proteínas específicas de cada grupo e comum entre eles foram analisadas por meio do Diagrama de Venn (figura 01), demonstrando um total de 14 proteínas no GC, 14 no G1, 33 no G2, 33 no G3 e 48 no G4, sendo 8 proteínas restritas ao GC, 3 ao G1, 2 ao G2, 3 ao G3 e 12 ao G4 (tabela 02). As proteínas comuns entre os grupos estão listadas na tabela 03 e figura 02.

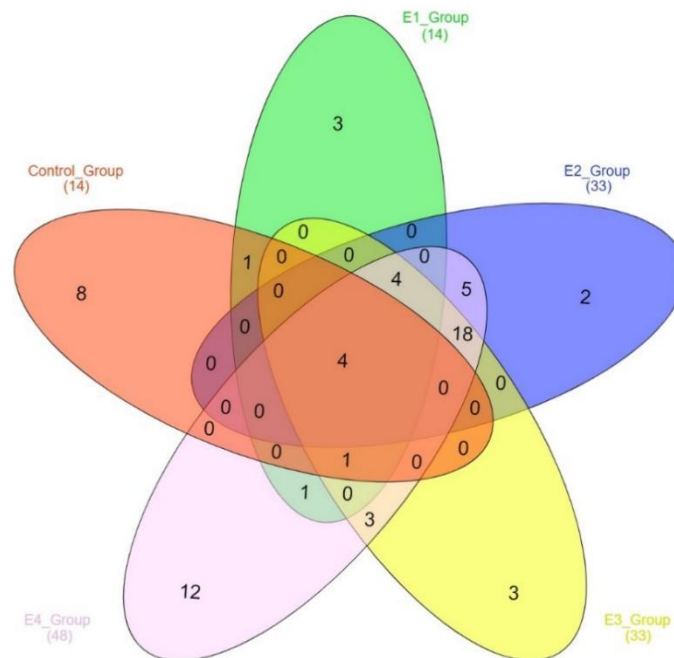


Figura 01. Diagrama de Venn das proteínas urinárias de cães com e sem DRC.

Tabela 02. Proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, identificadas diferencialmente em apenas um grupo estudado (GC, G1, G2, G3 e G4).

Controle (GC)	Estágio 1 (G1)	Estágio 2 (G2)	Estágio 3 (G3)	Estágio 4 (G4)
Desoxirribonuclease-1	Apolipoproteína A-I	Proteína de ligação a lipopolissacarídeos (LBP)	Alfa-1-microglobulina	Alfa-amilase
Proteína de ligação a galectina-3	Heparan sulfato proteoglicano 2	Proteína contendo domínio de peptidase S1(A0A5F4BRT0)	Proteína não caracterizada (A0A5F4DFF1/ alfa-2-macroglobulina)	Anexina
Molécula de adesão juncional 1	Proteína não caracterizada (H9GWR8/ cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 isoforma X34)			Apolipoproteína A-IV
Receptor 1 de hialuronano endotelial de vasos linfáticos (LYVE1)				Anidrase carbônica
Proteína 8 associada à remodelação da matriz				Proteína contendo domínio de endostatina
Pepsina A				Subunidade beta da hemoglobina
Proteína contendo domínio de peptidase S1 (A0A5F4CI30)				Proteína contendo domínio de haste IF
Proteína não caracterizada (J9P9J6/ Região constante da cadeia pesada de IgA, parcial)				Queratina, tipo II do citoesqueleto 2 epidérmico
				Lactotransferrina
				Membro F 1 da família Serpina
				Trombospondina 1
				Proteína não caracterizada (E2QZQ1/ inibidor da anidrase carbônica isoforma X2)

Tabela 03. Proteínas urinárias de cães saudáveis e com DRC, identificadas de forma simultânea nos grupos estudados (GC, G1, G2, G3 e G4).

GC + G1 (n=1)	G1+G4 (n=1)	G2+G4 (n=5)	G3+G4- (n=3)	GC+G1+G3+G4 (n=1)	G2+G3+G4 (n=18)	G1+G2+G3+G4 (n=4)	GC+G1+G2+G3+G4 (n=4)
Uromodulina	Fator de despolimerização de actina	C3/C5 convertase	Cininogênio 1	Albumina	Fragmento 1 do peptídeo de ativação	Membro 1 da Família B de ligação à proteína precursora beta amilóide	Alfa-1-B glicoproteína
		Ceruloplasmina	Proteína de ligação ao retinol no plasma		Alfa fetoproteína	Angiotensina1-10	Queratina, citoesqueleto 1 tipo II
		MOO Região V da cadeia pesada de Ig	Beta-2-microglobulina		Alfa-1 glicoproteína ácida	Haptoglobina [Clivado em: Cadeia alfa da haptoglobina; Cadeia beta da haptoglobina]	Queratina, citoesqueleto 10 tipo I
		Lisozima C, isoenzima do baço			Antitrombina-III	Queratina 75	Proteína contendo domínio de peptidase S1 (A0A5F4BR33)
		Proteína não caracterizada (E2RCC8/ cadeia pesada de imunoglobulina IGH-15)			Globulina de ligação de metal beta-1		
					Beta-2-glicoproteína 1		
					C3-beta-c		
					Anafilatoxina C4a		
					Fetúina B		
					Gc-globulina		

	Cadeia pesada 4 do inibidor de inter-alfa- tripsina	
	Alfa-2- glicoproteína 1 rica em leucina	
	Pentaxina	
	Plasminogênio	
	Proteína contendo o domínio SERPINA	

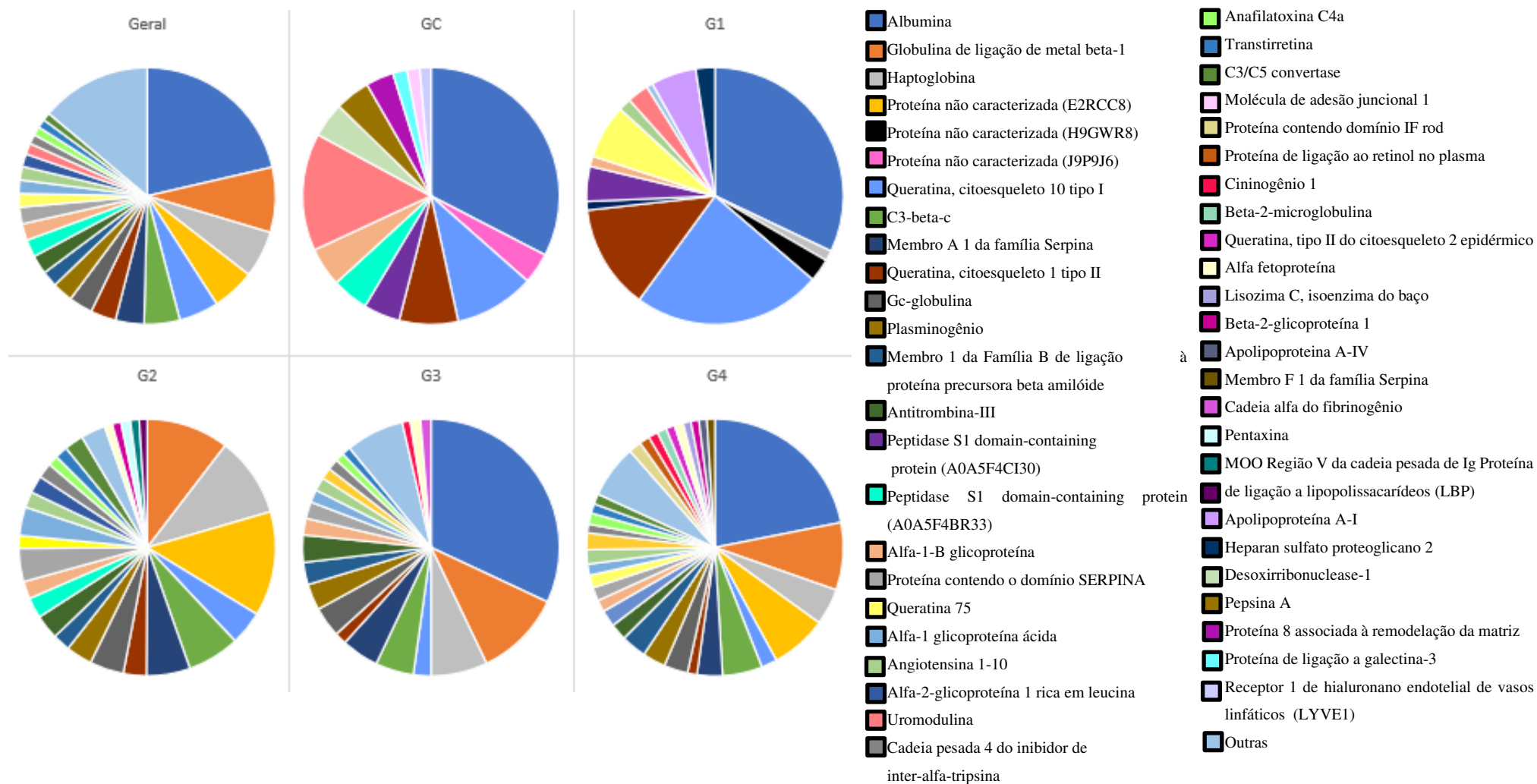


Figura 02. Proteínas identificadas na análise geral dos dados e por grupo estudado (GC, G1, G2, G3 e G4), conforme suas abundâncias relativas.

Em relação aos estágios, avaliando-se cada grupo separadamente, as proteínas identificadas na ordem de abundância relativa estão demonstradas no quadro 01 e no painel (figura 02). O conjunto de proteínas encontradas com menos de 1% de abundância no respectivo grupo foi classificado como “outras”.

A elevação crescente de proteínas do GC com o avançar da DRC de acordo com a IRIS (2019) foi observada, indicando importante alteração na seletividade da barreira de filtração glomerular (REECE, 2017) e/ou comprometimento da reabsorção tubular normal (VERLANDER, 2014).

Independente se comum ou não aos outros grupos de estudo, todas as proteínas presentes na urina de animais saudáveis (GC) possuíam a distribuição do peso molecular semelhante aos estudos de proteínas urinárias humanas (ADACHI et al., 2006) e canina (BRANDT et al., 2014), possuindo peso máximo de 68 kDa (albumina) corroborando que as proteínas filtradas pelo glomérulo saudável possuem peso aproximado menor que 70 kDa (REECE, 2017).

A albumina foi a principal proteína identificada nas urinas de cães com ausência ou presença de DRC (21,4%), assim como no G1 (32,1%), G3 (31,9%) e G4 (21,9%). Ela é a principal proteína plasmática e, portanto, principal proteína a ser filtrada pelo glomérulo. Tem peso aproximado de 66kDa, é formada por 585 AA, possui forma elíptica (globular), o que a confere alta solubilidade, e carga negativa fraca (ESCALANTE GÓMEZ; ZELEDÓN SÁNCHEZ; ULATE MONTERO, 2009). Seu tamanho e forma, possibilitam sua presença no filtrado glomerular. Entretanto, por possuir carga semelhante a membrana basal glomerular, parte é repelida na barreira de filtração. Grande parte da albumina presente no filtrado glomerular é reabsorvida pelos túbulos (FINCO, 1995; ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017; SYME; JEPSON, 2017).

Trabalhos descrevem a albumina como um importante marcador de lesão renal (RAILA et al., 2010a; SMETS et al., 2010a; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014; CHACAR et al., 2017; FERLIZZA et al., 2020). Ainda que a presença de albumina na urina esteja relacionada com a proteinúria, sua excreção parece não ser afetada pela taxa de depuração de creatinina plasmática exógena [P-Cl_{Cr}], não possuindo valor diagnóstico como marcadores para a detecção precoce de taxa reduzida de P-Cl_{Cr}, em cães não azotêmicos, não sendo indicada como marcador precoce da DRC (RAILA et al., 2010a).

A albuminúria está negativamente correlacionada com cães gravemente doentes (VADEN et al., 2010) e com sobrevivência de gatos com DRC naturalmente acometidos (SYME et al., 2006). Desta forma, a macroalbuminúria tem sido descrita como marcador da lesão glomerular associada à progressão da DRC (FINCO, 1995; ROURA; ELLIOTT;

GRAUER, 2017; SYME; JEPSON, 2017), conquanto lesões tubulares também apresentem albuminúria devido a reabsorção tubular comprometida (ROURA; ELLIOTT; GRAUER, 2017).

Neste estudo, notou-se que a abundância relativa diminuiu conforme a progressão do estadiamento da IRIS, que pode ser justificado pelo aumento do quantitativo de proteínas conforme o agravamento da doença, reduzindo proporcionalmente os valores de abundância relativa de cada proteína detectada.

A albumina não foi detectada no G2, porém uma falha na técnica relacionada a manipulação das amostras poderia justificar, visto que inexitem réplicas técnicas.

A globulina de ligação de metal beta-1 (transferrina) vem sendo estudada como marcador precoce de dano renal em humanos (KANAUCHI et al., 1995; BANG; HELM; SVENDSEN, 1996; NARITA et al., 2006; URREGO et al., 2020) e felinos (MAEDA et al., 2015). A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, sintetizada principalmente pelos hepatócitos. Contém 679 resíduos de aminoácidos, peso molecular ~79 kD e principal função de transportar o ferro sérico. Executa função antimicrobiana pela redução dos níveis de ferro livre e pela capacidade de redução da adesão de bactérias gram positivas e gram negativas; além disso tem sido implicada nas atividades de crescimento, diferenciação celular e citoproteção (GOMME; MCCANN, 2005).

Comparando felinos sadios e com DRC estágio I (IRIS), com base na análise da curva ROC, a sensibilidade e especificidade da albumina e da transferrina urinária foram maiores do que as de creatinina plasmática. A especificidade da transferrina apresentou-se superior em relação a albumina urinária. Além disso, a transferrina precede a albumina, visto que em felinos sadios e com DRC estágio I apresentando níveis de transferrina urinária $\geq 1,5$ mg/dL foram definitivamente diagnosticados com nefrite intersticial crônica por exame histopatológico, consistente com os achados no SDS-PAGE, sugerindo a inclusão da transferrina urinária nos testes bioquímicos como auxílio no estadiamento da IRIS para o diagnóstico precoce de doença renal em gatos (MAEDA et al., 2015).

Na medicina humana, um experimento utilizando humanos e modelo animal (ratos) expostos a nefrotoxinas (cisplatina, gentamicina e nitrato de uranila) demonstrou que a transferrina urinária aumenta no estado de risco, antes do dano ocorrer, como consequência da reabsorção tubular reduzida, identificando preventivamente subpopulações de pacientes em risco de nefrotoxicidade e da doença renal aguda. Dessa forma, ela pode ser explorada como biomarcador importante em pacientes com predisposição ao dano renal induzido por insultos

que causam alterações tubulares subclínicas (CASANOVA et al., 2020), que poderiam levar a DRC pela progressão da injúria renal inicial.

Neste estudo, a transferrina foi a segunda proteína mais amplamente identificada (8,2%) no geral das amostras analisadas, nos grupos G2 (10,4%), G3 (10,9%) e G4 (8,5%), demonstrando sua possível relevância na DRC de ocorrência natural a partir do estágio 2, entretanto, como não foi indicada no G1, sua precocidade a partir da instalação da DRC pode ser questionada.

A haptoglobina (Hp) (clivada em cadeia alfa e cadeia beta da Hp) foi a terceira proteína relativamente mais identificada na avaliação geral (5,9%). A Hp é uma proteína de fase aguda (WINIARCZYK et al., 2019) com função antibacteriana (por ligação à hemoglobina livre em tecidos infectados, limitando a disponibilidade de ferro para o crescimento bacteriano) (HARVEY, 2008) e com importante função protetora de realizar o sequestro intravascular da hemoglobina (Hb) extracelular, formando grandes complexos de proteínas Hb-Hp, prevenindo o extravasamento de Hb livre para os tecidos. O grande complexo Hb-Hp não pode ser filtrado pelo rim e a translocação através das monocamadas endoteliais é quase integralmente bloqueada, evitando que reações oxidativas provocadas principalmente pela porção heme da Hb (potencial de promover reações peroxidativas e ativação de cascatas inflamatórias) levem à deposição de globina (cilindros hialinos), sobrecarga de ferro, peroxidação lipídica e lesão tubular renal (SCHAER et al., 2014).

A Hp é uma glicoproteína de aproximadamente 80 kDa, sintetizada principalmente no fígado (HARVEY, 2008) e expressa pelos túbulos renais em resposta a lesão ou estresse oxidativo (D'ARMIENTO; DALAL; CHADA, 1997).

A presença da Hp foi descrita na urina de humanos há bastante tempo, ainda que não tenha sido detectada em todas as urinas normais de humanos (BERGGARD; BEARN, 1962). Sua utilidade como biomarcador foi descrita em pacientes após a avaliação das proteínas urinárias em pacientes com nefrite lúpica, na qual a Hp estava presente secundária ao dano tubular, sendo expressa a nível renal (AGGARWAL et al., 2017); e em pacientes com nefropatia diabética, onde a relação Hp-creatinina (HCR) demonstrou ser um indicador precoce de nefropatia e um marcador preditor independente de declínio funcional renal precoce (LIAO et al., 2018), antes da macroalbuminúria ou taxa de filtração glomerular (eTFG) reduzida (BHENSADIA et al., 2013).

A Hp na urina prediz o risco de mortalidade independente de albuminúria e fatores de risco em pacientes humanos com diabetes tipo 2, sugerindo ser biomarcador para o risco de mortalidade (LIU et al., 2020).

Em cães, até o momento, o estudo do perfil de proteínas da urina justificou o uso da Hp como biomarcador em cães com doença renal secundária a leishmaniose (GONZÁLEZ et al., 2022), babesiose (WINIARCZYK et al., 2019), XLHN (NABITY et al., 2011) e diabetes melito (WINIARCZYK et al., 2022). Embora exista avaliação de proteínas urinárias em cães machos nos estágios iniciais da lesão túbulo-intersticial em modelo canino de doença glomerular progressiva (XLHN), detectando altos níveis de Hp no tempo 1, momento em que os cães se tornaram-se proteinúricos (UPC > 2) e não azotêmicos (NABITY et al., 2011), não há análise empregando o estadiamento da IRIS.

A elevação da Hp urinária em cães com diabetes melito sem a presença de microalbuminúria quando comparado com cães saudáveis, pode sugerir sua precocidade (WINIARCZYK et al., 2022). Neste estudo, observou-se a presença da Hp como uma das principais proteínas encontradas a partir do estágio inicial (G1) da DRC, estando ausente em cães saudáveis (GC), sendo uma possível proteína a ser estudada como biomarcador precoce da DRC pela sua possível capacidade de diferenciação entre animal sadio (GC) e com DRC a partir da sua instalação (G1).

A abundância relativa da Hp no estágio inicial foi menor (12^a mais abundante no G1) que nos demais estágios (3^a mais abundante no G2 e G3 e 5^a no G4), mesmo que os demais estágios possuíssem um quantitativo maior de proteínas representadas. Isso ocorreu possivelmente devido maior grau de acometimento renal com a progressão da DRC, indicando que essa proteína possa ser possível biomarcador de progressão, porém estudos quantitativos futuros deverão ser realizados para confirmação.

Outra proteína amplamente encontrada na análise geral foi a proteína não caracterizada E2RCC8 (5,4%), alinhada por meio do BLASTp como uma cadeia pesada de imunoglobulina IGH-15, presente nos grupos G2 e G4. Outras imunoglobulinas identificadas em menor abundância foram a região constante da cadeia pesada de imunoglobulina A (IgA), parcial, em GC, e a cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 isoforma X34.

Apesar de não encontrar publicações referentes a IGH-15 na DRC, a cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 foi relacionada com a progressão da DRC em humanos. A amiloidose de cadeia leve tem sido descrita na medicina humana (DEMBER, 2006) e em cães e gatos (KADOTA et al., 2020), além da proteinúria de cadeia leve da imunoglobulina lambda ter sido descrita em humanos com síndrome de Fanconi complicada associada a síndrome nefrótica e amiloidose renal (RIKITAKE et al., 1989).

A presença da cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 em quantidade elevada em cães naturalmente infectados pela *L. infantum* (estágios III e IV, Guidelines LeishVet 2011) quando

comparado com o quantitativo presente na urina do grupo controle, pode indicar a presença dessa proteína devido a filtração glomerular ou produção local (GONZÁLEZ et al., 2022), embora exista relato da detecção de proteinúria com presença de cadeias leves livres de imunoglobulina em cães com morfologia renal normal no exame histopatológico e com concentrações séricas de creatinina e ureia nos valores de referência para espécie, sugerindo que essa proteína possa estar presente na ausência de desarranjo renal estrutural ou funcional aparente (BONFANTI et al., 2004). Neste estudo, a cadeia leve da imunoglobulina lambda-1 isoforma X34 foi sétima proteína mais abundante no G1, necessitando de experimentos futuros para maior elucidação da identificação desta proteína na DRC e avaliar sua possibilidade como biomarcador precoce.

A IgA foi a 10ª proteína mais abundante no grupo controle, possuindo importante função relacionada a anticorpos secretores nos fluidos do trato geniturinário (ECKERSALL, 2008), podendo estar presente na urina normal (PETERSON; BERGGÅRD, 1971), assim como observado neste estudo.

Apesar de algumas queratinas terem sido identificadas nesse estudo, as pesquisas não indicaram relevância relacionada a alterações renais, podendo ser consideradas contaminação das amostras ocorrida pela manipulação durante alguma etapa da metodologia empregada.

A próxima proteína abundantemente identificada na avaliação generalizada dos dados foi a C3-beta-c (complemento C3) (4,5%), que é um fragmento C-terminal da cadeia beta do complemento C3 (C3) com principal atividade biológica realizar quimiotaxia de neutrófilos, mas que também aumenta a permeabilidade vascular, podendo ter as características de uma anafilatoxina (NAKAGAWA; SUNADA; ANDO, 1998). Essa proteína está inserida no sistema complemento, que faz parte do sistema imunológico inato necessário para a defesa do hospedeiro e é ativado pelas vias clássica, alternativa ou de ligação à manose; sua ativação inadequada leva a danos renais (ZHAO et al., 2021).

C3-beta-c, já foi identificada na urina de cães com leishmaniose e doença renal, embora não indicada como possível biomarcador (GONZÁLEZ et al., 2022). A proteína C3 foi identificada diferencialmente entre os tempos estudados (tempo 1, referente ao início da proteinúria evidente, UPC > 2; e tempo 2, referente ao início da azotemia, creatinina \geq 1,2 mg/dL) em pacientes com XLHN, sendo que o maior nível dessa proteína estava presente no tempo 1 (NABITY et al., 2011).

Ao avaliar se a ativação efetiva do complemento tem sido associada a vários tipos de doença renal em humanos por meio de análise peptidômica baseada em espectrometria de massa, constatou-se que fragmentos específicos do complemento presentes na urina podem estar

associados a etiologias de doenças renais e a progressão da doença. Muitos peptídeos derivados de C3 demonstram associação inversa com a eTFG, podendo servir como biomarcadores não invasivos de pacientes portadores de doença renal, auxiliando no diagnóstico e tomada de decisão em relação ao manejo terapêutico do paciente (WENDT et al., 2021).

Níveis de C3, C9 e fator de complemento H demonstram abundância e correlacionaram-se negativamente com o declínio anual da eTFG em pacientes humanos com diabetes melito tipo 2 (DM2). A abundância urinária das proteínas do complemento está associada ao estágio final da doença renal nesses pacientes com DM2 e nefrite diabética comprovada por biópsia. Essas evidências revelam que o sistema complemento desempenha um papel fundamental no início e progressão da doença renal, indicando que o direcionamento terapêutico da via do complemento pode aliviar a progressão da doença renal (ZHAO et al., 2021).

Níveis altamente elevados de C3 urinários e ligeiramente elevados no plasma foram detectados em pacientes com biópsia positiva para doença da membrana basal antiglomerular humana, indicando que a ativação do complemento ocorre, nesses casos, principalmente *in situ* no rim (MA et al., 2013).

Neste trabalho em questão, C3-beta-c foi encontrada como a quarta proteína mais abundante nos grupos G2 (6,6%), G3 (4,8%) e G4 (5%), não estando presente no GC e nem no estágio inicial da DRC (G1), o que pode estar relacionado ao aumento da proteinúria, ativação do complemento a nível renal e progressão da DRC.

A uromodulina ou proteína da *Tamm horsfall* (THP), proteína mais abundante no GC, esteve presente juntamente com a albumina como as principais proteínas encontradas na urina de cães com funcionamento renal íntegro (BRANDT et al., 2014; GONZÁLEZ et al., 2022). Fisiologicamente, as células epiteliais do ramo ascendente espesso da alça de Henle e os túbulos contorcidos distais realizam a síntese desta glicoproteína de membrana, que possui cerca de 100 kDa. Em indivíduos saudáveis espera-se a presença dessa proteína, enquanto que quando há acometimento funcional renal juntamente com disfunção tubular, uma redução dramática ou ausência da sua expressão pode ser notado (KOHN, 2014; FERLIZZA et al., 2020; RAILA; SCHWEIGERT; WINIARCZYK, 2020). À medida que a DRC progride, uma queda na quantidade pode ser observada (RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2014), o que pode justificar a possível ausência dessa proteína a partir do G2 deste estudo.

Cães apresentam níveis mais altos de uromodulina na urina quando comparado com humanos (BRANDT et al., 2014) e felinos saudáveis (FERLIZZA et al., 2015), pois excretam vitamina A na urina e a uromodulina possui papel de proteína transportadora de retinol na urina desta espécie (SCHWEIGERT; RAILA; HAEBEL, 2002).

O membro 1 da família B de ligação a proteína precursora beta amiloide não foi identificada nos animais do GC, chamando a atenção para a realização de maiores estudos para avaliar seu potencial como marcador precoce da DRC. A proteína precursora beta amiloide é uma grande glicoproteína transmembranar que dá origem a proteína beta amiloide (XAVIER, 2008). Em humanos, essa proteína é responsável pelos depósitos amilóides das paredes vasculares cerebrais e das placas neuríticas da doença de Alzheimer (BENSON, 2001). Ainda em humanos, pesquisadores correlacionam a patogênese da DRC e à doença de Alzheimer, demonstrando que pacientes com doença renal expressam nível mais elevado de proteína precursora de amiloide, possivelmente por meio da super ativação do sistema renina angiotensina, pela ação da angiotensina II, resultando no acúmulo extracelular da proteína beta amiloide (MA; ZHENG; MENG, 2023).

3.5.2. CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL

Foi realizada a classificação funcional geral das proteínas para pacientes sem e com DRC, independente do estágio. Conforme demonstrado nas ilustrações gráficas, avaliou-se o componente celular (figura 03), classes proteicas (figura 04), função molecular (figura 05), processo biológico (figura 06) e vias (figura 07).

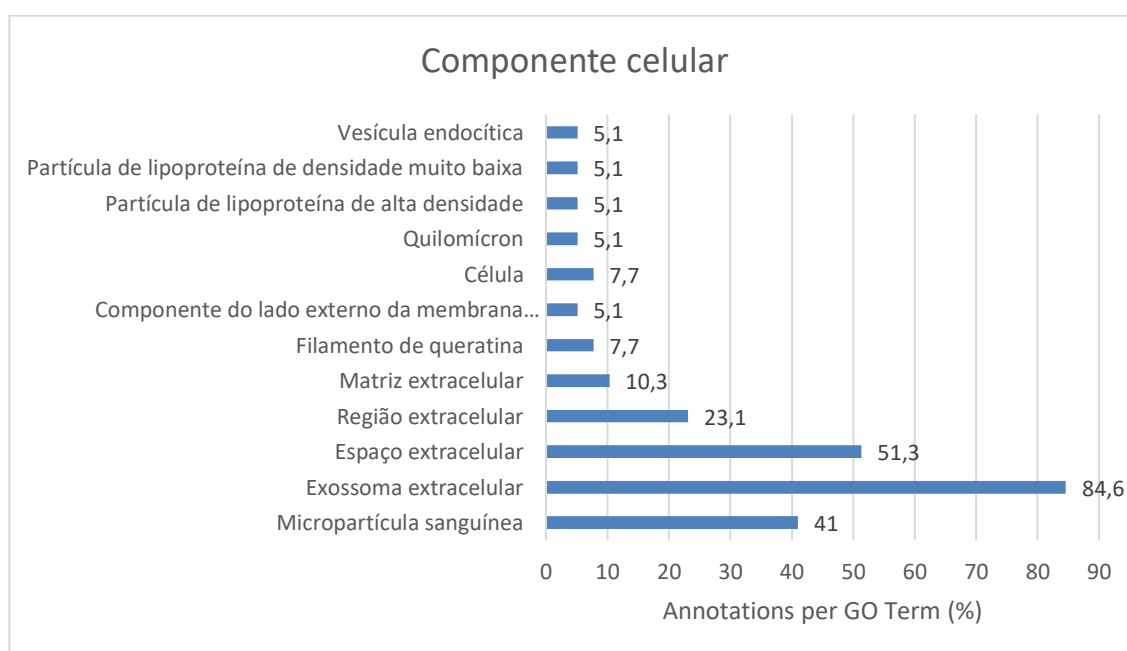


Figura 03. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com o componente celular identificado em cães com e sem DRC.

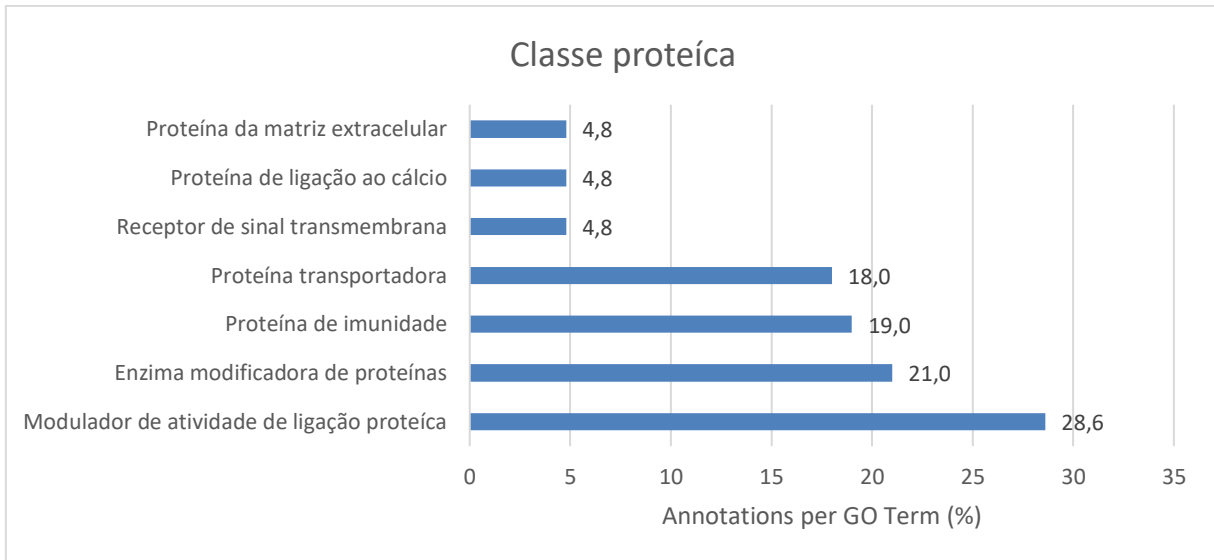


Figura 04. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com a classe proteica identificada em cães com e sem DRC.

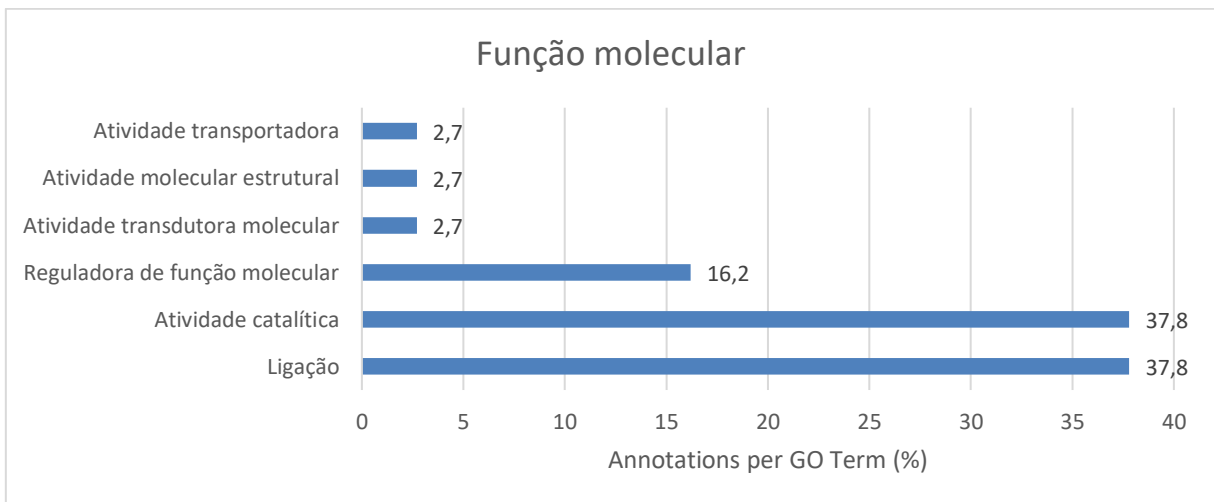


Figura 05. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com a função molecular identificada em cães com e sem DRC.

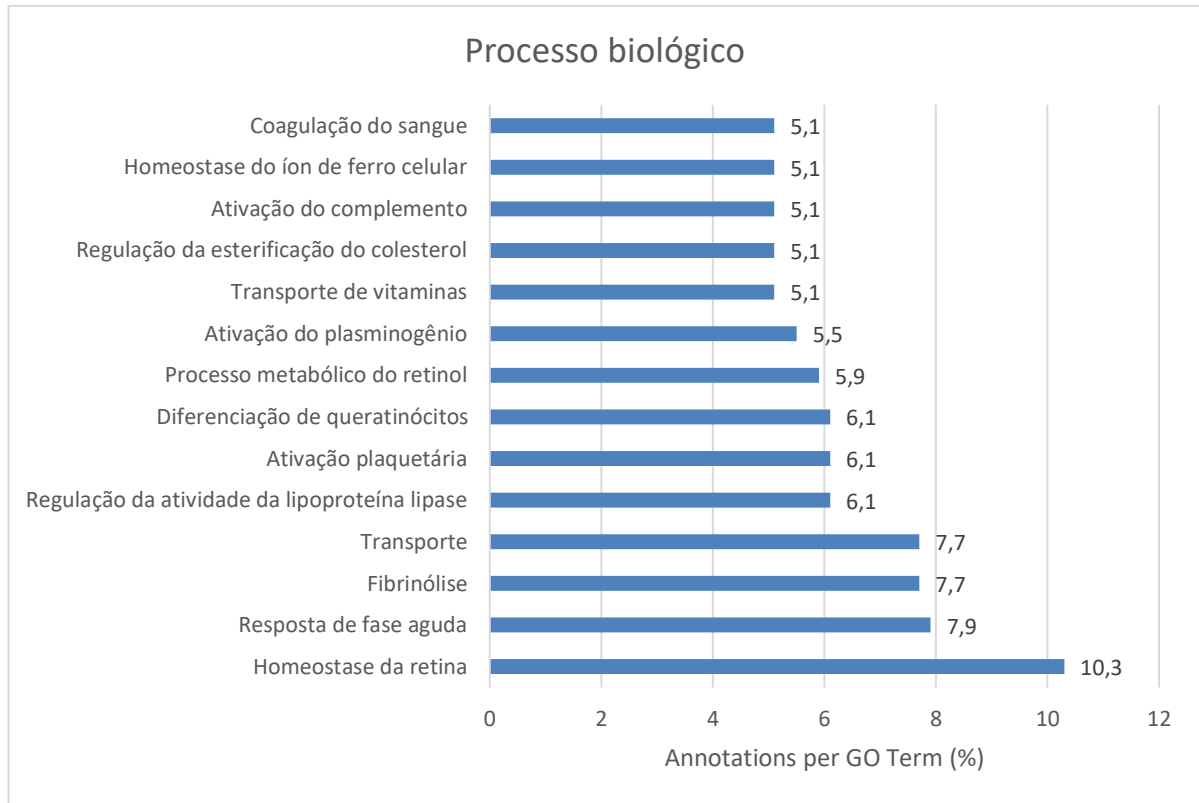


Figura 06. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>), de acordo com o processo biológico identificado em cães com e sem DRC.

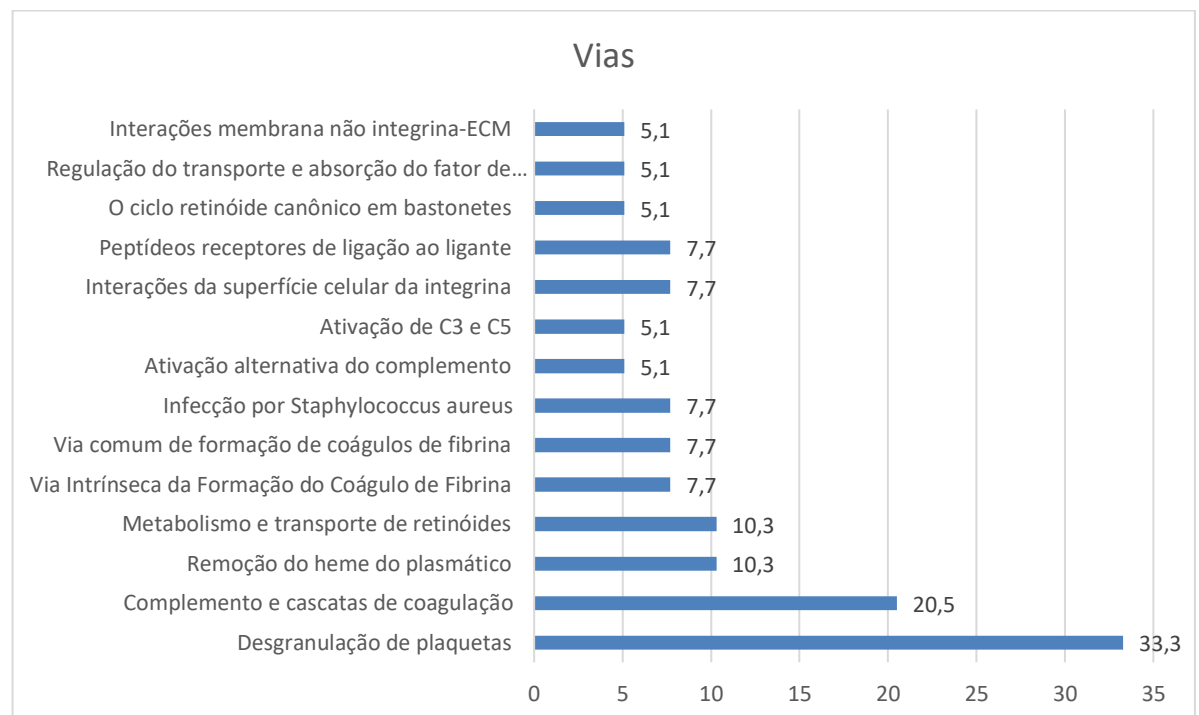


Figura 07. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncicrf.gov/home.jsp>), de acordo com as vias identificadas em cães com e sem DRC.

O estudo também analisou a classificação funcional por grupo (GC, G1, G2, G3 e G4), analisando-se a componente celular (figura 08), função molecular (figura 09), processo biológico (figura 10) e vias (figura 11).

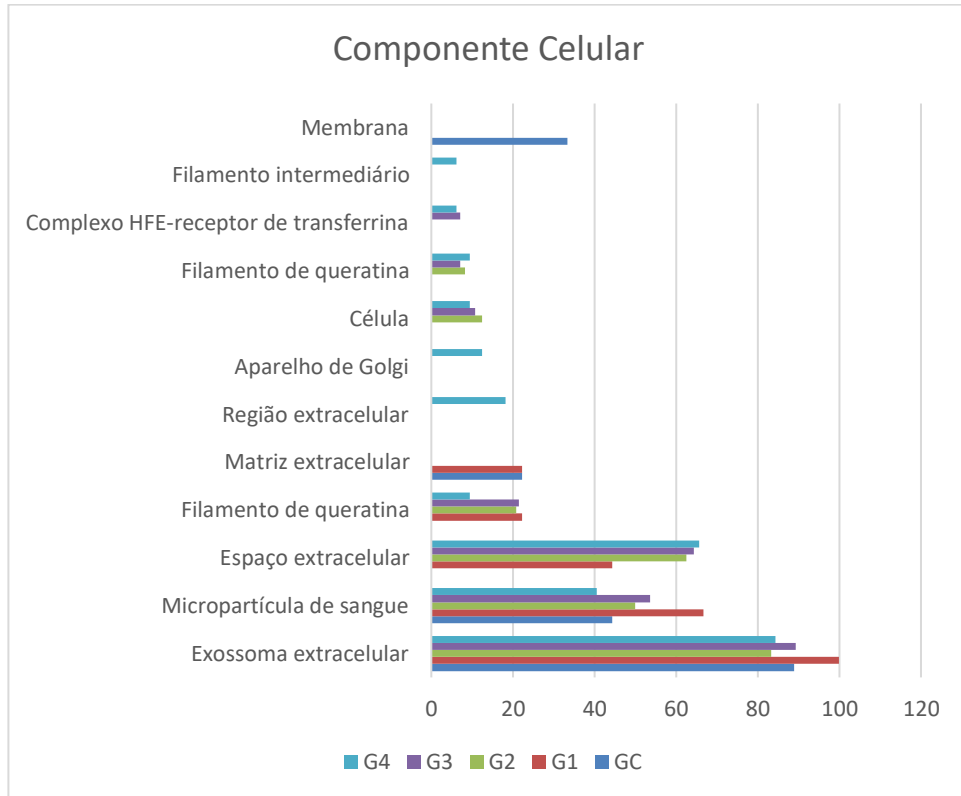


Figura 08. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com o componente celular identificado em cães saudáveis (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC.

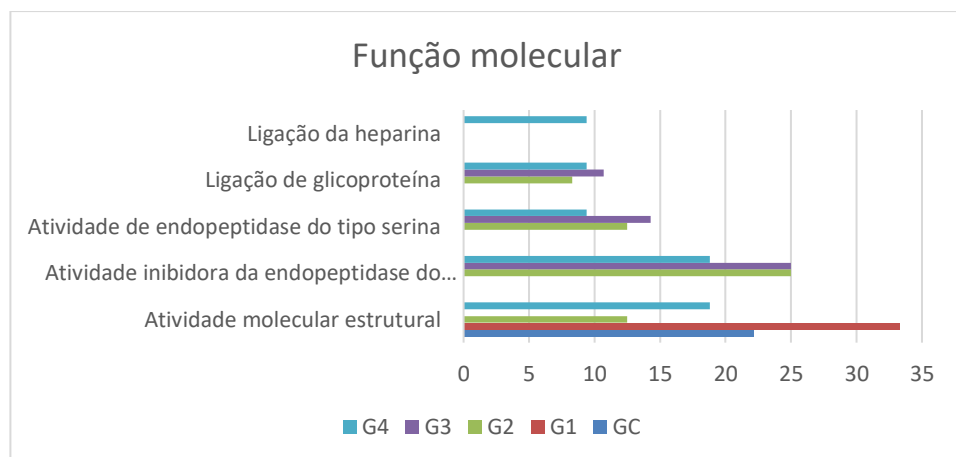


Figura 09. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com a função molecular identificada em cães saudáveis (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC.

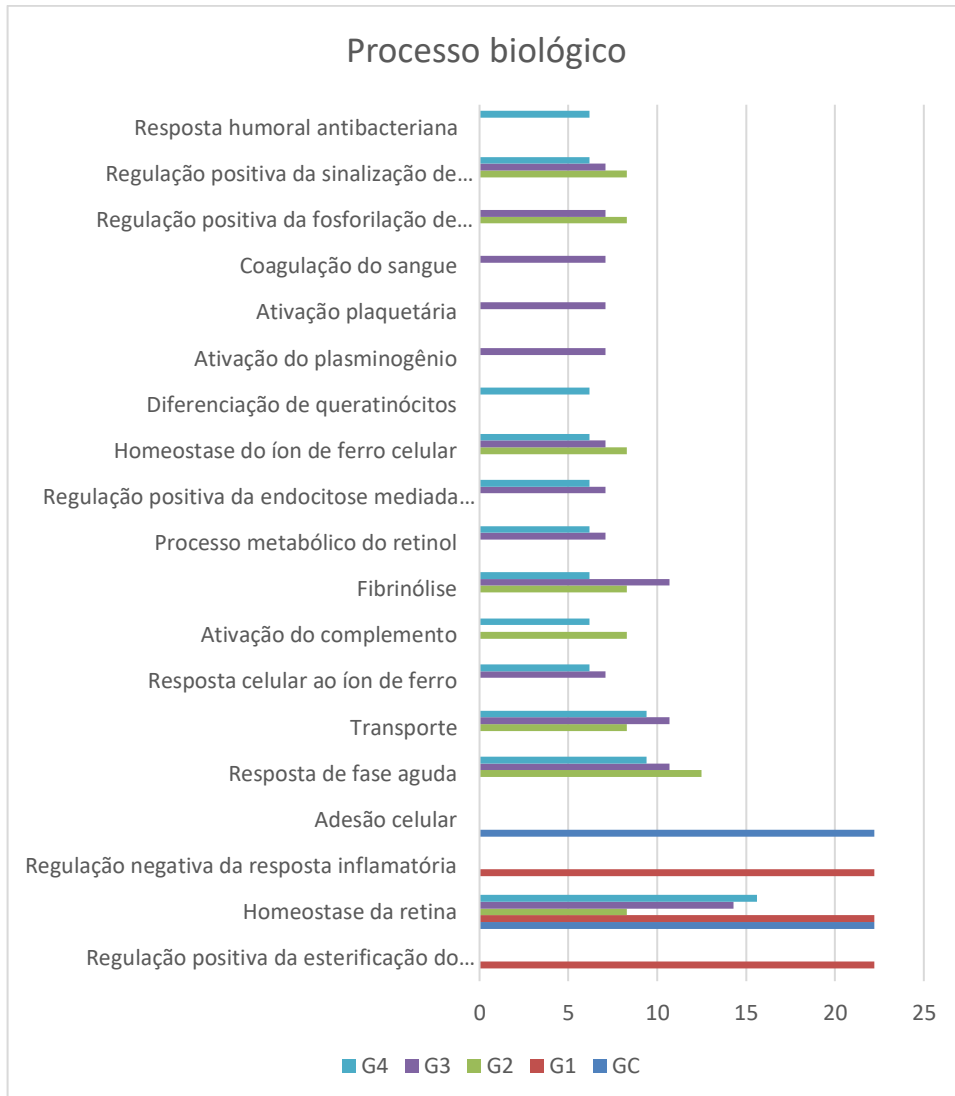


Figura 10. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com o processo biológico identificado em cães saudáveis (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC.

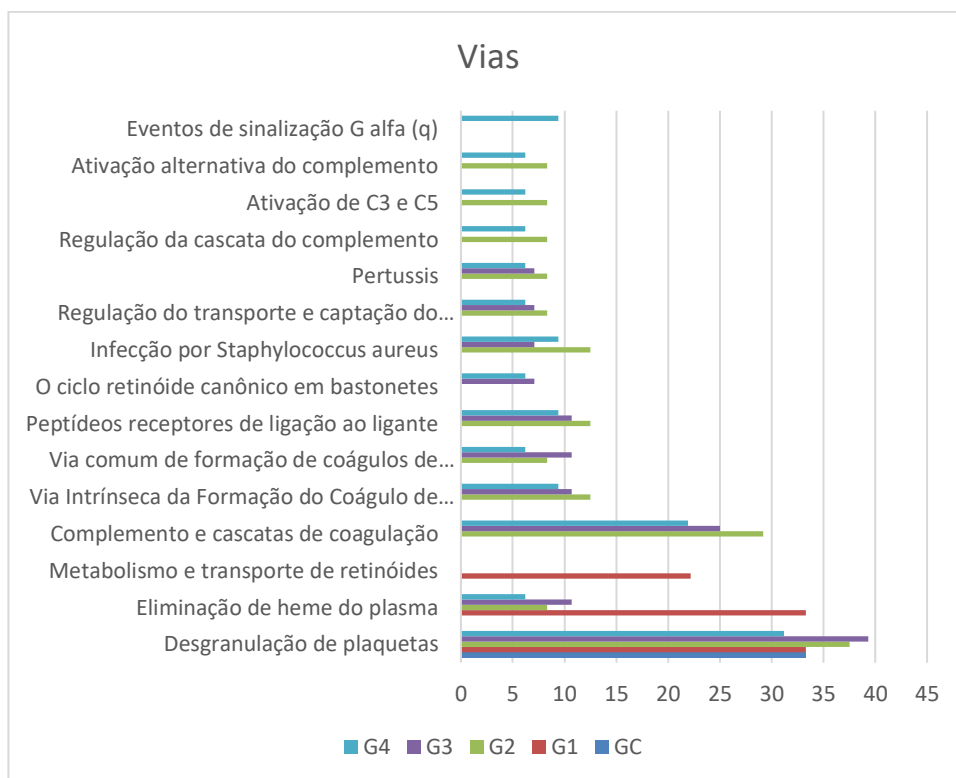


Figura 11. Classificação funcional das proteínas urinárias, por meio do DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>), de acordo com as vias identificadas em cães saudáveis (GC) e nos estágios 1 (G1), 2 (G2), 3 (G3) e 4 (G4) da DRC.

Em relação a origem proteica da análise generalizada dos dados, ao considerar os resultados da categoria componente celular, as proteínas encontradas neste estudo estão de acordo com o descrito na literatura para humanos (ADACHI et al., 2006; GOOD et al., 2010; KALANTARI et al., 2013), caninos (BRANDT et al., 2014; PELANDER et al., 2019b) e felinos (FERLIZZA et al., 2015), sendo a maioria de origem extracelular. Componentes do exossoma extracelular foi a classe mais comumente encontrada em cada grupo de estudo. Em relação as proteínas do espaço extracelular, elas foram menos abundantes nos GC e G1, possivelmente relacionados a maior preservação da integridade da matriz extracelular e menor perda das proteínas na urina destes grupos.

Exossomos são vesículas extracelulares com 30 a 150 nm que se originam dos endossomos (BRAHMADHI et al., 2022). Em várias patologias, os exossomos oferecem informações relacionadas a estados celulares ou teciduais alterados, e sua análise em fluidos biológicos oferece um auxílio diagnóstico (KALLURI; LEBLEU, 2020). Dessa forma, a análise das proteínas exossomais urinárias pode auxiliar a explicar a patogênese das doenças renais, pois os exossomos urinários derivam-se de todos os tipos de células renais que entram em contato com o espaço urinário, incluindo podócitos glomerulares e células dos túbulos renais, indicando que os exossomos podem refletir os processos celulares associados à patogênese

melhor do que uma amostra urinária completa, pois possuem densidade muito baixa e podem ser isolados por meio de ultracentrifugação (MOON et al., 2011).

Em humanos, estudos prévios avaliaram a aplicabilidade das vesículas extracelulares (EV) em uma variedade de doenças renais, encontrando alteração do proteoma, que reflete patologia renal subjacente (TURCO et al., 2016; WILLIAMS et al., 2020).

Em felinos, vesículas extracelulares urinárias foram isoladas, caracterizando-se o proteoma em gatos com função renal normal e com DRC normotensa ou hipertensa, por meio de ultrafiltração seguida por cromatografia de exclusão de tamanho. Identificou-se marcadores provenientes de todos os segmentos do néfron, entretanto, não foram detectadas proteínas expressas diferencialmente em gatos saudáveis e com DRC, embora cinco proteínas tenham sido diferentemente identificadas entre DRC normotensa e hipertensiva, estando algumas em maior abundância (aminopeptidase M) e outras diminuídas (alfa-2-macroglobulina, cauxina, inibidor de inter-alfa-tripsina cadeia pesada 4 e transferrina) nos pacientes com hipertensão (LAWSON et al., 2023).

No geral, a categoria função molecular detectou maior abundância das proteínas de ligação e atividade catalítica, assim como observado em estudo prévio de pacientes saudáveis (WINIARCZYK et al., 2019).

Em pacientes com lesão renal secundária a leishmaniose, autores identificaram abundância de proteínas da família atividade catalítica, agrupadas principalmente como atividades inibidoras e reguladoras de endopeptidase e de peptidase (GONZÁLEZ et al., 2022).

Endopeptidases, como a matriz metaloproteinases (MMPs), estão envolvidas na remodelação da matriz extracelular (MEC) e são cruciais para o desenvolvimento e homeostase tecidual (CATANIA; CHEN; PARRISH, 2007). Essas proteínas têm sido relacionadas com a progressão da doença renal, pois a inibição ou modulação de proteases promove a deposição de proteínas na matriz extracelular e, portanto, a fibrose renal (GOOD et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2022).

Em relação a função molecular de ligação, cães saudáveis (BRANDT et al., 2014) e humanos saudáveis (ADACHI et al., 2006) apresentaram muitas proteínas relacionadas a atividades de ligação na urina.

GC e G1 apresentaram como principal função atividade molecular estrutural. Atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina estava presente em abundância nos G2, G3 e G4, não sendo identificadas no GC e G1, concordando com o que fora previamente descrito em relação a progressão da doença renal.

No geral, em relação a classe proteica, a maioria das proteínas identificadas são moduladoras de atividade de ligação proteína, relacionando-se com uma das principais funções moleculares, a função de ligação. Diferentemente deste estudo que avalia DRC de ocorrência natural, pacientes com nefropatia por IgA apresentaram principalmente proteínas das classes moduladores de enzimas, hidrolases ou proteínas de transferência/transportadoras (PRIKRYL et al., 2017).

Acerca dos processos biológicos, na abordagem geral, a homeostase da retina foi o principal. Nos grupos, a homeostase da retina sobressaiu nos GC e G1, havendo uma redução não progressiva nos demais grupos, relacionando-se a manutenção da função renal nos animais saudáveis e ainda na instalação da DRC, ressaltando-se a importância da realização do diagnóstico precoce da DRC, enquanto os rins apresentem suas funções preservadas. Dentre as funções dos rins está regulação da pressão arterial por meio do controle do volume sanguíneo, sendo o sistema renina-angiotensina-aldosterona responsável por parte desse controle (MOYES; SCHULTE, 2010; REECE, 2017). Em vários componentes da retina, como a microvasculatura, células Muller, células ganglionares e o epitélio pigmentar da retina, existe um sistema renina-angiotensina-aldosterona localizado, desta forma, quando há uma desregulação no funcionamento renal, ocorre acometimento da homeostase retinal (WILKINSON-BERKA; AGROTIS; DELIYANTI, 2012). Em humanos, retinopatias e degeneração macular são comuns e graves, ameaçando a visão de pacientes com DRC nos estágios mais avançados, por isso, o reconhecimento, monitoramento e intervenção precoces são importantes para manutenção da visão desses pacientes (DEVA et al., 2011).

Outros processos biológicos abundantemente representados no geral foram a resposta de fase aguda, seguido de transporte e fibrinólise. A resposta de fase aguda foi altamente representada na busca por biomarcadores de prognóstico e classificação da nefropatia por IgA (KALANTARI et al., 2013). Na urina de felinos, os principais processos biológicos encontrados são resposta imune e celular, seguida de transporte e metabolismo (FERLIZZA et al., 2015).

Em cães saudáveis, as proteínas urinárias encontradas estão relacionadas a processo metabólico, resposta a estímulos, transporte e desenvolvimento estrutural anatômico, não havendo correlação com processos relacionados a resposta imune (BRANDT et al., 2014), apesar que na medicina humana existam relatos (ADACHI et al., 2006). Nesse estudo, os processos representados em animais saudáveis (GC) foram homeostase da retina e adesão celular, não havendo representação de processos relacionados a inflamação, concordando com achados

prévios (BRANDT et al., 2014). A adesão celular foi o processo biológico estatisticamente mais significativo observado no proteoma urinário humano (ADACHI et al., 2006).

Neste estudo, a partir do estágio 1 (G1), processos relacionados a inflamação começam a ser detectados (regulação negativa da resposta inflamatória), embora em menor quantidade, indicando que possivelmente os processos inflamatórios estejam presentes, mesmo que menos intensos, no estágio inicial da DRC, independente do fator causal inicial.

A urina doente possui maior atividade imunológica que a urina de animais saudáveis, visto que os principais processos encontrados estão relacionados com funções imunológicas e classificados em processo imune efetor, processo do sistema imune, resposta imune humoral e ativação do complemento (GONZÁLEZ et al., 2022).

Em relação ao transporte, proteínas como albumina, transferrina, hemopexina e Hp, foram descritas como componentes comuns detectados nas urinas de felinos (FERLIZZA et al., 2015) e humanos saudáveis (CANDIANO et al., 2010).

As vias mais representadas na análise completa dos dados desta pesquisa foram a degranulação de plaquetas, seguida do complemento e cascata de coagulação. A segunda foi uma das principais vias observadas nos grupos G2, G3 e G4, conquanto outras vias tenham sido representadas nesses grupos.

A via do complemento e cascata de coagulação foi significativamente encontrada em estudos anteriores (KALANTARI et al., 2013; GONZÁLEZ et al., 2022) e as proteínas urinárias diferencialmente expressas em humanos foram primariamente associadas com o complemento e cascata de coagulação (ZHAO et al., 2021). A via do complemento, além das vias desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e interações membrana não integrina-MEC foram mencionadas como relevantes na disfunção renal (BILIĆ et al., 2023).

A ativação do complemento como consequência de células tubulares sobrecarregadas com proteínas, estimulam a formação de mediadores inflamatórios (como o fator de crescimento transformador beta) e vasoativos (por exemplo, proteína quimiotática de monócitos-1, endotelina), que possuem efeitos tóxicos potenciais no rim, contribuindo para fibrose renal e progressão da DRC (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2012).

No GC a única via abundantemente representada foi a degranulação de plaquetas, que foi abundantemente representada no G1 e nos demais grupos. As vias de eliminação do heme plasmático e do metabolismo e transporte de retinóides foram representadas no G1, sendo essas três vias as únicas representadas no G1.

O metabolismo e transporte de retinóides está relacionado ao metabolismo da vitamina A no organismo. Os rins possuem importante papel no metabolismo da vitamina A pelo fato de

que cães clinicamente saudáveis possuem a capacidade de excretar quantidades substanciais de retinol e ésteres de retinil na urina em condições normais. Quase toda a vitamina A circula no plasma como retinol ligado a RBP (isto é, holo-RBP) em um complexo de transtirretina, que impede a excreção de holo-RBP pelos rins. Cães possuem altas concentrações de RBP sem complexo de transtirretina (isto é, RBP holo-livre) que pode ser facilmente filtrado pelos glomérulos renais e reabsorvido por endocitose mediada por megalina em células dos túbulos proximais. Essa recaptção parece ser importante para conservar, liberar e reciclar o retinol-RBP circulante em carnívoros. Retinol e os ésteres de retinil são compostos solúveis em gordura, que estão associados à proteína Tamm-Horsfall (THP) na urina de cães. A DRC leva a anormalidades distintas no metabolismo do retinol, ésteres de retinil e proteína transportadora de retinol (RBP), demonstrado pela elevação da razão RBP: creatinina urinária em cães com DRC quando comparado com animais saudáveis (RAILA et al., 2003a). Ainda sobre a elevação da razão RBP: creatinina urinária em cães com DRC, nesse estudo, o processo biológico relacionado ao processo metabólico do retinol esteve representado nos estágios avançados da IRIS (G3 e G4).

Como principal limitação, este estudo não utilizou réplicas técnicas, o que impossibilitou a comparação estatística dos resultados obtidos em cada grupo e, portanto, não permitiu a afirmação de proteínas para serem empregadas como ferramenta diagnóstica da DRC. Outra limitação foi a reduzida população estudada, entretanto, algumas proteínas apresentaram notoriedade e podem ser recomendadas para estudos posteriores com maior *n* amostral e com a realização de análises estatísticas, para verificação da sua aplicação como biomarcador urinário para diagnóstico precoce da DRC.

3.6.CONCLUSÃO

Identificar as proteínas urinárias e principais funções presentes em cada estágio da DRC, favorece o conhecimento a respeito da composição urinária e auxilia no entendimento da instalação e progressão da DRC, que permite o apontamento de proteínas alvos para realização de maiores estudos que demonstrarão a aplicabilidade como biomarcadores precoces da DRC.

Dentre as proteínas que tiveram destaque está a Hp, identificada a partir da instalação da DRC (estágio 1 da IRIS), podendo ser estudado como marcador precoce e de progressão da DRC. A transferrina demonstrou ser uma importante proteína e tem sido evidenciada como marcador de progressão e de predisposição ao dano renal.

O papel do sistema complemento foi evidenciado na patogenia da DRC. Adquirir maior conhecimento a respeito do complemento em cada estágio da DRC pode ser fundamental para entendimento da progressão da DRC em cães, podendo subsidiar informações para direcionar terapêuticamente a via do complemento objetivando o retardo da progressão da doença.

3.7.AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Departamento de Medicina Veterinária, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas (NuBioMol) da Universidade Federal de Viçosa pela disponibilização das instalações para a condução dos experimentos e análise dos dados.

3.8.FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pelas seguintes agências brasileiras: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (Finep) e Sistema Nacional de Laboratórios de Nanotecnologia (SisNANO)/Ministério da Ciência, Tecnologia e Informação (MCTI).

3.9.DECLARAÇÕES

3.9.1. COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV nº 94/2017 e CEUA/UFV 18/2021).

3.9.2. CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não ter conflito de interesses.

3.10. REFERÊNCIAS

ADACHI, J. et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. **Genome Biology**, v. 7, n. 9, 2006.

AGGARWAL, A. et al. Urinary haptoglobin, alpha-1 anti-chymotrypsin and retinol binding protein identified by proteomics as potential biomarkers for lupus nephritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 254–262, 2017.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

BANG, L. E.; HELM, J.; SVENDSEN, T. L. Retinol-Binding in Urine. **American Journal of Hypertension**, v. 7061, n. 96, p. 1024–1028, 1996.

BENSON, M. D. Amyloidosis. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1–8, 2001.

BERGGARD, I.; BEARN, A. G. Excretion of haptoglobin in normal urine. **Nature International Journal of Science**, v. 196, p. 1048–1050, 1962.

BHENSADIA, N. M. et al. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes. **Kidney International**, v. 83, n. 6, p. 1136–1143, 2013.

BILIĆ, P. et al. Serum and urine profiling by high-throughput TMT-based proteomics for the investigation of renal dysfunction in canine babesiosis. **Journal of Proteomics**, v. 270, n. June 2022, 2023.

BONFANTI, U. et al. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 618–624, 2004.

BRAHMADHI, A. et al. Exosomal proteomics in kidney disease: From technical approaches to clinical applications. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 30, n. 2, p. 202–222, 2022.

BRANDT, L. E. et al. Characterization of the canine urinary proteome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 193–205, 2014.

CAMUS, M. et al. Proteomic evidence of specific IGKV1-8 association with cystic lung light chain deposition disease. **Blood**, v. 133, n. 26, p. 2741–2744, jun. 2019.

CANDIANO, G. et al. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: Where do we stand? **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 829–844, 2010.

CASANOVA, A. G. et al. Urinary transferrin pre-emptively identifies the risk of renal damage posed by subclinical tubular alterations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, n. November 2019, p. 109684, 2020.

CATANIA, J. M.; CHEN, G.; PARRISH, A. R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 292, n. 3, 2007.

CHACAR, F. et al. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2017.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e**

gato. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

D'ARMIENTO, J.; DALAL, S. S.; CHADA, K. Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. **Gene**, v. 195, n. 1, p. 19–27, 1997.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência De Neoplasias E Modalidades De Tratamentos Em Cães, Atendidos No Hospital Veterinário Da Universidade Federal Do Paraná. **Archives of Veterinary Science**, v. 7, n. 2, p. 15–26, 2002.

DEMBER, L. M. Amyloidosis-associated kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12, p. 3458–3471, 2006.

DEVA, R. et al. Vision-threatening retinal abnormalities in chronic kidney disease stages 3 to 5. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 8, p. 1866–1871, 2011.

DORNELAS, L. R. S. M. et al. Application of serum and urinary electrophoresis as an aid tool for evaluating dogs at different stages of chronic kidney disease. **Comparative Clinical Pathology**, 2021.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–150.

ESCALANTE GÓMEZ, C.; ZELEDÓN SÁNCHEZ, F.; ULATE MONTERO, G. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. **Acta Médica Costarricense**, v. 49, n. 2, p. 83–89, 2009.

FERLIZZA, E. et al. The effect of chronic kidney disease on the urine proteome in the domestic cat (*Felis catus*). **Veterinary journal**, v. 204, n. 1, p. 73–81, abr. 2015.

FERLIZZA, E. et al. Urinary proteome and metabolome in dogs (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease. **Journal of proteomics**, v. 222, p. 103795, jun. 2020.

FINCO, D. R. Applied physiology of the kidney. In: FINCO, D. R.; OSBORNE, C. A. (Eds.). **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: William & Wilkins, 1995. p. 29–48.

FIORAVANTI, M. C. S.; MENESES, T. D. 2011. **Diagnóstico precoce de insuficiência renal em cães**. Seminários aplicados - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO, 2011.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, 2005.

GONZÁLEZ, M. A. et al. Urinary proteome of dogs with renal disease secondary to leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 149, n. April, p. 108–118, 2022.

GOOD, D. M. et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2424–2437, 2010.

HARVEY, J. W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–150.

HOFFMAN, J. M. et al. The companion dog as a model for human aging and mortality. **Aging Cell**, v. 17, n. 3, 2018.

HORMAECHE, M. et al. Proteomic analysis of the urine of *Dirofilaria immitis* infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 241–246, 2014.

IRIS. **INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2020.

JEPSON, R. E. Current Understanding of the Pathogenesis of Progressive Chronic Kidney Disease in Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1015–1048, 2016.

JILLINGS, E. et al. Does blood contamination of urine compromise interpretation of the urine protein to creatinine ratio in dogs? **New Zealand veterinary journal**, v. 67, n. 2, p. 74–78, mar. 2019.

KADOTA, A. et al. Pathology and Proteomics-Based Diagnosis of Localized Light-Chain Amyloidosis in Dogs and Cats. **Veterinary Pathology**, v. 57, n. 5, p. 658–665, 2020.

KALANTARI, S. et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science**, v. 367, n. 6478, 2020.

KANAUCHI, M. et al. Diagnostic significance of urinary transferrin in diabetic nephropathy. **The Japanese Journal of Nephrology**, v. 37, n. 11, p. 649–654, 1995.

KLEIN, J. et al. Comparison of CE-MS/MS and LC-MS/MS sequencing demonstrates significant complementarity in natural peptide identification in human urine. **Electrophoresis**, v. 35, n. 7, p. 1060–1064, 2014.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LAWSON, J. S. et al. Urinary extracellular vesicles as a source of protein-based biomarkers in feline chronic kidney disease and hypertension. **Journal of Small Animal Practice**, v. 64, n. 1, p. 3–11, 2023.

LIAO, W. L. et al. Urinary proteomics for the early diagnosis of diabetic nephropathy in Taiwanese patients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, 2018.

LIU, J. J. et al. Association of urine haptoglobin with risk of all-cause and cause-specific mortality in individuals with type 2 diabetes: A transethnic collaborative work. **Diabetes Care**, v. 43, n. 3, p. 625–633, 2020.

MA, B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 20, p. 2337—2342, 2003.

MA, K.; ZHENG, Z. R.; MENG, Y. Pathogenesis of Chronic Kidney Disease Is Closely Bound up with Alzheimer's Disease, Especially via the Renin-Angiotensin System. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 4, 2023.

MA, R. et al. Complement Activation Contributes to the Injury and Outcome of Kidney in Human Anti-glomerular Basement Membrane Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 172–178, 2013.

MAEDA, H. et al. Urinary albumin and transferrin as early diagnostic markers of chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 8, p. 937–943, 2015.

MEUTEN, D. Laboratory Evaluation and Interpretation of the Urinary System. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2. ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2012. p. 323–377.

MOON, P.-G. et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. **Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 2459–2475, jun. 2011.

MOYES, C. .; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2. ed. Porto Alegre: [s.n.].

NABITY, M. B. et al. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011.

NAKAGAWA, H.; SUNADA, Y.; ANDO, Y. Biological activities of C3 beta c, a novel neutrophil chemoattractant derived from the beta-chain of rat complement C3. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 253–257, 1998.

NARITA, T. et al. Increased urinary excretions of immunoglobulin G, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 142–144, 2006.

PELANDER, L. **Chronic kidney disease in the dog. Pathophysiological mechanisms and diagnostic aspects**. 2018. Tese - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2018.

PELANDER, L. et al. Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. **Veterinary Journal**, v. 249, p. 73–79, 2019a.

PELANDER, L. et al. Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. **Veterinary journal**, v. 249, p. 73–79, jul. 2019b.

PETERSON, P. A.; BERGGÅRD, I. Urinary Immunoglobulin Components in Normal, Tubular, and Glomerular Proteinuria: Quantities and Characteristics of Free Light Chains, IgG, IgA, and Fc γ Fragment. **European journal of clinical investigation**, v. 1, n. 4, p. 255–264, ago. 1971.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4693–4734.

PRIKRYL, P. et al. Proteomic approach for identification of IgA nephropathy-related biomarkers in urine. **Physiological Research**, v. 66, n. 4, p. 621–632, 2017.

RAILA, J. et al. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 7, p. 874–879, 2003.

RAILA, J. et al. of Albumin and Retinol-Binding Protein in Dogs. **Animals**, v. 71, n. 11, p. 1387–1394, 2010.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 261–265, jun. 2014.

RAJ, D. S.; PECOITS-FILHO, R.; KIMMEL, P. L. Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Chronic Renal Disease**, p. 199–212, 2015.

REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

RIKITAKE, O. et al. Adult Fanconi Syndrome in Primary Amyloidosis with Lambda Light-chain Proteinuria. **Japanese Journal of Medicine**, v. 28, n. 4, p. 523–526, 1989.

ROURA, X.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. Proteinuria. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; WESTROPP, J. L. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology**. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 2017. p. 50–59.

SCHAER, D. J. et al. Haptoglobin, hemopexin and related defense pathways-basic science, clinical perspectives and drug development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–13, 2014.

SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J.; HAEBEL, S. Vitamin A excreted in the urine of canines is associated with a Tamm-Horsfall like protein. **Veterinary research**, v. 33, n. 3, p. 299–311, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SIMON, R. et al. Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 94, p. 84–91, jun. 2014.

SMETS, P. M. Y. et al. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010.

SUN, Y. et al. Proteomic analysis of differentially expressed whey proteins in Guanzhong goat milk and Holstein cow milk by iTRAQ coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 8732–8740, 2020.

SYME, H. M. et al. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 528–535, 2006.

SYME, H. M.; JEPSON, R. Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. 8. ed. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4603–4649.

TURCO, A. E. et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2016.

URREGO, T. et al. Utility of urinary transferrin and ceruloplasmin in patients with systemic lupus erythematosus for differentiating patients with lupus nephritis. **Reumatologia Clinica**, v. 16, n. 1, p. 17–23, 2020.

VADEN, S. L. et al. The prevalence of albuminuria in dogs and cats in an ICU or recovering from anesthesia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 479–487, 2010.

VERLANDER, J. W. Fisiologia renal. In: KLEIN, B. G. (Ed.). **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 1160–1245.

VIENTÓS-PLOTTS, A. I. et al. Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine samples from dogs and cats. **American journal of veterinary research**, v. 79, n. 5, p. 525–531, maio 2018.

WENDT, R. et al. Molecular mapping of urinary complement peptides in kidney diseases. **Proteomes**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2021.

WILKINSON-BERKA, J. L.; AGROTIS, A.; DELIYANTI, D. The retinal renin-angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. **Peptides**, v. 36, n. 1, p. 142–150, 2012.

WILLIAMS, T. L. et al. Making urinary extracellular vesicles a clinically tractable source of biomarkers for inherited tubulopathies using a small volume precipitation method: proof of concept. **Journal of Nephrology**, v. 33, n. 2, p. 383–386, 2020.

WINIARCZYK, D. et al. Urinary proteome of dogs with kidney injury during babesiosis. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2019.

WINIARCZYK, D. Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction in dogs with chronic kidney disease. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 9, p. 525–528, 2020.

WINIARCZYK, D. et al. Urinary Proteome Differences in Canine Diabetes with and without the Presence of Microalbuminuria. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 1–10, 2022.

XAVIER, F. **Amiloidose**. 2008. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE , Universidade Da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2008.

ZHAO, L. et al. Urinary complement proteins and risk of end-stage renal disease: quantitative urinary proteomics in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 44, n. 12, p. 2709–2723, 2021.

4. CONCLUSÃO GERAL

A urina fisiologicamente contém proteínas que são filtradas do plasma ou resultantes do processo de secreção das células tubulares renais, sendo claramente um material adequado para o diagnóstico de doenças relacionadas ao rim e trato urinário, pois refletem a sua integridade e funcionamento. Nos últimos anos, observa-se uma evolução nas abordagens metodológicas para avaliação do proteoma urinário, que tem favorecido o conhecimento a respeito da composição urinária de animais sadios e doentes. Neste contexto, constatou-se estudos realizados com metodologias e delineamento experimental heterogêneos, além de pequena amostragem e riscos de viés, o que dificulta a comparação dos resultados.

Dentre as proteínas já descritas, encontram-se em destaque a proteína transportadora de retinol (RBP), proteína de Tamm-Horsfall (THP) e Lipocalina associada à gelatinase neutrofílica (NGAL), onde há associação significativa em ≥ 3 estudos independentes realizados com esses possíveis biomarcadores.

Neste estudo, foi identificado um total de 65 proteínas, notando uma tendência crescente do número de proteínas relacionados com a progressão da DRC, compatíveis com a deterioração da função renal evidenciada por importante lesão glomerular e/ou tubular. As proteínas presentes em cada estágio auxiliam no entendimento da progressão e na direção de proteínas alvos para o diagnóstico precoce da DRC. Embora não realizadas réplicas técnicas, o que impossibilita a comparação estatística dos resultados obtidos, algumas proteínas apresentaram notoriedade, sendo recomendados experimentos quantitativos futuros.

Dentre as proteínas que tiveram destaque estão a haptoglobina (Hp) e a transferrina. A Hp foi identificada a partir da instalação da DRC (estágio 1 da IRIS), podendo ser empregada como marcador precoce da DRC, caso estudos futuros constatem diferenças significativas entre os estágios da IRIS. A transferrina demonstrou ser uma importante proteína na ordem de abundância e tem sido evidenciada como marcador de progressão e de predisposição ao dano renal, evitando que a lesão primária ocorra e que a DRC se instale posteriormente.

A via do complemento e cascata de coagulação foi evidenciada como uma das principais, assim como foi abundante a presença de C3. O papel do sistema complemento é evidenciado na patogenia da DRC. Adquirir maior conhecimento a respeito do complemento em cada estágio da DRC pode ser fundamental para entendimento da progressão da DRC em cães, assim como já foi evidenciado em humanos. Tal entendimento poderá subsidiar informações para elucidar as possibilidades diagnósticas, terapêuticas e prognósticas da DRC.

REFERÊNCIAS

ABINPET. **Associação brasileira da indústria de produtos para animais de estimação.** Disponível em: <https://abinpet.org.br/wp-content/uploads/2024/03/abinpet_folder_dados_mercado_2024_draft2_web.pdf>. Acesso em: 09 abr. 2024.

ADACHI, J. et al. The human urinary proteome contains more than 1500 proteins, including a large proportion of membrane proteins. **Genome Biology**, v. 7, n. 9, 2006.

AGGARWAL, A. et al. Urinary haptoglobin, alpha-1 anti-chymotrypsin and retinol binding protein identified by proteomics as potential biomarkers for lupus nephritis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 188, n. 2, p. 254–262, 2017.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.

ARGILÉS, À. et al. CKD273, a New Proteomics Classifier Assessing CKD and Its Prognosis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

BANG, L. E.; HELM, J.; SVENDSEN, T. L. Retinol-Binding in Urine. **American Journal of Hypertension**, v. 7061, n. 96, p. 1024–1028, 1996.

BARTGES, J. W. Chronic Kidney Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 669–692, 2012.

BENSON, M. D. Amyloidosis. n. c, p. 1–8, 2001.

BERGGARD, I.; BEARN, A. G. Excretion of haptoglobin in normal urine. **Nature International Journal of Science**, v. 196, p. 1048–1050, 1962.

BERNARD, A. M. et al. Assessment of urinary retinol-binding protein as an index of proximal tubular injury. **Clinical chemistry**, v. 33, n. 6, p. 775–779, 1987.

BERRY, A. et al. Use of assistance and therapy dogs for children with autism spectrum disorders: A critical review of the current evidence. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 19, n. 2, p. 73–80, 2013.

BHENSADIA, N. M. et al. Urine haptoglobin levels predict early renal functional decline in patients with type 2 diabetes. **Kidney International**, v. 83, n. 6, p. 1136–1143, 2013.

BILIĆ, P. et al. Serum and urine profiling by high-throughput TMT-based proteomics for the investigation of renal dysfunction in canine babesiosis. **Journal of Proteomics**, v. 270, n. June 2022, 2023.

BONFANTI, U. et al. Free light-chain proteinuria and normal renal histopathology and function in 11 dogs exposed to *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, and *Babesia canis*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 5, p. 618–624, 2004.

BORGI, M.; CIRULLI, F. Pet face: Mechanisms underlying human-animal relationships. **Frontiers in Psychology**, v. 7, n. MAR, p. 1–11, 2016.

BRAHMADHI, A. et al. Exosomal proteomics in kidney disease: From technical approaches to clinical applications. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 30, n. 2, p. 202–222, 2022.

BRANDT, L. E. et al. Characterization of the canine urinary proteome. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 193–205, 2014.

BROWN, S. A. **Diagnosing Renal Disease**. The North American Veterinary Conference. Orlando, 2007. Disponível em: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20073120124>. Acesso em: 1 ago. 2020.

CAMUS, M. et al. Proteomic evidence of specific IGKV1-8 association with cystic lung light chain deposition disease. **Blood**, v. 133, n. 26, p. 2741–2744, jun. 2019.

CANDIANO, G. et al. 2D-electrophoresis and the urine proteome map: Where do we stand? **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 829–844, 2010.

CASANOVA, A. G. et al. Urinary transferrin pre-emptively identifies the risk of renal damage posed by subclinical tubular alterations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 121, n. November 2019, p. 109684, 2020.

CATANIA, J. M.; CHEN, G.; PARRISH, A. R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 292, n. 3, 2007.

CHACAR, F. et al. Urinary Tamm-Horsfall protein, albumin, vitamin D-binding protein, and retinol-binding protein as early biomarkers of chronic kidney disease in dogs. **Physiological Reports**, v. 5, n. 11, p. 1–9, 2017.

CHARNETSKI, C. J.; RIGGERS, S.; BRENNAN, F. X. Effect of petting a dog on immune system function. **Psychological Reports**, v. 95, n. 3 II, p. 1087–1091, 2004.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. A. **Urologia e nefrologia do cão e gato**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

COWGILL, L. D. et al. Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 995–1013, 2016.

CRITSELIS, E.; HEERSPINK, H. L. Utility of the CKD273 peptide classifier in predicting chronic kidney disease progression. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 31, n. 2, p. 249–254, 2016.

D'ARMIENTO, J.; DALAL, S. S.; CHADA, K. Tissue, temporal and inducible expression pattern of haptoglobin in mice. **Gene**, v. 195, n. 1, p. 19–27, 1997.

DE BRITO GALVAO, J. F. et al. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 134–162, 2013.

DE NARDI, A. B. et al. Prevalência De Neoplasias E Modalidades De Tratamentos Em Cães, Atendidos No Hospital Veterinário Da Universidade Federal Do Paraná. **Archives of**

Veterinary Science, v. 7, n. 2, p. 15–26, 2002.

DEMBER, L. M. Amyloidosis-associated kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, n. 12, p. 3458–3471, 2006.

DEVA, R. et al. Vision-threatening retinal abnormalities in chronic kidney disease stages 3 to 5. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 6, n. 8, p. 1866–1871, 2011.

DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 68, n. SUPPL. 241, p. 89–94, 2008.

DORNELAS, L. R. S. M. et al. Application of serum and urinary electrophoresis as an aid tool for evaluating dogs at different stages of chronic kidney disease. **Comparative Clinical Pathology**, 2021.

DUNAEVICH, A. et al. Acute on chronic kidney disease in dogs: Etiology, clinical and clinicopathologic findings, prognostic markers, and survival. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 34, n. 6, p. 2507–2515, 2020.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–150.

EDELWEISS, M. I. A.; MEINE, H. M. DE M.; SCROFERNEKER, M. L. Importância do sistema do complemento em nefrologia. **Jornal brasileiro de nefrologia**, v. 19, n. 1, p. 32–41, 1997.

EMIDIO, N. et al. Proteômica : uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3 e 4, p. 101–111, 2015.

ESCALANTE GÓMEZ, C.; ZELEDÓN SÁNCHEZ, F.; ULATE MONTERO, G. Proteinuria, fisiología y fisiopatología aplicada. **Acta Médica Costarricense**, v. 49, n. 2, p. 83–89, 2009.

FERLIZZA, E. et al. The effect of chronic kidney disease on the urine proteome in the domestic cat (*Felis catus*). **Veterinary journal**, v. 204, n. 1, p. 73–81, abr. 2015.

FERLIZZA, E. et al. Urinary proteome and metabolome in dogs (*Canis lupus familiaris*): The effect of chronic kidney disease. **Journal of proteomics**, v. 222, p. 103795, jun. 2020.

FINCO, D. R. Applied physiology of the kidney. In: FINCO, D. R.; OSBORNE, C. A. (Eds.). **Canine and feline nephrology and urology**. Baltimore: William & Wilkins, 1995. p. 29–48.

FIORAVANTI, M. C. S.; MENESES, T. D. 2011. **Diagnóstico precoce de insuficiência renal em cães**. Seminários aplicados - Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiania, GO, 2011.

FORTERRE, S.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J. Protein profiling of urine from dogs with renal disease using ProteinChip analysis. **Journal of Veterinary Diagnostic**

Investigation, v. 16, n. 4, p. 271–277, 2004.

FURLANI, I. L. et al. Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis. **Quimica Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 571–607.

GHYS, L. et al. Cystatin C: A New Renal Marker and Its Potential Use in Small Animal Medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 4, p. 1152–1164, 2014.

GOMME, P. T.; MCCANN, K. B. Transferrin: Structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, 2005.

GONZÁLEZ-AROSTEGUI, L. G. et al. Proteomics in dogs: a systematic review. **Research in Veterinary Science**, v. 143, p. 107–114, 2022.

GONZÁLEZ, M. A. et al. Urinary proteome of dogs with renal disease secondary to leishmaniosis. **Research in Veterinary Science**, v. 149, n. April, p. 108–118, 2022.

GOOD, D. M. et al. Naturally occurring human urinary peptides for use in diagnosis of chronic kidney disease. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 9, n. 11, p. 2424–2437, 2010.

GRAUER, G. F. Insuficiência renal aguda e doença renal crônica. In: MOSBY (Ed.). **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: NELSON, R.W.; COUTO, C.G, 2010. p. 648–662.

GRAUER, G. F. Proteinuria: Measurement and Interpretation. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 121–127, 2011a.

GRAUER, G. F. Introduction: proteinuric renal disease. **Topics in companion animal medicine**, v. 26, n. 3, p. 119–120, 2011b.

HALL, J. et al. Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine in Dogs with Naturally Occurring Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 794–802, 2016.

HALL, S. S.; GEE, N. R.; MILLS, D. S. Children reading to dogs: A systematic review of the literature. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–22, 2016.

HARLEY, L.; LANGSTON, C. Proteinuria in dogs and cats. **Canadian Veterinary Journal**, v. 53, n. 6, p. 631–638, 2012.

HARVEY, J. W. Iron Metabolism and Its Disorders. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–150.

HEILMANN, R. M. et al. Serum $\alpha(1)$ -proteinase inhibitor concentrations in dogs with exocrine pancreatic disease, chronic hepatitis or proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary journal**, v. 236, p. 68–71, 2018.

HELLER, M. et al. Trypsin catalyzed 16O-to-18O exchange for comparative proteomics: Tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-ion trap mass spectrometers. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, n. 7, p. 704–718, 2003.

HEPBURN, S. et al. An analysis of the impact of pre-analytical factors on the urine proteome: Sample processing time, temperature, and proteolysis. **Proteomics - Clinical Applications**, v. 9, n. 5–6, p. 507–521, 2015.

HEZZELL, M. J. et al. Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary Journal**, v. 255, p. 105420, 2020a.

HEZZELL, M. J. et al. Measurements of echocardiographic indices and biomarkers of kidney injury in dogs with chronic kidney disease. **Veterinary journal**, v. 255, p. 105420, 2020b.

HOFFMAN, J. M. et al. The companion dog as a model for human aging and mortality. **Aging Cell**, v. 17, n. 3, 2018.

HOKAMP, J. A. et al. Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 591–601, 2016.

HOKAMP, J. A. et al. Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease. **Veterinary clinical pathology**, v. 47, n. 3, p. 425–434, 2018.

HOOIJMANS, C. R. et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. **BMC Medical Research Methodology**, v. 14, n. 1, p. 43, 2014.

HORMAECHE, M. et al. Proteomic analysis of the urine of *Dirofilaria immitis* infected dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 241–246, 2014.

HU, S.; LOO, J. A.; WONG, D. T. Human body fluid proteome analysis. **Proteomics**, v. 6, n. 23, p. 6326–6353, 2006.

IRIS. **INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS_Staging_of_CKD_modified_2019.pdf>. Acesso em: 1 ago. 2022.

IRIS. **International Renal Interest Society**., 2023. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/>>

ISHIHAMA, Y. Proteomic LC-MS systems using nanoscale liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1067, n. 1–2, p. 73–83, 2005.

JATURAKAN, O. et al. SDS-PAGE Electrophoresis for Urinary Protein Analysis in Dogs with Chronic Kidney Disease and Urinary Tract Infection. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v. 43, n. 1, p. 75–83, mar. 2013.

JEPSON, R. E. Current Understanding of the Pathogenesis of Progressive Chronic

Kidney Disease in Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1015–1048, 2016.

JILLINGS, E. et al. Does blood contamination of urine compromise interpretation of the urine protein to creatinine ratio in dogs? **New Zealand veterinary journal**, v. 67, n. 2, p. 74–78, mar. 2019.

KADOTA, A. et al. Pathology and Proteomics-Based Diagnosis of Localized Light-Chain Amyloidosis in Dogs and Cats. **Veterinary Pathology**, v. 57, n. 5, p. 658–665, 2020.

KALANTARI, S. et al. Urinary prognostic biomarkers and classification of IgA nephropathy by high resolution mass spectrometry coupled with liquid chromatography. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

KALLURI, R.; LEBLEU, V. S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. **Science**, v. 367, n. 6478, 2020.

KANAUCHI, M. et al. Diagnostic significance of urinary transferrin in diabetic nephropathy. **The Japanese Journal of Nephrology**, v. 37, n. 11, p. 649–654, 1995.

KANIA, K. et al. Urinary proteases degrade albumin: Implications for measurement of albuminuria in stored samples. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 151–157, 2010.

KIM, Y. M. et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in dogs with stable or progressive kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 654–661, 2019.

KLEIN, J. et al. Comparison of CE-MS/MS and LC-MS/MS sequencing demonstrates significant complementarity in natural peptide identification in human urine. **Electrophoresis**, v. 35, n. 7, p. 1060–1064, 2014.

KRAMER, C. K.; MEHMOOD, S.; SUEN, R. S. Dog ownership and survival: A systematic review and meta-analysis. **Circulation: Cardiovascular Quality and Outcomes**, v. 12, n. 10, p. 1–8, 2019.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LAWSON, J. S. et al. Urinary extracellular vesicles as a source of protein-based biomarkers in feline chronic kidney disease and hypertension. **Journal of Small Animal Practice**, v. 64, n. 1, p. 3–11, 2023.

LEVINE, G. N. et al. Pet ownership and cardiovascular risk: A scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**, v. 127, n. 23, p. 2353–2363, 2013.

LIAO, W. L. et al. Urinary proteomics for the early diagnosis of diabetic nephropathy in Taiwanese patients. **Journal of Clinical Medicine**, v. 7, n. 12, 2018.

LIU, J. J. et al. Association of urine haptoglobin with risk of all-cause and cause-specific

mortality in individuals with type 2 diabetes: A transethnic collaborative work. **Diabetes Care**, v. 43, n. 3, p. 625–633, 2020.

LUSTOZA, M. D.; KOGIKA, M. M. Tratamento da insuficiência renal crônica em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária: Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 1, p. 62–69, 2003.

MA, B. et al. PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry : RCM**, v. 17, n. 20, p. 2337—2342, 2003.

MA, K.; ZHENG, Z. R.; MENG, Y. Pathogenesis of Chronic Kidney Disease Is Closely Bound up with Alzheimer's Disease, Especially via the Renin-Angiotensin System. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 4, 2023.

MA, R. et al. Complement Activation Contributes to the Injury and Outcome of Kidney in Human Anti-glomerular Basement Membrane Disease. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 172–178, 2013.

MAEDA, H. et al. Urinary albumin and transferrin as early diagnostic markers of chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 8, p. 937–943, 2015.

MATTA, G. C. **Da doença renal ao renal crônico. Physis: Revista de Saúde Coletiva**, 2000.

MEUTEN, D. Laboratory Evaluation and Interpretation of the Urinary System. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2. ed. Iowa: John Wiley & Sons, 2012. p. 323–377.

MISCHAK, H. et al. Proteomic biomarkers in kidney disease: Issues in development and implementation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 4, p. 221–232, 2015.

MISCHAK, H. Pro: Urine proteomics as a liquid kidney biopsy: No more kidney punctures! **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 4, p. 532–537, 2015.

MIYAKAWA, H. et al. Evaluation of the progression of non-azotemic proteinuric chronic kidney disease in dogs. **Research in veterinary science**, v. 138, p. 11–18, maio 2021.

MOON, P.-G. et al. Proteomic analysis of urinary exosomes from patients of early IgA nephropathy and thin basement membrane nephropathy. **Proteomics**, v. 11, n. 12, p. 2459–2475, jun. 2011.

MOYES, C. .; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2. ed. Porto Alegre: [s.n.].

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary journal**, v. 168, n. 1, p. 28–40, jul. 2004.

NABITY, M. B. et al. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 222–236, 2011.

NABITY, M. B. et al. Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 26, n. 2, p. 282–293, 2012.

NABITY, M. B. et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 4, p. 1036–1044, 2015.

NAKAGAWA, H.; SUNADA, Y.; ANDO, Y. Biological activities of C3 beta c, a novel neutrophil chemoattractant derived from the beta-chain of rat complement C3. **Immunology**, v. 94, n. 2, p. 253–257, 1998.

NARITA, T. et al. Increased urinary excretions of immunoglobulin G, ceruloplasmin, and transferrin predict development of microalbuminuria in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 29, n. 1, p. 142–144, 2006.

O'NEILL, D. G. et al. Chronic kidney disease in dogs in UK veterinary practices: prevalence, risk factors, and survival. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 4, p. 814–821, 2013.

PATITUCCI, L. T. et al. Electrophoretic analysis (SDS-PAGE) of canine urinary proteins according to the stage of chronic kidney disease. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1185–1196, 2020.

PELANDER, L. **Chronic kidney disease in the dog. Pathophysiological mechanisms and diagnostic aspects**. 2018. Tese - Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2018.

PELANDER, L. et al. Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. **Veterinary Journal**, v. 249, p. 73–79, 2019a.

PELANDER, L. et al. Urinary peptidome analyses for the diagnosis of chronic kidney disease in dogs. **Veterinary journal**, v. 249, p. 73–79, jul. 2019b.

PETERSON, P. A.; BERGGÅRD, I. Urinary Immunoglobulin Components in Normal, Tubular, and Glomerular Proteinuria: Quantities and Characteristics of Free Light Chains, IgG, IgA, and Fcγ Fragment. **European journal of clinical investigation**, v. 1, n. 4, p. 255–264, ago. 1971.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4693–4734.

PONTILLO, C.; MISCHAK, H. Urinary peptide-based classifier CKD273: Towards clinical application in chronic kidney disease. **Clinical Kidney Journal**, v. 10, n. 2, p. 192–201, 2017.

PRIKRYL, P. et al. Proteomic approach for identification of IgA nephropathy-related biomarkers in urine. **Physiological Research**, v. 66, n. 4, p. 621–632, 2017.

RAILA, J. et al. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 7, p. 874–879, 2003a.

RAILA, J. et al. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. 7, p. 874–879, 2003b.

RAILA, J. et al. of Albumin and Retinol-Binding Protein in Dogs. **Animals**, v. 71, n. 11, p. 1387–1394, 2010a.

RAILA, J. et al. Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 11, p. 1387–1394, nov. 2010b.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. Relationship between urinary Tamm-Horsfall protein excretion and renal function in dogs with naturally occurring renal disease. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 261–265, jun. 2014.

RAJ, D. S.; PECOITS-FILHO, R.; KIMMEL, P. L. Inflammation in Chronic Kidney Disease. **Chronic Renal Disease**, p. 199–212, 2015.

REECE, W. O. **Dukes fisiologia dos animais domésticos**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

RIKITAKE, O. et al. Adult Fanconi Syndrome in Primary Amyloidosis with Lambda Light-chain Proteinuria. **Japanese Journal of Medicine**, v. 28, n. 4, p. 523–526, 1989.

ROURA, X.; ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F. Proteinuria. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; WESTROPP, J. L. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology**. Quedgeley: British Small Animal Veterinary Association, 2017. p. 50–59.

SCHAER, D. J. et al. Haptoglobin, hemopexin and related defense pathways-basic science, clinical perspectives and drug development. **Frontiers in Physiology**, v. 5, n. OCT, p. 1–13, 2014.

SCHANSTRA, J. P.; MISCHAK, H. Proteomic urinary biomarker approach in renal disease: from discovery to implementation. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 5, p. 713–725, 2015.

SCHULTZ, C. J. et al. Freezing method affects the concentration and variability of urine proteins and the interpretation of data on microalbuminuria. The Oxford Regional Prospective Study Group. **Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association**, v. 17, n. 1, p. 7–14, jan. 2000.

SCHWEIGERT, F. J.; RAILA, J.; HAEBEL, S. Vitamin A excreted in the urine of canines is associated with a Tamm-Horsfall like protein. **Veterinary Research**, v. 33, n. 3, p. 299–311, 2002.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2006.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 2856–2860, 2007.

SIMON, R. et al. Absolute quantification of podocin, a potential biomarker of glomerular injury in human urine, by liquid chromatography-multiple reaction monitoring cubed mass

spectrometry. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 94, p. 84–91, jun. 2014.

SMETS, P. M. Y. et al. Urinary markers in healthy young and aged dogs and dogs with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 65–72, 2010a.

SMETS, P. M. Y. et al. Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl- β -D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 6, p. 896–902, 2010b.

STEINBACH, S. et al. Plasma and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with acute kidney injury or chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 28, n. 2, p. 264–269, 2014.

SUN, Y. et al. Proteomic analysis of differentially expressed whey proteins in Guanzhong goat milk and Holstein cow milk by iTRAQ coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 10, p. 8732–8740, 2020.

SYME, H. M. et al. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 3, p. 528–535, 2006.

SYME, H. M.; JEPSON, R. Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. (Eds.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine: Diseases of the dog and cat**. 8. ed. United States of America: Elsevier Saunders, 2017. p. 4603–4649.

SZCZEPANKIEWICZ, B. et al. Evaluation of tryptic podocin peptide in urine sediment using LC-MS-MRM method as a potential biomarker of glomerular injury in dogs with clinical signs of renal and cardiac disorders. **Molecules**, v. 24, n. 17, p. 1–16, 2019a.

SZCZEPANKIEWICZ, B. et al. Evaluation of Tryptic Podocin Peptide in Urine Sediment Using LC-MS-MRM Method as a Potential Biomarker of Glomerular Injury in Dogs with Clinical Signs of Renal and Cardiac Disorders. **Molecules**, v. 24, n. 17, ago. 2019b.

THANABOONNIPAT, C. et al. Renal ultrasonographic shear-wave elastography and urinary procollagen type III amino-terminal propeptide in chronic kidney disease dogs. **Veterinary world**, v. 13, n. 9, p. 1955–1965, 2020.

TURCO, A. E. et al. Specific renal parenchymal-derived urinary extracellular vesicles identify age-associated structural changes in living donor kidneys. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2016.

URREGO, T. et al. Utility of urinary transferrin and ceruloplasmin in patients with systemic lupus erythematosus for differentiating patients with lupus nephritis. **Reumatologia Clinica**, v. 16, n. 1, p. 17–23, 2020.

VADEN, S. L. et al. The prevalence of albuminuria in dogs and cats in an ICU or recovering from anesthesia. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 20, p. 479–487, 2010.

VERLANDER, J. W. Fisiologia renal. In: KLEIN, B. G. (Ed.). **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. p. 1160–1245.

VIANNA, H. R. et al. Inflamação na doença renal crônica : papel de citocinas Inflammation in chronic kidney disease : the role of cytokines. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 33, n. 3, p. 351–364, 2011.

VIENTÓS-PLOTTS, A. I. et al. Effect of blood contamination on results of dipstick evaluation and urine protein-to-urine creatinine ratio for urine samples from dogs and cats. **American journal of veterinary research**, v. 79, n. 5, p. 525–531, maio 2018.

WENDT, R. et al. Molecular mapping of urinary complement peptides in kidney diseases. **Proteomes**, v. 9, n. 4, p. 1–14, 2021.

WILKINSON-BERKA, J. L.; AGROTIS, A.; DELIYANTI, D. The retinal renin-angiotensin system: Roles of angiotensin II and aldosterone. **Peptides**, v. 36, n. 1, p. 142–150, 2012.

WILLIAMS, T. L. et al. Making urinary extracellular vesicles a clinically tractable source of biomarkers for inherited tubulopathies using a small volume precipitation method: proof of concept. **Journal of Nephrology**, v. 33, n. 2, p. 383–386, 2020.

WINIARCZYK, D. et al. Urinary proteome of dogs with kidney injury during babesiosis. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2019.

WINIARCZYK, D. Utility of urinary markers in the assessment of renal dysfunction in dogs with chronic kidney disease. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 76, n. 9, p. 525–528, 2020.

WINIARCZYK, D. et al. Urinary Proteome Differences in Canine Diabetes with and without the Presence of Microalbuminuria. **Animals**, v. 12, n. 6, p. 1–10, 2022.

WOHLFARTH, R. et al. Dogs motivate obese children for physical activity: key elements of a motivational theory of animal-assisted interventions. **Frontiers in Psychology**, v. 4, n. October, p. 1–7, 2013.

XAVIER, F. **Amiloidose**. 2008. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE , Universidade Da Beira Interior, Covilhã, Portugal, 2008.

YI, H. J. et al. Investigation on urinary and serum alpha klotho in dogs with chronic kidney disease. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 246, jul. 2020.

ZANDI-NEJAD, K. et al. Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? **Kidney International**, v. 66, n. 92, p. 76–89, 2004.

ZHAO, L. et al. Urinary complement proteins and risk of end-stage renal disease: quantitative urinary proteomics in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 44, n. 12, p. 2709–2723, 2021.

ZHOU, H. et al. Collection, storage, preservation, and normalization of human urinary exosomes for biomarker discovery. **Kidney International**, v. 69, n. 8, p. 1471–1476, 2006.

ZOJA, C.; ABBATE, M.; REMUZZI, G. Progression of renal injury toward interstitial inflammation and glomerular sclerosis is dependent on abnormal protein filtration. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 30, n. 5, p. 706–712, 2015.