

BRUNA RUBERTI

**Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal  
crônica**

São Paulo

2022

BRUNA RUBERTI

**Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Departamento:**

Clínica Médica

**Área de concentração:**

Clínica Veterinária

**Orientador:**

Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4151  
FMVZ

Ruberti, Bruna  
Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica / Bruna  
Ruberti. – 2022.  
91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina  
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto.

1. Doença renal. 2. Felinos. 3. Nutrição. 4. Perfil metabólico. 5. Toxinas urêmicas. I.  
Título.



## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica", protocolada sob o CEUA nº 5433030719 (ID 007745), sob a responsabilidade de **Marcio Antonio Brunetto e equipe; Bruna Ruberti** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 29/04/2020.

We certify that the proposal "Characterization of serum metabolome in cats with chronic kidney disease", utilizing 45 Cats (males and females), protocol number CEUA 5433030719 (ID 007745), under the responsibility of **Marcio Antonio Brunetto and team; Bruna Ruberti** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/29/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2019](#) a [07/2021](#)

Área: [Clínica Médica Veterinária](#)

Origem: [HOVET/FMVZ/USP](#)

Espécie: [Gatos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [1 a 20 anos](#)

N: [45](#)

Linhagem: [Diversas raças](#)

Peso: [1 a 7 kg](#)

Local do experimento: Os animais serão provenientes do atendimento da rotina clínica do Serviço de Clínica Médica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ-USP)

São Paulo, 03 de janeiro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RUBERTI, Bruna

Título: **Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Dedico aos meus queridos pais Francisco e Fátima, a minha amada irmã Camila, a pequena Lilica Maria e a nossa eterna Luna Maria.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guiar em meus caminhos, por me dar força e trazer paz em todos os momentos.

Aos meus pais Francisco e Fátima, que são a minha base, que sempre me apoiaram e me propuseram todas as melhores oportunidades na vida, nunca medindo esforços para comigo. À minha irmã Camila que está sempre ao meu lado, torcendo e vibrando junto comigo. Para sempre minha pequena. Eu amo vocês, obrigada por tudo.

Ao Ruã, meu companheiro e maior incentivador, caminhando sempre ao meu lado e me impulsionando sempre a evoluir e conquistar todos os meus objetivos. Agradeço por todo carinho e ajuda em todos os momentos.

Aos meus orientadores Profa. Dra. Marcia Mery Kogika e Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto, grandes inspirações e exemplos a serem seguidos. Obrigada por toda confiança e por abrirem as portas da Universidade de São Paulo e do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPENpet) com tamanha generosidade. Agradeço pelos ensinamentos, orientações e momentos compartilhados.

Às Médicas Veterinárias do Serviço de Clínica Médica do HOVET/FMVZ-USP, Khadine Kanayama, Bruna Coelho e Denise Simões, aos enfermeiros Milton Gregório e Elias Gonçalves e aos residentes por toda amizade, auxílio e colaboração no atendimento aos animais.

Às funcionárias do Serviço de Laboratório Clínico do HOVET/FMVZ-USP, Clara Mori, Maria Helena Pelissari, Cláudia Stricagnolo, Creide Costa e Edna dos Santos por toda ajuda, disponibilidade e ensinamentos.

À equipe administrativa do HOVET, sempre muito solícita e pronta para atender nossas necessidades: Josy, Helena, Isaura, Tereza e Osmar.

À toda equipe do CepenPet, em especial à Lucineia Mestieri, por todo auxílio e confiança depositada.

A todo pessoal do Centro de Desenvolvimento Nutricional da PremieRpet® (CDN), por me acolherem com tanto carinho. Agradeço em especial a Dra. Cristiana Pontieri pela oportunidade e financiamento do projeto. Obrigada aos colaboradores e colegas Clarissa, Zé e Michelle.

A minha grande amiga que me acolheu em sua casa durante todo o projeto com tamanha bondade e afeição, Daniela Pedrosa Machado, muito obrigada por toda ajuda e parceria.

Aos amigos de pós-graduação que me acolheram com todo carinho e generosidade e que compartilharam de toda ajuda e ensinamentos, Fernanda Chicharo Chacar, Natalia Garla Nascimento e Ricardo Duarte Lopes, obrigada pelo companheirismo e amizade.

Obrigada meus amigos da pós-graduação, Andressa Amaral, Caio Nogueira Duarte, Diego Garcia, Fabio Alves Teixeira, Larissa Risolia, Leandro Harotune, Lucas Henriquez, Mariana Perini, Mariana Rentas, Michele Carregallo, Nubia Rodrigues, Rafael Zafalon, Roberta Rodrigues, Rodrigo Olivindo, Telma Strauss, Thiago Vendramini, Vinicius Vasques, Vivian Pedrinelli por deixarem meus dias muito mais leves e felizes. Agradeço em especial ao Lucas Henriquez, Mariana Perini e Mariana Rentas pela grande ajuda nas coletas realizadas e processamento de amostras durante todo o projeto. Minha eterna gratidão.

Aos gatos participantes do projeto, Ada, Alfredo, Alvin, Bono, Belfort, Black, Britney, Charlie, Emmy, Gauss, George, Filó, Jujuba, Lady, Léo, Maitê, Maryam, Mickey, Minnie, Otelo, Pascal, Romeo, Serena, Tuckey, Vênus, William e Zezinho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecimento pela bolsa auxílio.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram, muito obrigada.



*“Nunca, jamais desanimeis, embora venham ventos contrários.”*

Santa Paulina

## RESUMO

RUBERTI, B. **Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica**. [Characterization of serum metabolome in cats with chronic kidney disease]. 2022. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma enfermidade comum entre os felinos e um dos maiores desafios é a identificação precoce de possíveis distúrbios estruturais e/ou funcionais que ocorrem nos estádios iniciais da doença, quando o animal ainda não apresenta sinais clínicos. A etiologia da DRC é heterogênea e geralmente a causa de base não é identificada devido ao curso adaptativo da doença, sendo que as manifestações clínicas são apenas observadas nos estádios mais avançados, o que evidencia que pelo menos 66% dos néfrons sofreram lesão ou já foram perdidos. Novas estratégias para o diagnóstico precoce da DRC estão surgindo na medicina veterinária visando a implementação de intervenções terapêuticas a fim de retardar a progressão da doença. A metabolômica é o estudo que envolve a identificação e quantificação de pequenas moléculas presentes em amostras biológicas e tem como objetivo demonstrar alterações no metabolismo do indivíduo sob diferentes condições, assim como elucidar o mecanismo fisiopatológico de doenças crônicas, como a DRC. O presente estudo teve como objetivos caracterizar a metabolômica sérica de gatos diagnosticados com DRC estádios 1 e 2, visando a melhor compreensão dos padrões metabólicos presentes em cada fase da doença, bem como comparar a metabolômica do soro dos animais antes e após a introdução do manejo alimentar com um alimento coadjuvante renal. A hipótese firma-se de acordo com estudos prévios com outras espécies que demonstraram variação no perfil de metabólitos em indivíduos submetidos à diferentes estímulos fisiopatológicos, modificações ambientais, dietéticas e/ou modificações genéticas. Foram incluídos 25 gatos domésticos (fêmeas e machos), 15 diagnosticados com DRC nos estádios 1 (Grupo DRC1, n= 6) e 2 (Grupo DRC2, n= 9), de acordo com a IRIS (Sociedade Internacional de Interesse Renal), e o grupo controle foi composto por 10 gatos saudáveis. Todos os animais, de todos os grupos, foram submetidos a um período de 30 dias em dieta de manutenção (alimento basal). Após esta etapa inicial, foram iniciadas as coletas das amostras. Os períodos de coleta foram divididos em tempos, sendo T0 antes dos animais receberem a dieta coadjuvante renal e 30 dias após receberem o alimento basal (padronização

dietética), seguidos dos tempos subsequentes T30 (30 dias após T0) e T60 (60 dias após T0). A caracterização da metabolômica foi realizada em T0 e T60 por espectrometria de massa/cromatografia gasosa (MS-GC). A análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e a análise de componentes principais (PCA) foram realizadas para avaliar as diferenças nos perfis metabolômicos entre os grupos e antes (DRC T0) e após a instituição do manejo dietético com o alimento coadjuvante renal (DRC T60) por meio do software Metaboanalyst 4.0. Gatos saudáveis e gatos com DRC estádios 1 e 2 apresentaram diferenças no perfil de metabólitos séricos quando avaliados já no tempo zero e após a padronização da dieta. O ácido cítrico e a monostearina foram os metabólitos que se diferenciaram entre os grupos de animais doentes renais quando comparados ao grupo controle. Após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal, outros metabólitos apresentaram diferença, dentre eles a glicina, frutose, ácido glutâmico, ácido araquidônico, ácido esteárico, creatinina e ureia. No geral, o emprego da metabolômica como ferramenta diagnóstica, tem o potencial de identificar complicações correlacionadas com a DRC ainda quando em condições subclínicas, o que pode auxiliar em elucidações de processos fisiopatológicos relacionados ao desenvolvimento e progressão da doença.

Palavras-chave: doença renal, felinos, nutrição, perfil metabólico, toxinas urêmicas

## ABSTRACT

RUBERTI, B. **Characterization of serum metabolome in cats with chronic kidney disease**. [Caracterização do metaboloma sérico de gatos com doença renal crônica]. 2022. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Chronic kidney disease (CKD) it is a common disease in cats and one of the major challenges is the early identification of structural and/or functional disorders that occur in the early stages of the disease when the animal presents no clinical signs. The etiology of CKD is heterogeneous and usually the first causes are not identified due to the adaptive course of disease evolution, and clinical manifestations are only observed in the most advanced stages, which shows that at least 66% of nephrons have been injured or have already been lost. New strategies for early diagnosis of CKD are emerging in veterinary sciences to implement therapeutic interventions to decrease disease progression. Metabolomics is the study that involves the identification and quantification of small molecules present in biological samples and aims to show changes in individual metabolism under different conditions, as well as to elucidate the pathophysiological mechanism of chronic diseases, such as CKD. The present study has the goal to define the serum metabolomic of cats with different stages of CKD, to better understand the metabolic patterns present in each phase of the disease, and to compare the serum metabolomics of the animals before and after renal diet. The hypothesis is based on previous studies with other species that demonstrated variation of the metabolomic profile of individuals submitted to different pathophysiological stimuli, environmental, dietary and/or genetic modifications. The study was conducted using 25 domestic cats (females and males), 15 diagnosed with CKD stage 1 (CKD1, n= 6) and 2 (CKD2, n= 9), according to IRIS (International Renal Interest Society), and the control group was composed of 10 healthy cats. All animals, from all groups, were submitted to a period of 30 days on a maintenance diet. After this period, the samples started to be collected. Sample collections were conducted in periods, labeled as times, with T0 being collection before animals received the renal diet, and 30 days after a maintenance diet, followed by subsequent times T30 (30 days after T0) and T60 (60 days after T0). The metabolomics analysis was performed on T0 and T60 by mass spectrometry/gas chromatography (MS-GC). Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and Principal component analysis (PCA) were performed to assess

differences in metabolomic profiles between groups and before (CKD T0) and after renal diet (CKD T60). Data analysis was performed on Metaboanalyst 4.0 software. Healthy cats and CKD cats stages 1 and 2 showed differences in serum metabolic profile at T0 and after diet standardization. Citric acid and monostearin differed between CKD and control groups. After 60 days of renal diet consumption, other 7 serum metabolites differed, including glycine, fructose, glutamic acid, arachidonic acid, stearic acid, creatinine, and urea. Overall, metabolomics markers have the potential to identify complications correlated with CKD already in subclinical conditions, and these can provide insights into the possible pathophysiologic processes that contribute to the development and progression of CKD.

Keywords: felines, metabolic profile, nutrition, renal disease, uremic toxins

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da doença renal crônica (DRC) em estádios e substádios (IRIS, 2019).....	26
Figura 2 - Correlação entre as principais práticas ômicas utilizadas em estudos de biologia de sistemas.....	31
Figura 3 - Consorte para recrutamento e alocação dos gatos clinicamente normais e doentes renais crônicos, nos grupos de estudo.....	42
Figura 4 - Linha do tempo do protocolo experimental.....	43
Figura 5 - Perfil metabólico detectado no soro segundo sua classificação bioquímica.....	55
Figura 6 - Análise Multivariada de Grupos (PCA).....	56
Figura 7 - <i>Partial Least Squares</i> (PLS) do soro dos animais no tempo zero (T0).....	57
Figura 8 - Concentração do metabólito ácido cítrico nos diferentes grupos experimentais após a padronização da dieta.....	58
Figura 9 - Concentração do metabólito monostearina nos diferentes grupos experimentais após a padronização da dieta.....	59
Figura 10 - <i>Partial Least Squares</i> (PLS) do soro dos animais no tempo sessenta (T60) dias após a introdução do alimento coadjuvante renal.....	60
Figura 11 - Concentração do metabólito glicina nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal.....	62
Figura 12 - Concentração do metabólito frutose nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal.....	63
Figura 13 - Variação da concentração do metabólito ácido glutâmico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal....	64
Figura 14 - Variação da concentração do metabólito ácido araquidônico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal....	65
Figura 15 - Variação da concentração do metabólito ácido esteárico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal....	66
Figura 16 - Concentração do metabólito creatinina nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal.....	67
Figura 17 - Variação da concentração do metabólito ureia nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal.....	68

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química e ingredientes do alimento Basal (Ba) e do alimento coadjuvante Renal (Re) empregados no estudo.....	44
Tabela 2 - Características individuais dos animais (n=25) incluídos no estudo de acordo com os grupos experimentais.....	51
Tabela 3 - Comparação das variáveis do hemograma dos gatos incluídos no estudo de acordo com os grupos, doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e tempos (média ± erro padrão).....	52
Tabela 4 - Comparação das variáveis da bioquímica sérica dos gatos incluídos no estudo de acordo com os grupos, doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e tempos (média ± erro padrão).....	53
Tabela 5 - Comparação das demais variáveis analisadas de acordo com os grupos doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e tempos (média ± erro padrão).....	54
Tabela 6 - Resultados obtidos por meio da análise univariada dos metabólitos no tempo zero (T0).....	58
Tabela 7 - Resultados obtidos por análise univariada dos metabólitos no tempo sessenta (T60).....	61

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos publicados na literatura que avaliaram doença renal crônica em felinos e/ou avaliação da função renal em felinos hígidos, metabolômica e uso da dieta.....	37
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
BHB	Beta-hidroxibutirato
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CaT	Cálcio total
CE	<i>Capillary electrophoresis</i>
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cl	Cloro
DHA	Ácido docosahexaenóico
DRC	Doença renal crônica
DMOMs	Distúrbios do metabolismo ósseo-mineral
ECC	Escore de condição corporal
EMM	Escore de massa muscular
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FA	Fosfatase alcalina
FELV	Leucemia viral felina
FGF-23	Fator de crescimento de fibroblasto-23
FIV	Imunodeficiência viral felina
GGT	Gama glutamil transferase
GC	<i>Gas chromatography</i>
HPTSR	Hiperparatireoidismo secundário renal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
IRIS	<i>International renal interest society</i>
K	Potássio
LC	<i>Liquid chromatography</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
Na	Sódio
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
P	Fósforo
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PLS	<i>Partial least squares</i>
PAS	Pressão arterial sistêmica

PD	Polidipsia
PT	Proteína total
PTH	Paratormônio
PU	Poliúria
QC	<i>Quality control</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPCu	Razão proteína:creatinina urinária
SDMA	Dimetilarginina simétrica
SRD	Sem raça definida
TFG	Taxa de filtração glomerular
TCA	Ácido tricarboxílico
TCM	Triglicérides de cadeia média
VCM	Volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>23</b>
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA	23
2.2	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	25
2.3	TERAPIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	28
2.4	METABOLÔMICA	31
2.5	METABOLÔMICA APLICADA A DOENÇA RENAL CRÔNICA	34
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>39</b>
5.1	SELEÇÃO DOS ANIMAIS	39
5.2	ACOMPANHAMENTO	42
5.3	DIETA E MANEJO ALIMENTAR	43
5.4	COLHEITA DE SANGUE	45
5.5	COLHEITA DE URINA	46
5.6	OUTROS EXAMES	46
5.6.1	ULTRASSONOGRRAFIA ABDOMINAL	46
5.6.2	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA	46
5.6.3	ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR	47
5.7	METABOLÔMICA	47
5.7.1	ANÁLISE EM MODO SCAN POR GCMS	47
5.7.2	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS	48
5.8	ANÁLISE DOS DADOS	49
5.8.1	DADOS GERAIS	49
5.8.2	DADOS DA METABOLÔMICA	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
6.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA	50
6.2	ESTATÍSTICA INFERENCIAL	52
6.2.1	VARIÁVEIS DO HEMOGRAMA	52
6.2.2	VARIÁVEIS DA BIOQUÍMICA SÉRICA	53
6.2.3	OUTRAS VARIÁVEIS	54
6.3	CARACTERIZAÇÃO DA METABOLÔMICA DOS GRUPOS CONTROLE E DOENTES RENAI	54
6.4	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ATRAVÉS DA ANÁLISE MULTIVARIADA DOS GRUPOS (PCA) REPRESENTANDO O CONTROLE DE QUALIDADE PARA VALIDADE ANALÍTICA DA ANÁLISE METABOLÔMICA	56

6.5	DISPOSIÇÃO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE E DOENTES RENAIIS NO T0 A PARTIR DA ANÁLISE DOS MÍNIMOS QUADRADOS PRINCIPAIS (PLS) NO T0 .....	57
6.6	COMPARAÇÃO DA METABOLÔMICA SÉRICA ANTES E DEPOIS DO ALIMENTO COADJUVANTE RENAL .....	59
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das doenças metabólicas mais comuns na espécie felina, a doença renal crônica (DRC) é uma enfermidade prevalente em gatos (ELLIOTT; BARBER, 1998; BROWN et al., 2016), definida pelo comprometimento estrutural e/ou funcional de um ou ambos os rins, ou de apenas uma região renal específica, com perda gradual de néfrons funcionais, sendo caracterizada pela presença de lesões irreversíveis e de natureza progressiva (POLZIN, 2011a; BARTGES, 2012).

Por tratar-se de uma enfermidade que cursa com alta morbidade e mortalidade nos felinos, o anseio pelo diagnóstico preciso e cada vez mais precoce da DRC tem implicado em novas estratégias investigatórias e cada vez mais pesquisas estão sendo desenvolvidas no âmbito clínico-laboratorial. A metabolômica é uma dessas linhas de estudos que possuem o intuito de aprimorar a modalidade diagnóstica na nefrologia veterinária (POLZIN, 2011a; RIVERA-VÉLEZ; VILLARINO, 2018).

Com o propósito de identificar e quantificar pequenas moléculas presentes em amostras biológicas, o estudo da metabolômica objetiva a sinalização de alterações no metabolismo animal sob diferentes condições e se mostra muito favorável no entendimento da fisiopatologia e acompanhamento de doenças crônicas, tais como a DRC (WEISS; KIM, 2012; RIVERA-VÉLEZ; VILLARINO, 2018). Essas pequenas moléculas de baixo peso molecular (até 1500 Da) são conhecidas como metabólitos e podem ser identificadas em amostras de soro e plasma sanguíneo, urina, líquor, saliva, tecido, fezes, entre outros. São produtos intermediários ou finais do metabolismo de aminoácidos, peptídeos, carboidratos, lipídeos, vitaminas, minerais e outras substâncias que podem ser utilizadas, ingeridas ou sintetizadas por uma determinada célula ou organismo (WISHART, 2008; KALIM; RHEE, 2017; CANUTO et al., 2018).

Frente a estas definições, sabe-se que a aplicação da metabolômica associada à DRC é promissora e particularmente atraente, sobretudo por estas moléculas estarem associadas não somente com a redução da excreção renal, mas sim com modificações metabólicas, as quais elucidariam alguns dos mecanismos fisiopatológicos da doença renal e medidas terapêuticas mais precoces poderiam ser aplicadas na tentativa de impedir a progressão da doença (RIVERA-VÉLEZ;

VILLARINO, 2018; LUO et al., 2019; RHEE et al., 2019). Desta forma, o presente estudo objetivou caracterizar a metabolômica no soro de gatos saudáveis (grupo controle) e gatos diagnosticados com DRC nos estádios 1 (DRC 1) e 2 (DRC 2), visando a melhor compreensão dos padrões metabólicos presentes em cada uma dessas fases da doença, bem como comparar a metabolômica do soro dos animais antes e após a introdução do manejo alimentar com um alimento coadjuvante renal.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

Com o aumento da qualidade de vida e consequente longevidade dos animais de companhia nas últimas décadas, cães e gatos tem sido cada vez mais diagnosticados com doenças relacionadas a senilidade, a exemplo da doença renal crônica (DRC). Considerada uma doença de distribuição mundial, é a enfermidade metabólica mais comum na espécie felina (LUND et al., 1999; BROWN et al., 2016). Pode acometer animais de qualquer faixa etária, porém, com maior predileção para gatos idosos. Estima-se que a prevalência para a faixa etária de animais com mais de 15 anos, possa chegar a 80%, entretanto, a ocorrência de DRC em conjunto com a nefrolitíase, tem sido cada vez mais identificada em animais jovens e de meia-idade (MARINO et al., 2014; BROWN et al., 2016). Siameses, Persas, Abissínios, Maine Coon e Birmaneses são algumas das raças que podem advir de maior risco para o desenvolvimento dessa enfermidade (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013).

A doença renal, para ser caracterizada como crônica, deve persistir por um período mínimo de três meses, com comprometimento renal estrutural e/ou funcional uni ou bilateral, e presença de lesões irreversíveis e de progressão espontânea (POLZIN, 2011a; BARTGES, 2012). Com a instauração da lesão e consequente perda progressiva dos néfrons, a perpetuação da doença se dá de forma lenta, porém constante, fazendo com que essas unidades funcionais desenvolvam mecanismos compensatórios e adaptativos, ou seja, com a capacidade dos néfrons em realizar hiperfiltração, existe dificuldade em se detectar a causa primária da DRC, e esta pode estar associada a fatores genéticos, individuais e ambientais (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013; JEPSON, 2016).

Entretanto, independente do fator que desencadeou a doença, é por meio de processos de adaptação e reparo celular em caso de lesões que acometeram os néfrons previamente, que a maioria dos felinos desencadeia lesões renais inespecíficas frente a diagnósticos morfológicos, resultando em sinais sobretudo correlacionados a fibrose renal e nefrite tubulointersticial, assim como já descrito em outras espécies de animais, inclusive em humanos (LIU, 2011; CHAKRABARTI et al., 2013; LAWSON et al., 2015). Conforme mencionado, com o desenvolvimento do processo de restauração ao dano celular, há produção de mediadores pró-

inflamatórios e pró-fibróticos e deflagração da resposta fibrogênica exacerbada. Especula-se então, que esse mecanismo de reparo no paciente com DRC, não é descontinuado (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013; JEPSON, 2016). Além do mais, alguns outros fatores correlacionados a senescência e a DRC em felinos já foram identificados, como por exemplo, o encurtamento dos telômeros (QUIMBY et al., 2013). Ainda, especula-se a possível associação com deficiência do co-receptor do fator de crescimento de Fibroblasto-23 (FGF-23), conhecido como Kotho. Entretanto, mais pesquisas são necessárias a fim de demonstrar se gatos com DRC têm ou não essa deficiência, como também a associação com a doença (HU et al., 2011; LINDBERG et al., 2014). Já as doenças glomerulares primárias são raras em felinos e, comumente são ligadas a doenças sistêmicas, portanto glomerulopatias secundárias, como nas neoplasias, infecções e nos processos inflamatórios ou não inflamatórios (VADEN, 2011; REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013).

Mesmo que possam parecer vantajosas pelo menos em curto prazo por colaborarem a sustentação da função renal como um todo, as respostas adaptativas renais frente a perda de néfrons, são nocivas em longo prazo por levarem a perda adicional dessas estruturas e, por consequência, a um declínio gradual da função renal. Frente a hipertrofia dos néfrons remanescentes, não se torna incomum verificar que os valores de marcadores bioquímicos renais indiretos possam se mostrar normais por um determinado período. Somente após redução substancial e massiva na função renal (mais de dois terços do número de néfrons em felinos) é possível detectar azotemia renal (azotemia – acúmulo de azotos, representados pelo aumento de creatinina e ureia séricas), a qual refletirá então a diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (BROWN et al., 2016; POLZIN, 2017).

Assim, com a diminuição da excreção de compostos nitrogenados não proteicos, há então o acúmulo das chamadas toxinas urêmicas no organismo do animal. Tendo em vista que a maioria dos felinos denotam de manifestações clínicas somente em estádios mais avançados da doença devido a grande capacidade de concentração urinária dos néfrons nessa espécie, quando a perda hídrica causada pela poliúria (PU) não for compensada, esses animais tendem a apresentar quadros de desidratação, levando ao agravamento das condições clínicas em decorrência da associação com a azotemia pré-renal (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013; POLZIN, 2017). Períodos de descompensação aguda associados às alterações de origem pré ou pós-renais são complicações



comumente presentes na vida de um animal com DRC, o que pode acarretar em piora prognóstica e diminuição no tempo de sobrevivência do paciente (BARTGES, 2012; POLZIN, 2017).

## 2.2 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA





O diagnóstico da DRC é embasado em um conjunto de informações obtidas a partir do histórico do animal, realizado mediante exame físico e execução de exames complementares seriados (laboratoriais e de imagem). As primeiras informações adquiridas por intermédio de uma conversa com o tutor podem auxiliar na precisão e agilidade diagnóstica. Apesar dos felinos apresentarem manifestações clínicas somente nos estádios mais avançados da DRC devido aos mecanismos adaptativos que foram desenvolvidos com o intuito de manter o equilíbrio no organismo, é importante salientar quais as manifestações que o gato possa vir a apresentar no decorrer de cada estágio e com o avançar da enfermidade (BROWN et al., 2016; COWGILL et al., 2016).

Frente ao diagnóstico laboratorial, a mensuração de creatinina e ureia séricas, além da dimetilarginina simétrica (SDMA), são rotineiramente utilizados para estimar de maneira indireta a taxa de filtração glomerular (TFG). Entretanto, devem ser considerados sempre o estado de hidratação, dieta empregada, peso corporal, além do escore de condição corporal (ECC) e de massa muscular (EMM), pois os referidos fatores podem influenciar em alguns dos resultados de maneira significativa (HALL et al., 2014). Em 1998, a *International Renal Interest Society* (IRIS) criou diretrizes para unificar um sistema de estadiamento e substadiamento da DRC em cães e gatos, com o propósito de auxiliar na classificação da doença conforme a progressão e gravidade, direcionar o tratamento e auxiliar no prognóstico da doença. A IRIS (com as últimas modificações e atualizações realizadas em 2019) classifica a doença de acordo com os estádios baseados na função renal (mensurada através da creatinina e SDMA), proteinúria e pressão arterial sistêmica (PAS). Vale ressaltar que o paciente deve estar hidratado e em ambiente calmo, para que os resultados sejam precisos para a correta categorização (IRIS, 2019).

Quando o felino se encontra no estágio 1 da DRC, sinais clínicos normalmente não são observados. São pacientes que não apresentam azotemia, uma vez que a concentração de creatinina sérica estará dentro do intervalo de normalidade e a de

SDMA sérica normal ou discretamente aumentada (Figura 1). Porém, este paciente apresentará alguma anormalidade de cunho renal, como a incapacidade de concentração urinária (ao se descartar uma causa extra renal), proteinúria de origem renal, alterações no sedimento urinário, a exemplo de celularidade de origem epitelial ou mesmo cilindrúria, palpação renal anormal ou achados anormais no exame de imagem, ou até mesmo resultados anormais obtidos em casos de biopsia renal. Gatos em estadio 2 da DRC podem apresentar valores de creatinina dentro da faixa de normalidade (quando SDMA encontra-se aumentado) ou já apresentar valores acima do normal, isto é, o animal possivelmente apresentará discreta azotemia renal. Neste momento, manifestações clínicas podem ou não estar presentes. Diferentemente dos cães, gatos em estadio 2 dificilmente manifestam sinais clínicos como PU e polidipsia (PD) nas fases iniciais, visto a grande capacidade dos néfrons, em sua maioria justamedulares, em realizar concentração urinária. Caso manifestem, são sinais brandos e raramente notados (IRIS, 2019).

Figura 1 – Classificação da doença renal crônica (DRC) em estadios e subestadios (IRIS, 2019)

					
		Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4
		No azotemia (Normal creatinine)	Mild azotemia (Normal or mildly elevated creatinine)	Moderate azotemia	Severe azotemia
<b>Creatinine in mg/dL</b>	Canine	Less than <b>1.4</b> (125 µmol/L)	1.4–2.8 (125–250 µmol/L)	2.9–5.0 (251–440 µmol/L)	Greater than <b>5.0</b> (440 µmol/L)
	Feline	Less than <b>1.6</b> (140 µmol/L)	1.6–2.8 (140–250 µmol/L)	2.9–5.0 (251–440 µmol/L)	Greater than <b>5.0</b> (440 µmol/L)
<b>SDMA* in µg/dL</b>	Canine	Less than <b>18</b>	18–35	36–54	Greater than <b>54</b>
	Feline	Less than <b>18</b>	18–25	26–38	Greater than <b>38</b>
<b>UPC ratio</b> Substage based on proteinuria	Canine	Nonproteinuric <0.2		Borderline proteinuric 0.2–0.5	Proteinuric >0.5
	Feline	Nonproteinuric <0.2		Borderline proteinuric 0.2–0.4	Proteinuric >0.4
<b>Systolic blood pressure in mm Hg</b> Substage based on blood pressure	Normotensive <140		Prehypertensive 140–159		
	Hypertensive 160–179		Severely hypertensive ≥180		

Fonte: IRIS (2019)

Quando no estadio 3, o animal apresentará azotemia renal de magnitude moderada, além de aumento nos valores de SDMA. Nesta etapa, manifestações

clínicas podem ocorrer devido às alterações renais ou até mesmo por causas extra-renais, sendo estas apresentadas de acordo com cada indivíduo. Poliúria e polidipsia, desidratação, anorexia ou hiporexia, alterações gastrentéricas como êmese, diarreia e até constipação podem ser observadas, contudo, diminuição do apetite ou apetite seletivo, que pode estar acompanhado de náusea, geralmente precedem esses sinais (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; POLZIN, 2011a; REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013; IRIS, 2019). Palidez de mucosa, letargia, fraqueza, pelagem sem brilho e com aspecto seco também fazem parte das alterações clínicas que podem ser manifestadas por gatos doentes renais crônicos a depender da fase em que a doença se encontra e, que normalmente são notados pelos tutores juntamente com a visível perda de peso e perda de massa magra (baixos ECC e EMM). Segundo a IRIS, quando o paciente se encontra em estadio 3 e não demonstra sinais clínicos, este pode ser considerado um animal estadio 3 inicial. Do contrário, quando o paciente denota vários sinais clínicos combinados ou não com os sinais sistêmicos, este pode ser classificado como estadio 3 tardio (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; POLZIN, 2011a; IRIS, 2019). Já no estadio 4 da DRC, o felino se encontra em um quadro de azotemia grave e altos valores de SDMA conseqüentemente tendem a ser mensurados. Nessa etapa, há maior probabilidade de serem observadas diversas manifestações clínicas sistêmicas, além de crises urêmicas com o avançar da doença (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; IRIS, 2019).

Com relação ao substadiamento, avalia-se a presença e magnitude da proteinúria e graduação da PAS. No quesito proteinúria, são considerados três possíveis substadiamentos para gatos: não proteinúrico [razão proteína:creatinina urinária (RPCu) <0,2], proteinúria limítrofe ou *borderline* proteinúrico (RPCu entre 0,2-0,4) e, proteinúrico (RPCu >0,4) (SYME, 2009; IRIS, 2019). Frente às mensurações de PAS, a classificação do animal como normotenso se dá quando as mensurações de PAS se mantiverem abaixo de 140mmHg; pré-hipertensos quando as aferições oscilarem entre 140 e 159mmHg; hipertensos quando a PAS se apresentar no intervalo de 160-179mmHg e hipertensão grave quando valores de PAS são iguais ou superiores a 180mmHg (Figura 1) (TAYLOR et al., 2017; ACIERNO et al., 2018; IRIS, 2019). Para ambas as mensurações, estas devem ser realizadas e confirmadas em duas a três ocasiões com intervalos de uma ou duas semanas. Quanto a mensuração da pressão, esta deve ser aferida com animal calmo e em ambiente tranquilo. Na presença de hipertensão, cuidados devem ser tomados devido o risco de lesões em

órgãos-alvo como cérebro, coração, rins e olhos (FINCO, 2004; SYME, 2009; IRIS, 2019).

### 2.3 TERAPIA DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A terapia atual da DRC em felinos objetiva a diminuição da velocidade de progressão da doença com consequente preservação dos néfrons remanescentes, atenuação e controle dos sinais clínicos e melhora na qualidade de vida dos pacientes acometidos por tal enfermidade. Sabe-se que o manejo nutricional é um dos pilares a ser considerado como tratamento base e de rotina para um animal com DRC, assim como a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico e acidobásico, controle da PAS, redução e controle da proteinúria e correção da anemia quando presente. Perante a importância da terapia nutricional no curso da DRC, o enfoque desta seção será nesta parte do tratamento (POLZIN, 2011b; BARTGES, 2012; ELLIOTT; GRAUER; WESTROPP, 2017; IRIS, 2019).

Sugerido a partir do estadios 2 e fortemente recomendado para os estadios 3 e 4 da DRC, o manejo nutricional para gatos nefropatas objetiva atender a necessidade energética e de nutrientes essenciais para garantir a nutrição adequada ao paciente doente renal, prevenir ou atenuar as manifestações e consequências clínicas da doença, controlar os distúrbios hidroeletrólíticos, acidobásicos e minerais, além de retardar a progressão da DRC e prolongar a sobrevida do animal acometido (ELLIOTT, 2006; IRIS, 2019; PARKER, 2021).

Com a finalidade de alcançar todos esses objetivos listados, os alimentos para gatos doentes renais têm caráter alcalinizante a fim de neutralizar e auxiliar o sistema de tamponamento no organismo, apresenta teores reduzidos de proteína (tópico em discussão), fosfato e sódio, contudo, são enriquecidos com ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, antioxidantes, fibras, potássio e vitamina D (ELLIOTT et al., 2000; ROSS et al., 2006; GEDDES; ELLIOTT; SYME, 2013). Práticas clínicas conduzidas a fim de demonstrar os benefícios do fornecimento desse alimento para pacientes nefropatas tiveram resultados promissores. A exemplo, o estudo prospectivo realizado por Elliot et al. (2000) comparou a utilização de um alimento renal formulado com redução de proteína e fósforo com um alimento de manutenção. Os animais doentes renais que fizeram parte do grupo que recebeu o alimento formulado para tal enfermidade, apresentaram maior tempo de sobrevida quando

comparados aos felinos doentes renais que continuaram a receber alimento de manutenção [633 dias (animais manejados com alimento renal) *versus* 264 dias (animais com alimento de manutenção)] (ELLIOTT et al., 2000). Outro estudo, este retrospectivo, conduzido por Plantinga et al. (2005), também comparou o tempo de sobrevida de gatos que receberam alimentos coadjuvantes renais (sete diferentes alimentos comerciais para doentes renais) com animais que não receberam tais alimentos. Este estudo corroborou os resultados encontrados por Elliot et al. (2000) e, mais uma vez, demonstrou que os gatos alimentados com dietas de prescrição para DRC, dispuseram maior tempo de sobrevida [animais com alimento renal – 16 meses *versus* sete meses de sobrevida com o alimento de manutenção (PLANTINGA et al., 2005)].

Além de trabalhos demonstrando maior tempo de sobrevida em animais que foram alimentados com dieta para paciente renal, outros estudos comprovaram a diminuição ou redução por completo nos episódios de crises urêmicas e inclusive óbito, como o conduzido por Ross et al. (2006), que avaliou durante dois anos gatos em estadio 2 e 3 da DRC em um ensaio clínico duplo cego, randomizado e controlado. Neste estudo, de um total de 22 gatos alimentados com dieta coadjuvante renal, nenhum apresentou agudização da doença (ou crise urêmica) ou foi a óbito, enquanto que dos outros 23 gatos que receberam dieta de manutenção, seis manifestaram sinais clínicos e alterações laboratoriais de crise urêmica, além de cinco gatos evoluírem para óbito em decorrência da evolução da doença (ROSS et al., 2006).

Diante das diversas evidências que demonstram a efetividade do emprego do alimento coadjuvante renal em felinos com DRC, também surgem discussões na comunidade científica no tocante a restrição proteica nessa espécie (SCHERK; LAFLAMME, 2016). Sabe-se que gatos, por serem animais carnívoros estritos, apresentam maior necessidade proteica que os cães e homem (NRC, 2006; FEDIAF, 2021). Dessa forma, muito se discute a respeito dos riscos para uma possível desnutrição proteica quando alimentos com menor teor de proteína são oferecidos, principalmente em pacientes geriátricos, em que o avançar da idade faz com que ocorra maior perda de peso e massa magra. Ademais, a diminuição do EMM já foi associada ao aumento de mortalidade em gatos doentes renais crônicos (FREEMAN et al., 2016). Sendo assim, não há estudos ou consenso que estabeleçam a quantidade ideal de proteína nos alimentos para gatos com DRC, além disso, ainda existem muitas divergências em relação ao melhor momento para se empregar tal

estratégia (LARSEN, 2016; POLZIN; CHURCHILL, 2016; SCHERK; LAFLAMME, 2016). Contudo, vale destacar a importância dos animais se encontrarem estáveis clinicamente no momento da introdução do alimento para nefropatas, vistas as chances de ocorrer aversão. Animais doentes renais, a depender do estadio, podem se encontrar nauseados, principalmente nos casos em que o paciente esteja internado devido à descompensação da função renal ou à crise urêmica (IRIS, 2019; PARKER, 2021).

Outro assunto em pauta e discutido atualmente, diz respeito aos teores de fósforo nos alimentos desses felinos. Tendo em vista a importância deste tema nas discussões atuais e a comprovada correlação do excesso de fósforo e a progressão da DRC, visto que as proteínas são fontes importantes de fósforo nos alimentos, recentemente um estudo *crossover* buscou investigar e responder, pelo menos parcialmente, essa pergunta. No trabalho, 23 gatos no estadio 1 da DRC, receberam dietas com teores de fósforo semelhantes, mas com teores de proteína variados (36,8%; 31,9% e 25,9%). Comparativamente, foi observado que as dietas que continham maiores teores de proteína, mesmo com teores de fósforo controlados, aumentavam as concentrações plasmáticas de toxinas urêmicas e valores de RPCu. Sendo assim, diante do conhecimento atual, os efeitos isolados da restrição proteica e de fosfato, em relação a função renal e tempo de sobrevivência de gatos nos estadiamentos iniciais da DRC, ainda precisam ser melhor elucidados (EPHRAIM; JEWELL, 2021).

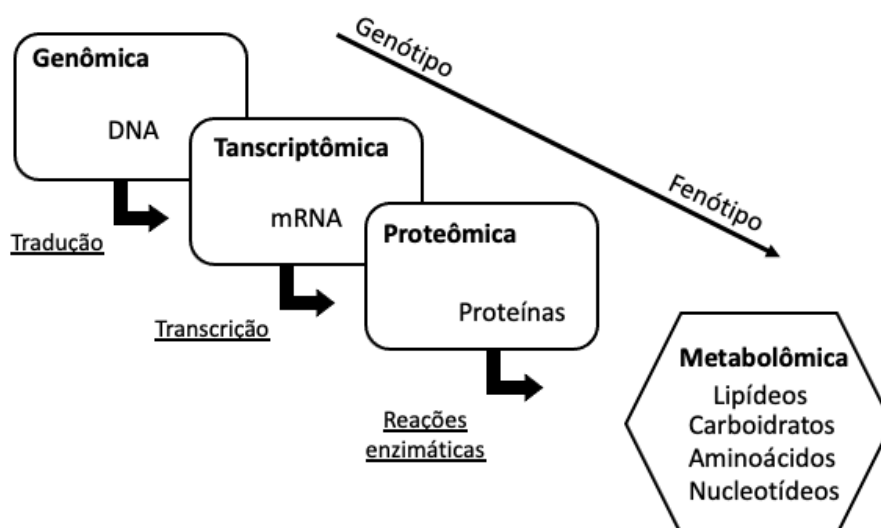
Visto que a hiperfosfatemia está intimamente correlacionada aos distúrbios do metabolismo ósseo-mineral (DMOMs), sendo o hiperparatireoidismo secundário renal (HPTSR) o mais prevalente em gatos com DRC, esta é mais uma complicação frequentemente observada em cães e gatos com esta doença, a qual manifesta-se tardiamente, embora o desenvolvimento já ocorra no curso inicial da DRC (SEGEV; MELTZER; SHIPOV, 2016; KDIGO, 2017). Sabe-se que o equilíbrio entre intestino, ossos e rins é fundamental principalmente em se tratando de animais que possuem a taxa de filtração glomerular diminuída (GEDDES et al., 2013). Ademais, cálcio e fósforo são minerais controlados por hormônios como paratormônio (PTH) e calcitriol ( $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ). A dieta coadjuvante renal para pacientes nefropatas é considerada a primeira linha de tratamento para o controle da hiperfosfatemia, sendo que já foi demonstrado também seu benefício em reduzir as concentrações de FGF-23 e PTH no estudo conduzido por Geddes e colaboradores (2013); outros métodos de controle

desse aumento de fósforo só devem ser iniciados quando se fez uso exclusivo de dieta inicialmente por 30 dias (KIDDER; CHEW, 2009; BRITO GALVAO et al., 2013; GEDDES et al., 2013; GEDDES; ELLIOTT; SYME, 2013).

## 2.4 METABOLÔMICA

Com o advento das pesquisas científicas que possibilitam cada vez mais a compreensão do funcionamento em nível celular dos organismos e suas modificações biológicas, as ciências ômicas tem por objetivo identificar todo o conjunto de biomoléculas presentes em um tecido, célula, fluido ou organismo, como a exemplo do estudo dos genes (conhecido como genômica), proteínas (chamado de proteômica), alterações dos transcritos-RNA (transcriptômica), etc. A metabolômica é parte do complexo de ciências ômicas, a qual estuda as alterações dos metabólitos, que são produtos intermediários ou finais de processos celulares de uma determinada amostra biológica, possuem baixo peso molecular (até 1500 Da) e, ao seu conjunto, dá-se o nome de metaboloma (Figura 2) (FIEHN, 2002; ZHANG et al., 2012a; KLASSEN et al., 2017; CANUTO et al., 2018).

Figura 2 – Correlação entre as principais práticas ômicas utilizadas em estudos de biologia de sistemas



Fonte: Adaptado de Klassen et al. (2017)

As primeiras ponderações a respeito deste tema já aconteceram há décadas, porém, foi somente em 1998 que o termo começou a ser expandido em literatura e, em 2002, que Oliver Fiehn descreveu pela primeira vez como sendo a análise quantitativa abrangente do metaboloma (OLIVER et al., 1998; FIEHN, 2002). Ainda existem algumas divergências em relação às terminologias empregadas para esse tipo de análise, porém, todas se aplicam ao estudo integrado da bioquímica de um organismo complexo, em que os resultados alcançados são medidos em nível molecular (NICHOLSON; LINDON; HOLMES, 1999; VILLAS-BÔAS et al., 2005; NICHOLSON; LINDON, 2008).

Esses metabólitos, pequenas moléculas que em sua totalidade formam o metaboloma, estão intimamente correlacionados com o fenótipo por realizarem uma leitura direta do estado celular do indivíduo, ou seja, são moléculas que respondem diretamente à mudanças ambientais, alimentares, à presença de toxinas, mudanças genéticas, doenças e a outras diferentes alterações fisiopatológicas (DETTMER; HAMMOCK, 2004; CANUTO et al., 2018). Além disso, as abordagens metabolômicas estão sendo cada vez mais empregadas pelos pesquisadores como ferramenta de pesquisa na medicina individualizada, vistas as alterações no metaboloma do indivíduo quando este é submetido à diferentes estímulos. Sendo assim, desde suas primeiras aplicações, a metabolômica vem se expandindo em campos como o da fisiologia, nutrição, doenças infecciosas, toxicologia, farmacologia, entre outros (WISHART, 2008; HANNA; BROPHY, 2015; CANUTO et al., 2018).

Dois abordagens podem ser aplicadas para classificar as análises metabolômicas: metabolômica alvo (*target*), que é definida como a quantificação de metabólitos pré-selecionados ou já conhecidos (alvos), de propriedade físico-químicas similares ou que se encontrem ligados a rotas metabólicas específicas. Assim, pode-se utilizar de uma técnica analítica particular e com melhor desempenho para os compostos de interesse (MAPELLI; OLSSON; NIELSEN, 2008; KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013); e metabolômica global (*untarget*), que é uma análise qualitativa baseada na identificação do maior número de metabólitos possível dentro do sistema biológico estudado, sendo que estes podem pertencer a diversas classes químicas, ou seja, não há nenhum direcionamento prévio. Esta última estratégia (global) é muito utilizada em estudos em que haja comparações de grupos, por exemplo, caso e controle ou doentes e saudáveis (ELLIS et al., 2007; ROESSNER; BOWNE, 2009; KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013).



Devido a abundância de informações, enorme diversidade de estruturas químicas e complexidade no estudo dos metabólitos, inúmeras plataformas e técnicas analíticas podem ser utilizadas para identificação e compreensão dessas pequenas moléculas. Apesar das tecnologias envolvidas nesses estudos serem muito sofisticadas e altamente sensíveis, estas ainda não estão disponíveis como uma ferramenta única capaz de analisar todo o metaboloma (ROESSNER; BOWNE, 2009; KLASSEN et al., 2017). As técnicas analíticas mais frequentemente empregadas nos estudos metabolômicos incluem a ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês, *nuclear magnetic resonance*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) (DUNN; ELLIS, 2005; MAPELLI; OLSSON; NIELSEN, 2008).

A NRM, é uma técnica muito utilizada na detecção dos metabólitos por ser considerada simples e ao mesmo tempo abrangente, a qual demanda de pouca ou nenhuma manipulação de amostra, ou seja, as amostras biológicas a serem analisadas, como fluidos, sólidos e semi-sólidos, requerem praticamente nenhum tratamento prévio. Além disso, existe a vantagem de se necessitar de pouca quantidade de amostra para análise, a qual não é destruída após manipulação. Entretanto, trata-se de uma técnica de custo alto, que demanda de aparelhos/equipamentos de alta resolução, possui baixa sensibilidade e seletividade, e ainda pode comprometer a interpretação de alguns resultados, dados problemas com sobreposição de sinais em algumas regiões dos espectros (DUNN; ELLIS, 2005; BECKONERT et al., 2007; LUDWIG; VIANT, 2010).

Já a MS, é a técnica mais aplicada para análises metabolômicas nos dias atuais, por ser considerada um dos métodos mais rápidos, com alta sensibilidade e seletividade. Porém, embora vantajosa em vários aspectos, esse processo de análise requer uma etapa prévia de preparação das amostras, o qual utiliza alguma técnica de separação para aumentar a sensibilidade de detecção e ampliar a cobertura do metaboloma. Dentre as técnicas de separação estão a cromatografia gasosa (GC, do inglês, *gas chromatography*), a cromatografia líquida de alta eficiência (LC, do inglês, *liquid chromatography*) e a eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) (KUEHNBAUM; BRITZ-MCKIBBIN, 2013; VIANT; SOMMER, 2013).

Independente da técnica escolhida e utilizada, é importante salientar que quando há possibilidade da utilização de mais de um método de análise para uma mesma amostra, objetivando maior cobertura do metaboloma, mais completo será o resultado obtido. Contudo, em qualquer um dos métodos escolhidos, haverá a

geração de uma infinidade de dados complexos, os quais deverão ser tratados, identificados e posteriormente interpretados (DETTMER; HAMMOCK, 2004; DUNN; ELLIS, 2005; KLASSEN et al., 2017).

## 2.5 METABOLÔMICA APLICADA A DOENÇA RENAL CRÔNICA

A aplicação da metabolômica associada à DRC é particularmente atraente, sobretudo por estas moléculas estarem associadas não somente com a redução da excreção renal e identificação de novos biomarcadores da doença, mas sim com modificações metabólicas que ocorrem constantemente no organismo do animal (TITAN et al., 2018). Com a possibilidade de identificação desses novos metabólitos, mecanismos correlacionados com a fisiopatologia da doença renal poderão ser elucidados. Ademais, avaliar os efeitos em curto prazo ocasionados por mudanças dietéticas e implementar medidas terapêuticas mais precoces na tentativa de diminuir a velocidade de progressão da doença, nos fazem apostar nessa linha de estudo que demonstra ser tão promissora (HALL et al., 2020; EPHRAIM; JEWELL, 2021).

Observa-se crescimento considerável de trabalhos envolvendo abordagens metabolômicas no campo da nefrologia na medicina humana e também veterinária. Um exemplo se dá ao estudo realizado por Shah et al. (2013) que identificou o metaboloma no plasma de humanos classificados em diferentes estádios da DRC e demonstrou mudanças significativas na concentração de certos metabólitos de acordo com o estádio em que o indivíduo se encontrava. As principais diferenças encontradas nos diferentes estádios foram consistentes com alterações no metabolismo da arginina, nos fatores de coagulação, no aumento da inflamação, no comprometimento do transporte aniônico de carboxilato e na diminuição da produção de hormônios esteroides. Posto isto, os autores chegaram à conclusão de que estas diferenças podem sinalizar futuros biomarcadores para identificação de importantes alterações em estádios específicos da DRC, além do fornecimento de informações a respeito dos processos fisiopatológicos envolvidos na progressão da doença e que ainda, estes podem trazer subsídios para condutas terapêuticas (SHAH et al., 2013).

Outro estudo idealizado por Titan e colaboradores (2018) também demonstrou o potencial da metabolômica na descoberta de novos biomarcadores correlacionando o aparecimento de certos metabólitos quando presente também a diminuição da TFG

(TITAN et al., 2018). Ainda na medicina humana, outros autores fizeram a identificação de metabólitos séricos em pacientes com doença renal quando em associação com a modificação dietética, comparando dietas com alto e baixo teor proteico, vista a possibilidade de identificação de metabólitos associados não somente a ingestão alimentar, mas sim em relação ao processo de metabolização desse alimento. Ademais, salientaram que além da oportunidade da descoberta de novos biomarcadores, a metabolômica pode ser utilizada como um indicador de adesão às intervenções dietéticas em ensaios clínicos, paralelo a possibilidade de se avaliar a ingestão alimentar em estudos epidemiológicos (REBHOLZ et al., 2019).

Já na medicina veterinária, o metaboloma urinário foi caracterizado em animais de várias espécies como cães, inclusive no estudo de neoplasia em vesícula urinária (ZHANG et al., 2012b), gatos (RIVERA-VÉLEZ; VILLARINO, 2018) e equinos (ESCALONA et al., 2015). A variação do metaboloma no plasma, entre cães e gatos saudáveis, também já foi identificada por Colyer e colaboradores (2011). Além disso, um estudo recente realizado por Ephraim e Jewell no ano de 2020, avaliou os efeitos da adição de betaína e fibra solúvel na dieta em metabólitos e no microbioma fecal de cães com doença renal em estádios iniciais (EPHRAIM; JEWELL, 2020) e os mesmos autores, publicaram recentemente um trabalho realizado com felinos que avaliou através da metabolômica do plasma e da urina, os efeitos do alto consumo de proteína na dieta, mas com teor de fósforo controlado, em pacientes com DRC também em estádios iniciais (EPHRAIM; JEWELL, 2021).

Outros dois ensaios clínicos muito relevantes nessa área da medicina veterinária que ainda há muito a ser explorada e que correlacionaram as vertentes da nefrologia e da nutrição clínica com a metabolômica, também foram recentemente publicados. O primeiro estudo relacionou a composição da dieta com a porcentagem de massa magra, concentrações de toxinas urêmicas e função renal em felinos idosos (HALL et al., 2019). Já o segundo, avaliou a resposta do metaboloma plasmático e do microbioma fecal em relação a inclusão de fibra alimentar em gatos com DRC (HALL et al., 2020).

Foi realizado um compilado de artigos científicos que envolvessem doença renal crônica em felinos e/ou avaliação da função renal em felinos hígidos, metabolômica e o uso da dieta (Quadro 1). Até o presente momento, até onde se sabe, não foram realizados estudos que avaliaram a metabolômica do soro de gatos doentes renais nos estádios 1 e 2 da DRC, além de gatos saudáveis, com comparação entre

grupos e em combinação com os efeitos da dieta coadjuvante renal padronizada para todos os animais.

Quadro 1. Estudos publicados na literatura que avaliaram doença renal crônica em felinos e/ou avaliação da função renal em felinos hígdios, metabôlômica e o uso da dieta

Autor/Ano	Título	Objetivos/Intervenção/Hipótese	Resultados/Conclusão
FINCH et al., 2021	Preliminary demonstration of benchtop NMR metabolic profiling of feline urine: chronic kidney disease as a case study	Usar a tecnologia de perfil metabólicio de bancada baseada em ressonância magnética nuclear (RMN) com o objetivo de aplicá-la como uma ferramenta metabólicio viável e rápida no apoio a tomada de decisão clínica	O estudo identificou 15 metabólitos em gatos DRC que eram diferentes dos controles. Entre eles estavam acetato, creatinina, citrato, taurina, glicina, serina e treonina. A tecnologia de RMN de bancada foi capaz de distinguir entre casos de DRC e amostras de animais controle em uma coorte felina piloto, com base no perfil metabólicio
EPHRAIM; JEWELL, 2021	High Protein Consumption with Controlled Phosphorus Level Increases Plasma Concentrations of Uremic Toxins in Cats with Early Chronic Kidney Disease	Avaliar o efeito da dieta com teores de proteína variados, porém com inclusões de fósforo semelhantes, em gatos com DRC, por meio do peso corporal e concentrações de toxinas urêmicas no sangue	Os resultados do estudo sugeriram que o consumo do alimento com maior teor proteico resultou em aumento de BUN, RPCu, além de aumento nas concentrações das toxinas urêmicas microbianas como <i>3-indoxyl sulfate</i> e <i>p-cresol sulfate</i> no plasma, porém, não houve mudança no peso corporal
HALL et al., 2020	Chronic kidney disease in cats alters response of the plasma metabolome and fecal microbiome to dietary fiber	Avaliar os efeitos da alimentação de gatos saudáveis e gatos com DRC com diferentes tipos de fibras dietéticas por meio da determinação de metabólitos plasmáticos e caracterização do microbioma fecal	O estado de saúde dos gatos influenciou os efeitos das fibras fermentáveis da dieta tanto no metaboloma plasmático quanto microbioma fecal. Fibras mais fermentáveis parecem ser preferíveis para gatos com DRC
HALL; JEWELL; EPHRAIM, 2020	Changes in the Fecal Metabolome Are Associated	Avaliar os efeitos da alimentação de gatos saudáveis e gatos com DRC com diferentes	As alterações nas concentrações de metabólitos fecais não refletiram as concentrações de metabólitos plasmáticos

	with Feeding Fiber Not Health Status in Cats with Chronic Kidney Disease	tipos de fibras dietéticas através do metaboloma fecal	previamente relatadas para esses gatos (estudo anterior). Os efeitos observados no metaboloma fecal, foram menores
HALL et al., 2019	Influence of Dietary Ingredients on Lean Body Percent, Uremic Toxin Concentrations, and Kidney Function in Senior-Adult Cats	Determinar se a modificação dos alimentos de manutenção com fontes proteicas alternativas, frutas e vegetais e quantidades aumentadas de lipídios funcionais (óleo de peixe), atrasariam o declínio associado à idade na taxa de filtração glomerular e massa corporal magra em gatos adultos idosos	O uso dos alimentos testes por seis meses, aumentou a porcentagem de massa corporal magra, manteve as concentrações de albumina sérica, aumentou a TFG, diminuiu as concentrações séricas de SDMA e diminuiu as concentrações da toxina urêmica 3-indoxil sulfato. Essas mudanças na dieta podem ajudar a retardar a sarcopenia e a inflamação crônica associada ao envelhecimento em gatos adultos idosos
HALL et al., 2014	Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides	Determinar se a dieta com baixo teor de proteína e fósforo, mas com adição de óleo de peixe, L-carnitina e triglicerídeos de cadeia média (TCM), altera os biomarcadores séricos de função renal, assim como a metabolômica	A suplementação de alimentos para gatos com 1,5% de óleo de peixe, L-carnitina e TCM não alterou a função renal durante o período de alimentação de 6 meses. Nesse estudo, a concentração sérica de SDMA apresentou maior correlação com a TFG do que a concentração de creatinina sérica

Legenda: NMR = *Nuclear magnetic resonance*; RMN = Ressonância magnética nuclear; DRC = Doença renal crônica; BUN = *Blood urea nitrogen*; RPCu = Razão proteína:creatinina urinária; TFG = Taxa de filtração glomerular; SDMA = Dimetilarginina simétrica; TCM = Triglicerídeos de cadeia média.

### **3 HIPÓTESE**

O perfil de metabólitos sérico difere entre gatos saudáveis e doentes renais, assim como nos diferentes estádios da doença e com a mudança da dieta.

### **4 OBJETIVOS**

O presente estudo objetivou caracterizar a metabolômica no soro de gatos saudáveis (grupo controle) e gatos diagnosticados com DRC nos estádios 1 e 2, bem como comparar o perfil de metabólitos dos animais antes e após a introdução do manejo alimentar com um alimento coadjuvante renal.

### **5 MATERIAL E MÉTODOS**

Este foi um estudo clínico controlado não randomizado, em que os animais foram alocados em grupos conforme o estádio da doença em que se encontravam, assim como o grupo dos animais saudáveis (grupo controle). Foi um estudo que fez parte de um projeto maior, que envolveu também a avaliação do perfil aminoacídico plasmático e composição corporal dos mesmos animais, executado por Daniela Pedrosa Machado. Foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo [FMVZ/USP - (protocolo CEUA número 5433030719)] e do Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premier pet® (protocolo CEUA número 088-18).

#### **5.1 SELEÇÃO DOS ANIMAIS**

No total, 37 felinos candidatos foram triados para participar do estudo. Esses animais eram provenientes dos gatis do Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premierpet® (CDN), localizado na cidade de Dourado, São Paulo e do Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos (CEPEN pet) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, localizado na cidade de Pirassununga, São Paulo.

Destes animais, 26 foram diagnosticados com DRC, sete animais no estadio 1 e 19 animais no estadio 2 conforme as diretrizes das IRIS (2019) para diagnóstico, estadiamento e tratamento da DRC em pequenos animais; os outros 11 animais compuseram o grupo controle. Dentre o total (37 animais), oito foram excluídos com diagnóstico de doença concomitante, sendo mais frequentes as doenças osteoarticulares, seguida de cardiomiopatia hipertrófica. Dos 29 restantes, dois vieram a óbito antes do início do estudo. Assim, 27 animais foram selecionados e iniciaram o ensaio clínico, dentre os quais, 10 eram clinicamente normais e 17 possuíam doença renal crônica, sendo sete no estadio 1 (DRC1, n= 7) e 10 no estadio 2 (DRC2, n= 10). Durante a execução do projeto, um animal pertencente ao grupo estadio 1 foi excluído devido manifestações de doença neurológica antes do T60 (DRC1, n= 6) e, outro pertencente ao grupo estadio 2 também foi excluído devido agudização da DRC em razão da presença de nefrólito/ureterólito e hidronefrose unilateral (submetido a nefrectomia unilateral) (DRC2, n= 9). Os animais participantes do estudo permaneceram em seus gatis corriqueiros, sob suas rotinas habituais, tendo livre acesso às áreas externas e interação com os funcionários diariamente.

Os critérios de inclusão para os felinos clinicamente normais foram a ausência de alterações em exames físicos e exames complementares (laboratoriais e de imagem). Para a inclusão dos animais com doença renal crônica, os seguintes critérios foram seguidos: para os animais em estadio 1, apenas presença de alteração persistente de morfologia renal ao exame ultrassonográfico, sendo considerada uma, ou mais, das seguintes alterações: rins com diminuição de tamanho, hiperecogênicos, com perda parcial de relação corticomedular, presença de áreas de infarto ou de cistos em um ou ambos os rins. Os animais não apresentavam azotemia (creatinina sérica com valores <1,6mg/dL) ou aumento de SDMA (valores abaixo de 18µg/dL) e se apresentavam clinicamente normais. Para a inclusão dos animais em estadio 2, foram adotados os critérios de presença de azotemia renal persistente, mensuradas em intervalos de no mínimo 15 dias, em animais hidratados e em jejum alimentar de 12 horas, excluindo assim a possibilidade de azotemia pré-renal, assim como causas de azotemia pós-renal (creatinina sérica com valores entre 1,6 a 2,8mg/dL). Ademais, os animais deveriam se encontrar clinicamente estáveis, com ou sem a presença de alterações em morfologia renal ao exame ultrassonográfico.

Em relação aos critérios de exclusão, foram considerados a presença ou suspeita de comorbidades como endocrinopatias, hepatopatias, doenças

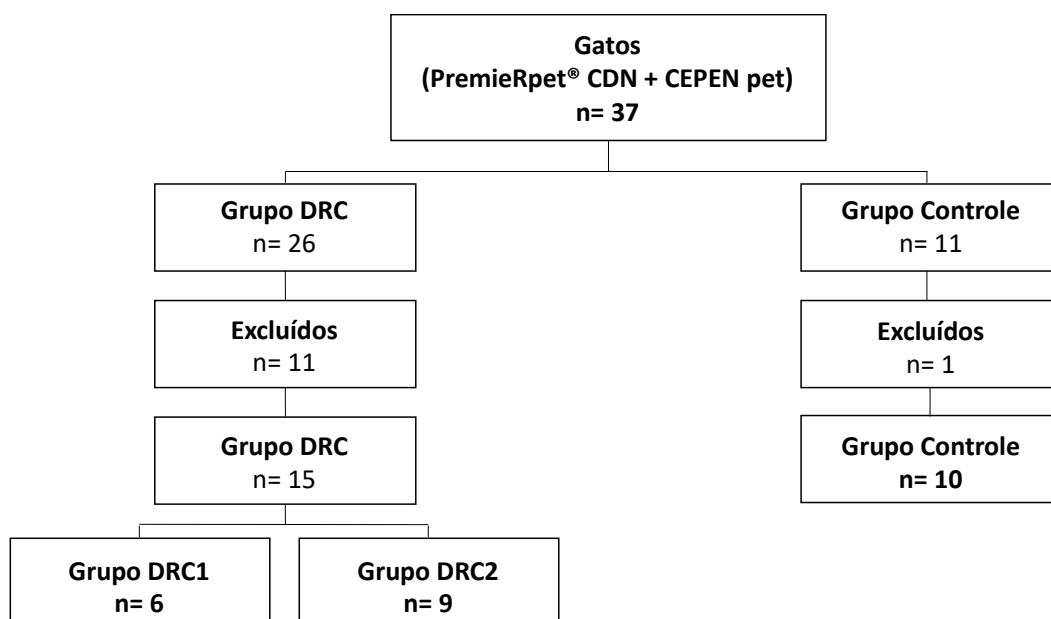


neurológicas, doenças infecciosas [hemoparasitose, leucemia viral felina (FELV) e imunodeficiência viral felina (FIV)], cardiomiopatia hipertrófica, doenças osteoarticulares, neoplasias, piodermites, além de possíveis alterações em palpação de tireoide e/ou alterações sugestivas de doenças gastroentéricas.

Todos os animais foram submetidos à avaliação clínica, exame físico associado aos escores de condição corporal e massa magra, coleta de sangue e urina e realização de ultrassonografia abdominal. Foram realizados os seguintes exames laboratoriais: hemograma, bioquímica sérica [albumina, proteína total (PT), alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), colesterol, triglicérides, creatinina, nitrogênio ureico (BUN), fósforo (P), cálcio total (CaT), sódio (Na), potássio (K), cloro (Cl)], glicemia, exame de urina e RPCu]. Todos os animais também foram submetidos à avaliação da pressão arterial sistêmica, de acordo com as diretrizes do consenso do Colégio Americano de Medicina Veterinária Interna (ACIERNO et al., 2018).

Uma vez incluídos no estudo, os felinos foram alocados em três grupos. Os animais clinicamente normais, compuseram o grupo controle (n = 10). Este grupo foi selecionado a fim de comparar a metabolômica entre os animais saudáveis e animais com doença renal no tempo zero (T0), além de comparar a metabolômica antes e após o consumo do alimento coadjuvante renal (efeito da dieta) em um grupo de animais saudáveis. Os animais no estadio 1 da DRC foram alocados no grupo DRC1 (n = 6) e os animais no estadio 2 da DRC foram alocados no grupo DRC2 (n = 9) (Figura 3).

Figura 3 – Consorte para recrutamento e alocação dos gatos clinicamente normais e doentes renais crônicos, nos grupos de estudo



Legenda: CDN = Centro de Desenvolvimento Nutricional da PremieRpet®; CEPEN pet = Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos; DRC = Doente renal crônico

Fonte: Ruberti (2022)

## 5.2 ACOMPANHAMENTO

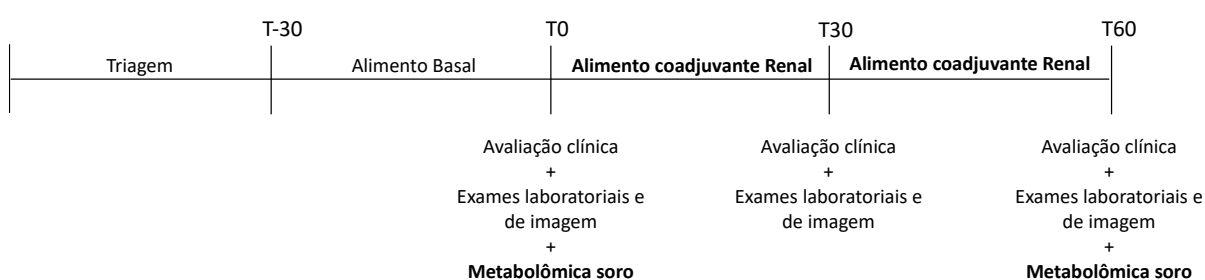
Os animais foram avaliados e acompanhados clinicamente todas as semanas, e a realização de exames complementares e coletas de material para análise metabólica foram feitas a cada 30 dias.

Os tempos de acompanhamento foram denominados de tempo menos trinta (T-30), que correspondeu ao período antes do início do estudo e teve como objetivo a padronização da dieta (dieta de manutenção = alimento basal) 30 dias precedentes ao momento de coleta inicial. Os tempos seguintes foram denominados de tempo zero (T0), tempo 30 (T30) e tempo sessenta (T60), em que o T0 correspondeu ao início do estudo, marcado pelo dia de realização de exames complementares e coleta de material para análise metabólica, além do início da oferta do alimento coadjuvante renal para todos os animais, de todos os grupos; T30, referente ao período de 30 dias após a primeira coleta, no qual todos os animais foram reavaliados e coletado material

para o acompanhamento dos mesmos através de exames complementares; e T60, em que novamente foram coletadas amostras de sangue para realização de exames complementares e coleta de material para análise metabólica 60 dias após a ingestão do alimento coadjuvante renal.

A Figura 4 ilustra, de forma resumida, o protocolo experimental no decorrer dos tempos de avaliação.

Figura 4 – Linha do tempo do protocolo experimental



Legenda: T-30 = tempo menos trinta (correspondeu aos 30 dias antes do início do estudo, padronização da dieta); T0 = tempo zero (equivalente ao início do estudo, marcado pelo dia de realização de exames complementares e coleta de material para análise metabólica, além do início da ingestão do alimento coadjuvante Renal pelos animais); T30 = tempo trinta (referente ao período de 30 dias após a primeira coleta, onde todos os animais foram reavaliados e coletado material para o acompanhamento dos mesmos através de exames complementares); e T60 = tempo sessenta (60 dias após o início da ingestão do alimento coadjuvante renal, onde novamente os animais foram submetidos a exames complementares e coleta de material para análise metabólica).

Fonte: Ruberti (2022)

### 5.3 DIETA E MANEJO ALIMENTAR

Os animais foram manejados com uma dieta de manutenção antes do início do período experimental a fim de padronizar o alimento fornecido. O chamado alimento “Basal” (Ba), possuía perfil recomendado para gatos geriátricos, sendo sua composição formulada com alto teores de proteína e teores de fósforo reduzidos. Os animais receberam o mesmo alimento basal durante 30 dias. Após esses 30 dias iniciais onde foi instituída a padronização dietética, se deu início o período de adaptação para conseqüente troca de alimento. A troca ocorreu de maneira gradual, onde a cada dia, 20% do alimento basal era substituído pelo alimento coadjuvante “Renal” (Re). Ao final dos cinco dias do período de adaptação a nova dieta, todos os

gatos (grupos controle, DRC1 e DRC 2), estavam recebendo somente o alimento Re. Este novo alimento foi fornecido de maneira exclusiva durante os 60 dias subsequentes ao T0 e apresentava teor proteico recomendado para gatos adultos em manutenção e baixo teor de fósforo (Tabela 1). O cálculo da quantidade fornecida foi efetuado de acordo com as recomendações de necessidade energética para gatos adultos através da fórmula:  $75 \times (PC)^{0,67}$  (FEDIAF, 2021), na qual PC = peso corporal. O resultado obtido em Kcal/dia foi dividido pela energia metabolizável do alimento. Os animais foram reavaliados em relação ao manejo alimentar em intervalo de sete dias, durante os 60 dias do estudo.

Tabela 1 - Composição química e ingredientes do alimento Basal (Ba) e do alimento coadjuvante Renal (Re) empregados no estudo

Nutrientes (g/100kcal)	Ba <sup>1</sup>	Re <sup>2</sup>
Proteína	9,84	8,29
Extrato etéreo em hidrólise ácida	4,98	3,77
Fibra bruta	0,59	0,39
Matéria mineral	1,78	1,03
Cálcio	0,31	0,12
Fósforo	0,27	0,11
Ca:P	1,12	1,08
Potássio	0,17	0,21
Sódio	0,19	0,07
Ômega-3	0,10	0,26
Energia metabolizável (kcal/Kg)	3,920	4,353

<sup>1</sup>**Ingredientes alimento Basal:** farinha de vísceras de frango, farinha de torresmo, glúten de milho 60, ovo em pó, aveia, polpa desidratada de beterraba, quirera de arroz, gordura de frango, óleo de soja, óleo refinado de peixe, cloreto de sódio, cloreto de potássio, levedura de cana-de-açúcar autolisada e desidratada, aditivo acidificante, BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno), betaína, DL-metionina, extrato de Yucca, frutoligossacarídeos, mananoligossacarídeos, hidrolisado de fígado de aves e suíno, L-carnitina, L-lisina, parede celular de levedura, sulfato de condroitina, sulfato de glicosamina, taurina, acetato de DL-alfa tocoferol, acetato de retinol, ácido ascórbico monofosfato, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, bissulfito de menadiona nicotinamida, cianocobalamina, cloreto de colina, colecalciferol, niacina (ácido nicotínico), piridoxina, riboflavina, tiamina, ferro aminoácido quelato, iodeto de cálcio, manganês aminoácido quelato, selenometionina hidroxí análoga, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de zinco, zinco aminoácido quelato.

<sup>2</sup>**Ingredientes alimento coadjuvante Renal:** albumina, farinha hidrolisada de frango, farinha de vísceras de frango, farinha de torresmo, glúten de milho 60, ovo em pó, proteína isolada de soja, cevada em grãos, farinha de mandioca, lecitina de soja, milho integral moído, polpa desidratada de beterraba, quirera de arroz, banha suína, óleo refinado de peixe, óleo de vísceras de frango, carbonato de cálcio, citrato de potássio, cloreto de potássio, frutooligossacarídeos, galactooligossacarídeos, beta-glucano, levedura de cana-de-açúcar autolisada e desidratada, mananoligossacarídeos, aditivo acidificante, BHA (Butilhidroxianisol), BHT (Butilhidroxitolueno), DL-metionina, L-lisina, óxido de magnésio, sulfato de cálcio, taurina, acetato de DL-alfa tocoferol, acetato de retinol, ácido ascórbico monofosfato, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, bissulfito de menadiona nicotinamida, cianocobalamina, cloreto de colina, colecalciferol, niacina (ácido nicotínico), piridoxina, riboflavina, tiamina, ferro aminoácido quelato, iodeto de cálcio, manganês aminoácido quelato, selenometionina hidroxí análoga, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de zinco, zinco aminoácido quelato.

#### 5.4 COLHEITA DE SANGUE

Amostras de sangue das veias jugulares (preferencialmente) ou cefálicas, foram obtidas de modo asséptico e acondicionadas em frascos com EDTA para realização de hemograma e contagem plaquetária e, em frascos com gel ativador de coagulação, para bioquímica sérica, SDMA e metabólica. Os animais se encontravam em jejum alimentar de aproximadamente quatro horas para as coletas de hemograma e 12 horas para as coletas das demais amostras.

O hemograma e contagem plaquetária, além da bioquímica sérica com mensurações de creatinina, BUN, CaT, P, Na, K, Cl, PT, albumina, triglicérides, colesterol e atividade sérica da FA, ALT e GGT foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da PremieRpet®, localizado na cidade de Dourado – SP.

Para realização do hemograma, 0,5mL de sangue foram colocados em tubo com anticoagulante EDTA. O hemograma foi efetuado em analisador automático de hematologia para uso veterinário da marca Mindray®, modelo BC-5000 Vet. A metodologia utilizada para contagem de leucócitos totais foi a citometria de fluxo por laser. O hematócrito foi determinado pelo método colorimétrico e os demais parâmetros foram determinados por impedância elétrica. O hemograma foi realizado no T0, T30 e T60 para o acompanhamento clínico do paciente.

Já as mensurações das concentrações séricas de creatinina, BUN, CaT, P, Na, K, Cl, PT, albumina, triglicérides, colesterol, FA, ALT e GGT, foram realizadas em analisador bioquímico FUJI-DRI-CHEM NX500i, da marca Fujifilm® determinados por colorimetria. As concentrações séricas de Na, K e Cl, por meio da metodologia de eletrodos íons seletivos. Todas essas mensurações foram realizadas também nos três tempos (T0, T30 e T60) para acompanhamento clínico.

A mensuração sérica da SDMA foi realizada através do teste *Catalyst SDMA* IDEXX, no analisador IDEXX *Catalyst One Analyzer* pertencente a clínica veterinária Espaço Pet Care, localizada em São Carlos - SP. O SDMA foi realizado nos momentos T0 e T60.

Para análise metabólica, foi realizada a separação do soro após processamento em centrífuga por 10 minutos a 3.000rpm no Laboratório de Análises Clínicas da PremieRpet® e, as amostras então foram acondicionadas e mantidas sob refrigeração em ultrafreezer a -80°C, para posterior análise no Laboratório de

Metabolômica da UNIFESP – São Paulo, SP. Para análise metabolômica, foram realizadas coletas nos momentos T0 e T60.

## 5.5 COLHEITA DE URINA

Amostras de urina foram colhidas de forma asséptica, por meio de cistocentese (guiada por ultrassom), após breve contenção física, para realização de exame de urina e RPCu. Para a coleta de urina, os animais encontravam-se em jejum hídrico e alimentar de aproximadamente quatro horas (maior confiabilidade para averiguação de densidade urinária/capacidade de concentração de urina e menor confiabilidade em pH urinário devido ao pouco tempo de jejum alimentar).

## 5.6 OUTROS EXAMES

### 5.6.1 ULTRASSONOGRRAFIA ABDOMINAL

Também foi realizada ultrassonografia abdominal total com especial avaliação de todo o trato urinário, nos diferentes momentos do estudo (T0, T30 e T60). Estas avaliações foram realizadas pelo mesmo profissional da área de diagnóstico por imagem.

### 5.6.2 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA

Avaliada no momento do acompanhamento mensal dos animais, com uso do método indireto com Doppler (Modelo 811-B Doppler Ultrasonic Flow Detector, Parks Medical Electronics, Inc – Oregon, EUA). As mensurações foram realizadas no membro torácico (direito ou esquerdo), ou pélvico (direito ou esquerdo) utilizando-se manguitos conforme o tamanho do animal (40% da circunferência medida em centímetros no terço proximal do rádio e ulna).

Foram realizadas seis mensurações em cada animal (com descarte da primeira) e, o valor final foi obtido pela média das mensurações. Os animais eram então classificados conforme subestadiamento proposto pela IRIS, descrito anteriormente.

### 5.6.3 ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E ESCORE DE MASSA MUSCULAR

Foi realizada a avaliação do ECC de acordo com a escala de nove pontos, validada para gatos por (LAFLAMME, 1997). Ainda, foi avaliado o EMM de acordo com a escala de 4 pontos (0-3) (MICHEL et al., 2011). Essas avaliações foram realizadas pela mesma pessoa durante todo o período experimental (T0, T30 e T60) para evitar possíveis erros de avaliação, devido a subjetividade dos métodos.

Além disso, foi realizada a pesagem dos animais semanalmente em balança digital de uso veterinário (BRASMED®) durante os 60 dias de estudo.

## 5.7 METABOLÔMICA

### 5.7.1 ANÁLISE EM MODO SCAN POR GCMS

Para a análise em GC-MS, 100uL de cada amostra foi misturada em um vórtex com 300uL de acetonitrila para garantir a desproteíntização e, então centrifugado por 10 min a 15400g a 4°C. Na sequência, 100uL do sobrenadante foi transferido para *vials* de análise em GC-MS contendo *inserts* de vidro e, então o solvente foi evaporado em *SpeedVac* a 30°C. Para a metoximação das amostras, 10uL de hidróclorato de O-metoxiamina (15mg/mL) em piridina foi adicionado a cada *vial* de análise e, então, levados ao vórtex. Os *vials* foram cobertos e incubados em ambiente escuro em temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, 10uL de BSTFA com 1% de TMCS (v/v) foram adicionados e, as amostras vortexadas e incubadas a 70°C por 1h para o processo de siliilação. No final do procedimento, 20uL do padrão interno ácido pentadecanóico (20ppm em heptano) foi adicionado a cada *vial* de análise. Três amostras de branco foram preparadas seguindo o mesmo procedimento das amostras preparadas. Estes brancos foram analisados no início, no meio e no final da sequência (KIND et al., 2009; VALLEJO et al., 2009).

A análise das amostras foi conduzida num sistema de cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (GCMS-QP2020 NX, Shimadzu Co., Kyoto, Japão). Para a separação, 1uL da amostra foi carregado numa coluna DB5-MS (30m x 0.25mm, 0.25um, Restek). A amostra foi injetada em modo *splitless* num fluxo de 20mL/min de gás Hélio. O gás carregador foi conduzido num fluxo constante de 1,36mL/min. A temperatura inicial da coluna foi inicialmente mantida

a 80°C e então aumentada gradativamente numa taxa de 15°C/min até atingir a temperatura final de 300°C e, esta foi mantida por 8min antes de resfriá-la. As temperaturas do injetor, linha de transferência e filamento da fonte e o quadrupolo foram mantidas a 280, 200, 150 e 150°C, respectivamente. O sistema foi operado em modo de *full scan* (m/z 40-650) numa taxa de 3 espectros/s e, com o EI configurado a 70eV. Então um método de tempo de retenção fechado (TRF) foi aplicado para reduzir o tempo de retenção (TR) de toda a análise (VALLEJO et al., 2009; MASTRANGELO et al., 2015).

O controle dos instrumentos, a aquisição de dados e o processamento de dados foram realizados pelo software *LabSolutions* (GCMS versão 4.5, Shimadzu Co., Japão), que permite controle em tempo real de cada analito analisado para a identificação dos metabólitos em modo SIM e Scan.

#### 5.7.2 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS

A identificação dos metabólitos foi realizada a partir da comparação dos espectros obtidos por meio das amostras analisadas com espectros de referência adquiridos nas mesmas condições experimentais, ou seja, os picos dos analitos e padrões externos foram integrados pelo mesmo software, utilizando as mesmas configurações e normalizados pela adição e detecção de padrões internos adicionados a cada amostra antes da análise. Assim, uma curva analítica de calibração foi construída para a determinação da linearidade e, com a utilização de padrões internos, a concentração de cada metabólito gerou valores de quantificação em micromolar (uM) com maior confiabilidade. Os dados foram finalmente exportados para o software Excel (Microsoft Office) para subsequente análise estatística das moléculas identificadas e quantificadas em modo SIM.

Para as análises em modo Scan, os metabólitos detectados foram processados para a criação de uma matriz unificada de variáveis a partir dos diferentes estados de carga, adutos e grupos dos mesmos analitos em todas as amostras e, para isso foram utilizados os softwares *GCMS Solution* (v.3.30), *NIST 17 MASS* (v.1.00.1) e *GCMS Smart Metabolite* (v.3.01), todos desenvolvidos pela Shimadzu Co. Os softwares foram configurados da maneira mais eficiente possível para processar todos os picos detectados, separando-os do ruído do equipamento. Após a identificação das moléculas detectadas pelas bibliotecas NIST (KIND et al., 2009) e *Smart Metabolite*,



as amostras foram exportadas para o software Excel (Microsoft Office) para tratamento estatístico. Bases de dados públicas disponíveis na internet ([www.metlin.scripps.edu](http://www.metlin.scripps.edu), <https://www.genome.jp/kegg/>, [www.lipidmaps.org](http://www.lipidmaps.org) ou <http://www.hmdb.ca>) também foram utilizadas para a identificação e/ou conformação de espectros de GC-MS.

## 5.8 ANÁLISE DOS DADOS

### 5.8.1 DADOS GERAIS

Foram obtidas as seguintes variáveis: contagem de hemácias (células x  $10^6/\mu\text{L}$ ), hematócrito (%), hemoglobina (g/dL), volume corpuscular médio (VCM) (fL), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (g/dL), contagem de plaquetas ( $\mu\text{L}$ ), leucócitos totais ( $\mu\text{L}$ ), neutrófilos segmentados ( $\mu\text{L}$ ), linfócitos ( $\mu\text{L}$ ), monócitos ( $\mu\text{L}$ ), eosinófilos ( $\mu\text{L}$ ), basófilos ( $\mu\text{L}$ ), PT (g/dL), albumina (g/dL), ALT (U/l), GGT (U/l), FA (U/l), colesterol (mg/dL), triglicérides (mg/dL), glicemia (mg/dL), Na (mEq/L), K (mEq/L), Cl (mEq/L), CaT (mg/dL), P (mg/dL), creatinina (mg/dL), BUN (mg/dL), SDMA ( $\mu\text{g/dL}$ ), RPCu, ECC, EMM e peso corporal (kg).

As análises foram realizadas no programa estatístico R (versão 4.0.4; R Core Team, 2020) através da interface *RStudio* (RStudio, 2019) com auxílio dos pacotes estatísticos *lme4*, *tidyverse*, *car* e *psych*. Antes do desenho dos modelos estatísticos, foram consideradas as diferenças entre grupos para as seguintes variáveis: ECC, raça (categorizada entre SRD e outra raça) e idade. Detectou-se diferença na idade e proporção de raça entre os grupos. Animais do grupo controle eram mais jovens que os animais dos grupos DRC1 e DRC2, houve maior proporção de animais SRD do que o grupo controle. Desta forma, os modelos estatísticos foram construídos a fim de avaliar o efeito da interação entre os grupos (controle, DRC1 e DRC2) e os tempos (T0 e T60), controlando para os efeitos de raça e idade dos animais. Modelos lineares mistos foram construídos de forma a contabilizar os efeitos das medidas repetidas (animal considerado como medida aleatória). Modelos onde a interação entre grupo e tempo não foram significativas, foram reavaliados sem incluir a interação no modelo e os resultados dos efeitos fixos foram reportados.

## 5.8.2 DADOS DA METABOLÔMICA

A análise estatística uni- e multivariada foram realizadas no *Metaboanalyst 4.0* seguindo os algoritmos paramétricos e não-paramétricos como T-test, ANOVA paramétrica e sua versão não-paramétrica (Kruskal-Wallis), criando modelos multivariados com transformação logarítmica para a normalização dos dados, por meio de modelos não-supervisionados, como a análise de componente principal (PCA) e, supervisionados, como a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS e a sua regressão ortogonal, OPLS), verificando-se a possibilidade de identificação de “*outliers*”, tendências, e para selecionar as variáveis responsáveis pela separação mostradas pelos modelos e além dos testes de validação, respectivamente. A análise de interação de vias metabólicas das moléculas analisadas e consideradas como significativas para o modelo experimental proposto foram realizadas no software *Cytoscape*.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O grupo controle (n = 10) foi constituído por seis machos e quatro fêmeas. A idade dos animais variou de três a 13 anos e a média de faixa etária do grupo foi de  $5,8 \pm 3,33$  (média  $\pm$  desvio padrão) anos de idade. O peso corporal dos animais variou de 3,19 – 5,54kg (média de  $4,52 \pm 0,65$ kg). A distribuição racial também variou, sendo um animal exótico (1/10); um british shorthair (1/10); um bengal (1/10); quatro persas (4/10), um abissínio (1/10) e, dois sem raça definida (SRD) (2/10).

Para compor o grupo dos animais doentes renais crônicos estadio 1 (grupo DRC1, n = 6), foram selecionados cinco machos e uma fêmea. A idade dos animais variou de oito a 13 anos e a média de faixa etária foi de  $11 \pm 2,28$  anos de idade. O peso corporal variou de 4,62 – 6,69kg; e a média foi de  $5,29 \pm 0,73$ kg. Todos os animais que compuseram o grupo DRC estadio 1 eram animais SRD.

Já o grupo de animais com DRC no estadio 2 (grupo DRC2, n = 9), foi composto por quatro machos e cinco fêmeas que possuíam idade entre 7 – 19 anos;  $10,78 \pm 3,93$  anos de idade. O peso corporal variou de 3,19 – 8,01kg; e a média foi de  $4,88 \pm$

1,5kg. Em relação a distribuição racial, seis animais eram SRD (6/9), um Ragdoll (1/9), um Bengal (1/9) e um Maine Coon (1/9) (Tabela 2).

Tabela 2 - Características individuais dos animais (n=25) incluídos no estudo de acordo com os grupos experimentais

<b>Controle</b>						
<b>Raça</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status sexual</b>	<b>Peso corporal (Kg)</b>	<b>ECC</b>	<b>EMM</b>	<b>Gatil de origem</b>
Exótico British	4	FC	3,19	5	3	CDN
Shorthair	3	FC	4,57	6	3	CDN
Bengal	4	MC	5,53	5	3	CDN
Persa	8	MC	4,88	6	3	CDN
Persa	3	FC	3,97	5	3	CDN
Abissínio	3	MC	4,09	5	3	CDN
SRD	8	FC	4,90	6	3	CDN
Persa	4	MC	4,86	6	3	CDN
Persa	8	MC	4,38	5	2	CDN
SRD	13	MC	4,80	7	3	CEPEN
<b>Média</b>	<b>5,80</b>		<b>4,52</b>	<b>5,60</b>	<b>2,90</b>	
<b>Doente renal crônico estadio 1</b>						
SRD	8	MC	4,93	5	3	CDN
SRD	9	MC	6,69	9	3	CDN
SRD	10	FC	5,37	9	3	CDN
SRD	13	MC	4,93	5	3	CEPEN
SRD	13	MC	5,19	5	3	CEPEN
SRD	13	MC	4,62	5	3	CEPEN
<b>Média</b>	<b>11</b>		<b>5,29</b>	<b>6,33</b>	<b>3,0</b>	
<b>Doente renal crônico estadio 2</b>						
SRD	7	MC	5,06	5	2	CDN
SRD	7	MC	3,72	5	2	CDN
Ragdoll	8	FC	5,18	5	2	CDN
SRD	13	MC	6,2	7	3	CDN
Bengal	10	FC	3,50	5	3	CDN
SRD	19	FC	4,49	7	2	CDN
Maine Coon	7	MC	8,00	7	2	CDN
SRD	12	FC	3,19	5	2	CDN
SRD	13	MC	4,60	5	3	CEPEN
<b>Média</b>	<b>10,78</b>		<b>4,88</b>	<b>5,66</b>	<b>2,33</b>	

Legenda: MC = macho castrado; FC = fêmea castrada; ECC = Escore de condição corporal; EMM = Escore de massa muscular; CEPEN = Centro de Pesquisa em Nutrologia de Cães e Gatos VNP/FMVZ-USP; CDN = Centro de Desenvolvimento Nutricional da PremieRpet®.

## 6.2 ESTATÍSTICA INFERENCIAL

Através da análise estatística, identificamos que houve interação entre os grupos avaliados em relação as variáveis ECC e peso corporal, além de plaquetas e potássio. Para as demais variáveis, serão reportadas as comparações de grupo e tempo de forma individual, demonstradas nas tabelas a seguir:

### 6.2.1 VARIÁVEIS DO HEMOGRAMA

As variáveis avaliadas no hemograma, estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Comparação das variáveis do hemograma dos gatos incluídos no estudo de acordo com os grupos doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e os tempos (média  $\pm$  erro padrão)

Variável	Diferença significativa entre grupos ( $p < 0,05$ )			Diferença significativa entre tempos ( $p < 0,05$ )		Interação grupos
	Controle	DRC1	DRC2	T0	T60	
Hemácias ( $\times 10^6/uL$ )	9,76 $\pm$ 0,44	10,37 $\pm$ 0,57	8,78 $\pm$ 0,42			Não
Hemoglobina (g/dL)	14,4 $\pm$ 0,51	15,9 $\pm$ 0,66	13,8 $\pm$ 0,48			Não
Hematócrito (%)	42 $\pm$ 1,43	46,2 $\pm$ 1,85	39,7 $\pm$ 1,36			Não
VCM (fL)		Não				Não
CHGM (g/dL)		Não		35,5 $\pm$ 0,21	33,6 $\pm$ 0,21	Não
Leuc. totais (uL)		Não		9843 $\pm$ 688	11207 $\pm$ 688	Não
Neut. seg. (uL)	6550 $\pm$ 611	3876 $\pm$ 789	5776 $\pm$ 578	4666 $\pm$ 411	6135 $\pm$ 411	Não
Linfócitos (uL)		Não				Não
Monócitos (uL)		Não				Não
Eosinófilos (uL)		Não		567 $\pm$ 78,2	738 $\pm$ 78,2	Não
Basófilos (uL)		Não				Não

Legenda: DRC1 = Doente renal crônico estadio 1; DRC2 = Doente renal crônico estadio 2; T0 = Tempo zero; T60 = Tempo sessenta.

## 6.2.2 VARIÁVEIS DA BIOQUÍMICA SÉRICA

As variáveis avaliadas na bioquímica sérica, estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Comparação das variáveis da bioquímica sérica dos gatos incluídos no estudo de acordo com os grupos doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e os tempos (média  $\pm$  erro padrão)

Variável	Diferença significativa entre grupos ( $p < 0,05$ )			Diferença significativa entre tempos ( $p < 0,05$ )		Interação grupos
	Controle	DRC1	DRC2	T0	T60	
Albumina (g/dL)		Não			Não	Não
ALT (U/L)		Não		68,9 $\pm$ 8,39	61,2 $\pm$ 8,39	Não
GGT (U/L)		Não			Não	Não
FA (U/L)		Não		32,8 $\pm$ 3,66	30,7 $\pm$ 3,66	Não
Creatinina (mg/dL)	1,41 $\pm$ 0,13	1,13 $\pm$ 0,16	1,89 $\pm$ 0,12		Não	Não
BUN (mg/dL)	25,9 $\pm$ 1,88	20,9 $\pm$ 2,43	34,2 $\pm$ 1,78		Não	Não
Cálcio Total (mg/dL)	9,75 $\pm$ 0,13	10,25 $\pm$ 0,17	10,22 $\pm$ 0,12	10,29 $\pm$ 0,10	9,86 $\pm$ 0,10	Não
Fósforo (mg/dL)		Não		5,17 $\pm$ 0,15	5,68 $\pm$ 0,15	Não
Proteína Total (uL)		Não		8,04 $\pm$ 0,13	7,82 $\pm$ 0,13	Não
Colesterol (mg/dL)		Não		193 $\pm$ 10,5	162 $\pm$ 10,5	Não
Triglicérides (mg/dL)		Não			Não	Não
Sódio (mEq/L)		Não		153 $\pm$ 0,47	157 $\pm$ 0,47	Não
Cloro (mEq/L)		Não		117 $\pm$ 0,57	121 $\pm$ 0,57	Não

Legenda: DRC1 = Doente renal crônico estadio 1; DRC2 = Doente renal crônico estadio 2; T0 = Tempo zero; T60 = Tempo sessenta.

### 6.2.3 OUTRAS VARIÁVEIS

As demais variáveis avaliadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação das demais variáveis analisadas dos gatos incluídos no estudo de acordo com os grupos doente renal crônico estadio 1, doente renal crônico estadio 2, controle e os tempos (média  $\pm$  erro padrão)

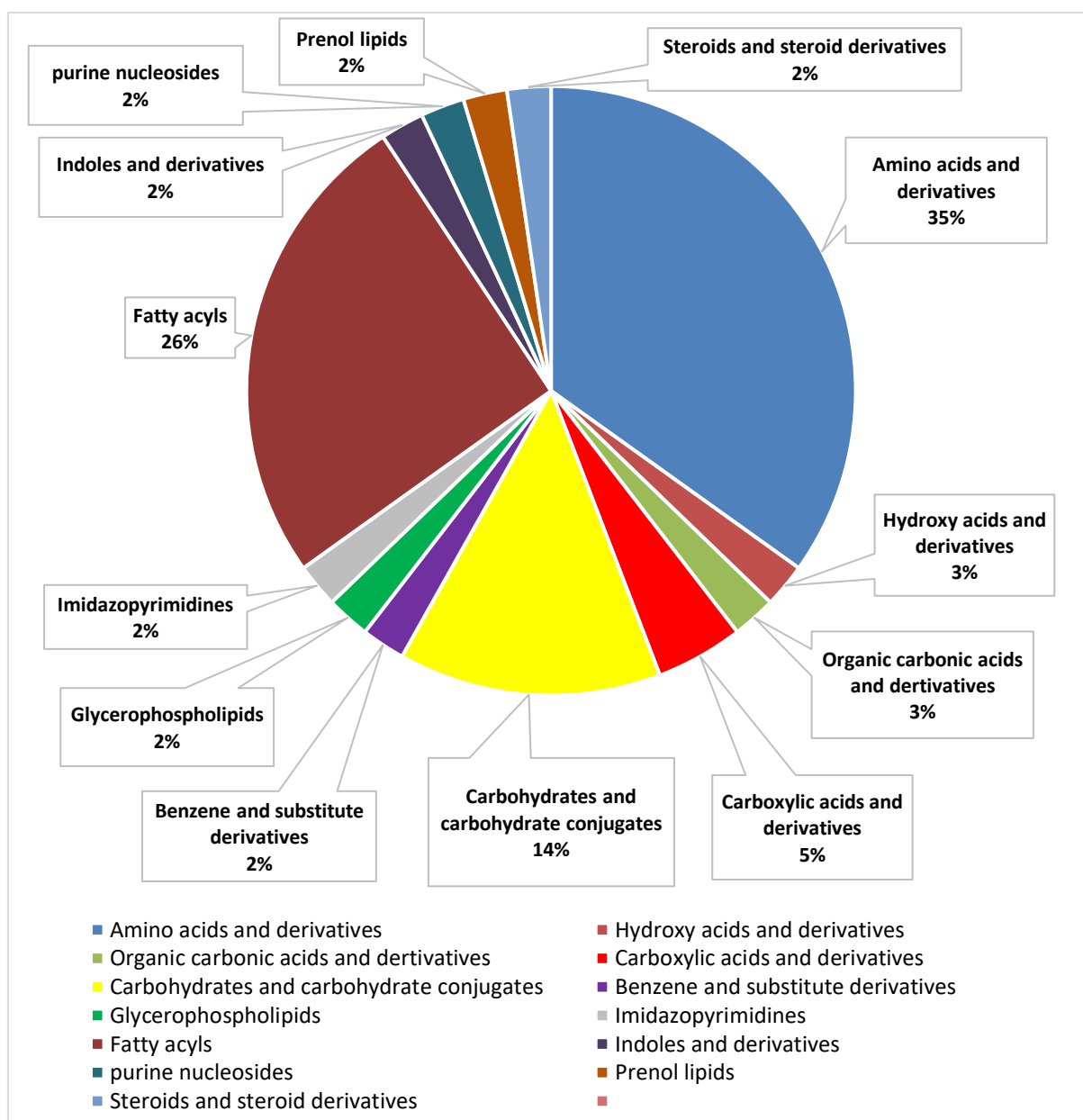
Variável	Diferença significativa entre grupos ( $p < 0,05$ )			Diferença significativa entre tempos ( $p < 0,05$ )		Interação grupos
	Controle	DRC1	DRC2	T0	T60	
EMM	2,89 $\pm$ 0,12	3,02 $\pm$ 0,15	2,23 $\pm$ 0,11	Não		Não
RPCu	Não			Não		Não
Glicemia (mg/dL)	Não			78,9 $\pm$ 5,12	96,7 $\pm$ 5,12	Não
SDMA (ug/dL)	Não			11,16 $\pm$ 0,86	9,21 $\pm$ 0,83	Não

Legenda: DRC1 = Doente renal crônico estadio 1; DRC2 = Doente renal crônico estadio 2; T0 = Tempo zero; T60 = Tempo sessenta; EMM = Escore de massa muscular; RPCu = Razão proteína:creatinina urinária; SDMA = Dimetilarginina simétrica.

### 6.3 CARACTERIZAÇÃO DA METABOLÔMICA DOS GRUPOS CONTROLE E DOENTES RENAIIS

Um total de 43 metabólitos de diferentes classes bioquímicas foram identificados no soro dos animais coletados no momento T0. Esses metabólitos (ilustrados na Figura 5) foram separados respectivamente conforme sua classificação, código de identificação, nível de identificação, sua chave de identificação no *Human Metabolome Database* (HMDB) e seu desvio padrão relativo (RSD), calculado a partir de amostras do Controle de Qualidade (QCs) preparadas e analisadas juntamente com as amostras dos animais, com o intuito de validar analiticamente a repetibilidade e robustez do método, a precisão da injeção e a variação analítica das amostras. Metabólitos encontrados com desvio padrão relativo acima de 30,9% foram removidos da análise.

Figura 5 – Perfil metabólico detectado no soro segundo sua classificação bioquímica



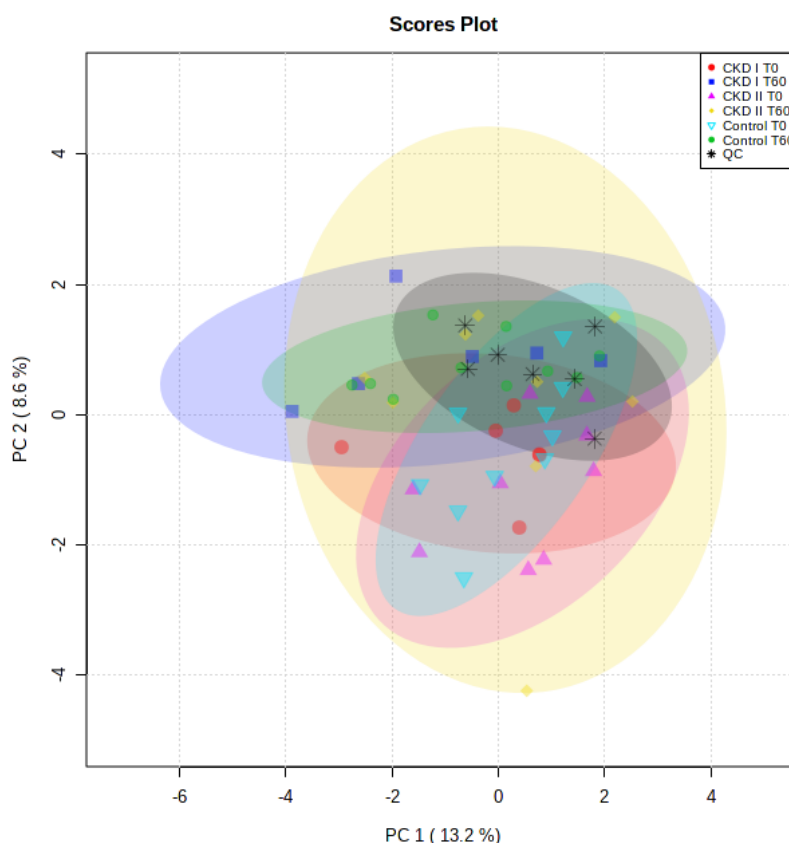
Legenda: *Amino acids and derivatives* = Aminoácidos e derivados; *Organic carbonic acids and derivatives* = Ácidos carbônicos orgânicos e derivados; *Carbohydrates and carbohydrate conjugates* = Carboidratos e conjugados de carboidratos; *Glycerophospholipids* = Glicerofosfolipídeos; *Fatty acyls* = Ácidos graxos; *Purine nucleosides* = Nucleosídeos de purina; *Steroids and steroid derivatives* = Esteróides e derivados de esteróides; *Hydroxy acids and derivatives* = Hidroxiácidos e derivados; *Carboxylic acids and derivatives* = Ácidos carboxílicos e derivados; *Imidazopyrimidines* = Imidazolpirimidinas; *Indoles and derivatives* = Índois e derivados; *Phenol lipids* = Lipídios de fenol.

Fonte: Ruberti (2022)

#### 6.4 REPRESENTAÇÃO GRÁFICA ATRAVÉS DA ANÁLISE MULTIVARIADA DOS GRUPOS (PCA) REPRESENTANDO O CONTROLE DE QUALIDADE PARA VALIDADE ANALÍTICA DA ANÁLISE METABOLÔMICA

O controle de qualidade para validade analítica do método utilizado foi realizado através da Análise dos Componentes Principais (PCA), a qual demonstrou a disposição dos animais classificados de acordo com a metabolômica de cada indivíduo ilustrada na Figura 6.

Figura 6 – Análise Multivariada de Grupos (PCA)



Legenda: Os grupos relacionados ao T0 do tratamento estão dispostos mais abaixo com relação aos grupos do T60. Além disso, o agrupamento do Controle de Qualidade (QC) mostra boa reprodutibilidade analítica e robustez do método utilizado. CKD I T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo zero (T0); CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo sessenta (T60); CKD II T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo zero (T0); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo sessenta (T60); *Control* T0 = grupo controle no tempo zero (T0); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60); Controle de Qualidade (QC).

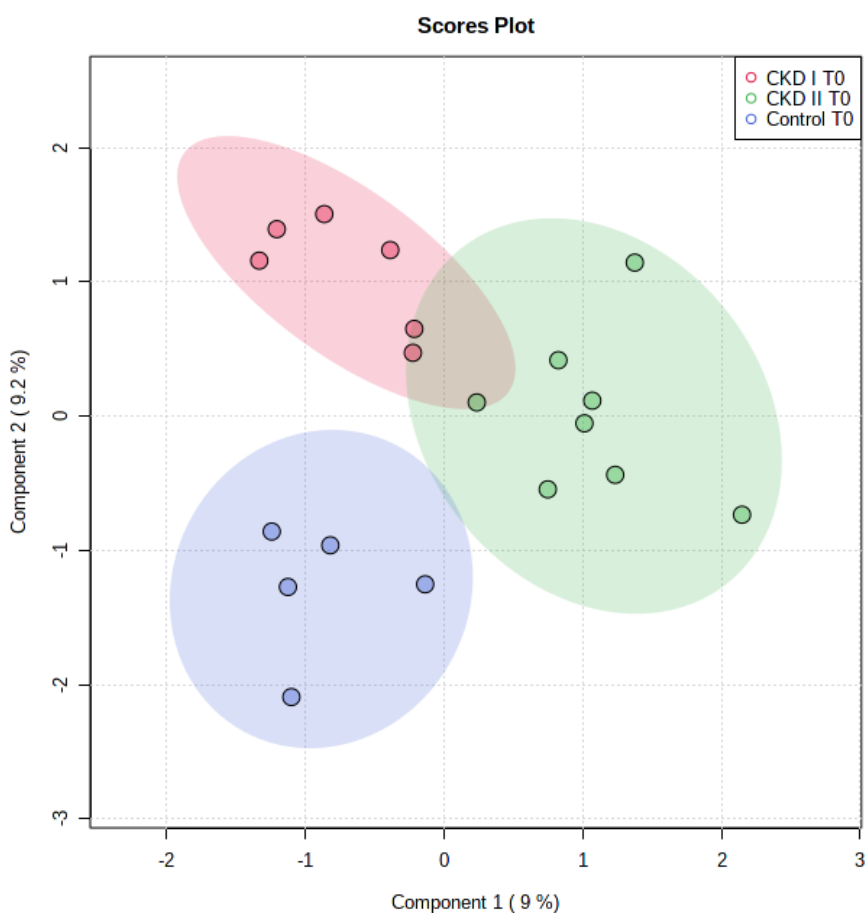
Fonte: Ruberti (2022)



## 6.5 DISPOSIÇÃO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLE E DOENTES RENAIIS NO T0 A PARTIR DA ANÁLISE DOS MÍNIMOS QUADRADOS PRINCIPAIS (PLS) NO T0

Foi realizada análise multivariada dos grupos através dos Mínimos Quadrados Parciais (PLS), a qual demonstrou a disposição dos animais classificados de acordo com a metabolômica de cada indivíduo (Figura 7).

Figura 7 – *Partial Least Squares* (PLS) do soro dos animais no tempo zero (T0)



Legenda: CKD I T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo zero (T0); CKD II T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo zero (T0); Control T0 = grupo controle no tempo zero (T0).

Fonte: Ruberti (2022)

Além disso, foi realizada análise univariada desses metabólitos, a qual apontou diferença entre os grupos DRC 1 e DRC 2, além de grupo controle e DRC 2 para ácido

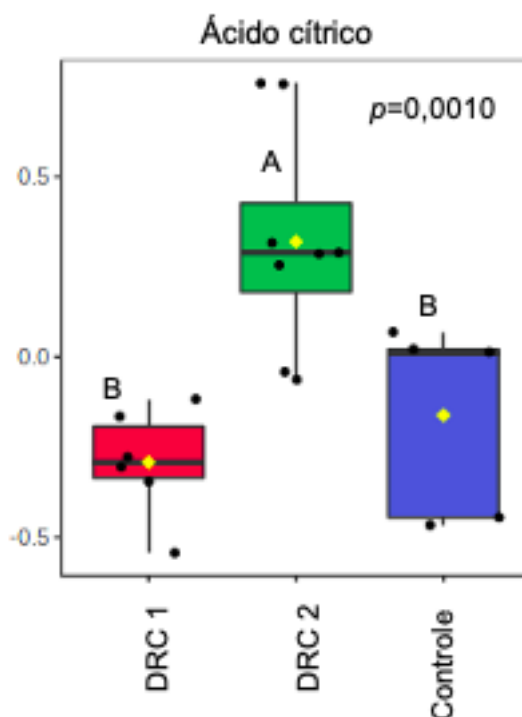
cítrico ( $p < 0,01$ ) e entre o grupo controle e DRC 2 para o metabólito monostearina ( $p < 0,01$ ) (Tabela 6; Figura 8 e Figura 9).

Tabela 6 – Resultados obtidos por meio da análise univariada dos metabólitos no tempo zero (T0)

Metabólitos	P Value	FDR	Tukey's HDS
Ácido cítrico	0,0010236	0,044016	DRC1 – DRC 2 Controle – DRC 2
Monostearina	0,0020674	0,044448	Controle - DRC2

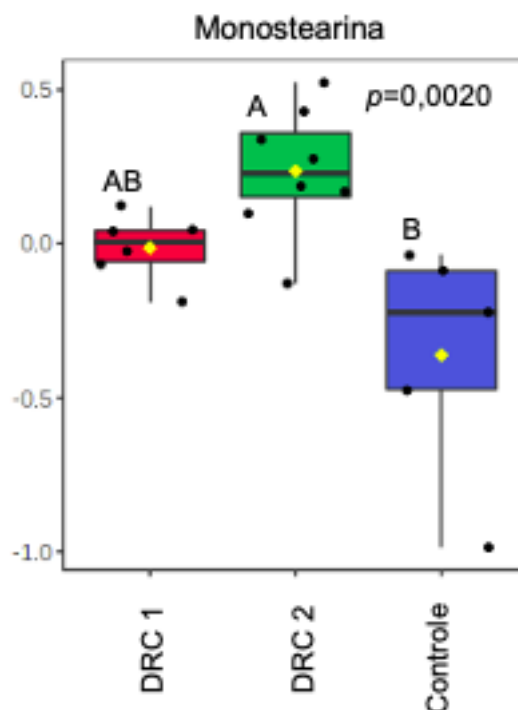
Legenda: P Value = Valor de P; FDR = False Discovery Rate; Tukey's HDS = Tukey's Honest Significant Difference Test; DRC 1 = doente renal crônico estadio 1; DRC 2 = doente renal crônico estadio 2; Controle = grupo controle.

Figura 8 – Concentração do metabólito ácido cítrico nos diferentes grupos experimentais após a padronização da dieta



Legenda: CKD I T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo zero (T0); CKD II T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo zero (T0); Control T0 = grupo controle no tempo zero (T0); Citric acid = ácido cítrico.

Figura 9 – Concentração do metabólito monostearina nos diferentes grupos experimentais após a padronização da dieta



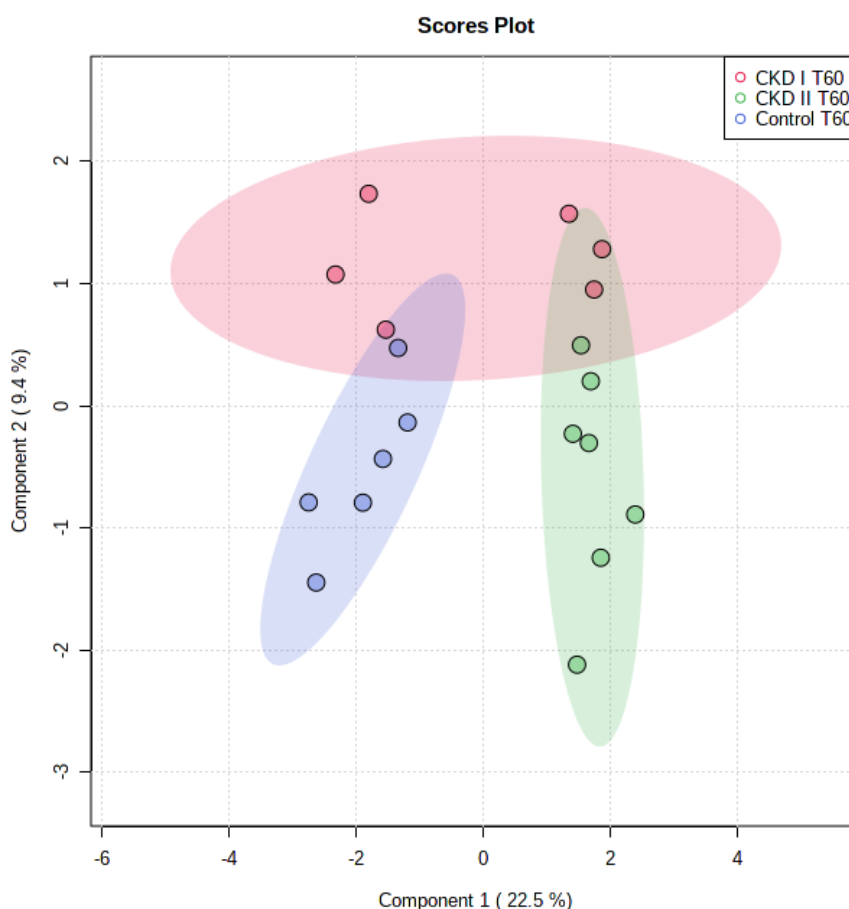
Legenda: CKD I T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo zero (T0); CKD II T0 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo zero (T0); *Control* T0 = grupo controle no tempo zero (T0). *Monostearin* = Monostearina.

Fonte: Ruberti (2022)

## 6.6 COMPARAÇÃO DA METABOLÔMICA SÉRICA ANTES E DEPOIS DO ALIMENTO COADJUVANTE RENAL

Após 60 dias da introdução do alimento coadjuvante renal (Re), foram coletadas novas amostras séricas e então realizada uma nova análise multivariada de grupos através dos mínimos quadrados parciais (PLS) (Figura 10).

Figura 10 – *Partial Least Squares* (PLS) do soro dos animais no tempo sessenta (T60) dias após a introdução do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo sessenta dias (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo sessenta dias (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta dias (T60).

Fonte: Ruberti (2022)

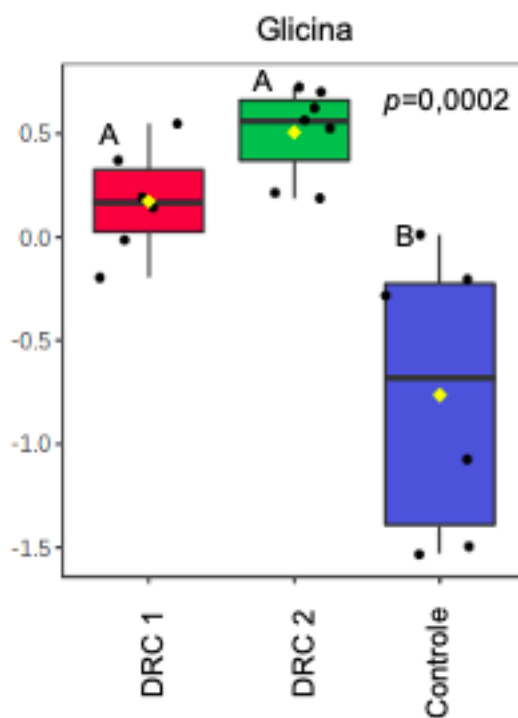
Ainda, conforme executado em T0, no T60 foi realizada uma nova análise univariada dos metabólitos que diferiram, a qual apontou diferença em sete metabólitos: entre os grupos controle e DRC1, além de grupo controle e DRC2 para glicina ( $p < 0,01$ ), diferença entre os grupos DRC1 e DRC2, além do grupo controle e DRC2 para frutose ( $p < 0,01$ ), entre o grupo controle e DRC2 para o ácido glutâmico ( $p < 0,01$ ), ácido araquidônico ( $p < 0,01$ ), e ácido esteárico ( $p < 0,01$ ). Ainda, diferenças entre os grupos DRC1 e DRC2, além de grupo controle e DRC2 para creatinina ( $p < 0,04$ ) e entre o grupo controle e DRC2 para ureia ( $p < 0,01$ ), (Tabela 7; Figuras 11-17).

Tabela 7 – Resultados obtidos por análise univariada dos metabólitos no tempo sessenta (T60)

<b>Metabólitos</b>	<b>P Value</b>	<b>FDR</b>	<b>Tukey's HDS</b>
Glicina	0,0002343	0,0054675	Controle - DRC1; Controle - DRC2
Frutose	0,00074809	0,010723	DRC1 - DRC2; Controle - DRC2
Ácido glutâmico	0,0013398	0,014402	Controle - DRC2
Ácido araquidônico	0,0041824	0,026921	Controle - DRC2
Ácido esteárico	0,0043825	0,026921	Controle - DRC2
Creatinina	0,035838	0,0001541	DRC1 - DRC2; Controle - DRC2
Ureia	0,0030823	0,026507	Controle - DRC2

Legenda: P Value = Valor de P; FDR = *False Discovery Rate*; Tukey's HDS = *Tukey's Honest Significant Difference Test*; DRC1 = doente renal crônico estadio 1; DRC2 = doente renal crônico estadio 2; Controle = grupo controle.

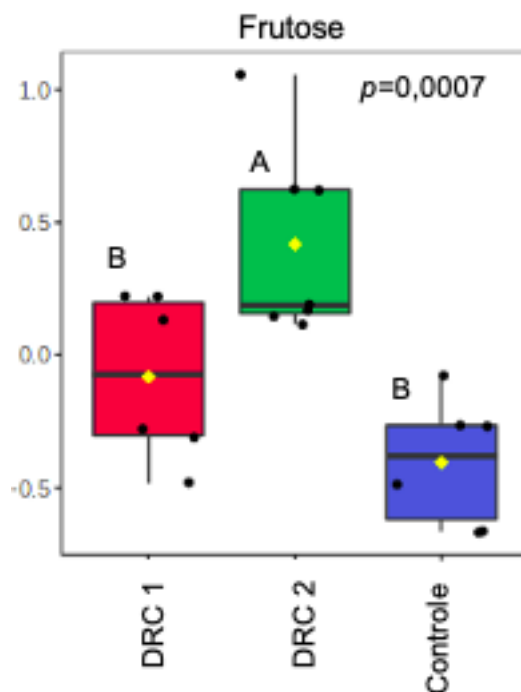
Figura 11 – Concentração do metabólito glicina nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Glycine* = Glicina.

Fonte: Ruberti (2022)

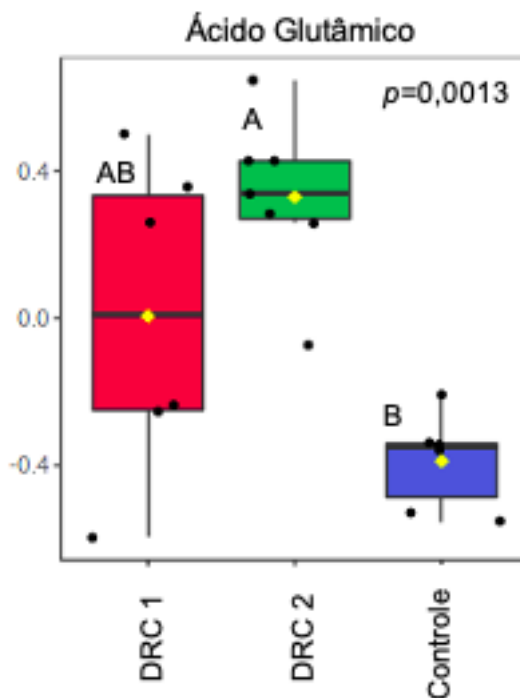
Figura 12 – Concentração do metabólito frutose nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Fructose* = Frutose.

Fonte: Ruberti (2022)

Figura 13 – Variação da concentração do metabólito ácido glutâmico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal

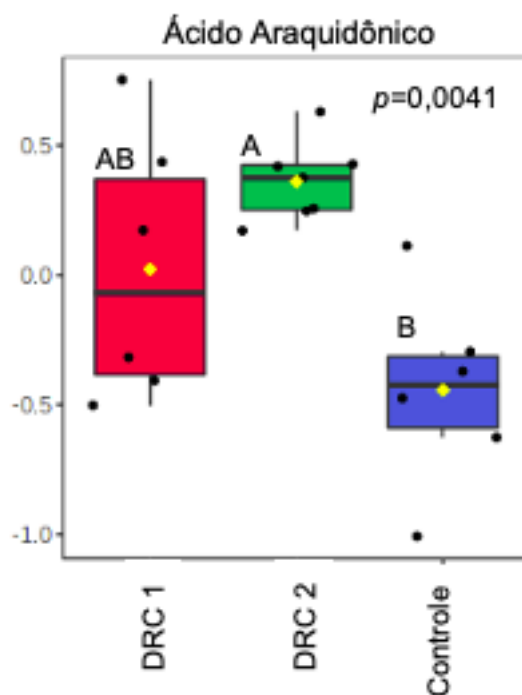


Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Glutamic acid* = ácido glutâmico.

Fonte: Ruberti (2022)



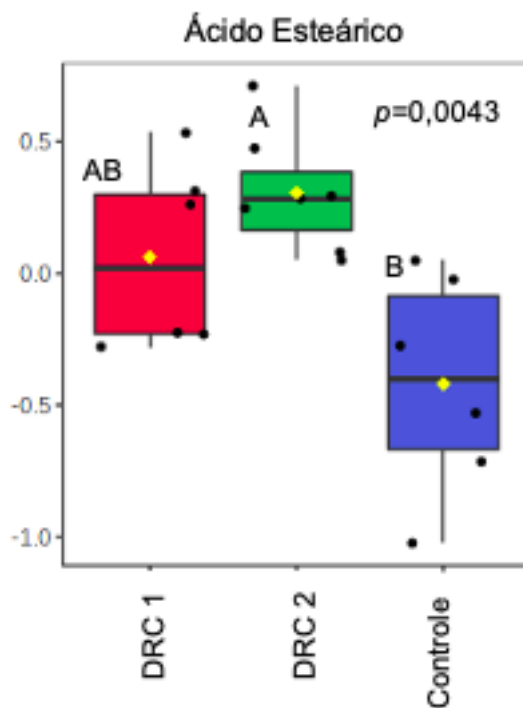
Figura 14 – Variação da concentração do metabólito ácido araquidônico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Arachidonic acid* = ácido araquidônico.

Fonte: Ruberti (2022)

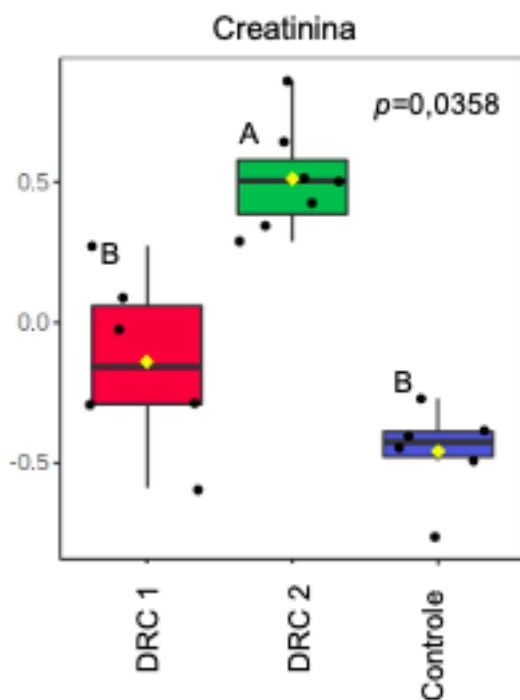
Figura 15 – Variação da concentração do metabólito ácido esteárico nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Stearic acid* = ácido esteárico.

Fonte: Ruberti (2022)

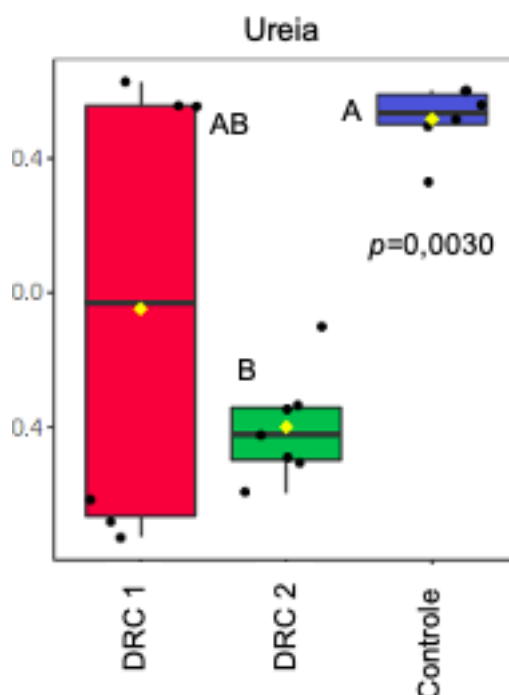
Figura 16 – Concentração do metabólito creatinina nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Creatinine* = Creatinina.

Fonte: Ruberti (2022)

Figura 17 – Variação da concentração do metabólito ureia nos diferentes grupos experimentais após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal



Legenda: CKD I T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 1 no tempo 60 (T60); CKD II T60 = grupo doente renal crônico (DRC) estadio 2 no tempo 60 (T60); *Control* T60 = grupo controle no tempo sessenta (T60). *Urea* = Ureia.

Fonte: Ruberti (2022)

## 7 DISCUSSÃO

As análises metabolômicas foram capazes de identificar 43 metabólitos no soro dos animais avaliados nos tempos T0 e T60. Dois deles, ácido cítrico e monostearina, apresentaram diferença entre os grupos no momento T0.

A concentração de ácido cítrico também foi maior no soro dos animais do grupo DRC2, o que aponta diferenças entre os estadios e, também ser doente renal crônico ou não. O ácido cítrico é um metabólito intermediário do ciclo de Krebs [também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)], sendo sintetizado a partir da acetil-CoA e oxaloacetato. Esse conjunto de vias metabólicas ocorre na matriz mitocondrial e é o principal responsável pelo processo de produção de energia celular, pois origina as moléculas de adenosina trifosfato (ATP) (JIMÉNEZ-URIBE et al., 2021).

Sabe-se que os rins são altamente dependentes da função mitocondrial, dada sua vasta necessidade e demanda energética (GAMBOA et al., 2016; JIMÉNEZ-URIBE et al., 2021). Quando a atividade das mitocôndrias se encontra em desequilíbrio, há aumento do estresse oxidativo e do estado inflamatório do indivíduo. Estudos em humanos demonstraram associação entre o avançar da disfunção mitocondrial e a progressão da DRC, ou seja, quanto mais extenso o distúrbio dessa organela, mais avançado é o estágio em que o paciente se encontra (GRANATA et al., 2009; GAMBOA et al., 2016). Gamboa e colaboradores (2016) avaliaram a atividade mitocondrial das células musculares de pacientes saudáveis e pacientes em diferentes estágios da DRC. Os autores associaram a gravidade desta enfermidade à marcadores de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, alterações estas que podem explicar a disfunção muscular associada à fragilidade e sarcopenia que ocorre na DRC (GAMBOA et al., 2016).

Outro ensaio conduzido em humanos por meio da metabolômica como ferramenta investigativa no estudo da DRC, demonstrou alteração no ciclo do ácido cítrico. Com a disfunção mitocondrial presente, há então inibição dessa via e consequente acúmulo do ácido cítrico sérico, o qual é precursor de diversos outros metabólitos (HALLAN et al., 2017). Destaca-se também a convergência entre essas informações e o fato da nefrite tubulointersticial crônica de origem idiopática ser a causa mais provável para a maioria dos casos de DRC, principalmente em felinos idosos. A região dos túbulos nos néfrons tem grande demanda energética por realizar as funções de filtração e reabsorção (LIU, 2011; CHAKRABARTI et al., 2013; LAWSON et al., 2015). Todavia, não podemos afirmar que a DRC diagnosticada nos felinos do nosso estudo foi originada por uma falha na atividade mitocondrial, porém, é possível que a doença agrave essa disfunção.

Em paralelo a isso, o estímulo de outra via atrelada a geração de ATP (já que parte da via glicolítica encontra-se inibida) pode ocorrer em consequência dessas alterações encontradas, como exemplo a via de síntese de ácidos graxos (HUANG et al., 2018). A monostearina, que é um ácido graxo, foi o segundo metabólito que diferiu em T0 e se apresentou em maior concentração no grupo de animais DRC2 quando comparado ao grupo Controle. A monostearina é um monoglicerídeo que pode ser formado através da liberação de um ácido graxo do diacilglicerol (CAO et al., 2011). Estudo conduzido por Wei e colaboradores (2014) demonstrou que lesão renal isquêmica impacta diretamente no metaboloma plasmático e renal. Os autores

observaram que em resposta à isquemia, há também adaptação do metabolismo em relação a fonte de energia (de glicose para lipídeos) (WEI et al., 2014). Outros pesquisadores (HUANG et al., 2018) também utilizaram a metabolômica e a associaram com a proteômica (proteo-metabolômica) para comprovar que há ativação de nova via para uso de fonte de energia em casos de injúria renal induzida, para compensar a perda de função dos rins lesionados. Nesses dois estudos citados anteriormente, a monoasterina apresentou aumento de concentração (WEI et al., 2014; HUANG et al., 2018).

Apesar da possibilidade de outra via ser estimulada para gerar ATP, a doença renal crônica é uma enfermidade que resulta em diminuição da oxidação de ácidos graxos, o que pode ser considerado um mecanismo adicional que leva ao acúmulo de lipídios. A dificuldade em se utilizar ácidos graxos causa depleção de energia, resultando em aumento da apoptose celular, o que por sua vez, contribui para a fibrose e a progressão da DRC (STADLER; GOLDBERG; SUSZTAK, 2015). Em concordância com os achados dos autores referenciados, estão os resultados encontrados no presente estudo, o qual encontrou aumento desses dois metabólitos no grupo que apresentava função renal mais alterada (DRC2). Apesar dos felinos avaliados não apresentarem diferença entre os grupos em relação às concentrações de colesterol e triglicérides circulantes, esse achado por meio da metabolômica pode sinalizar o início de uma via a ser afetada. Sabe-se que alterações no metabolismo lipídico são frequentemente relatadas em humanos doentes renais, onde a progressão da doença tem associação com dislipidemias (RUIDERA et al., 1988; VAZIRI, 2006; KOCHAN et al., 2021). Em cães, também já há relatos de dislipidemia em pacientes com DRC (BEHLING-KELLY, 2014). Em gatos, informações neste sentido são limitadas. Um estudo publicado em 2016, mensurou as concentrações de beta-hidroxibutirato (BHB) circulante (molécula produzida em situações de balanço energético negativo/catabolismo ou diminuição da utilização de glicose) em felinos com DRC. Os autores encontraram leve aumento da concentração deste metabólito em 20% desses pacientes, ou seja, os animais aumentaram o uso da gordura como fonte de energia por meio da beta-oxidação, possivelmente também pela inibição da via glicolítica. Porém, uma das limitações referidas no estudo, foi a falta de informações em relação ao balanço energético de cada paciente, visto que um histórico preciso do peso corporal ou da condição corporal não estava disponível de forma consistente, ou seja, na maioria dos casos, as amostras de BHB sérico foram

coletadas quando o animal foi admitido pela primeira vez no hospital e, não havia informações se os animais estavam ou não se alimentando. Foi levado em consideração apenas o fato da DRC ser uma doença que pode levar ao catabolismo/balanço energético negativo do paciente (GORMAN et al., 2016).

Após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal, as amostras analisadas apresentaram diferenças entre os grupos na concentração de outros metabólitos: glicina, frutose, ácido glutâmico, ácido araquidônico, ácido esteárico, creatinina e ureia. Ambos os estádios dos animais com doença renal apresentaram diferença quando comparados ao grupo controle em relação a concentração de glicina, a qual estava presente em maior quantidade nos grupos doentes renais, especialmente no grupo DRC2. A glicina é sintetizada principalmente nos rins e no fígado e participa da biossíntese do heme, creatina, ácidos nucleicos e ácido úrico e, apesar de ser um aminoácido não essencial devido sua biossíntese endógena, alguns estudos apontam que a quantidade de glicina sintetizada in vivo não é suficiente para atender às demandas metabólicas em determinadas condições em humanos, suínos e ratos (DARLING et al., 1999; WANG et al., 2013).

Os rins desempenham papel importante na conversão da glicina em outro aminoácido, a serina (FÜRST, 1989). Desta forma, a perda de massa renal contribui para o acúmulo de glicina na circulação devido a sua não conversão, o que justifica os resultados observados. Gatos no estadio 2 da DRC apresentaram concentrações maiores de glicina do que aqueles no estadio 1 e, os gatos no estadio 1, por sua vez, apresentaram maiores concentrações em comparação aos saudáveis. Ademais, mudanças na concentração de glicina no plasma com o avanço da DRC foram associadas a desordens no metabolismo de aminoácidos tanto em ratos, quanto em humanos (MAHBUB et al., 2019). Como mencionado anteriormente, com a conversão de glicina em serina alterada, é esperado então que haja acúmulo de glicina e consequente diminuição de serina sérica em pacientes com DRC. Summers e colaboradores (2022) publicaram recentemente um estudo que apontou redução de serina no plasma de gatos doentes renais quando comparados a animais saudáveis, informação semelhante à encontrada no presente estudo (SUMMERS et al., 2022). Os resultados apresentados nesta dissertação em relação a serina também corroboram com os encontrados por nosso grupo de pesquisa, porém em cães saudáveis e doentes renais crônicos estádios 3 e 4. Os animais com DRC também apresentaram redução de serina na circulação (BRUNETTO et al., 2021).

Estudos que empregaram a metabolômica como ferramenta investigativa e diagnóstica na urina de felinos com DRC, também relataram a presença desse metabólito (glicina). Um estudo recente com resultados preliminares publicados por Finch e colaboradores (2021) apontou que o metabolismo da glicina, assim como da serina e treonina, apresentou associação com a DRC, sugerindo então que o metabolismo desses aminoácidos pode estar alterado em indivíduos com doença renal em comparação com os indivíduos saudáveis (RIVERA-VÉLEZ; VILLARINO, 2018; FINCH et al., 2021).

Em relação a mensuração desse metabólito no plasma ou soro de felinos, foi publicado em literatura no ano de 1999, um trabalho realizado por Goldenstein et al. (1999) que mensurou as concentrações plasmáticas da glicina, após a ingestão de alimentos comerciais de manutenção e coadjuvante renal, por no mínimo duas semanas. Gatos com DRC surpreendentemente apresentaram diminuição das concentrações plasmáticas de glicina quando comparados ao grupo controle. Os autores esperavam resultado contrário, visto que com a diminuição da função renal, se esperaria acúmulo desse metabólito no plasma (GOLDSTEIN et al., 1999).

Assim como o ácido cítrico em T0, a frutose também predominou entre os animais do grupo DRC2, demonstrando claras diferenças entre os grupos DRC1 e DRC2, além do grupo Controle e DRC2 no T60. A frutose é um carboidrato que pode ser proveniente da dieta, que após digerida e metabolizada, será livremente filtrada através dos glomérulos renais e, então, reabsorvida principalmente pelos transportadores de frutose localizados nas células epiteliais tubulares proximais. Além disso, será utilizada no citosol como substrato para a gliconeogênese e manutenção da glicemia (LEE et al., 2016; NAKAGAWA et al., 2021). Ademais, é um metabólito que também pode ser produzido no rim durante a reabsorção de glicose (principalmente em casos de diabetes), bem como em casos de hipóxia intra-renal (NAKAGAWA et al., 2021).

Ao compararmos o teor de carboidratos da dieta basal com o da dieta coadjuvante renal, a quantidade total de carboidratos fornecida no alimento coadjuvante renal é maior do que no alimento basal (36% x 29%), aspecto que poderia ter relação com o resultado encontrado. Porém, além da frutose corresponder a uma pequena fração presente nessa massa total de carboidratos, considera-se o fato de que os felinos expressam a enzima frutoquinase, a qual é responsável por metabolizar a frutose de forma muito mais substancial do que outros animais, como os cães por



exemplo (TANAKA et al., 2005). Ainda, segundo um estudo realizado por Arai e colaboradores no ano de 1999, ao se comparar a quantidade de frutose plasmática antes e após a administração desse açúcar via endovenosa, tanto em cães, quanto em gatos, a frutose foi rapidamente absorvida e metabolizada em ambas as espécies, porém, com maior efetividade na espécie felina (ARAI et al., 1999).

Já em relação ao segundo ponto, o qual se tem conhecimento de que a frutose é um metabólito produzido em situações de hipóxia no tecido renal, vem ao encontro com nossos achados em relação a maior concentração de frutose no soro do grupo dos animais com DRC mais avançada (estadio 2), quando comparado aos demais (ROSHANRAVAN et al., 2018; NAKAGAWA et al., 2021). Contudo, atrelado ao benefício dado a esse metabólito, o qual é ligado a proteção em um cenário de isquemia, a frutose em excesso e sob condições patológicas, pode ter consequências deletérias e se tornar um mediador pró-fibrótico, além de induzir maior inflamação do tecido renal (NAKAGAWA et al., 2021). Outros autores também associaram o seu aumento à presença de alterações no ciclo do ácido cítrico, as quais resultaram na maior concentração de frutose no plasma de pacientes humanos com DRC quando comparados aos pacientes saudáveis (ROSHANRAVAN et al., 2018).

Os próximos três metabólitos a serem discutidos, ácido glutâmico, ácido araquidônico e ácido esteárico, também apresentaram diferenças entre o grupo controle versus animais do grupo DRC2, ou seja, apresentaram maior acúmulo nos pacientes em estadio mais avançado da doença.

Referente ao ácido glutâmico, este é uma molécula pertencente ao grupo dos aminoácidos não essenciais. Sabe-se que os rins exercem marcante função na produção, além de utilização de vários aminoácidos. Além disso, contribuem para a homeostase de diversos deles, assim como do ácido glutâmico. O aumento sérico do ácido glutâmico em pacientes doentes renais, foi explicado por alguns autores, como consequência da diminuição da captação renal (PRESCOTT; WAELSCH, 1947; EL-GAYAR et al., 1994; SULIMAN et al., 2005). Quando o animal apresenta algum grau de comprometimento da função desse órgão, é esperado que haja consequente acúmulo desse aminoácido. Um estudo realizado por El-Gayar et al. (1994), em humanos, demonstrou que mesmo em pacientes com concentração plasmática de creatinina dentro do intervalo de referência para a espécie, mas já com algum sinal de alteração da função renal, essa molécula se encontrava aumentada no plasma, ou seja, os autores apontaram que o ácido glutâmico poderia ser melhor estudado como

um possível biomarcador mais precoce para diagnóstico da DRC (EL-GAYAR et al., 1994).

Um estudo em cães avaliou o perfil aminoacídico de animais que eram proteinúricos por consequência da DRC. Os resultados encontrados foram diferentes aos publicados por El-Gayar et al. (1994). Os cães doentes renais não demonstraram diferenças em relação aos aminoácidos analisados, quando comparados aos animais saudáveis (PARKER; FASCETTI; KLAMER, 2019). No presente estudo, apesar das análises por metabolômica serem qualitativas, foi observado aumento de ácido glutâmico no soro dos animais do grupo DRC2, quando comparados aos animais do grupo controle, corroborando os resultados encontrados em humanos. Porém, não foram encontradas diferenças em relação ao grupo DRC1, muito provavelmente pelo estágio inicial não apresentar perda de função renal que comprometa a captação deste aminoácido.

O ácido araquidônico é um ácido graxo que está presente principalmente na forma de fosfolípido nas membranas celulares (WANG et al., 2019). Quando as células se encontram sob estresse, o ácido araquidônico é liberado dos fosfolípidos pelas enzimas fosfolipases (CURRIE; NEEDLEMAN, 1984; WANG et al., 2019). Este metabólito é precursor de diversos mediadores pró-inflamatórios produzidos através das vias metabólicas coordenadas pelas enzimas cicloxigenases, lipoxigenases e via do citocromo P450, ou seja, o metabolismo do ácido araquidônico e a inflamação renal estão interligados de várias maneiras (HAN et al., 2011; WANG et al., 2019). No presente estudo observou-se que este metabólito apresentou maior concentração no grupo que apresenta a doença em estágio mais avançado quando em comparação ao grupo controle. No entanto, vale ressaltar sua vasta importância frente ao metabolismo lipídico e a informação de que este é um ácido graxo sintetizado a partir do ácido linoleico via atividade das enzimas delta-6-desaturase e delta-5-desaturase. Porém, em felinos, a atividade dessas duas enzimas é limitada, motivo pelo qual o ácido graxo araquidônico é essencial para gatos (LEGRAND-DEFRETIN, 1994; NRC, 2006; WANG et al., 2019; FEDIAF, 2021).

Como já mencionado anteriormente, o metabolismo anormal dos ácidos graxos está intimamente relacionado à DRC. O ácido esteárico também demonstrou correlação negativa quando associado à TFG, evidenciado pelo maior acúmulo no soro dos animais do grupo DRC2 após 60 dias do alimento coadjuvante renal quando comparado aos do grupo controle. Kang e colaboradores (2015) demonstraram que

peças e camundongos com fibrose tubulointersticial, tinham menor expressão de enzimas-chave reguladoras da oxidação de ácidos graxos e, por consequência, aumento da deposição de lipídios intracelulares. Ainda, a concentração de outros ácidos graxos, incluindo o ácido esteárico, aumentou em camundongos com fibrose renal em relação aos controles (KANG et al., 2015). Vale lembrar que a disfunção da oxidação de ácidos graxos, além do acúmulo de lipídios intracelulares, induz o desenvolvimento de fibrose renal e, que esta por sua vez, está intimamente correlacionada com a progressão da DRC (ZHANG et al., 2016).

Por fim, creatinina e ureia destacam-se por serem os marcadores mais utilizados na rotina clínica. Como esperado, concentrações mais elevadas de creatinina e ureia (no nosso caso a ureia foi mensurada através do BUN) também foram observados em gatos com DRC *versus* gatos saudáveis, no início do estudo. A creatinina é um aminoácido derivado do catabolismo muscular, a partir da degradação da creatina e do fosfato de creatina, ambos presentes principalmente no músculo. Este metabólito é a substância mais utilizada como biomarcador indireto da TFG. Sua concentração deve ser interpretada de maneira cautelosa e à luz do EMM, hidratação e dieta fornecida ao animal (STEVENS; LEVEY, 2005; STEVENS et al., 2006; WEINER; MITCH; SANDS, 2015).

Já a ureia, molécula filtrada pelos glomérulos e parcialmente reabsorvida pelos túbulos proximais e distais, também é um dos biomarcadores mais afetados quando há redução na TFG (DOSSETOR, 1966; PARK; RABINOWITZ, 1969; BRAUN; LEFEBVRE, 2008; KOBAYASHI, 2015). Porém, é válido lembrar que esta é uma molécula sintetizada no fígado e que além disso pode ser influenciada pela desidratação, desnutrição, estado de catabolismo proteico, teor de proteína da dieta, utilização de glicocorticoide, além de sangramento gastrointestinal. Como sua produção está intimamente correlacionada com a ingestão proteica, as concentrações desse metabólito na circulação podem ser empregadas para avaliar se os pacientes com DRC estão recebendo quantidades adequadas de proteína (DOSSETOR, 1966; HOSTEN, 1990). Em nosso estudo, após os 60 dias de fornecimento do alimento coadjuvante renal, não houve mudança nas concentrações deste metabólito, o que pode estar correlacionado com a pequena variação na ingestão proteica (40,0 versus 37,7%). Mais especificamente em relação aos animais do grupo DRC2, a manutenção da concentração de ureia é um achado interessante, uma vez que este alimento

coadjuvante renal empregado no estudo possui maior teor de proteína do que o usualmente empregado para o manejo da DRC em gatos, a partir do estadio 2.

Com a redução do *clearance* renal, conseqüentemente, há comprometimento na eliminação desses metabólitos pelos rins, os quais acumulam no organismo e são então designados como toxinas urêmicas (POLZIN, 2011b; REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013). No presente estudo, as variáveis bioquímicas mais conhecidas e estudadas em pacientes doentes renais, conforme mencionado anteriormente, creatinina e ureia, duas das quais atuam como toxinas quando acumuladas, se diferenciaram entre os grupos de animais com DRC em estadio mais avançado quando comparado aos grupos DRC1 e controle, conforme já esperado. Além disso, vale salientar que não houve diferença em relação aos tempos avaliados, demonstrando então que o alimento coadjuvante renal não teve efeito nestas variáveis, ou seja, manteve estabilidade após os 60 dias de instituição da nova dieta.

Em consonância com esses achados, estão os resultados encontrados no presente estudo em relação a creatinina, a qual se destacou no grupo DRC2 através da análise metabolômica, conforme exposto anteriormente. No entanto, quando se avaliou a ureia através desta mesma análise, este metabólito apresentou maior concentração no grupo controle em relação ao grupo DRC2, após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal. Este resultado pode estar atrelado a composição da dieta avaliada neste estudo e sua metabolização de acordo com cada grupo, visto que todos os animais receberam os mesmos alimentos nos mesmos tempos. No estudo realizado por Hall e colaboradores (2020), os autores avaliaram os efeitos da alimentação de gatos saudáveis e gatos doentes renais com alimentos que continham diferentes tipos de fibras dietéticas (alimento A: inclusão de 0,40% de frutooligossacarídeos; alimento B: inclusão de 3,44% de polpa de maçã, os dois alimentos também continham beta-glucanos) por meio da determinação de metabólitos plasmáticos e caracterização do microbioma fecal. Os resultados demonstraram que o estado de saúde dos gatos influenciou nos efeitos das fibras fermentáveis incluídas nas dietas, tanto no metaboloma plasmático, quanto no microbioma fecal e, que o grupo doente renal apresentou menor concentração de ureia em comparação ao grupo controle quando alimentados com fontes de fibras provenientes de frutooligossacarídeos (HALL et al., 2020).

No presente estudo, as fontes de fibras de ambos os alimentos eram semelhantes, todavia, apresentaram diferenças em relação aos prebióticos inclusos.

O alimento basal possuía em sua composição mananoligossacarídeos e frutooligossacarídeos. O alimento coadjuvante renal, por sua vez, possuía na sua composição além dos dois anteriores, galactooligossacarídeos e beta-glucanos. Assim, é possível que a inclusão destes prebióticos possa ter influenciado no metabolismo da ureia, em função da possível modulação da microbiota. O crescimento de bactérias que utilizam a amônia proveniente do metabolismo proteico no intestino grosso, pode ter resultado em menor absorção intestinal deste metabólito, que por sua vez reduziu a formação de ureia pelo fígado, nos gatos do grupo DRC2 (YOUNES et al., 1995; SUMMERS et al., 2019; WERNIMONT et al., 2020).

Em relação as demais variáveis que não as metabólicas, as que demonstraram interação entre os grupos avaliados, ECC e peso corporal, foram associadas ao consumo ideal do alimento em relação aos nutrientes e quilocalorias diários. Dentre os grupos, ao se comparar os animais saudáveis (controle) e DRC1, não foi observada diferença entre os animais do próprio grupo ou ao longo dos tempos avaliados, no entanto, animais do grupo DRC2, apresentaram perda de peso e de ECC após 60 dias de consumo do alimento coadjuvante renal. Todavia, não foi observada alteração na quantidade de massa muscular ao se analisar a composição corporal dos animais (MACHADO, 2021).

Animais saudáveis e em estadio 1 da DRC apresentam função renal preservada, do contrário, animais em estadio 2 da doença já apresentam pelo menos 66% dessa função comprometida (CHEW; DIBARTOLA; SCHENCK, 2011; POLZIN, 2017; IRIS, 2019) e, comumente podem demonstrar sinais de perda de peso, sendo principalmente associada a perda de apetite, redução da ingestão alimentar, além da possibilidade de menor absorção de todos os nutrientes fornecidos associados a possível maior necessidade energética (FINCH; HEIENE, 2017; POLZIN, 2017). Todavia, sabe-se que não houve diferença no consumo dos alimentos entre os grupos [ingestão média de 67,03 kcal/kg<sup>0,67</sup> por dia (MACHADO, 2021)]. Ademais, os resultados demonstram que apesar da diferença na avaliação do ECC entre os animais do grupo DRC2 quando comparado T0 e T60, sendo esta uma variável avaliada de maneira subjetiva, esta se manteve dentro da classificação considerada normal para a espécie (5/9) (LAFLAMME, 1997). Porém, vale salientar que a perda de peso em animais doentes renais pode ser muito prejudicial, impactando diretamente no tempo de sobrevivência dos felinos, conforme já demonstrado por alguns autores (KING et al., 2007).

Quanto a variável EMM, o grupo de animais com doença renal no estadio mais avançado (estadio 2), apresentou diferença (escore mais baixo) quando comparado ao grupo DRC1 e grupo controle. Este também é um dos sinais comumente manifestados por animais que apresentam essa enfermidade, visto que o catabolismo proteico tende a estar mais acentuado nesses pacientes (BARTGES; POLZIN, 2011). Como não foram observadas diferenças ao se avaliar essa variável em relação ao tempo, não foi atribuído a este achado como efeito da nova alimentação, mas sim, como uma condição que já existia anteriormente. No entanto, assim como a subjetividade do método de ECC, a avaliação do EMM também é uma determinação subjetiva. Todavia, importante salientar novamente que os animais do grupo DRC2 não apresentaram diferença em relação a quantidade de massa muscular nos momentos T0 e T60 (MACHADO, 2021).

No atinente às variáveis sanguíneas (plaquetas e potássio) que demonstraram essa interação entre os grupos avaliados (assim como peso corporal e ECC), sabe-se que em relação a interação relacionada a contagem plaquetária, devemos levar em consideração que a análise ocorreu por método automático, sem leitura de lâmina, conforme realizado em laboratórios munidos de profissionais da área, o que levou a diversos resultados abaixo do valor de referência, porém, sem a confirmação de leitura, a qual provavelmente estaria associada aos agregados plaquetários, achado comum em pacientes submetidos ao estresse da colheita (MCGROTTY, 2008). Já em relação ao potássio, sabe-se que sua excreção ocorre primordialmente pelos rins e que sua diminuição é mais comum do que seu aumento, tanto em cães quanto em gatos. Apesar da variação, os valores se encontraram dentro do intervalo de referência para a espécie felina (KOGIKA; DE MORAIS, 2017).

## 8 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente estudo, foi possível concluir que:

- Gatos saudáveis e gatos com DRC estadios 1 e 2 apresentaram diferenças no perfil de metabólitos séricos quando avaliados já no tempo zero e após a padronização da dieta. O ácido cítrico e a monostearina foram os metabólitos que se diferenciaram entre os grupos de animais doentes renais quando comparados ao grupo controle;
- A DRC pode resultar em alterações do metabolismo a partir do estadio 2 e, estas parecem ocorrer em nível mitocondrial, evidenciado pelo aumento do ácido cítrico no grupo DRC2. O organismo como forma compensatória, ativa outras vias para gerar ATP, como exemplo a via da síntese de ácidos graxos (evidenciado pelo aumento da monostearina). Todavia, a doença renal crônica é uma enfermidade que resulta em diminuição da oxidação de ácidos graxos, o que pode ser considerado um mecanismo adicional que leva ao acúmulo de lipídios (hiperlipidemia);
- Após 60 dias de ingestão do alimento coadjuvante renal, outros metabólitos apresentaram diferença, dentre eles a glicina, frutose, ácido glutâmico, ácido araquidônico, ácido esteárico, creatinina e ureia;
- Alguns deles apresentam potencial para uso como possíveis biomarcadores precoces de diagnóstico da doença renal crônica, como por exemplo o ácido glutâmico;
- A inclusão de prebióticos no alimento coadjuvante renal pode ter resultado na redução de ureia nos pacientes doentes renais, possivelmente pela modulação da microbiota intestinal e consequente redução da absorção de amônia para a circulação.

## 9 REFERÊNCIAS

ACIERNO, M. J. et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1803–1822, nov. 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.15331>>.

ARAI, T. et al. A comparison of the plasma fructose concentrations in dogs and cats and changes in the fructose concentrations in dogs following intravenous administration of fructose. **Veterinary research communications**, v. 23, n. 4, p. 203–9, jun. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461796>>.

BARTGES, J.; POLZIN, D. J. (ed.). **Nephrology and Urology of Small Animals**. Chichester, West Sussex, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2011.

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.

BECKONERT, O. et al. Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. **Nature protocols**, v. 2, n. 11, p. 2692–2703, 2007.

BEHLING-KELLY, E. Serum Lipoprotein Changes in Dogs with Renal Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1692–1698, 2014.

BRAUN, J.-P.; LEFEBVRE, H. P. Kidney Function and Damage. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (Ed.). **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. [s.l.] Academic Press, 2008. p. 485–528.

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, 8 mar. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vec.12036>>.

BROWN, C. A. et al. Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 309–326, 11 mar. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0300985815622975>>.

BRUNETTO, M. A. et al. Evaluation of Serum and Urine Amino Acids in Dogs with Chronic Kidney Disease and Healthy Dogs Fed a Renal Diet. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 844, 6 dez. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/11/12/844>>.

CANUTO, G. et al. Metabolômica: Definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75–91, 2018.

CAO, D.-S. et al. A new strategy of exploring metabolomics data using Monte Carlo tree. **The Analyst**, v. 136, n. 5, p. 947–954, 2011. Disponível em:



<<http://xlink.rsc.org/?DOI=C0AN00383B>>.

CHAKRABARTI, S. et al. Histomorphometry of Feline Chronic Kidney Disease and Correlation With Markers of Renal Dysfunction. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 147–155, 2013.

CHEW, D. J.; DIBARTOLA, S. P.; SCHENCK, P. **Canine and Feline Nephrology and Urology**. 2nd. ed. St. Louis, Mo: Elsevier Saunders, 2011.

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.

CURRIE, M. G.; NEEDLEMAN, P. Renal Arachidonic Acid Metabolism. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 46, p. 327–41, 1984.

DARLING, P. B. et al. Threonine kinetics in preterm infants fed their mothers' milk or formula with various ratios of whey to casein. **Am J Clin Nutr**, v. 69, p. 105–14, 1999.

DETTMER, K.; HAMMOCK, B. D. Metabolomics - A New Exciting Field within the "omics" Sciences. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 7, p. 396–397, maio 2004. Disponível em: <<https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.112-1241997>>.

DOSSETOR, J. B. The Relative Significance of Blood Urea Nitrogen and Serum Creatinine Concentrations in Azotemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 65, n. 6, p. 1287–1299, 1966.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285–294, abr. 2005. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993605000348>>.

EL-GAYAR, A. et al. Alterations of Plasma Free Amino Acids in Nephrotic Syndrome. **International Urology and Nephrology**, v. 26, n. 6, p. 707–712, 1994.

ELLIOTT, D. A. Nutritional Management of Chronic Renal Disease in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 6, p. 1377–1384, nov. 2006. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561606001021>>.

ELLIOTT, J. et al. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure: Effect of dietary management. **Journal of Small Animal Practice**, v. 41, n. 6, p. 235–242, 2000.

ELLIOTT, J.; BARBER, P. J. Feline chronic renal failure: Clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. **Journal of Small Animal Practice**, v. 39, n. 2, p. 78–85, 1998.

ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; WESTROPP, J. . (ed.). **BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology**. Third ed. Quedgeley: British Small Animal Veterinary

Association, 2017.

ELLIS, D. I. et al. Metabolic fingerprinting as a diagnostic tool. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 9, p. 1243–1266, set. 2007. Disponível em: <<https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/14622416.8.9.1243>>.

EPHRAIM, E.; JEWELL, D. E. Effect of Added Dietary Betaine and Soluble Fiber on Metabolites and Fecal Microbiome in Dogs with Early Renal Disease. **Metabolites**, v. 10, n. 9, p. 1–20, 2020.

EPHRAIM, E.; JEWELL, D. E. High Protein Consumption with Controlled Phosphorus Level Increases Plasma Concentrations of Uremic Toxins in Cats with Early Chronic Kidney Disease. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 2, p. 1–8, 31 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.heraldopenaccess.us/openaccess/high-protein-consumption-with-controlled-phosphorus-level-increases-plasma-concentrations-of-uremic-toxins-in-cats-with-early-chronic-kidney-disease>>.

ESCALONA, E. E. et al. Dominant components of the Thoroughbred metabolome characterised by 1H-nuclear magnetic resonance spectroscopy: A metabolite atlas of common biofluids. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 6, p. 721–730, 2015.

FEDIAF. Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs. **Nutritional Guidelines - For Complete and Complementary Pet Food for a Cats and Dogs**, n. October, p. 98, 2021.

FIEHN, O. Metabolomics - The link between genotypes and phenotypes. **Plant Molecular Biology**, v. 48, n. 1–2, p. 155–171, 2002.

FINCH, N. et al. Preliminary demonstration of benchtop NMR metabolic profiling of feline urine: chronic kidney disease as a case study. **BMC Research Notes**, v. 14, n. 1, p. 469, 24 dez. 2021. Disponível em: <<https://bmcresearchnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-021-05888-y>>.

FINCH, N.; HEIENE, R. Early detection of chronic kidney disease. In: ELLIOTT, J.; GRAUER, G. F.; WESTROPP, J. L. (Ed.). **BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology**. 3rd. ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association, 2017. p. 130–142.

FINCO, D. R. Association of systemic hypertension with renal injury in dogs with induced renal failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 18, n. 3, p. 289–294, 2004.

FREEMAN, L. M. et al. Evaluation of Weight Loss Over Time in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 5, p. 1661–1666, 16 set. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.14561>>.

FÜRST, P. Amino acid metabolism in uremia. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 310–323, 1989.

GAMBOA, J. L. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in patients with

chronic kidney disease. **Physiological Reports**, v. 4, n. 9, p. e12780, maio 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.14814/phy2.12780>>.

GEDDES, R. F. et al. The role of phosphorus in the pathophysiology of chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 23, n. 2, p. 122–133, mar. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vec.12032>>.

GEDDES, R. F.; ELLIOTT, J.; SYME, H. M. The Effect of Feeding a Renal Diet on Plasma Fibroblast Growth Factor 23 Concentrations in Cats with Stable Azotemic Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, n. 6, p. 1354–1361, nov. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12187>>.

GOLDSTEIN, R. E. et al. Plasma amino acid profiles in cats with naturally acquired chronic renal failure. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, n. 1, p. 109–113, 1999.

GORMAN, L. et al. Serum Beta Hydroxybutyrate Concentrations in Cats with Chronic Kidney Disease, Hyperthyroidism, or Hepatic Lipidosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 2, p. 611–616, 15 mar. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.13826>>.

GRANATA, S. et al. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 388, 21 dez. 2009. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-388>>.

HALL, J. A. et al. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1676–1683, nov. 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvim.12445>>.

HALL, J. A. et al. Influence of Dietary Ingredients on Lean Body Percent, Uremic Toxin Concentrations, and Kidney Function in Senior-Adult Cats. **Metabolites**, v. 9, n. 10, p. 238, 19 out. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/9/10/238>>.

HALL, J. A. et al. Chronic kidney disease in cats alters response of the plasma metabolome and fecal microbiome to dietary fiber. **PLOS ONE**, v. 15, n. 7, p. e0235480, 2 jul. 2020. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0235480>>.

HALL, J. A.; JEWELL, D. E.; EPHRAIM, E. Changes in the Fecal Metabolome Are Associated with Feeding Fiber Not Health Status in Cats with Chronic Kidney Disease. **Metabolites**, v. 10, n. 7, p. 281, 9 jul. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-1989/10/7/281>>.

HALLAN, S. et al. Metabolomics and Gene Expression Analysis Reveal Down-regulation of the Citric Acid (TCA) Cycle in Non-diabetic CKD Patients. **EBioMedicine**, v. 26, p. 68–77, dez. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352396417304267>>.

HAN, L.-D. et al. Plasma esterified and non-esterified fatty acids metabolic profiling using gas chromatography–mass spectrometry and its application in the study of diabetic mellitus and diabetic nephropathy. **Analytica Chimica Acta**, v. 689, n. 1, p. 85–91, mar. 2011. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267011000961>>.

HANNA, M. H.; BROPHY, P. D. Metabolomics in pediatric nephrology: emerging concepts. **Pediatric Nephrology**, v. 30, n. 6, p. 881–887, 2015.

HOSTEN, A. O. BUN and Creatinine. In: WALKER, H.; HALL, W.; HURST, J. (Ed.). **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory**. 3rd. ed. Boston: Butterworths, 1990. p. 874–878.

HU, M. C. et al. Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 1, p. 124–136, 2011.

HUANG, H. et al. Proteo-metabolomics reveals compensation between ischemic and non-injured contralateral kidneys after reperfusion. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 8539, 4 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-018-26804-8>>.

IRIS, 2019. **International Renal Interest Society**, 2019. Disponível em: <<http://www.iris-kidney.com/>>.

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. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.002>>.

JIMÉNEZ-URIBE, A. P. et al. Involvement of Tricarboxylic Acid Cycle Metabolites in Kidney Diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 9, p. 1259, 24 ago. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/11/9/1259>>.

KALIM, S.; RHEE, E. P. An overview of renal metabolomics. **Kidney International**, v. 91, n. 1, p. 61–69, jan. 2017.

KANG, H. M. et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development. **Nature Medicine**, v. 21, n. 1, p. 37–46, 1 jan. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nm.3762>>.

KDIGO. KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease–Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). **Kidney International Supplements**, v. 7, n. 1, p. 1–59, jul. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2157171617300011>>.

KIDDER, A. C.; CHEW, D. Treatment Options for Hyperphosphatemia in Feline CKD: What's Out there? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 11, p. 913–924, 1 nov. 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1016/j.jfms.2009.09.012>>.

KIND, T. et al. FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 15 dez. 2009. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ac9019522>>.

KING, J. N. et al. Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 5, p. 906–916, set. 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03042.x>>.

KLASSEN, A. et al. Metabolomics: Definitions and Significance in Systems Biology. In: SUSSULINI, A. (Ed.). **Metabolomics: From Fundamentals to Clinical Applications**. [s.l.] Springer International Publishing, 2017. p. 3–17.

KOBAYASHI, T. Metabolomics and Stages of Chronic Kidney Disease. In: PATEL, V. B.; PREEDY, V. R. (Ed.). **Biomarkers in Kidney Disease**. London: Springer, 2015. p. 69–82.

KOCHAN, Z. et al. Dietary Lipids and Dyslipidemia in Chronic Kidney Disease. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3138, 9 set. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6643/13/9/3138>>.

KOGIKA, M. M.; DE MORAIS, H. A. A Quick Reference on Hypokalemia. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 47, n. 2, p. 229–234, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561616301280>>.

KUEHNBAUM, N. L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. New Advances in Separation Science for Metabolomics: Resolving Chemical Diversity in a Post-Genomic Era. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2437–2468, 10 abr. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr300484s>>.

LAFLAMME, D. P. Development and validation of a body condition score system for cats: a clinical tool. **Feline Practice**, v. 25, n. 5, p. 13–18, 1997.

LARSEN, J. A. Controversies in Veterinary Nephrology: Differing Viewpoints. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1095–1098, nov. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561616300481>>.

LAWSON, J. et al. Renal fibrosis in feline chronic kidney disease: Known mediators and mechanisms of injury. **Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 18–26, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.10.009>>.

LEE, J.-E. et al. Systematic biomarker discovery and coordinative validation for different primary nephrotic syndromes using gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1453, p. 105–115, jul. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967316306495>>.

LEGRAND-DEFRETIN, V. Differences between cats and dogs: a nutritional view. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 53, n. 1, p. 15–24, 28 mar. 1994. Disponível em:

<[https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665194000066/type/journal\\_article](https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0029665194000066/type/journal_article)>.

LINDBERG, K. et al. The kidney is the principal organ mediating Klotho effects. **Historic Environment: Policy and Practice**, v. 5, n. 2, p. 210–225, 2014.

LIU, Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 12, p. 684–696, 2011.

LUDWIG, C.; VIANT, M. R. Two-dimensional J -resolved NMR spectroscopy: review of a key methodology in the metabolomics toolbox. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 22–32, jan. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pca.1186>>.

LUND, E. M. et al. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 9, p. 1336–41, 1 maio 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10319174>>.

LUO, S. et al. Serum Metabolomic Alterations Associated with Proteinuria in CKD. **Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN**, v. 14, n. 3, p. 342–353, 2019.

MACHADO, D. **Perfil aminoacídico plasmático e composição corporal de gatos doentes renais crônicos alimentados com dieta formulada com teor de proteína recomendado para gatos em manutenção e baixo fósforo**. 2021. 2021.

MAHBUB, M. H. et al. Relationship of reduced glomerular filtration rate with alterations in plasma free amino acids and uric acid evaluated in healthy control and hypertensive subjects. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 10252, 16 dez. 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-46598-7>>.

MAPELLI, V.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 490–497, set. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779908001807>>.

MARINO, C. L. et al. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 465–472, 2014.

MASTRANGELO, A. et al. From sample treatment to biomarker discovery: A tutorial for untargeted metabolomics based on GC-(EI)-Q-MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 900, p. 21–35, nov. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267015012350>>.

MCGROTTY, Y. Diagnosis and management of chronic kidney disease in dogs and cats. **In Practice**, v. 30, n. 9, p. 502–507, out. 2008. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1136/inpract.30.9.502>>.

MICHEL, K. E. et al. Correlation of a feline muscle mass score with body composition determined by dual-energy X-ray absorptiometry. **British Journal of Nutrition**, v. 106, n. S1, p. S57–S59, 2011.

NAKAGAWA, T. et al. Endogenous Fructose Metabolism Could Explain the Warburg Effect and the Protection of SGLT2 Inhibitors in Chronic Kidney Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 16 jun. 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2021.694457/full>>.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. *Metabonomics*. v. 455, n. October, p. 1054–1056, 2008.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C.; HOLMES, E. “Metabonomics”: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n. 11, p. 1181–1189, 22 jan. 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/004982599238047>>.

NRC. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington, USA: National Academies Press, 2006.

OLIVER, S. G. et al. No Title. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 373–378, 1998.

PARK, R.; RABINOWITZ, L. Effect of Reduced Glomerular Filtration Rate on the Fractional Excretion of Urea in the Dog. **Experimental Biology and Medicine**, v. 132, n. 1, p. 27–29, 1 out. 1969. Disponível em: <<http://ebm.sagepub.com/lookup/doi/10.3181/00379727-132-34139>>.

PARKER, V. J. Nutritional Management for Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 51, n. 3, p. 685–710, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561621000176>>.

PARKER, V. J.; FASCETTI, A. J.; KLAMER, B. G. Amino acid status in dogs with protein-losing nephropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 680–685, 2019.

PLANTINGA, E. et al. Retrospective study of the survival of cats with acquired chronic renal insufficiency offered different commercial diets. **Veterinary Record**, v. 157, n. 7, p. 185–187, 2005. Disponível em: <<http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L41195231>>.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: BARTGES, J.; POLZIN, D. (Ed.). **Nephrology and Urology of Small Animals**. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2011a. p. 433–471.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 41, n. 1, p. 15–30, 2011b.

POLZIN, D. J. Chronic Kidney Disease. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C.; CÔTÉ, E. (Ed.). **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 8th. ed. St Louis: Elsevier, 2017. p. 4693–4734.

POLZIN, D. J.; CHURCHILL, J. A. Controversies in Veterinary Nephrology: Renal Diets Are Indicated for Cats with International Renal Interest Society Chronic Kidney Disease Stages 2 to 4: The Pro View. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1049–1065, 2016.

PRESCOTT, B. A.; WAELSCH, H. Free and Combined Glutamic Acid in Human Blood Plasma and Serum. **J. Biol. Chem.**, 1947.

QUIMBY, J. M. et al. Feline chronic kidney disease is associated with shortened telomeres and increased cellular senescence. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 305, n. 3, p. 295–303, 2013.

REBHOLZ, C. M. et al. Serum metabolites associated with dietary protein intake: results from the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) randomized clinical trial. **The American journal of clinical nutrition**, v. 109, n. 3, p. 517–525, 2019.

REYNOLDS, B. S.; LEFEBVRE, H. P. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors - what do we know? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 1 SUPPL., p. 3–14, 2013.

RHEE, E. P. et al. Variability of two metabolomic platforms in CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 14, n. 1, p. 40–48, 2019.

RIVERA-VÉLEZ, S.-M.; VILLARINO, N. F. Feline urine metabolomic signature: characterization of low-molecular-weight substances in urine from domestic cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 20, n. 2, p. 155–163, 3 fev. 2018.

ROESSNER, U.; BOWNE, J. What is metabolomics all about? **BioTechniques**, v. 46, n. 5, p. 363–365, abr. 2009. Disponível em: <<https://www.future-science.com/doi/10.2144/000113133>>.

ROSHANRAVAN, B. et al. Chronic kidney disease attenuates the plasma metabolome response to insulin. **JCI Insight**, v. 3, n. 16, 23 ago. 2018. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/122219>>.

ROSS, S. J. et al. Clinical evaluation of dietary modification for treatment of spontaneous chronic kidney disease in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 229, n. 6, p. 949–957, 2006.

RUIDERA, E. et al. Fatty Acid Metabolism in Renal Ischemia. **Lipids**, v. 23, p. 882–884, 1988.

SCHERK, M. A.; LAFLAMME, D. P. Controversies in Veterinary Nephrology: Renal Diets Are Indicated for Cats with International Renal Interest Society Chronic Kidney Disease Stages 2 to 4: The Con View. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1067–1094, 2016.



SEGEV, G.; MELTZER, H.; SHIPOV, A. Does Secondary Renal Osteopathy Exist in Companion Animals? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 46, n. 6, p. 1151–1162, nov. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195561616300420>>.

SHAH, V. O. et al. Plasma metabolomic profiles in different stages of CKD. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 8, n. 3, p. 363–370, 2013.

STADLER, K.; GOLDBERG, I. J.; SUSZTAK, K. The Evolving Understanding of the Contribution of Lipid Metabolism to Diabetic Kidney Disease. **Current Diabetes Reports**, v. 15, n. 7, p. 40, 10 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11892-015-0611-8>>.

STEVENS, L. A. et al. Assessing kidney function - Measured and estimated glomerular filtration rate. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 23, p. 2473–2483, 2006. STEVENS, L. A.; LEVEY, A. S. Measurement of kidney function. **Medical Clinics of North America**, v. 89, n. 3, p. 457–473, 2005.

SULIMAN, M. E. et al. Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 2, p. 342–349, 2005.

SUMMERS, S. C. et al. The fecal microbiome and serum concentrations of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate in cats with chronic kidney disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 33, n. 2, p. 662–669, 2019.

SUMMERS, S. C. et al. Serum and Fecal Amino Acid Profiles in Cats with Chronic Kidney Disease. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 2, p. 84, 17 fev. 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2306-7381/9/2/84>>.

SYME, H. M. Proteinuria in Cats. Prognostic marker or mediator? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 3, p. 211–218, 1 mar. 2009. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1016/j.jfms.2009.01.003>>.

TANAKA, A. et al. Comparison of Expression of Glucokinase Gene and Activities of Enzymes Related to Glucose Metabolism in Livers between Dog and Cat. **Veterinary Research Communications**, v. 29, n. 6, p. 477–485, ago. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11259-005-1868-1>>.

TAYLOR, S. S. et al. ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Hypertension in Cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, p. 288–303, 2017.

TITAN, S. M. et al. Metabolites related to eGFR: Evaluation of candidate molecules for GFR estimation using untargeted metabolomics. **Clinica Chimica Acta**, v. 489, n. August, p. 242–248, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898118304510>>.

VADEN, S. L. Glomerular Disease. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 26, n. 3, p. 128–134, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1053/j.tcam.2011.04.003>>.

VALLEJO, M. et al. Plasma fingerprinting with GC-MS in acute coronary syndrome. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 6, p. 1517–1524, 28 jul. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-009-2610-6>>.

VAZIRI, N. D. Dyslipidemia of chronic renal failure: The nature, mechanisms, and potential consequences. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 290, n. 2, p. 262–272, 2006.

VIANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. **Metabolomics**, v. 9, n. S1, p. 144–158, 9 mar. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11306-012-0412-x>>.

VILLAS-BÔAS, S. G. et al. Mass spectrometry in metabolome analysis. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 5, p. 613–646, set. 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.20032>>.

WANG, T. et al. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 15, p. 3683, 27 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/20/15/3683>>.

WANG, W. et al. Glycine metabolism in animals and humans: implications for nutrition and health. **Amino Acids**, v. 45, n. 3, p. 463–477, 25 set. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-013-1493-1>>.

WEI, Q. et al. Changes in Metabolic Profiles during Acute Kidney Injury and Recovery following Ischemia/Reperfusion. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e106647, 5 set. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0106647>>.

WEINER, I. D.; MITCH, W. E.; SANDS, J. M. Urea and Ammonia Metabolism and the Control of Renal Nitrogen Excretion. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 10, n. 8, p. 1444–1458, 7 ago. 2015. Disponível em: <<http://cjasn.asnjournals.org/lookup/doi/10.2215/CJN.10311013>>.

WEISS, R. H.; KIM, K. Metabolomics in the study of kidney diseases. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 1, p. 22–33, 2012.

WERNIMONT, S. M. et al. The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 25 jun. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2020.01266/full>>.

WISHART, D. S. Metabolomics: applications to food science and nutrition research. **Trends in Food Science and Technology**, v. 19, n. 9, p. 482–493, 2008.

YOUNES, H. et al. Fermentable Fibers or Oligosaccharides Reduce Urinary Nitrogen Excretion by Increasing Urea Disposal in the Rat Cecum. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 4, p. 1010–1016, 1995.

ZHANG, A. et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **The Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293–300, 2012a. Disponível em:

<<http://xlink.rsc.org/?DOI=C1AN15605E>>.

ZHANG, J. et al. NMR-based metabolomics study of canine bladder cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1822, n. 11, p. 1807–1814, 2012b.

ZHANG, Z.-H. et al. Metabolomic Signatures of Chronic Kidney Disease of Diverse Etiologies in the Rats and Humans. **Journal of Proteome Research**, v. 15, n. 10, p. 3802–3812, 7 out. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jproteome.6b00583>>.