

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

GUILHERME HENRIQUE COSTA SILVA

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HOMOCISTEÍNA EM CÃES DOENTES RENAIIS
CRÔNICOS**

BELO HORIZONTE

2023

GUILHERME HENRIQUE COSTA SILVA

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE HOMOCISTEÍNA EM CÃES DOENTES RENAIIS
CRÔNICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof^a. Dra. Fabíola de Oliveira Paes Leme

BELO HORIZONTE

2023

S586c Silva , Guilherme Henrique Costa, 1991-
Concentração sérica de homocisteína em cães doentes renais crônicos / Guilherme Henrique Costa Silva. –
2023.

71 f.
Inclui bibliografia e apêndices: f. 56-71.

Orientadora: Fabíola de Oliveira Paes Leme.

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

1- Cão – Teses. 2- Cão – doenças – Teses. I – Leme, Fabíola de Oliveira Paes. II – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III- Título.

CDD – 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUILHERME HENRIQUE COSTA SILVA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovado(a) em 17 de maio de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Fabiola de Oliveira Paes Leme - Orientador(a)

Dr.(a). Julio Cesar Cambraia Veado

Dr.(a). Daniela Bastos de Souza Karam Rosa



Documento assinado eletronicamente por Fabiola de Oliveira Paes Leme, Professora do Magistério Superior, em 19/05/2023, às 11:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniela Bastos de Souza Karam Rosa, Usuário Externo, em 22/05/2023, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Julio Cesar Cambraia Veado, Professor do Magistério Superior, em 22/05/2023, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2270709 e o código CRC F373E214.

AGRADECIMENTOS

Gratidão, um sentimento de grande reconhecimento aos que comigo caminharam e fizeram parte da transposição dos obstáculos nos mais tortuosos caminhos da vida.

Sou extremamente grato à minha orientadora, Profa. Fabiola, por todo apoio nas horas difíceis, por todo o conhecimento compartilhado e por acreditar sempre em minha capacidade de adaptação e desenvolvimento frente aos problemas vivenciados.

Aos meus tios e tias, meus segundos pais e mães, que sempre me incentivaram a continuar voando em busca do conhecimento e qualidade profissional, mesmo quando o pouso parecia a resolução mais fácil.

À minha mãe, minha base e meu espelho, a eterna gratidão por todos os sacrifícios realizados, abdicando dos próprios sonhos para que eu conseguisse obter êxito em minha caminhada profissional.

Ao meu pai, que não mediu esforços e trabalhou “horas a fio” para que tivéssemos a condição de nos dedicar sempre ao estudo.

À minha irmã, minha melhor amiga, com quem pude contar nos momentos difíceis e que foi meu exemplo de resiliência nas adversidades da vida.

Aos meus professores, Júlio, Rubens e Adriane que sempre me forneceram as ferramentas para busca e edificação da excelência científica e técnica.

À Daniela, por todo carinho, presteza e paciência, sem a qual esse projeto jamais teria existido.

Aos meus grandiosíssimos amigos e confidentes, Karen, Pedro e Pollyana por todo o apoio fornecido quando a única opção aparentemente viável era a desistência e me estenderam as mãos para que a jornada se tornasse mais leve.

“Those who are in love with practice without knowledge are like the sailor who gets into a ship without rudder or compass and who never can be certain whether he is going. Practice must always be founded on sound theory, and to this Perspective is the guide and the gateway”.

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

Com o aumento da longevidade dos animais de companhia e a existência de determinadas enfermidades endêmicas que comprometem a função renal de cães e gatos, a doença renal crônica tem se tornado uma condição cada vez mais prevalente na rotina clínica. O diagnóstico precoce é fundamental para a adoção das devidas medidas terapêuticas antes que ocorra perda importante da massa funcional renal. O método atualmente mais utilizado muitas vezes possui baixa correlação com a taxa de filtração glomerular em baixos níveis de disfunção renal, o que retarda o diagnóstico e o sucesso das medidas intervencionistas. Em medicina, os níveis circulantes de homocisteína tem demonstrado uma relação inversamente proporcional ao declínio da função renal, embora na veterinária, o número de trabalhos com esse analito ainda seja escasso. Este trabalho teve por objetivo verificar, através da realização de um ensaio clínico com animais portadores de doença renal crônica, as relações existentes entre as concentrações séricas de homocisteína e a função renal. 5 cães hígidos e 16 portadores de DRC foram admitidos ao estudo e submetidos a avaliação clínica e laboratorial, com os pacientes portadores de DRC avaliados em 4 tempos distintos, sob efeito de tratamento conservador. A concentração de homocisteína foi avaliada em amostras de plasma ao longo desses 4 tempos, constatando-se que esta apresentou-se elevada em pacientes portadores de DRC em relação aos pacientes hígidos e que quanto maior era o estágio da doença maiores eram os valores de hiperhomocisteinemia. Tal achado evidencia o potencial da utilização dessa molécula como biomarcador de disfunção renal.

Palavras-chave: *Sobrevivência; biomarcador; Filtração; prognóstico*

ABSTRACT

With the increase in the longevity of companion animals and the existence of certain endemic diseases that compromise the renal function of dogs and cats, chronic kidney disease has become an increasingly prevalent condition in the clinical routine. Early diagnosis is essential for the adoption of appropriate therapeutic measures before significant loss of renal functional mass. The currently most used method often has low correlation with the glomerular filtration rate at low levels of renal dysfunction, which delays the diagnosis and the success of interventional measures. In medicine, circulating levels of homocysteine have been shown to be inversely proportional to declining renal function, although in veterinary medicine, the number of works with this analyte is still small. This work aims to verify, through a clinical trial with animals with chronic kidney disease, the relationships between plasma concentrations of homocysteine and kidney function. 5 healthy dogs and 16 with CKD were admitted to the study and submitted to clinical and laboratory evaluation, with patients with CKD evaluated at 4 different times, under the effect of conservative treatment. The concentration of homocysteine was evaluated in plasma samples over these 4 times, showing that it was higher in patients with CKD compared to healthy patients and that the higher the stage of the disease, the higher the levels of hyperhomocysteinemia. This finding highlights the potential use of this molecule as a biomarker of renal dysfunction.

Palavras-chave: *Survival; Prognosis; Filtration; biomarker.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo esquemático do metabolismo da metionina e homocisteína.....	20
Figura 2. Efeitos da homocisteína no metabolismo celular e sua relação com o estresse oxidativo.	22

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representação gráfica da distribuição dos animais dentro dos diferentes grupos	33
Gráfico 2. Representação gráfica da distribuição dos pacientes em relação ao sexo	33
Gráfico 3. Comportamento da média estimada da concentração de homocisteína sérica (mmol/L) em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da homocisteína (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.	35
Gráfico 4. Média estimada das concentrações de homocisteína nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.....	36
Gráfico 5. Representação gráfica da média das concentrações de homocisteína nos diferentes tempos entre os grupos 1 (vermelho) e 2 (azul).	37
Gráfico 6. Comportamento da média estimada da da relação SDMA:Proteína total em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da relação SDMA:Proteína total dos cães do grupo controle no tempo 1.....	38
Gráfico 7. Média estimada da relação SDMA:Proteína total nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.....	39
Gráfico 8. Comportamento da média estimada da relação RPCU:Densidade urinária em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da relação RPCU:Densidade dos cães do grupo controle no tempo 1.	40
Gráfico 9. Média estimada da relação RPCU:Densidade urinária nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.....	40
Gráfico 10. A. A. Correlação total entre os níveis de creatinina e homocisteína. B. Correlação entre os níveis de creatinina e homocisteína para os grupos 1 e 2. C. Variação das correlações entre creatinina e homocisteína ao longo dos tempos.	433
Gráfico 11. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e SDMA. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e SDMA para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e SDMA ao longo dos tempos.....	455

Gráfico 12. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e fósforo. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e creatinina para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e a creatinina ao longo dos tempos.....	45
Gráfico 13. <i>Representação gráfica da média das densidades urinárias nos diferentes tempos entre os grupos 1 (azul) e 2 (vermelho).</i>	47
Gráfico 14. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e densidade urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e densidade urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e densidade urinária ao longo dos tempos...48	
Gráfico 15. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RPC urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RPC urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RPC urinária ao longo dos tempos.	49
Gráfico 16. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e TAS plasmático. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e TAS plasmático para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e TAS plasmático ao longo dos tempos.	51
Gráfico 17. . A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e TAS urinário. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e TAS urinário para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e TAS urinário ao longo dos tempos.....	52
Gráfico 18. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RANSEL urinário. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RANSEL urinário para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RANSEL urinário ao longo dos tempos. ..	55
Gráfico 19. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RANSOD urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RANSOD urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RANSOD urinária ao longo dos tempos. .	54

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estágios da doença renal crônica em cães e gatos, baseados nas concentrações séricas de creatinina e SDMA (dimetilarginina simétrica), segundo a IRIS (2023).	16
Quadro 2. Subestadiamento do DRC de acordo com os níveis de proteinúria, segundo a IRIS (2023).	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos e medianas) dos biomarcadores dos 16 cães portadores de DRC em todos os tempos.	34
Tabela 2. Efeito global do estádio, do tempo e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância.	35
Tabela 3. Dados da estatística descritiva para a homocisteína nos diferentes grupos e tempos.	36
Tabela 4. Efeito global do estádio, do tempo e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância para a relação SDMA:Proteína total.	38
Tabela 5. Efeito global do estádio, do tempo e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância para a relação RPCU:Densidade urinária.....	40
Tabela 6. Correlações entre os biomarcadores e a homocisteína avaliados no estudo.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

ADNT	Adenosil-transferase
B6	Vitamina B6
B9	Vitamina B9
B12	Vitamina B12
CBS	Cistationa β -sintase
DRC	Doença renal crônica/Doente renal crônico
EO	Estresse oxidativo
EROS	Espécimes reativas de oxigênio
GC	Grupo controle
GFI	Glicosil fosfatidil inositol
GPX	Glutationa peroxidase
Hcy	Homocisteína
hHcy	Hiperhomocisteinemia
IL-8	Interleucina 8
IRIS	Sociedade internacional de interesse renal
Met	Metionina
MT	Metalotioneína
MTHFR	Metilenotetrahidrafolato-redutase
NO	Óxido nítrico
NTHF	5-N-Tetrahidrofolato
QMCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
RPCU	Relação proteína/creatinina urinária
SAHH	S- adenosilhomocisteinase
SAM	S-adenosil metionina
SDMA	Dimetil arginina assimétrica
TFG	Taxa de filtração glomerular
tHcy	Homocisteína total

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1.1 CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA.....	15
1.2 A HOMOCISTEÍNA.....	18
1.2.1 Origem da molécula.....	18
1.2.2 Interpretação das concentrações de homocisteína.....	21
1.2.3 O estresse oxidativo e a doença renal crônica.....	23
1.2.4 A doença renal crônica e sua relação com as concentrações de homocisteína	24
2. HIPÓTESE	28
3. OBJETIVOS.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 ANIMAIS.....	28
4.2. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA	30
4.2.1 EXAME FÍSICO	30
4.2.2 EXAMES LABORATORIAIS	30
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 HOMOCISTEÍNA	35
5.2 SDMA:PROTEÍNA TOTAL.....	38
5.2 RPCU:Densidade urinária	39
5.4 CORRELAÇÕES ENTRE PARES DE VARIÁVEIS	41
6. CONCLUSÕES:	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:.....	56
ANEXOS:.....	71

1. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é a desordem renal mais comum em cães e gatos, com o número de animais de companhia portadores da condição aumentando à medida do aumento da longevidade. Com a redução no número de néfrons funcionais, os néfrons remanescentes autoperpetuam a lesão por atuarem em sobrecarga de função, conferindo à DRC um caráter de cronicidade e progressão (Ettinger & Feldman, 2005; Ruiz-Ortega et al., 2020).

A identificação precoce e a introdução de práticas terapêuticas que visam proporcionar a adequada renoproteção tem sido um ponto importante na obtenção de melhor prognóstico e qualidade de vida para os pacientes. Entretanto, o tratamento utilizado é apenas conservativo e visa retardar a progressão natural das lesões renais, não promovendo restauração funcional total. Os métodos atualmente utilizados para sua identificação podem pecar pela baixa sensibilidade em estágios iniciais de disfunção renal ou acessibilidade, com retardo no diagnóstico e consequências indesejáveis no resultado clínico.

Assim, a identificação de marcadores cada vez mais precoces e que possam facilmente ser incorporados na rotina clínica, de forma isolada ou em conjunto com outros analitos, pode permitir intervenções terapêuticas em estágios iniciais da doença e, conseqüentemente possibilitarem um maior tempo de preservação da função renal remanescente.

A homocisteína (Hcy), um aminoácido não essencial derivado do metabolismo da metionina, tem sido relacionada, na medicina, como um bom biomarcador de função renal, embora o mecanismo responsável por essa associação ainda não seja completamente elucidado. Sabe-se que pacientes portadores de DRC, mesmo em baixos níveis de disfunção, já apresentam tendência em se apresentarem hiperhomocisteinêmicos, com os acréscimos proporcionais, em intensidade, ao grau de declínio na função renal.

Em medicina veterinária, entretanto, o número de trabalhos existentes ainda é escasso e sequer existem valores de referência estabelecidos para sua concentração em animais hígidos. Assim como na medicina, existem estudos que correlacionam a hiperhomocisteinemia ao maior risco do desenvolvimento de alterações cardíacas, mas ainda não esclarecem a relação do analito à condição renal do paciente.

Dado o potencial da utilização da homocisteína como indicador precoce de disfunção renal, o objetivo desse trabalho é demonstrar que existe correlação entre a doença renal crônica, o declínio da função renal e a concentração de homocisteína sérica.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 CARACTERIZAÇÃO E DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

A doença renal crônica (DRC) é a desordem renal mais comum em cães e gatos, sendo caracterizada pela perda permanente e progressiva do número de néfrons funcionais e consequente declínio de função renal. A prevalência na população de cães é estimada em 0,5 a 1%, enquanto em gatos a prevalência é maior, variando entre 1 a 3%. Animais mais velhos apresentam as maiores prevalências, com taxas próximas aos 80% na população de gatos geriátricos (Polzin, 2010; Marino et al., 2014).

A progressão natural da doença ou a piora sustentada da função renal ao longo do tempo, é uma característica da DRC na maioria dos animais, mas sua patogênese ainda permanece indefinida. Múltiplos fatores de risco são documentados, tais como: idade, proteinúria, endemia de certos agentes infecciosos, doenças cardíacas e predisposição racial. A falha na eliminação desses e outros fatores pode ser uma explicação para a progressividade da doença. Também, como os néfrons remanescentes executam suas funções em sobrecarga de trabalho, para compensação dos perdidos de forma irreversível, desencadeiam um mecanismo de troca de danos contínuos, autoperpetuador da lesão renal (Coweggil et al., 2016; Ettinger & Feldman, 2017).

Considerando-se a natureza crônica e progressiva da doença, muitos pacientes necessitam de tratamentos vitalícios que visam retardar a velocidade da progressão das lesões renais. O prognóstico é intrinsecamente relacionado à fase em que a doença é diagnosticada e o momento em que o tratamento conservativo é instituído, de tal forma que quanto mais precocemente se inicia a terapia, mais favorável é o prognóstico. Entretanto, o quadro muitas vezes só é evidenciado em estágio mais avançado da doença, quando a perda de massa funcional renal já é importante, o que resulta em menor eficácia terapêutica e/ou redução na qualidade de vida e longevidade dos pacientes. Isso ocorre pela característica silenciosa da doença ou pela utilização de métodos diagnósticos com baixa sensibilidade, especialmente adotados em estágios iniciais da doença (Pressler, 2015). Assim, a utilização de marcadores de disfunção renal cada vez mais sensíveis e

precoces, isto é, capazes de identificar o doente renal crônico em estágios iniciais, tem sido um ponto chave no tratamento da condição (Barllet et al., 2010; Roudebush et al., 2010; Sargent, 2020).

Atualmente, o estadiamento da DRC é realizado com base em uma classificação proposta pela sociedade internacional de interesse renal (IRIS, 2023). Há quatro classificações propostas (quadro 1), baseadas na avaliação, em dois momentos distintos e em pacientes estáveis e normohidratados, das concentrações séricas de creatinina e/ou da dimetilarginina assimétrica (SDMA). O sistema de classificação é utilizado como guia para definição das intervenções terapêuticas e determinação prognóstica dos pacientes, de tal forma que quanto maior o grau da doença, pior é o prognóstico e o sucesso terapêutico. Como os sinais característicos da DRC não são comuns nos estádios iniciais, para se alcançar o diagnóstico precoce, a identificação de fatores de risco para o desenvolvimento da doença, obtida pela análise do histórico clínico do paciente e presença de doenças concomitantes, é um ponto fundamental (Syme, 2019).

Quadro 1. Estágios da doença renal crônica em cães e gatos, baseados nas concentrações séricas de creatinina e SDMA (dimetilarginina simétrica), segundo a IRIS (2023).

Concentração sérica para cães				
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 4
Creatinina (mg/dL)	< 1,4	1,4 – 2,8	2,9 – 5,0	> 5,0
SDMA (µg/dL)	< 18	18 - 35	36 – 54	> 54
Concentração sérica para gatos				
	Estágio 1	Estágio 2	Estágio 3	Estágio 4
Creatinina (mg/dL)	< 1,6	1,6 – 2,8	2,9 – 5,0	> 5,0
SDMA (µg/dL)	< 18	18 - 25	26-38	> 38

Ainda, a IRIS propõe um sistema de subestadiamento baseado em níveis de proteinúria apresentados pelo paciente (quadro 2). A presença persistente de concentrações proteicas na urina em valores acima do normal constitui uma condição patológica e que pode desencadear quadros de hipoalbuminemia. Além disso, em animais azotêmicos ou não, a ocorrência de proteinúria tem demonstrado forte correlação com menor taxa de sobrevivência tanto em gatos quanto em cães. Dessa forma, o subestadiamento de pacientes através da avaliação da relação proteína/creatinina urinária (RPCU) é de suma importância para a consideração das intervenções

terapêuticas a serem adotadas (Wehner et al., 2008; Littman, 2011; Hokamp et al., 2016; Vaden & Elliot, 2016; Meindl et al., 2018). O teste padrão-ouro para avaliação da proteinúria é a relação proteína/creatinina urinária (RPCU), principalmente por apresentar, mesmo com uma única amostra de urina, uma boa correlação com a quantificação de proteínas eliminadas na urina de amostras ao longo de 24 horas (Harley & Langston, 2012).

Quadro 2. Subestadiamento do DRC de acordo com os valores de proteinúria, segundo a IRIS (2023).

Relação proteína: creatinina urinária		Subestádio
Cães	Gatos	
< 0.2	< 0.2	Não proteinúrico
0.2 a 0.5	0.2 a 0.4	Proteinúrico limítrofe
> 0.5	> 0.4	Proteinúrico

A estimativa da taxa de filtração glomerular (TFG) é considerada o padrão-ouro para avaliação da função renal, uma vez que se correlaciona de forma proporcional à massa renal funcional (Pressler, 2015). Apesar de a mensuração direta da TFG ser difícil, sua avaliação se torna possível através da utilização de biomarcadores com os quais se correlaciona. Usualmente, a creatinina é utilizada como o principal biomarcador de função renal na rotina clínica, mas apresenta baixa correlação com a TFG, quando os pacientes apresentam baixos níveis de disfunção renal. Além disso, a influência da massa magra em sua concentração sérica dificulta ainda mais a interpretação em pacientes com baixo escore corporal, como os geriátricos, e/ ou que apresentem alterações sutis na TFG. Tais fatos resultam no atraso da detecção da DRC, uma vez que, quando ocorrem elevações em sua concentração, já ocorreu uma perda importante no número de néfrons funcionais. Como a adoção de medidas terapêuticas em estágios iniciais pode retardar a progressão da doença, além de aumentar as chances de identificação da causa da disfunção, o que influencia diretamente no prognóstico, a busca por biomarcadores mais sensíveis que possam ser utilizados para identificação precoce e monitoração desses pacientes é justificável (Braun et al., 2003; Ettinger & Feldman, 2005; Nabity et al., 2015; Sargent et al., 2020).

A SDMA é um biomarcador relativamente recente cujas concentrações séricas variam de acordo com alterações na taxa de filtração glomerular, uma vez que sua depuração ocorre quase que exclusivamente por via renal. Isso, somado ao fato de que parece sofrer mínima influência de alterações extra renais, a torna um marcador da TFG

em potencial. Essa substância deriva da metilação intranuclear da L-arginina e é liberada na circulação após a proteólise (Nabity et al., 2015). Além de ser mais precoce na identificação de declínios iniciais na função renal, a SDMA não sofre interferência da quantidade de massa magra do paciente e varia pouco em relação às diferentes raças. Apesar disso, seu papel como ferramenta de monitoramento na progressão da DRC ainda não se encontra estabelecido, com possibilidade de interferência de fatores como a dieta e a taxa de renovação proteica em suas concentrações (Sargent et al., 2020).

Em felinos, já se demonstrou que a presença de endocrinopatias, como o hipertireoidismo, influenciam de forma menos significativa as concentrações de SDMA do que as de creatinina (Szlosek et al., 2020). Entretanto, concentrações significativamente mais baixas de SDMA são encontradas em gatos portadores de diabetes mellitus e sem DRC (Langhorn et al., 2017). Em cães portadores de hipotireoidismo, condição que afeta negativamente a TFG, os níveis de SDMA podem se encontrar normais, mesmo com elevações claras nas concentrações de creatinina, colocando em dúvida o valor da SDMA como biomarcador confiável em cães com disfunções tireoidianas (Di Paola et al., 2020).

1.2 A HOMOCISTEÍNA

1.2.1 Origem da molécula

A Homocisteína (Hcy) é um metabólito sulfurado, produzida de forma endógena através da desmetilação da metionina, a única fonte da qual deriva, e é fundamental para manutenção da homeostase celular. Seu metabolismo contribui para a ocorrência de duas vias metabólicas: a remetilação dependente ou não de folato e a transulfuração pela cistationa, com formação de metionina e cisteína, respectivamente. Nas duas vias, as vitaminas do complexo B desempenham um importante papel, participando como cofatores enzimáticos, especialmente as vitaminas riboflavina (B₂), piridoxina (B₆), folato (B₉) e cobalamina (B₁₂), além de enzimas, cujas produções são reguladas por fatores genéticos (Kumar et al., 2017; Finkesltein & Martin, 2000; Koklesova et al., 2021).

Ambas as vias metabólicas são reguladas pela S-adenosilmetionina (SAM), que, além de atuar como um doador universal de grupamentos metil (-CH₃) e coenzima na transmetilação da He, é um inibidor alostérico da enzima metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) e ativador da Cistationa β-sintase (CBS). Dessa forma, por ativar ou

inibir a atividade dessas enzimas, concentrações elevadas de SAM evitam o acúmulo celular de homocisteína e concentrações reduzidas resultam em aumento das concentrações de homocisteína, podendo levar a quadros de hiperhomocisteinemia (Kumar et al., 2017; Koklesova et al., 2021).

A partir da metionina (Met), um aminoácido essencial obtido através da alimentação ou da quebra de proteínas endógenas, as moléculas de SAM são obtidas na reação enzimática catalisada pela enzima adenosil-transferase (ADNT). Após sua síntese, a SAM doa seu grupamento metil a uma variedade de moléculas denominadas receptoras de metil, dando origem a compostos metilados e à S-adenosil homocisteína (SAH). A molécula de SAH, então, sofre deadenilação, processo mediado pela enzima S-adenosil hidrolase, com formação do aminoácido homocisteína. A He resultante pode ser metabolizada pela via da remetilação, especialmente em estados em que as concentrações de Met estão reduzidas, processo que pode ser catalisado por duas enzimas distintas: a metionina sintase, que se utiliza do grupamento metil do 5- N tetrahidrofolato (5 NTHF) em reação dependente da vitamina B₁₂, ou a betaina homocisteína S-metiltransferase, que utiliza a betaína como doadora de metil. Apesar de o 5 NTHF ser a principal fonte dos grupamentos metil na remetilação da He, a betaína e a colina também podem atuar como fontes doadoras. Ainda, a He pode sofrer transulfuração, reação catalisada pela CBS na presença de concentrações adequadas de Met, produzindo o aminoácido cisteína. Alternativamente, a homocisteína pode se recombinar com a serina para formar cistationina, reação catalisada pela CBS com dependência da B₆ (McCully, 2015; Kumar et al., 2017).

A presença de aparato enzimático e seus cofatores em concentrações adequadas é fundamental para a ocorrência das vias metabólicas das quais a He participa. Dessa maneira, mutações genéticas nos genes que codificam as enzimas responsáveis pelas reações de remetilação ou transulfuração podem resultar em formas severas de hiperhomocisteinemia, enquanto a deficiência das vitaminas B₆, B₉ e B₁₂, de forma isolada, geralmente causam elevações mais discretas (Perry et al., 1995). Há estudos que indicam que países que não contam com políticas de suplementação dietética de ácido fólico, apresentam maiores prevalências de hiperhomocisteinemia, dado a sua importância no metabolismo desse aminoácido (Hao et al., 2003).

Ao contrário da metionina, a homocisteína é um aminoácido não essencial, mas que possui um papel importante no crescimento, pois pode ser convertida em Met, via remetilação, na ausência de metionina dietética. A cisteína, por sua vez, não fornece

suporte ao crescimento, pois não pode ser reconvertida em Met, uma vez que a reação química da qual resulta é irreversível (McCully, 2015). A figura 1 ilustra o esquema de produção da homocisteína.

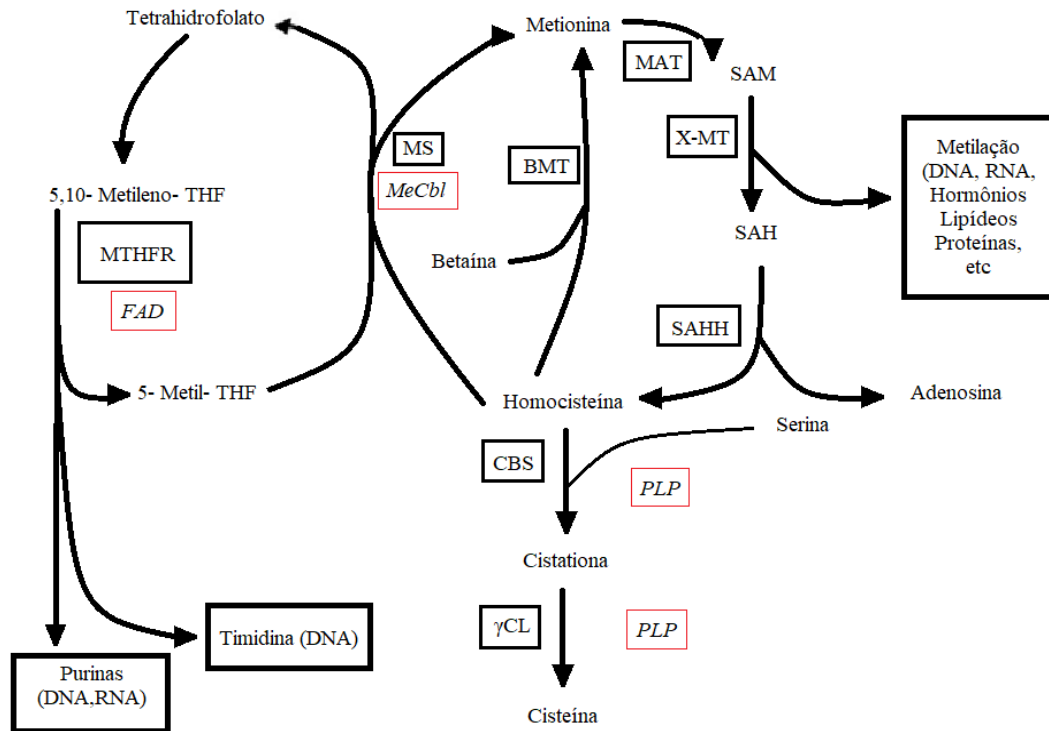


Figura 1. Resumo esquemático do metabolismo da metionina e homocisteína. As caixas delimitadas por maior espessura de linha relacionam-se às enzimas, enquanto as com linha fina demonstram os cofatores enzimáticos. X-MT, metiltransferases dependentes de AdoMet; SAHH, S-Adenosilhomocisteína hidrolase; MS, metionina sintase; BMT, betaína metiltransferase; MTHFR, metileno-tetrahydrofolato redutase; CBS, cistationa β-sintase; γCL, γ-cistationase; MeCbl, metilcobalamina; FAD, flavina adenina dinucleotídeo; PLP, piridoxal 5'-fosfato. Adaptado de Fowler, 2005.

A homocisteína circulante total (tHcy) é definida como a soma de todas as formas de He presentes no plasma sanguíneo, o que inclui as formas que circulam livremente e as ligadas entre si ou às proteínas plasmáticas (Long & Nie, 2016; Perna & Ingrassio, 2019). Uma vez produzida no meio intracelular, seu excesso é liberado na corrente sanguínea de forma ativa. Cerca de 80% da tHe encontra-se oxidada e é transportada ligada a proteínas plasmáticas, especialmente à albumina. Menos de 1% encontra-se em sua forma livre e 10% circulam em uma forma dissulfídica, em que duas moléculas de He se encontram ligadas por pontes de enxofre. A concentração plasmática de tHe é dependente do equilíbrio existente entre a velocidade com que é produzida, a taxa de

metabolização pelas vias de remetilação e transulfuração, e a sua taxa de remoção (Ueland et al., 1993; Long & Nie, 2016; Hermman & Sitdikova, 2021).

Em ratos, o tecido renal desempenha importante papel na metabolização da He, especialmente pela via de transulfuração, sendo os rins indicados como o principal sítio para remoção e metabolização da He circulante (Bostom et al., 1995; House et al., 1997). Há relatos de que em humanos, as enzimas relacionadas ao metabolismo da He apresentam grandes concentrações no tecido renal e hepático (Finkelstein, 1990), mas não foram encontradas referências em animais domésticos ou na medicina veterinária .

1.2.2 Interpretação das concentrações de homocisteína

A hiperhomocisteinemia (hHcy) é definida como uma elevação das concentrações plasmáticas de tHe, isto é, da soma de todas as formas de Hcy existentes no plasma sanguíneo. Em humanos, tais elevações estão mais comumente relacionadas à deficiência de componentes que atuam diretamente em suas vias metabólicas, principalmente as vitaminas do complexo B, importantes cofatores das enzimas participantes dessas reações. Além disso, defeitos genéticos que implicam em prejuízos à síntese de enzimas que catalisam as reações envolvidas em seu metabolismo, idade, sexo, estilo de vida e doença renal crônica são apontadas como causas de hiperhomocisteinemia (Nerbas et al., 2005; Neves et al., 2009; Long & Nie, 2016).

Enquanto em humanos a hHcy é classificada quanto à intensidade em leve, moderada e severa, em medicina veterinária nem mesmo os níveis de referência se encontram bem estabelecidos, com poucos estudos relacionados ao tema (Friedman et al., 2001; Suematsu et al., 2006; Lee & Hyun, 2012; Lee et al., 2017).

Em medicina, a Hcy é considerada um fator independente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, sendo conhecida a forte relação existente entre a hHcy e fatores preditores de desenvolvimento de placas ateromatosas. Ainda, foi demonstrado que os baixos níveis de homocisteína, obtidos após suplementação com vitamina B₁₂, em pacientes sem doença renal, reduz de forma significativa o risco de ocorrência de paradas cardíacas. Acredita-se que esse achado, em parte, explique a relação existente entre doenças renais crônicas e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Spence, 2013; Spence et al., 2016). Entretanto, os alvos celulares da Hcy cuja interação resultavam em disfunção celular e contribuía para os quadros de aterosclerose não eram completamente compreendidos, até se demonstrar o seu efeito

no interior das células endoteliais (Barbato et al., 2007; Colgan & Austin, 2007).

A metalotioneína (MT) representa um tipo de proteína intracelular atuante nos processos de detoxificação de metais pesados, regulação do metabolismo de metais como o cobre e zinco, além da participação na eliminação de espécies reativas de oxigênio- EROs (Palmiter, 1998; Li et al., 2004). Embora, devido à alta afinidade, a MT constitua o principal sítio de metabolização do zinco, ele ainda pode ser liberado pelas vias de sinalização do óxido nítrico (NO) e pela molécula oxidada de glutatona, mas em quantidades menores. As moléculas de MT são fundamentais no equilíbrio redutor de oxidação (redox), na sinalização do NO e homeostase do zinco. Dado a importância do zinco na transdução de sinais intracelulares, a redução em sua capacidade de ligação poderia prejudicar de forma deletéria vários processos celulares. Nesse ponto, a Hcy determina, ao interagir com a MT, prejuízos à expressão proteica e remoção de radicais livres intracelulares (Maret, 1994; Jiang et al., 1998; Maret & Vallee, 1998). Além disso, a molécula de Hcy é responsável por reduzir a biodisponibilidade do NO de forma direta e indireta pela redução na atividade intracelular da enzima antioxidante glutatona peroxidase (GPX), o que eleva os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) contribuindo ainda mais para um estado de estresse oxidativo e redução da biodisponibilidade de NO (Upchurch et al., 1997). O resumo esquemático do efeito da Hcy sobre o estresse oxidativo se encontra na figura 2.

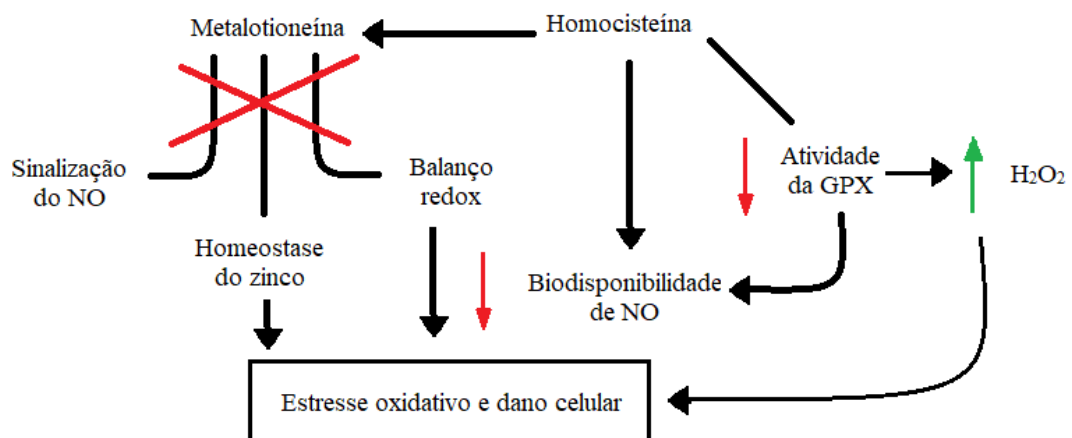


Figura 2. Efeitos da homocisteína no metabolismo celular e sua relação com o estresse oxidativo. NO, óxido nítrico; GPX, glutatona peroxidase, H_2O_2 , peróxido de hidrogênio

A hipótese de que o grupamento químico tiol, presente em aminoácidos como a homocisteína e cisteína, é facilmente oxidado e forma as EROs, responsáveis pelos efeitos citotóxicos da Hcy, é refutável, uma vez que esse efeito é apenas observado com a Hcy, não se verificando a ocorrência de injúria às células endoteliais com a cisteína, presente no plasma em concentrações muito maiores do que a Hcy (Colgan & Austin, 2007).

Em cães, a hHcy é apontada como deletéria para a função cardíaca, induzindo a mudanças hemodinâmicas e na função ventricular ao reduzir a biodisponibilidade do NO (Suematsu et al., 2007). Foi determinada a existência de correlação positiva entre os níveis plasmáticos de Hcy e o grau de doença mixomatosa da valva mitral (DMVM) (Lee et al., 2017). Também, já se foi demonstrado que os níveis de Hcy se apresentam elevados em cães com doenças cardiovasculares e renais (Rossi et al., 2008).

Estudos indicam que existem diferenças nos níveis de homocisteína, quando se considera fatores como raça, sexo e castração (especialmente em fêmeas), mas a idade parece ser um fator de menor importância. Ainda, as concentrações de Hcy se encontram elevadas nas mais diversas enfermidades, como neoplasias, doenças cardíacas e renais em cães e gatos (Trisolini et al., 2008; Kakimoto et al., 2014).

Em cães, a ausência de jejum prévio à coleta da amostra sanguínea para análise e o tipo de dieta usualmente ingerida pelo paciente parecem não influenciar os níveis plasmáticos de Hcy (Fokkema et al., 2003; Kakimoto et al., 2014).

1.2.3 O estresse oxidativo e a doença renal crônica

A geração de radicais livres resulta de um processo contínuo e fisiológico para o desempenho das funções vitais do organismo. No metabolismo, esses radicais atuam como substâncias que antecedem outras em uma sequência metabólica para a transferência de elétrons em uma série de reações químicas. A produção dessas substâncias em uma proporção adequada, possibilita a geração de energia através da fosforilação oxidativa, além destas atuarem em mecanismos de defesa durante os processos infecciosos e inflamatórios. Entretanto, quando há produção excessiva dessas substâncias ou há desequilíbrio no contrabalanço antioxidante, essa elevação relativa de substâncias altamente reativas gera danos oxidativos às células e aos próprios tecidos (Ferreira & Matsubara, 1997; Colliti et al., 2019).

Para se evitar os danos da formação de EROs, os mecanismos antioxidantes endógenos constituem sistemas de autodefesa com uma participação crucial na manutenção da integridade celular e são ativados quando o estresse oxidativo não pode ser contrabalanceado, sendo responsáveis por retardar processos metabólicos e até mesmo interromper ciclos celulares para se evitar mais danos oxidativos (Fuente, 2002).

Os rins recebem cerca de 25% do débito cardíaco e suas células são ricas em mitocôndrias, o que o torna muito suscetível a danos resultantes da superprodução de radicais livres, uma vez que estas constituem a maior fonte de EROs do organismo (Sureshbabu et al., 2015). Há múltiplos mecanismos que protegem os rins contra danos oxidativos desencadeados por EROs, sendo eles representados por componentes enzimáticos como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), óxido nítrico sintetase (NOS) e por compostos não enzimáticos (Aruna e Devi, 2014).

Sabe-se que as alterações morfológicas e funcionais renais na DRC contribuem para o estabelecimento de um estado de estresse oxidativo local e sistêmico, que tende a se agravar com a progressão da doença (Brown, 2008). Como a quantificação direta das EROs é difícil, uma vez que estas possuem curto tempo de meia vida e reagem facilmente com outras moléculas do organismo, avaliar as substâncias que fazem parte do sistema antioxidante de defesa constitui uma alternativa viável de avaliação do estresse oxidativo. (Ling & Kuo, 2008).

O estado antioxidante total (TAS) fornece informações sobre o estado antioxidante geral do organismo, podendo incluir antioxidantes ainda não reconhecidos ou não facilmente mensuráveis. Níveis reduzidos de TAS indicam a ocorrência de estresse oxidativo e maior susceptibilidade a danos oxidativos (Janion et al., 2022). Ainda, em pacientes DRC, com o estado de estresse oxidativo, há regulação para baixo dos níveis de SOD e atenuação da atividade da GPX, o que contribuiu para a superposição do estado oxidante frente ao antioxidante e danos oxidativos às células renais (Ratliff et al., 2016).

1.2.4 A doença renal crônica e sua relação com as concentrações de homocisteína

Em média, 85% a 100% dos pacientes humanos com doença renal crônica apresentam quadro de hHcy, com valores entre 3 a 5 vezes maiores em pacientes com doença renal em estágio terminal (Nie & Long, 2016; Cianciolo et al., 2017).

Apesar de a associação entre hHcy e o risco de desenvolvimento de complicações cardiovasculares ser conhecida, sua relação com a doença renal crônica ainda é motivo de discussão. Estudos atuais demonstram que a hHcy pode ser tanto resultante quanto perpetuadora da progressão da DRC. A redução no metabolismo e excreção renal resultam na elevação das concentrações de hHcy. Essa elevação gera danos vasculares, induz a um estado de EO e antagoniza as propriedades vasodilatadoras do NO, gerando ainda mais disfunção endotelial. Após o dano oxidativo, as células endoteliais produzem citocinas pró-inflamatórias, especialmente a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (QMCP-1), contribuindo para a amplificação do estado inflamatório presente em pacientes portadores de DRC. Acredita-se que a Hhe gera dano às células renais, por mecanismo semelhante ao que ocorre nas células endoteliais (Koning & Hu, 2010; Cianciolo et al., 2017).

Como a homocisteína é transportada, em maior parte, ligada a proteínas plasmáticas, em especial a albumina, uma pequena fração de sua concentração total encontra-se disponível para a filtração glomerular. Dessa maneira, a hipótese de que a taxa de filtração glomerular prejudicada é o principal determinante da concentração de Hcy circulante é refutada, uma vez que macromoléculas, em condições normais, não são filtradas pelos rins. Ainda, foi demonstrado através de ensaios imunoenzimáticos, que a excreção renal de homocisteína é insignificante (Refsum et al., 1985; Togawa et al., 2000; Perna et al., 2004; Cohen et al., 2019).

Em medicina, pacientes com doença renal tendem a apresentarem hHcy, mesmo em baixos níveis de disfunção renal, apesar dos mecanismos por trás desse estado ainda não se encontrarem completamente elucidados. Acredita-se que o tecido renal desempenhe importante papel no metabolismo desse aminoácido e a perda de massa renal, que acompanha os quadros de DRC, seja o fator determinante da elevação em suas concentrações. Tal fato é reforçado pela observação de que o tratamento usualmente eficaz realizado para os quadros de hiperhomocisteinemia, através da suplementação de vitaminas do complexo B, não ser tão efetivo em pacientes portadores de DRC quando comparados aos demais pacientes. Isso pode, em parte, ser explicado pelo fato de que, apesar da vitamina B₁₂ ser necessária para corrigir a remetilação da homocisteína, sua suplementação em pacientes portadores de DRC pode gerar acúmulo e ocorrência de efeitos tóxicos (Soria et al., 1990; Nerbas et al., 2005; Long & Nie, 2016).

Estudos mais antigos, defenderam a hipótese de que a TFG é a principal determinante no aumento das concentrações circulantes de homocisteína, através da

realização de comparações entre a TFG estimada e os valores circulantes de Hcy de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo I e de pacientes portadores de DRC. Enquanto os diabéticos, em decorrência da doença, apresentavam maior TFG e menores níveis séricos de Hcy, o oposto era verificado em pacientes portadores de DRC, com a TFG reduzida, estabelecendo-se uma correlação negativa entre Hcy e a TFG (Hultberg et al., 1993; Arnadottir et al., 1996; Wollesen et al., 1999; Aksoy et al., 2006). Ainda, evidenciou-se que pacientes portadores de insuficiência renal apresentavam altos riscos de desenvolverem hiperhomocisteinemia, independentemente das concentrações séricas de vitamina B (Francis et al., 2004). Entretanto, há estudos que afirmam que a excreção renal de Hcy é insignificante, uma vez que, de sua pequena fração filtrada, quase a totalidade é reabsorvida pelas células tubulares renais, e propõem que os principais fatores associados aos quadros de hiperhomocisteinemia no DRC sejam resultantes da redução do metabolismo renal de Hcy, deficiências de vitaminas do complexo B (B₆, B₉ e B₁₂) e diminuição no metabolismo extra-renal de Hcy devido ao quadro de uremia (Soria et al., 1990; Nerbas et al., 2005). Também, a análise do gradiente arteriovenoso ao longo das artérias e veias renais de pacientes hiperhomocisteinêmicos, não demonstrou diferença nas concentrações de Hcy, reforçando a ideia de que a TFG não desempenha papel direto e importante na depuração de Hcy (Garibotto, 2003; Van Gulder, 2005).

Como um dos fatores responsáveis pela determinação das concentrações plasmáticas de Hcy é a velocidade com que é metabolizada, há a teoria de que as substâncias azotêmicas oriundas de quadros de disfunção renal inibem o metabolismo extrarenal de Hcy e ocasionam a hHcy. Sabe-se que a remoção metabólica da Hcy tanto pela via de remetilização, quanto pela via de transsulfuração, encontra-se reduzida em pacientes renais terminais (Stam, 2004). O fígado é considerado o órgão mais provavelmente afetado pela hHcy dado o seu papel como principal responsável pela regulação do metabolismo proteico e a elevada concentração de enzimas participantes das reações envolvendo a Hcy em seu parênquima (Van Guldener, 2005; Long & Nie, 2016).

Um estudo transversal realizado com uma população de 17.000 indivíduos que tentou associar a TFG aos valores de Hcy, constatou que, quanto maior era a concentração sérica de Hcy, menores eram a taxa de filtração glomerular e o *clearance* de creatinina. Além disso, constatou-se que, quanto maior era o estágio da doença, maiores eram os níveis de Hcy, de tal forma que pessoas que apresentavam níveis de

Hcy acima dos valores de referência possuíam alta probabilidade de apresentarem taxas de filtração glomerular abaixo dos valores de referência e/ou proteinúria. Desse estudo, 3602 pessoas com taxas de filtração glomerular normais foram divididas em dois grandes grupos, de acordo com as concentrações plasmáticas de Hcy (acima ou abaixo dos valores de referência). Foi realizada a mensuração anual da TFG e se constatou que as que apresentavam valores de Hcy elevados tinham maior queda anual da TFG e maior chance de desenvolvimento de DRC (Cohen et al., 2019).

De fato, existe uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de Hcy e o clearance de creatinina, o que pode advir do fato de a Hcy ser primariamente transulfurada nos rins e a deficiência de massa renal funcional determinar a elevação de seus níveis plasmáticos sob diferentes condições fisiológicas e patológicas (Long & Nie., 2016; Ye et al., 2016). Mesmo indivíduos que demonstram pequenos graus de disfunção renal, apresentam concentrações aumentadas de Hcy (Chauveau et al., 1993; Levi et al., 2014; Ye et al., 2016).

Em cães, não existe ainda a determinação de valores de referência para os níveis plasmáticos de homocisteína. Há estudos que indicam a existência de variações de acordo com a raça do animal. Entretanto, apesar da quantidade escassa de estudos, já se demonstrou uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de creatinina e Hcy (Lee et al., 2017), e que a Hcy circulante, da mesma forma que em humanos, pode sofrer influência de doenças cardíacas e renais (Rossi et al., 2008). Nenhum estudo transversal em cães portadores de DRC foi encontrado na literatura, sendo este o primeiro estudo comparando os resultados de tHe ao estadiamento da DRC e a evolução temporal com o tratamento conservador recomendado pela IRIS (2023).

Fatores como proteinúria, hiperfosfatemia, hipocalcemia, hipoalbuminemia e aumento nas concentrações do fator de crescimento de fibroblastos 23 (FGF-23), tem sido associados com maior taxa de mortalidade em pacientes azotêmicos portadores de DRC, tanto em cães quanto em gatos. Também, a progressão dentro dos estádios propostos pela IRIS, está diretamente relacionada ao prognóstico e limitações das intervenções terapêuticas a serem realizadas (Geddes et al., 2015; Rudisnky et al., 2018; Syme, 2019). Nesse contexto, a homocisteína surge como um possível biomarcador para avaliação da função renal e a gravidade de suas consequências. Embora em medicina exista uma associação direta entre a função renal e a elevação nas concentrações de homocisteína, na medicina veterinária a quantidade de trabalhos disponíveis que os correlacione, até a presente data, é escassa (Çavir & Kozat, 2016).

2. HIPÓTESE

A concentração sérica de homocisteína se apresenta elevada em pacientes doentes renais crônicos, sendo mais elevada quanto maior o estágio da DRC.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a concentração sérica de tHe em cães portadores de DRC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Relacionar os índices SDMA:Proteína total e RPCU:Densidade urinária aos estádios da DRC em cães.

Correlacionar os marcadores de função renal (creatinina, SDMA e fósforo séricos e densidade urinária) com os níveis séricos de tHe ao longo de 120 dias.

Correlacionar o estatus antioxidante total (TAS) e as enzimas antioxidantes (GPX e SOD) às concentrações séricas de tHcy.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram avaliados 21 cães atendidos pelo setor de nefrologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, sendo 16 portadores de doença renal crônica e 5 animais hígidos, de raças e idades variadas. Os cães foram diagnosticados como DRCs e classificados, segundo a IRIS (2023) e, posteriormente divididos em 3 grupos:

- 1- Grupo controle (GC): Pacientes considerados clinicamente hígidos, comprovadamente não portadores de DRC.
- 2- Grupo 1: Pacientes estadiados como DRC 1 ou 2.
- 3- Grupo 2: Pacientes estadiados como DRC 3 ou 4.

Como critérios de inclusão para o grupo de doentes renais crônicos, os pacientes deveriam comprovadamente apresentar DRC e não deveriam demonstrar sinais de descompensação sistêmica ou síndrome urêmica, através de dados obtidos com a

anamnese, exame físico completo e exames complementares (laboratoriais e ultrassonográficos), todos realizados em um mesmo atendimento, sendo este primeiro momento identificado como T0. Esses pacientes poderiam apresentar outras comorbidades, desde que estas estivessem clinicamente sob controle e não envolvessem a função renal direta ou indiretamente. Para os cães hípidos, utilizou-se os mesmos critérios, mas com a constatação da ausência de afecções renais ou cardíacas com os dados obtidos.

Foram excluídos do estudo pacientes doentes renais crônicos que apresentassem sinais de descompensação, isto é, alterações no apetite e disposição, êmese, diarreia ou qualquer outra manifestação clínica da síndrome urêmica. Além disso, pacientes que demonstraram qualquer comorbidade aguda (piometra, sepse) ou crônica descompensada (insuficiência cardíaca congestiva, hiperadrenocorticism), que pudessem gerar um viés de interpretação.

Todos os cães portadores de DRC, para efeito de padronização, receberam dieta específica (Equilíbrio Veterinary – Renal RE - canino®) e suplemento a base de ômega-3, vitamina E, selenito de sódio, gluconato de cobre, gluconato de zinco, sulfato de condroitina e glucosamina (Gerioox®). Tanto a dieta renal quanto o suplemento tiveram suas doses diárias calculadas de acordo com a recomendação do fabricante, baseada no peso do animal.

Foram propostos quatro tempos (tempo 1 ao tempo 4) de acompanhamento para os cães DRC, os quais foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial ao longo desses tempos. Entre os tempos 1, 2 e 3, os intervalos foram de 30 dias e entre os tempos 3 e 4, o intervalo foi de 60 dias, totalizando 120 dias de avaliação. As análises dos pacientes portadores de DRC, em vários tempos, com intervalos relativamente longos, teve como objetivo a obtenção de um perfil no qual a média dos parâmetros avaliados pudesse retratar valores, os mais próximos possíveis da realidade de cada paciente. Os cães do GC foram submetidos a avaliação clínica e laboratorial em um único tempo uma vez que, ao constatar a seu estado de higidez, não seria esperado grandes variações nos parâmetros avaliados. Todas as etapas da avaliação clínica e coleta de sangue e urina foram realizadas nas dependências do Hospital Veterinário da UFMG.

4.2. DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA

4.2.1 EXAME FÍSICO

Os cães selecionados foram submetidos ao exame físico completo incluindo: aferição da pressão arterial sistêmica por doppler vascular; inspeção da coloração de mucosas orais e oculares; estado de hidratação através do turgor cutâneo, lubrificação de mucosas e tempo de preenchimento capilar; medição da frequência cardíaca pela auscultação; frequência respiratória pela visualização dos movimentos respiratórios por minuto; palpação abdominal e de linfonodos e aferição da temperatura retal por termômetro digital.

4.2.2 EXAMES LABORATORIAIS

Foram obtidas amostras de sangue e de urina de todos os cães normohidratados, que se encontravam em jejum de 12 horas e sem intercorrências clínicas nas últimas 24 horas. A coleta de sangue foi realizada por venopunção, com seringas de 5mL e agulha 25x7mm, preferencialmente da veia jugular externa, distribuídos da seguinte forma:

- 1mL no microtubo de tampa roxa contendo anticoagulante EDTA 10% (hemograma);
- 3mL no tubo de tampa vermelha, sem anticoagulante (análises bioquímicas séricas);

As amostras foram processadas respeitando-se um prazo máximo de 2 horas após a coleta, sendo mantidas sob refrigeração entre 2°C e 6°C até o processamento.

A coleta de urina em fêmeas foi realizada pela técnica de cistocentese guiada por ultrassom, utilizando-se seringa de 10mL e agulha 25x7mm. Já a coleta em machos se deu por passagem de sonda uretral de calibre adequado ao tamanho do animal. O volume de coleta de urina foi entre 8 a 10 mL. A urina foi processada em até 2 horas após a coleta e o sobrenadante alíquotado e congelado a -80°C para posterior análise.

O objetivo do congelamento das amostras a -80°C foi possibilitar a dosagem da homocisteína em um mesmo momento, para melhor aproveitamento dos kits.

Todos os exames foram executados no Laboratório de Patologia Clínica do

Hospital Veterinário e na estrutura do MULTILAB da Escola de Veterinária da UFMG, seguindo protocolos validados, sendo eles:

- Hemograma completo, com avaliação da contagem de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos e plaquetas (iCounter Diagno);
- Dosagem sérica de ureia, creatinina, SDMA, fósforo, cálcio iônico, cálcio total, albumina, globulina, fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamyltransferase (GGT), alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total, ácidos biliares, glicose, frutossamina, amilase, lipase, colesterol, triglicérides, ácido úrico; utilizando-se kits Idexx (Catalist One). Todos os analitos foram dosados para realização de estadiamento dos pacientes.
- Urina rotina com avaliação da proteína urinária, creatinina urinária, RPC e densidade urinária (Urit);
- Dosagem de proteína urinária para cálculo da razão proteína creatinina urinária (RPCU) e atividade da GGT, utilizando-se kits comerciais (Biotécnica);
- Dosagem de TAS e GPX e SOD utilizando-se kits comerciais (Randoxx).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar as diferenças entre estádios, levando em consideração o tempo, foram ajustados modelos de equações de estimativas generalizadas para cada variável resposta. Estes modelos de regressão são adequados a dados com realização de medidas repetidas no mesmo indivíduo ao longo do tempo, sendo bastante flexíveis quanto à distribuição de probabilidade da variável resposta (Guimarães & Hirakata, 2012). Foi ajustado um modelo separado para cada variável resposta mensurada, sendo que o grupo e o tempo, juntamente com a interação entre essas duas variáveis, foram utilizados como preditores (variáveis independentes). Os quatro estádios foram agrupados em apenas dois (Estádios 1 e 2 e Estádios 3 e 4). Para todas as variáveis foi utilizada uma estrutura de autocorrelação temporal de simetria composta. Escolheram-se as distribuições de probabilidade mais adequadas para cada variável resposta de interesse. Para as variáveis com distribuições bem-comportadas, utilizou-se a distribuição gaussiana e para variáveis com valores positivos e distribuições assimétricas, utilizou-se a distribuição gama. Após o ajuste do modelo, testaram-se os efeitos dos estádios, do tempo e da

interação de forma global (overall) e calcularam-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada estádio para cada tempo. Para verificar a significância da diferença entre estádios para cada tempo, ou da diferença entre tempos para cada estádio, foi necessária a aplicação de testes de comparações múltiplas (*pairwise*). Para estes testes aplicou-se a correção de Sidak.

Para avaliar a associação entre duas variáveis quantitativas, calculou-se a correlação paramétrica de Pearson. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram avaliados 21 cães atendidos pelo setor de nefrologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, sendo 16 portadores de doença renal crônica e 5 animais hígidos, de raças e idades variadas. Os animais doentes renais crônicos foram classificados neste estudo de acordo com o estadiamento proposto pela IRIS (2023), baseado nas concentrações de creatinina sérica e SDMA, e subclassificados em 2 grandes grupos: um contendo os classificados como DRC 1 e 2 e outro contendo os pacientes DRC 3 e 4. Tal subdivisão foi realizada devido ao pequeno número de pacientes presentes em cada estádio, de forma isolada, tendo o agrupamento a finalidade de tornar os resultados mais representativos estatisticamente. 5 pacientes fizeram parte do grupo controle (GC), constituído por uma população de cães comprovadamente hígidos. A distribuição relativa dos cães dentro dos grupos pode ser visualizada no gráfico 1.

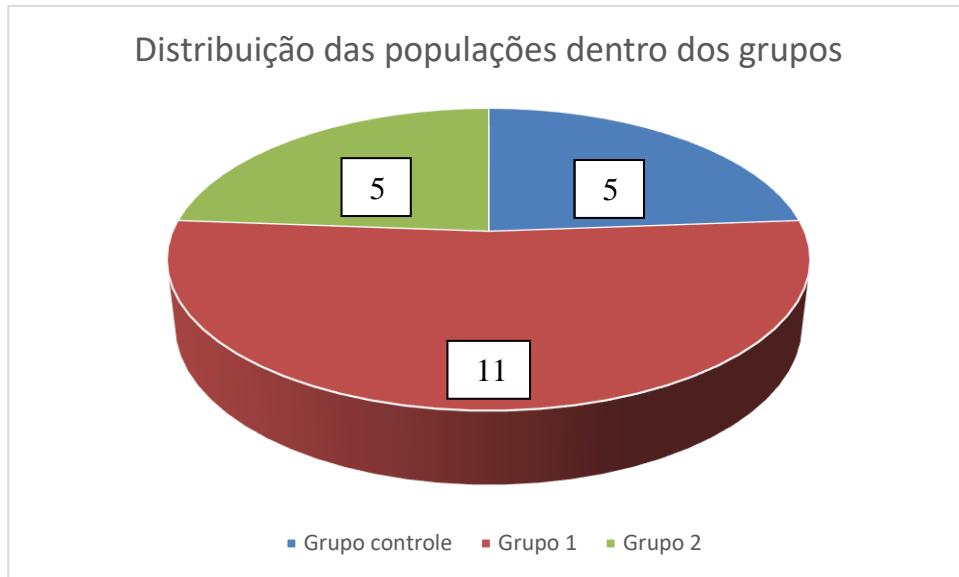


Gráfico 1. Representação gráfica da distribuição dos animais dentro dos diferentes grupos

A distribuição dos pacientes de acordo com o sexo, pode ser observada no gráfico 2. Dentre o total de pacientes, apenas 5 eram fêmeas e os 16 restantes, machos.

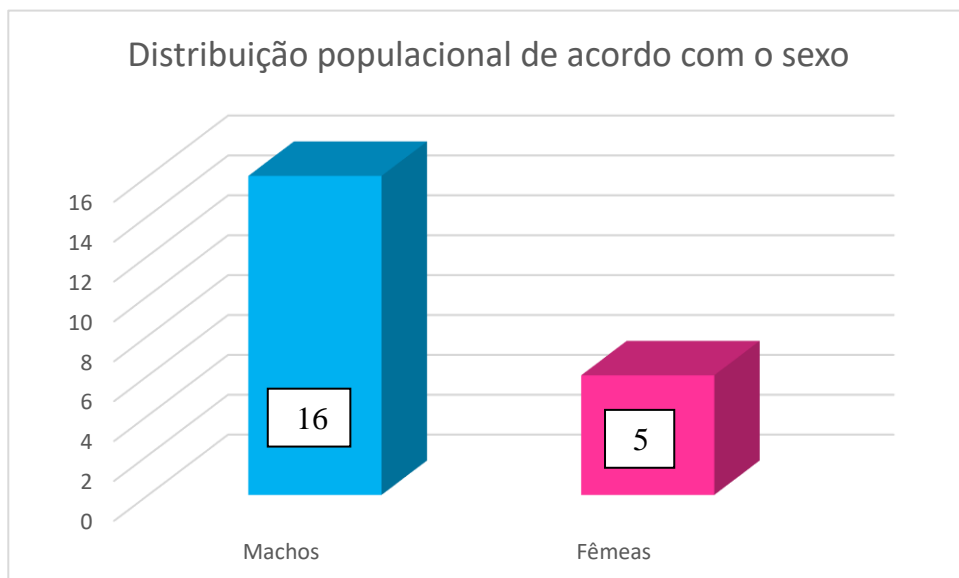


Gráfico 2. Representação gráfica da distribuição dos pacientes em relação ao sexo

Abaixo são apresentadas a tabelas com os dados analisados, organizados de acordo com o estágio do paciente e os tempos de avaliação. Dois animais vieram a óbito, o primeiro, classificado como DRC 4, e o segundo, classificado como DRC 2, ambos no tempo 3 (60 dias de avaliação), o primeiro caso possivelmente à gravidade e o segundo à descompensação. Em nenhum dos pacientes pôde-se realizar a necropsia.

Os pacientes foram avaliados ao longo de quatro tempos (1 ao 4), com a exceção dos pacientes do GC cujos dados foram obtidos uma única vez. Tal decisão foi tomada ao considerar que, uma vez hígid, não seriam esperados, dentro do período de avaliação, grandes variações nos parâmetros avaliados. Os indicadores avaliados ao longo do tempo encontram-se abaixo apresentados nas tabelas contendo as respectivas variáveis paramétricas e não paramétricas. Os principais índices de estatística descritiva podem ser verificados na tabela 1.

Tabela 1. Principais índices de estatística descritiva (média, desvio-padrão, mínimos e máximos e medianas) dos biomarcadores dos 16 cães portadores de DRC em todos os tempos.

Analitos	Média	Desv. Padrão	Min	Mediana	Max
Homocisteína total	28,29	14,06	4,42	25,03	65,41
Creatinina	2,57	1,85	0,70	2,15	9,50
Uréia	88,38	59,89	10,70	77,03	246,10
SDMA	19	14,91	3	16	79
Densidade urinária	1,017	0,007	1,005	1,014	1,038
Fósforo sérico	4,95	1,637	2,30	4,70	10,70
Proteína total	6,14	2,31	5,80	6,60	10,00

A seguir, são apresentados dois resultados para cada variável resposta. Primeiro tem-se a tabela do efeito global do estágio, do tempo e da interação entre estas variáveis. Se os valores p das tabelas forem menores que 0,05 há evidência de que o respectivo fator teve um efeito significativo. Se a interação entre tempo e estágio for significativa (a interação é evidenciada pelos dois pontos), então existe evidência de que a modificação na variável resposta ao longo do tempo foi distinta entre os dois grupos comparados. Em seguida, é apresentado o gráfico com as médias e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada tratamento em cada tempo. As letras acima de cada média representam as comparações múltiplas (pairwise). Letras maiúsculas especificam diferenças entre estágios para um mesmo tempo. Letras minúsculas especificam as diferenças entre tempos para o mesmo estágio. Pontos que compartilham pelo menos uma mesma letra, não possuem diferenças significativas entre si a um nível de significância de 5%. Por último são apresentados gráficos que comparam os grupos de estadiamento com o grupo dos animais hígid. Nessa comparação utiliza-se apenas dados do tempo 1.

5.1 HOMOCISTEÍNA

Em relação à homocisteína, foi observado um efeito significativo do estádio sobre a variável, sendo que os grupos de estadiamentos foram diferentes entre si especialmente nos tempos 2 e 3 (tabela 2 e 3 e gráficos 3,4 e 5).

Tabela 2. Efeito global do tempo, do estádio e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância.

Fator	G.L.	χ^2	Valor p
Tempo	3	1,9	0,596
Estádio	1	5,5	0,019
Tempo:Estádio	3	36,1	< 0,001

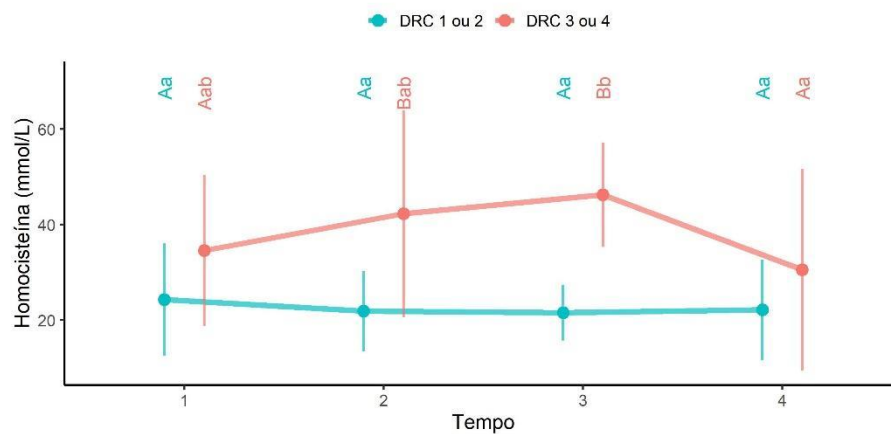


Gráfico 3. Comportamento da média estimada da concentração de homocisteína sérica (mmol/L) em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da homocisteína (mmol/L) dos cães do grupo controle no tempo 1.

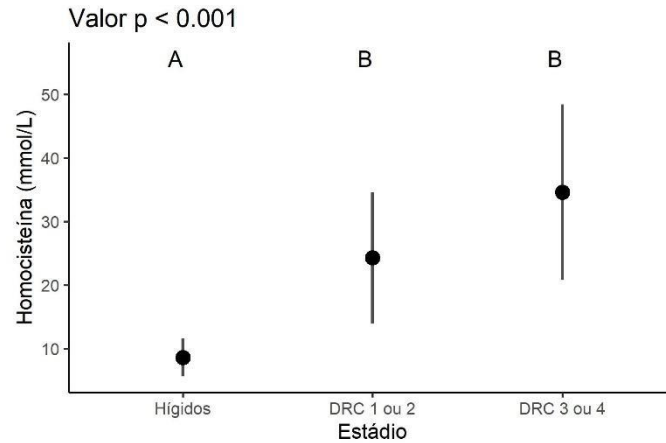


Gráfico 4. Média estimada das concentrações de homocisteína nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Tabela 3. Dados da estatística descritiva para a homocisteína nos diferentes grupos e tempos.

GRUPO 1					
Homocisteína					
Tempo	Média	Desv.Padrão	Min	Mediana	Max
T1	26,64	14,12	4,42	24,05	45,48
T2	26,73	16,92	11,99	18,59	65,41
T3	27,19	16,09	12,76	25,03	60,36
T4	27,61	14,61	12,76	23,52	54,02
GRUPO 2					
Homocisteína					
Tempo	Média	Desv.Padrão	Min	Mediana	Max
T1	30,99	13,73	19,60	27,12	46,25
T2	34,60	12,27	21,63	36,12	46,05
T3	42,23	0,23	21,48	21,80	21,95
T4	21,87	0,10	21,80	21,80	21,95

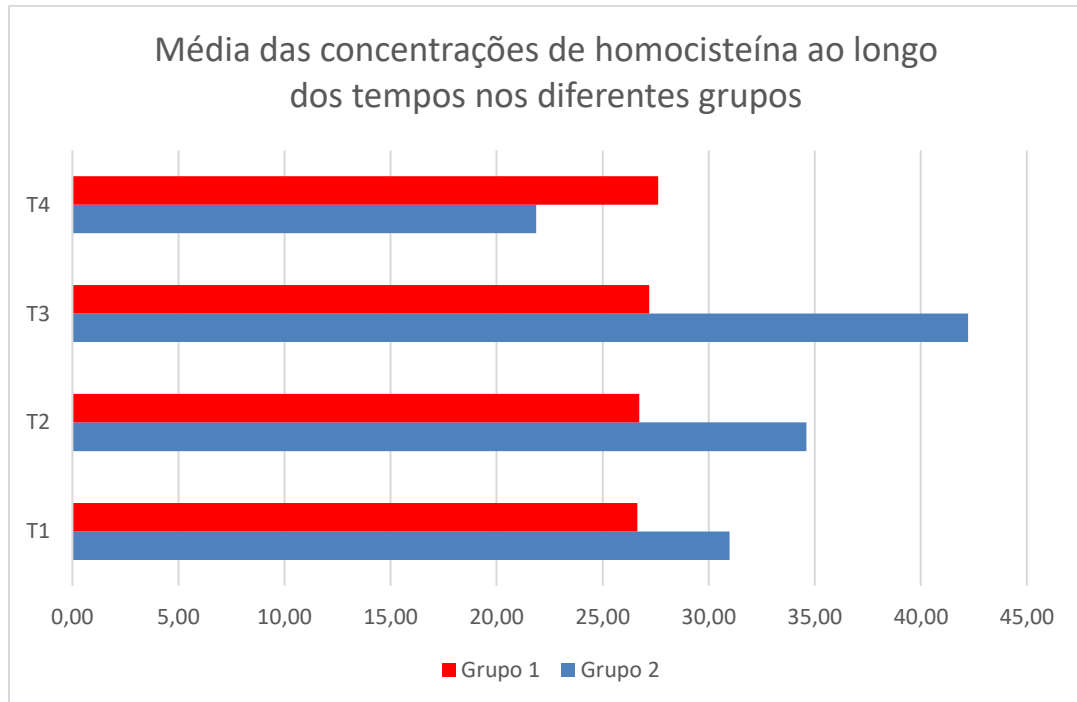


Gráfico 5. Representação gráfica da média das concentrações de homocisteína nos diferentes tempos entre os grupos 1 (vermelho) e 2 (azul).

Neste trabalho, os pacientes DRC, em ambos os grupos analisados, demonstraram-se hiperhomocisteinêmicos, com as concentrações de homocisteína sérica apresentando-se mais elevadas quanto maior era o estágio da doença. Tal fato corrobora o que é observado em humanos, onde os pacientes DRC apresentam concentrações elevadas de Hcy de forma proporcional ao estágio da doença. Considerando-se que os rins são um importante sítio de metabolização da Hcy, a redução da massa renal total funcional, que aumenta com a progressão da doença, pode ser a justificativa para a Hhe. Ainda, o próprio quadro de Hhe é apontado como fator de geração de maiores danos às células renais, desempenhando, portanto, um papel duplo, como causa e consequência da disfunção renal, conforme discutido por Koning & Hu (2010), Nie & Long (2016) e Cianciolo et al. (2017). Nota-se a manutenção mais ou menos constante das concentrações de Hcy ao longo dos tempos no grupo 1, mas ainda assim, as concentrações são mais elevadas que as observadas no grupo controle. O Grupo 2, ao contrário, demonstrou elevação das concentrações até o tempo 3 e redução significativa no tempo 4. Isso pode estar associado a redução do número de pacientes participantes do grupo, devido à morte, abandono da participação no experimento ou outro fator ainda a se explicar, relacionado à progressão da doença ou ao tratamento conservador instituído. Essa redução do tempo 3 para 4 contradiz o que é evidenciado em humanos, onde os pacientes terminais demonstram concentrações mais elevadas de He (Stam,

2004), mas ainda se mostraram superiores às concentrações dos animais hígidos.

5.2 SDMA:PROTEÍNA TOTAL

Quanto a relação SDMA:Proteína total, um efeito significativo de estágio foi observado (Tabela 4 e gráficos 6 e 7), sendo que os grupos de estadiamento foram diferentes entre si nos quatro tempos. Também foi observado uma tendência de aumento ao longo dos tempos para o grupo 2 (DRC 3 e 4).

Tabela 4. Efeito global do estágio, do tempo e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância para a relação SDMA:Proteína total.

Fator	G.L.	χ^2	Valor p
Tempo	3	4,0	0,263
Estádio	1	19,7	< 0,001
Tempo:Estádio	3	16,2	0,001

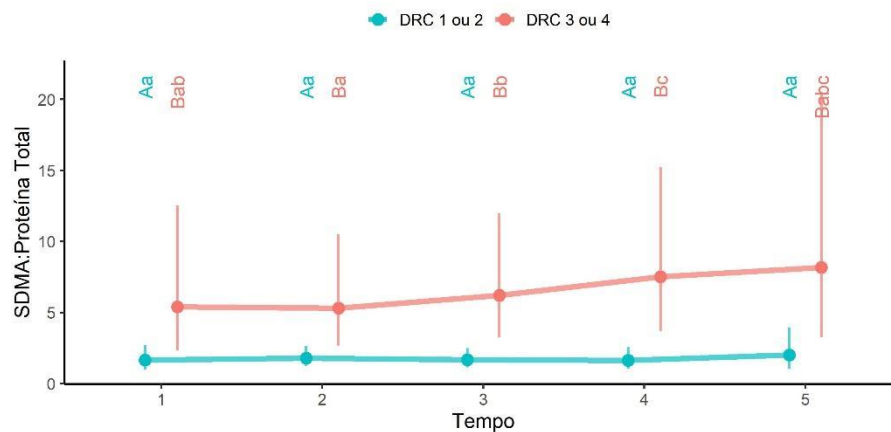


Gráfico 6. Comportamento da média estimada da da relação SDMA:Proteína total em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da relação SDMA:Proteína total dos cães do grupo controle no tempo 1.

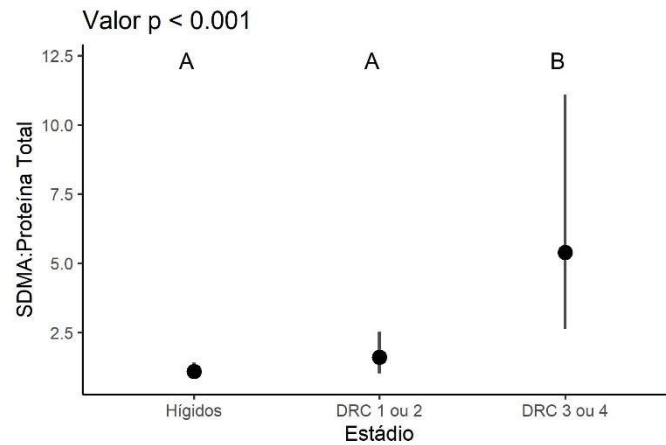


Gráfico 7. Média estimada da relação SDMA:Proteína total nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

Sabe-se que a SDMA é um marcador mais precoce para identificação da DRC em baixos níveis de disfunção renal e que tende a se elevar à medida em que se aumenta o estágio da doença (Nabity et al., 2015). Parte das complicações provenientes da disfunção renal são explicadas pelo desbalanço energético e proteico que os animais apresentam. A proteinúria persistente, comum na DRC, pode resultar em hipoalbuminemia, além de se correlacionar com maior taxa de mortalidade em pacientes azotêmicos (Wehner et al., 2008; Littman, 2011). Dessa forma, embora este índice não tenha sido encontrado na literatura, aponta para a maior gravidade do comprometimento renal, associado a alterações sistêmicas em pacientes mais graves, devendo ser incluído na avaliação do doente renal e, quem sabe, ser avaliado como preditor de prognóstico, o que não pode ser avaliado no presente estudo.

5.2 RPCU:Densidade urinária

A relação RPCU:Densidade urinária também demonstrou efeito significativo entre os estádios, sendo que os grupos de estadiamento foram diferentes entre si nos quatro tempos (Tabela 5 e gráficos 8 e 9).

Tabela 5. Efeito global do estádio, do tempo e da interação entre essas variáveis, com seus respectivos graus de liberdade, qui-quadrado e significância para a relação RPCU:Densidade urinária

Fator	G.L.	χ^2	Valor p
Tempo	3	36,3	< 0,001
Estádio	1	14,1	< 0,001
Tempo:Estádio	3	1,6	0,658

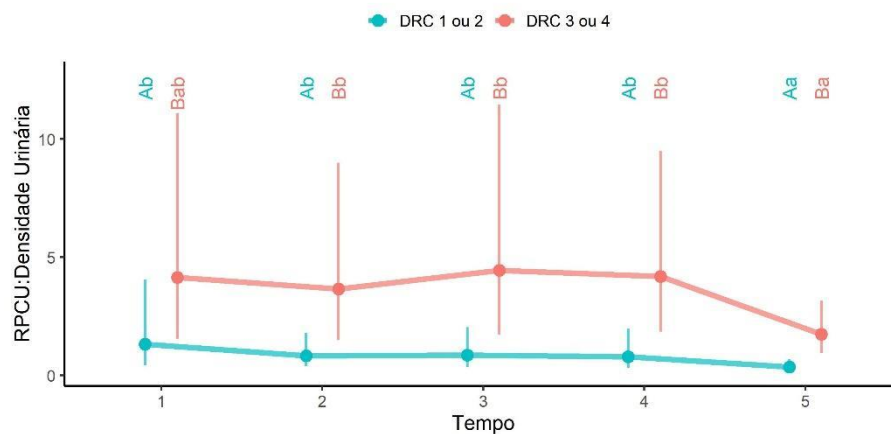


Gráfico 8. Comportamento da média estimada da relação RPCU:Densidade urinária em relação aos grupos 1 e 2 da DRC (traçados coloridos) e aos tempos de avaliação (1, 2, 3 e 4). A reta representa uma referência para a média estimada da concentração da relação RPCU:Densidade dos cães do grupo controle no tempo 1.

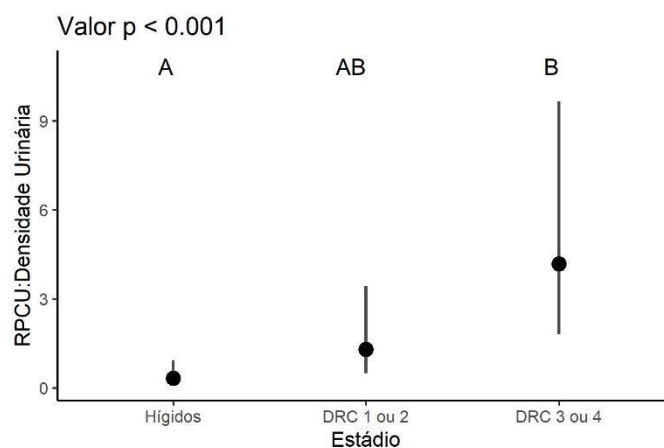


Gráfico 9. Média estimada da relação RPCU:Densidade urinária nos grupos de cães controle (hígidos) e cães DRC pertencentes aos grupos 1 e 2. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os estádios. Barras verticais representam o intervalo de confiança das variáveis em cada grupo.

A proteinúria persistente, normalmente identificada pela RPCU em amostras de urina, é um preditor de prognóstico negativo na DRC e pode ser utilizada para identificação precoce da doença em cães (Hokamp et al., 2016). A perda de proteínas pela urina deve ser sempre interpretada em conjunto com a densidade urinária, uma vez que esta pode subestimar ou superestimar a perda real por efeito de diluição ou concentração do analito. O índice RPCU:Densidade urinária demonstrou não só ser altamente influenciável pelo estágio da doença, assim como a homocisteína, mas também se elevou em todos os tempos analisados, estando, também, relacionado à gravidade da doença. Entretanto, este índice também não foi encontrado em literatura, mas pode, no futuro, ser utilizado de forma conjunta a outros analitos como preditor de prognóstico em pacientes portadores de DRC.

5.4 CORRELAÇÕES ENTRE PARES DE VARIÁVEIS

Abaixo, são apresentadas as correlações entre os pares de variáveis. Para cada dupla, apresenta-se, inicialmente, a correlação com todos os dados e, em seguida, as correlações para cada um dos dois grupos de DRC. Por último, as correlações para cada tempo. Em cada gráfico é apresentado o valor da correlação e o seu valor p . A interpretação dos valores de correlação, segundo Schober et al., 2018, é possibilitada pela consideração de que a correlação é:

- Fraca se $> 0,1$ e $< 0,39$

-Moderada se $> 0,4$ e $< 0,69$

-Forte se $> 0,7$ e $< 0,89$

- Muito forte se $> 0,9$

Um resumo dos resultados estatísticos para as correlações é demonstrado na tabela 6.

Tabela 6. Correlações entre os biomarcadores e a homocisteína avaliados no estudo.

Analito 1	Analito 2	Correlação	Valor p
Homocisteína	Creatinina	0,33	0,033
Homocisteína	Densidade urinária	-0,39	0,009
Homocisteína	Fósforo	0,2	0,217
Homocisteína	Ransel	-0,24	0,121
Homocisteína	Ransod	0,02	0,881
Homocisteína	RPCU	0,13	0,409
Homocisteína	SDMA	0,27	0,087
Homocisteína	TAS plasmático	0,41	0,006
Homocisteína	TAS urinário	-0,2	0,197

A análise geral dos coeficientes de correlação demonstra que grande parte dos analitos se correlacionam de forma considerada fraca com a homocisteína (gráficos 10 ao 19), à exceção do estatus antioxidante total (TAS), que demonstrou correlação moderada com a He.

Em geral, a creatinina sérica se correlacionou de forma positiva com a homocisteína, entretanto, essa correlação se mostrou fraca (gráfico 10-A). Isso pode ser explicado pelas distintas formas com que essas substâncias são depuradas no organismo. Enquanto a creatinina é eliminada pelo processo de filtração via urina, a concentração de Hcy urinária é extremamente baixa (Refsum, 1985). Em humanos, um estudo que demonstrou que em indivíduos do sexo masculino portadores de hipertensão sistêmica, os níveis de creatinina se elevam concomitante à Hcy. Entretanto, nesse mesmo estudo, não se observou a mesma correlação em indivíduos do sexo feminino (Yang et al., 2020). Como neste ensaio não se testou o efeito do sexo sobre as concentrações de Hcy, permanece incerto o exato mecanismo que determina essa fraca correlação. Ainda, a correlação para o grupo 1 se mostrou moderada e positiva, enquanto para o grupo 2, fraca e negativa (gráfico 10-B). Ao longo dos tempos, em geral, a correlação permanece fraca e sem significância (gráfico 10-C).

Vale ressaltar que a influência da massa magra nas concentrações de creatinina não foi testada neste ensaio clínico.

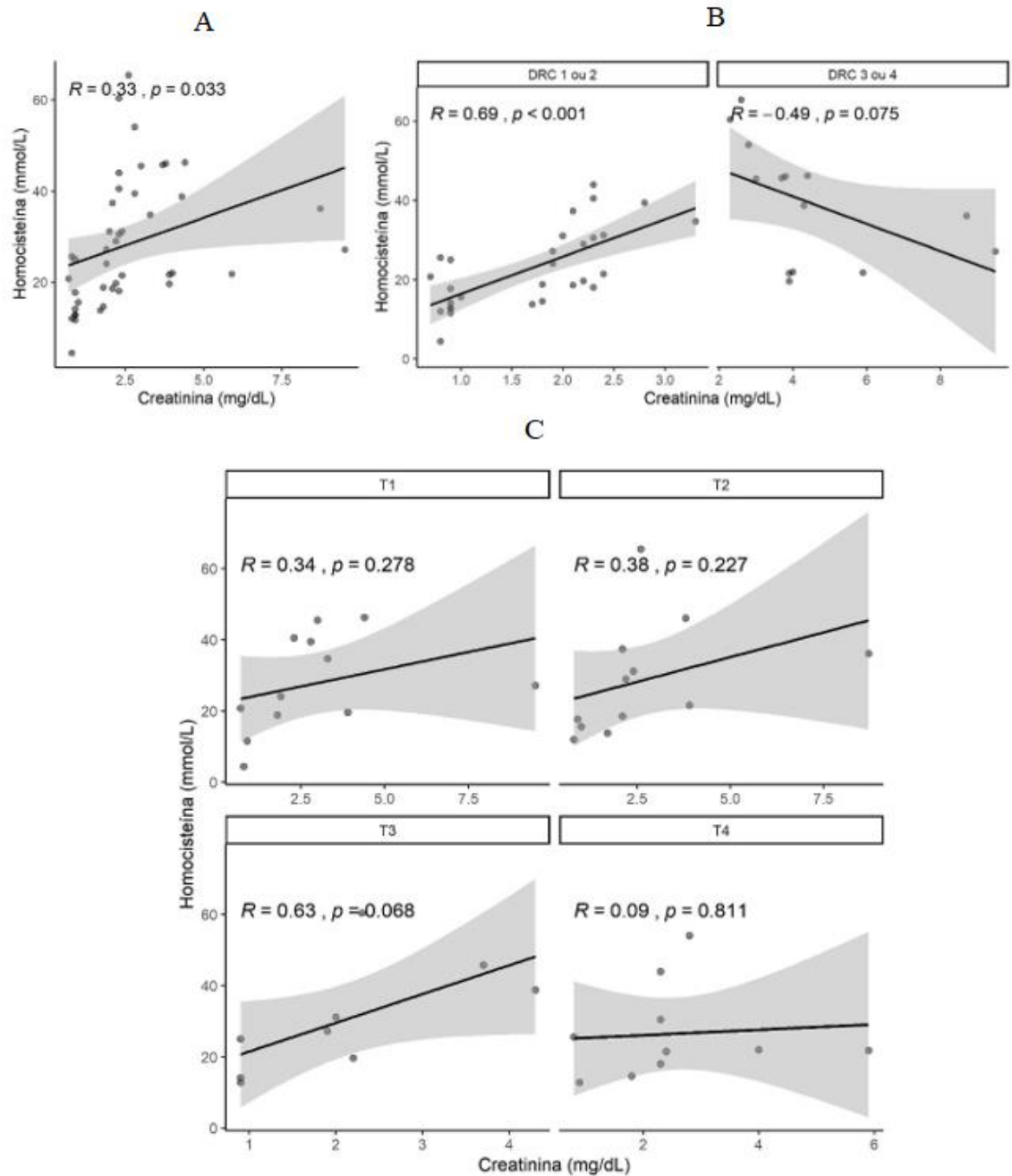


Gráfico 10. A. A. Correlação total entre os níveis de creatinina e homocisteína. B. Correlação entre os níveis de creatinina e homocisteína para os grupos 1 e 2. C. Variação das correlações entre creatinina e homocisteína ao longo dos tempos.

O mesmo verificado para a creatinina, acontece para a correlação existente entre as moléculas de Hcy e SDMA (gráfico 11-A), com uma correlação fraca, positiva e sem significância estatística ($p > 0,05$). Como o SDMA é depurado de forma semelhante à creatinina essa fraca correlação pode ser explicada, em parte, por esta constatação. Em humanos portadores de doença arterial de membros inferiores, foi demonstrado por Jud

et al, 2018 uma significativa correlação entre os níveis de Hcy e SDMA séricos. Entretanto, em um experimento realizado por Magné et al., 2015, camundongos com hHcy induzida apresentaram redução significativa dos níveis plasmáticos de SDMA circulante, sendo esse achado associado a uma regulação para baixo da atividade proteossômica e, conseqüentemente, da liberação da SDMA na circulação. A correlação para o grupo 1 se mostrou forte e positiva, enquanto para o grupo 2, moderada e negativa (gráfico 11-B), o que contraria o esperado, uma vez que, com o declínio da função renal, espera-se um aumento tanto das concentrações de SDMA e Hcy. Ao longo dos tempos (gráfico 11-C), o tempo 3 foi o único que demonstrou significância estatística entre as correlações. Como em cães não existem atualmente estudos que estabeleçam uma correlação entre essas variáveis, permanece, ainda, incerto os fatores que possam justificar o observado neste presente estudo. Entretanto, considerando-se a possibilidade da redução da atividade proteolítica pela Hcy crescente ao longo dos estádios, e que essa atividade é responsável por determinar a formação e liberação das moléculas de SDMA, há uma possibilidade de que o observado no estudo de Magné et al., 2015 com camundongos possa ocorrer também em cães, o que ainda precisa ser determinado através da realização de mais estudos.

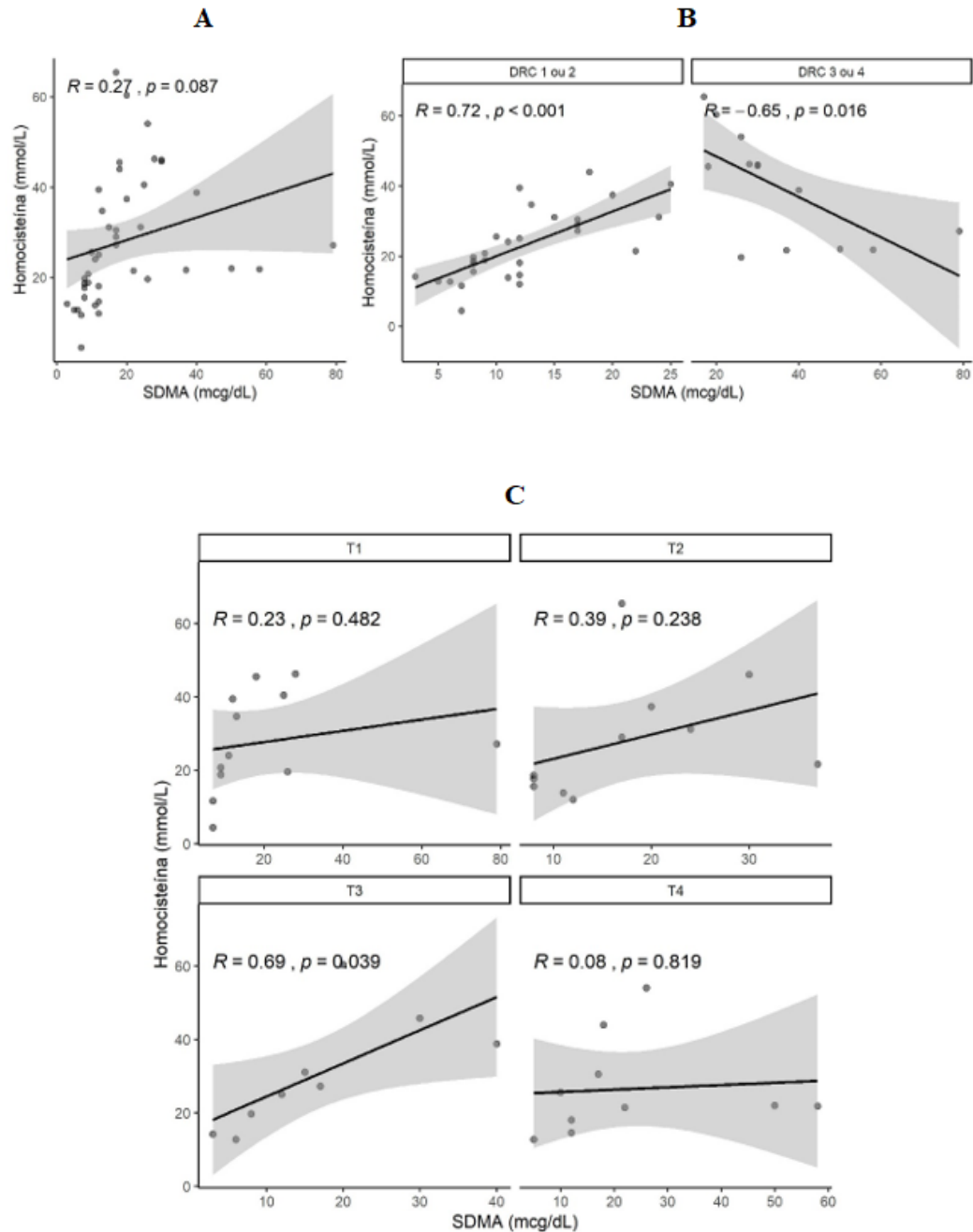


Gráfico 11. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e SDMA. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e SDMA para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e SDMA ao longo dos tempos.

A correlação entre o fósforo sérico e a He não se demonstrou significativa (gráfico 12-A). Entretanto, ao analisar separadamente os grupos há uma correlação moderada e positiva no grupo 1 e moderada e negativa no grupo 2 (gráfico 12-B), semelhante ao verificado às relação Hcy:SDMA e Hcy:Creatinina, não havendo qualquer significância

ao longo dos tempos (gráfico 12-C). Considerando-se que com a progressão da DRC os níveis de fósforos tendem a se elevar de forma progressiva, assim como as concentrações de Hcy, esperava-se uma correlação significativa entre essas variáveis. Não foram encontrados estudos correlacionando essas duas variáveis.

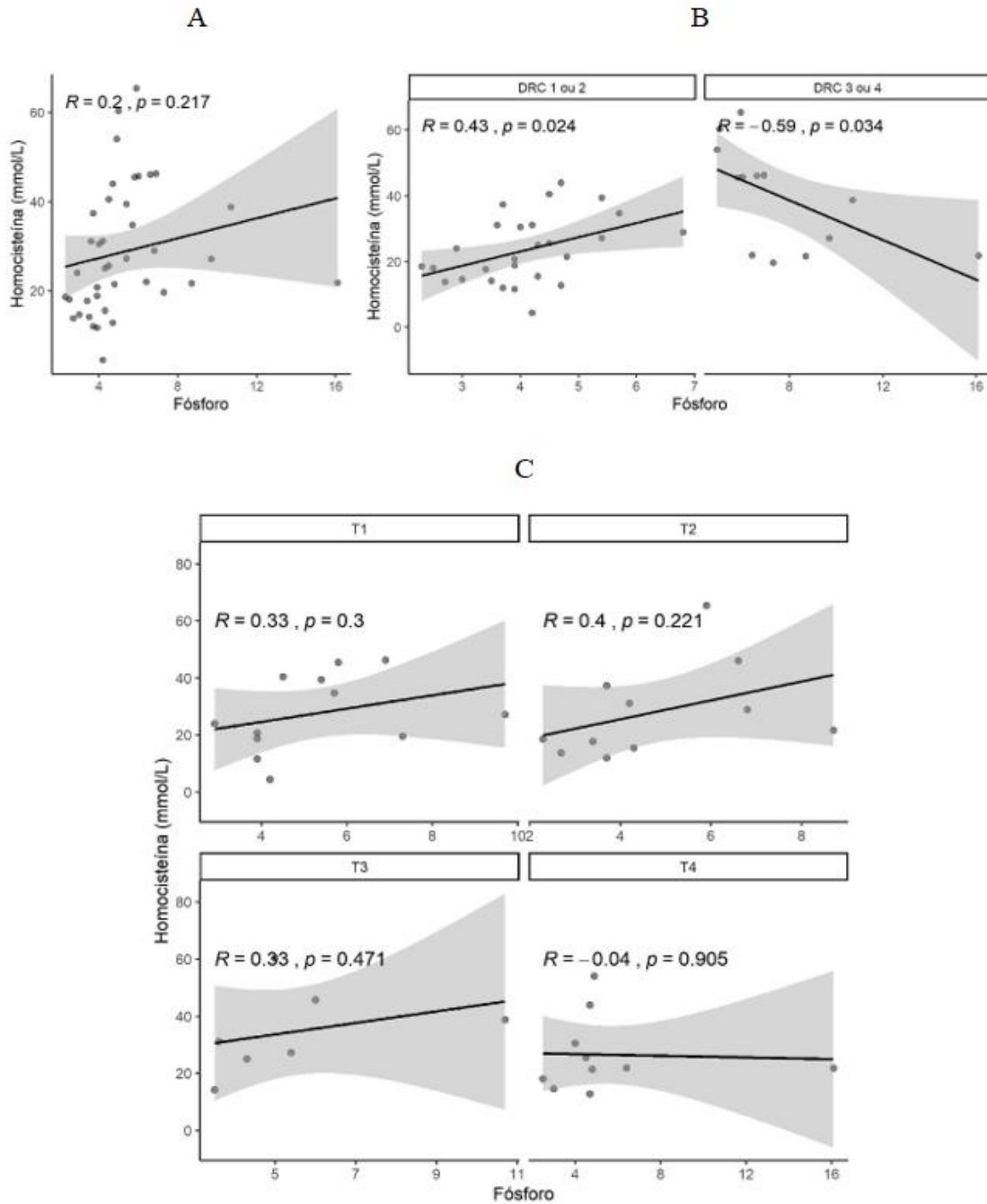


Gráfico 12. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e fósforo. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e creatinina para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e a creatinina ao longo dos tempos

A densidade urinária é um importante marcador de função renal que revela a capacidade dos néfrons realizarem a devida concentração urinária (Syme, 2019). Com a progressão da doença, espera-se que essa habilidade se encontre prejudicada, tendo os pacientes DRCS a se manterem na faixa isostenúrica (1,007 a 1,013) e as concentrações de Hcy mais elevadas. De forma geral, a correlação negativa verificada (gráfico 14-A) corresponde ao esperado, porém se demonstrou fraca. Não se encontrou significância ($p < 0,05$) na análise dos grupos de forma isolada (gráfico 14-B), tampouco no efeito dos tempos sobre a correlação (gráfico 14-C). Tal fato pode ser justificado pelo visualizado no gráfico 13, onde se verifica que, para o grupo 1, grande parte dos pacientes se manteve, em média, dentro da faixa normostenúrica, enquanto para o grupo 2, se mantiveram na faixa isostenúrica, mas sem grandes variações ao longo dos tempos.

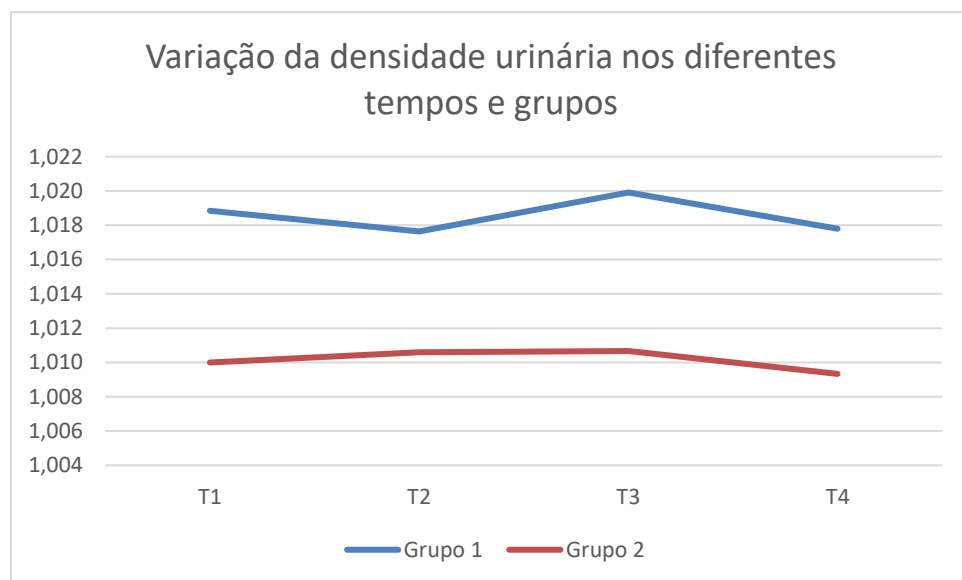


Gráfico 13. Representação gráfica da média das densidades urinárias nos diferentes tempos entre os grupos 1 (azul) e 2 (vermelho).

A correlação entre a Hcy e RPCU (gráfico 15-A) não se demonstrou significativa ($p > 0,05$). Ainda, não se observou qualquer efeito significativo de tempo (gráfico 15-C) na correlação entre a Hcy a RPCU urinária. Entretanto, ao observar de forma isolada os grupos (gráfico 15-B), enquanto a correlação não foi significativa para o grupo 1, ela foi negativa e moderada para o grupo 2. Sabe-se que, em pacientes portadores de DRC, a perda de proteína urinária pode inclusive encontrar-se menor nos estádios mais avançados da doença (3 e 4) do que nos iniciais como demonstrado por Syme (2019), o que pode explicar a correlação encontrada dentro do grupo 2.

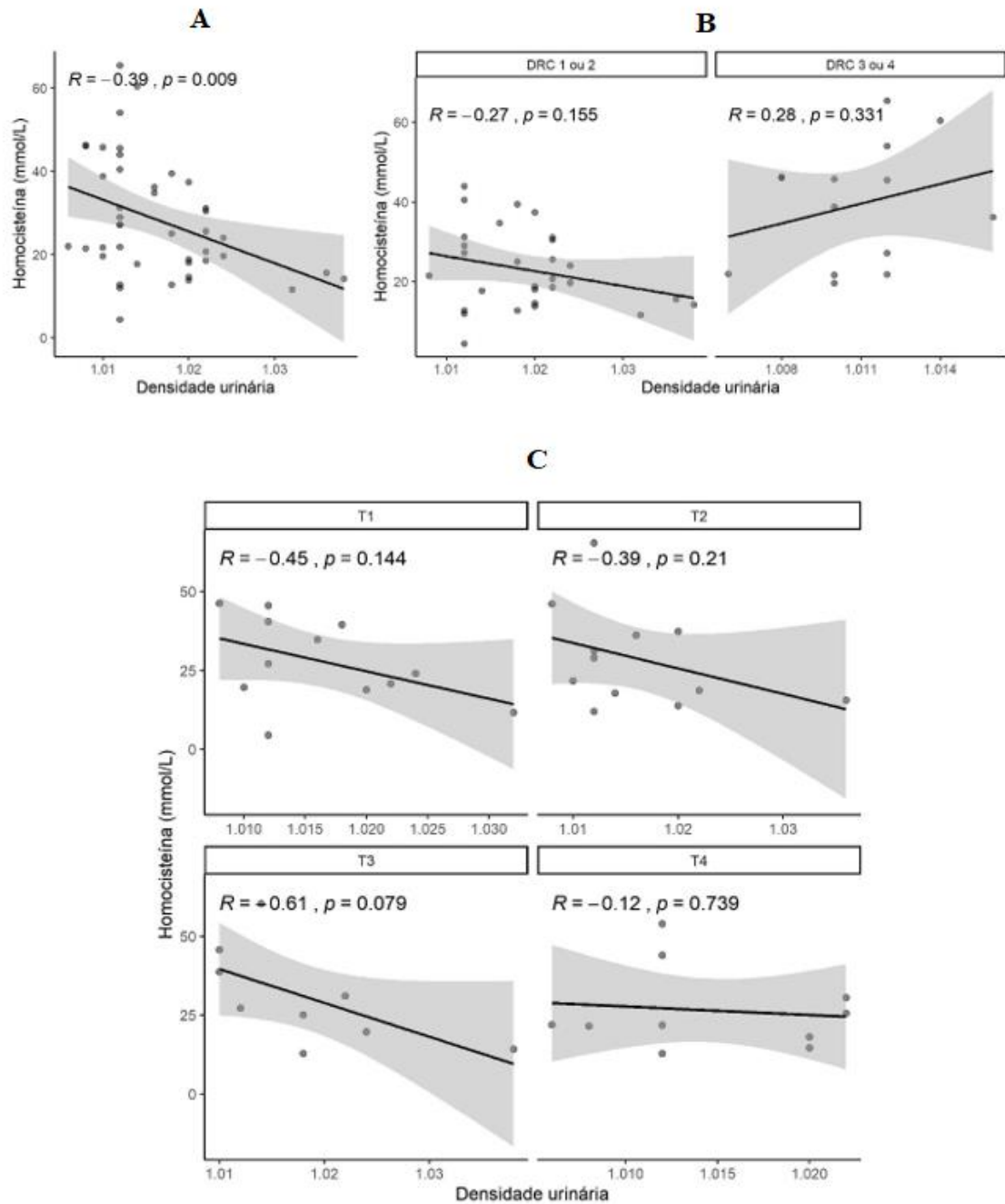


Gráfico 1410. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e densidade urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e densidade urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e densidade urinária ao longo dos tempos.

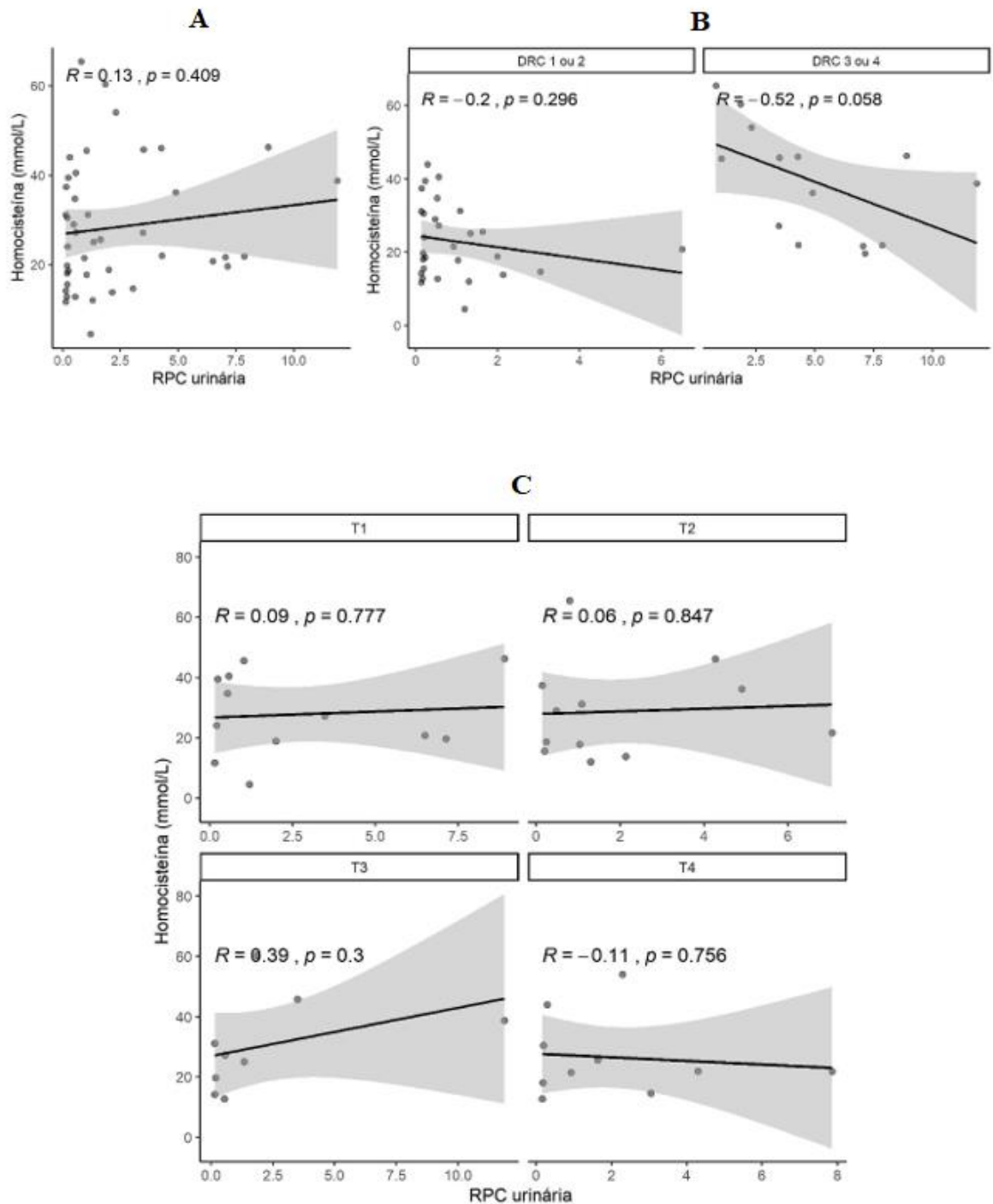


Gráfico 15. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RPC urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RPC urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RPC urinária ao longo dos tempos.

Houve correlação moderada entre a Hcy e o TAS plasmático (gráfico 16-A), o que pode ser justificado pelo possível mecanismo de injúria às células renais, mediado pela indução de um estado de estresse oxidativo, como proposto por Koning & Hu (2010) e Cianciolo et al. (2017). Nota-se ainda que essa correlação se torna mais forte no grupo 2 em relação ao grupo 1 (gráfico 16-B), não apresentando, entretanto, um efeito significativo em relação aos tempos estudados (gráfico 16-C). Ainda, o fato do TAS plasmático correlacionar-se moderadamente com a Hcy, pode indicar a existência de um estado de EO sistêmico.

Quanto ao TAS urinário (gráfico 17-A), apesar de, em geral, não haver significância ao longo dos tempos (gráfico 17-C) e para o grupo 1, o grupo 2 (gráfico 17-B) demonstrou uma forte correlação positiva com a Hcy. Tal constatação pode ser justificada pela fisiopatogenia da hHcy na DRC sugerida por Cianciolo et al. (2017), representando a ocorrência de lesão renal por EROs desencadeada pelas crescentes concentrações de Hcy. Apesar disso, são os níveis reduzidos de TAS que indicam o estado de estresse oxidativo, como apontado por Janion et al., 2022, se esperando uma correlação negativa entre as concentrações de Hcy e o TAS urinário. A elevação do status antioxidante pode estar relacionada a um mecanismo compensatório ativado na tentativa de contrabalançar os efeitos do estresse oxidativo.

As concentrações urinárias das enzimas GPX (gráfico 18) e SOD (gráfico 19) apresentaram, em geral, correlações baixas com a Hcy e sem significância estatística. Isso pode evidenciar a participação de outros mecanismos na determinação do estado de estresse oxidativo. Ainda, deve-se considerar que os pacientes foram condicionados com tratamento conservador ao longo do ensaio clínico, o que pode ter, de certa forma, impactado nos resultados obtidos. Tal hipótese já foi discutida na tese de Rosa (2021) que comprovou que o tratamento conservador reduz o estresse oxidativo de pacientes DRC. Entretanto, ao se observar o grupo 2, houve correlação moderada e negativa entre as concentrações urinárias de GPX e a Hcy (gráfico 18-B). Tal observação corresponde ao esperado, uma vez que o estresse oxidativo na DRC resulta em atenuação da atividade da GPX, explicando o porquê as concentrações de GPX reduzem à medida em que as concentrações de Hcy se eleva com a progressão da DR (Ratliff et al.,2016).

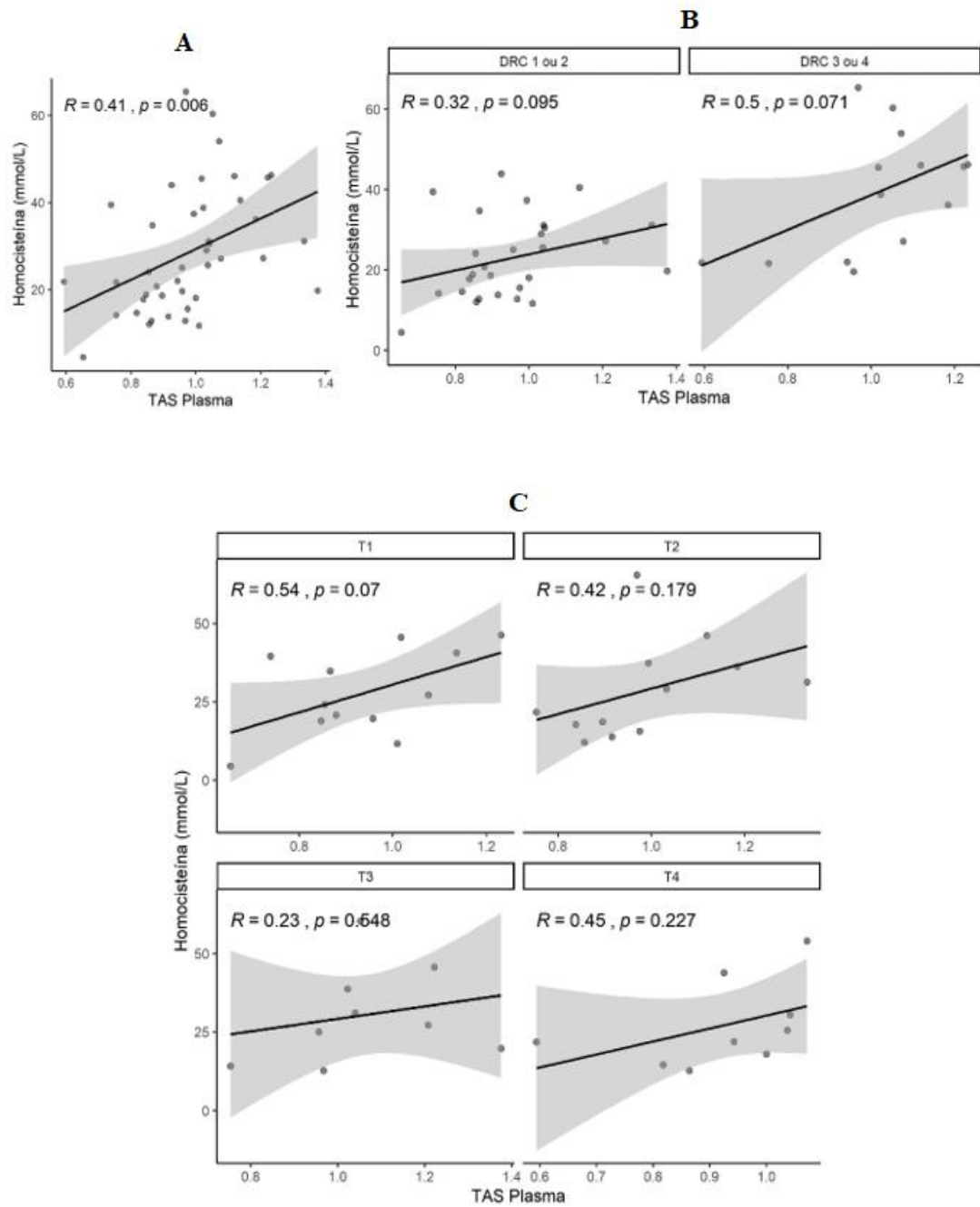


Gráfico 16. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e TAS plasmático. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e TAS plasmático para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e TAS plasmático ao longo dos tempos.

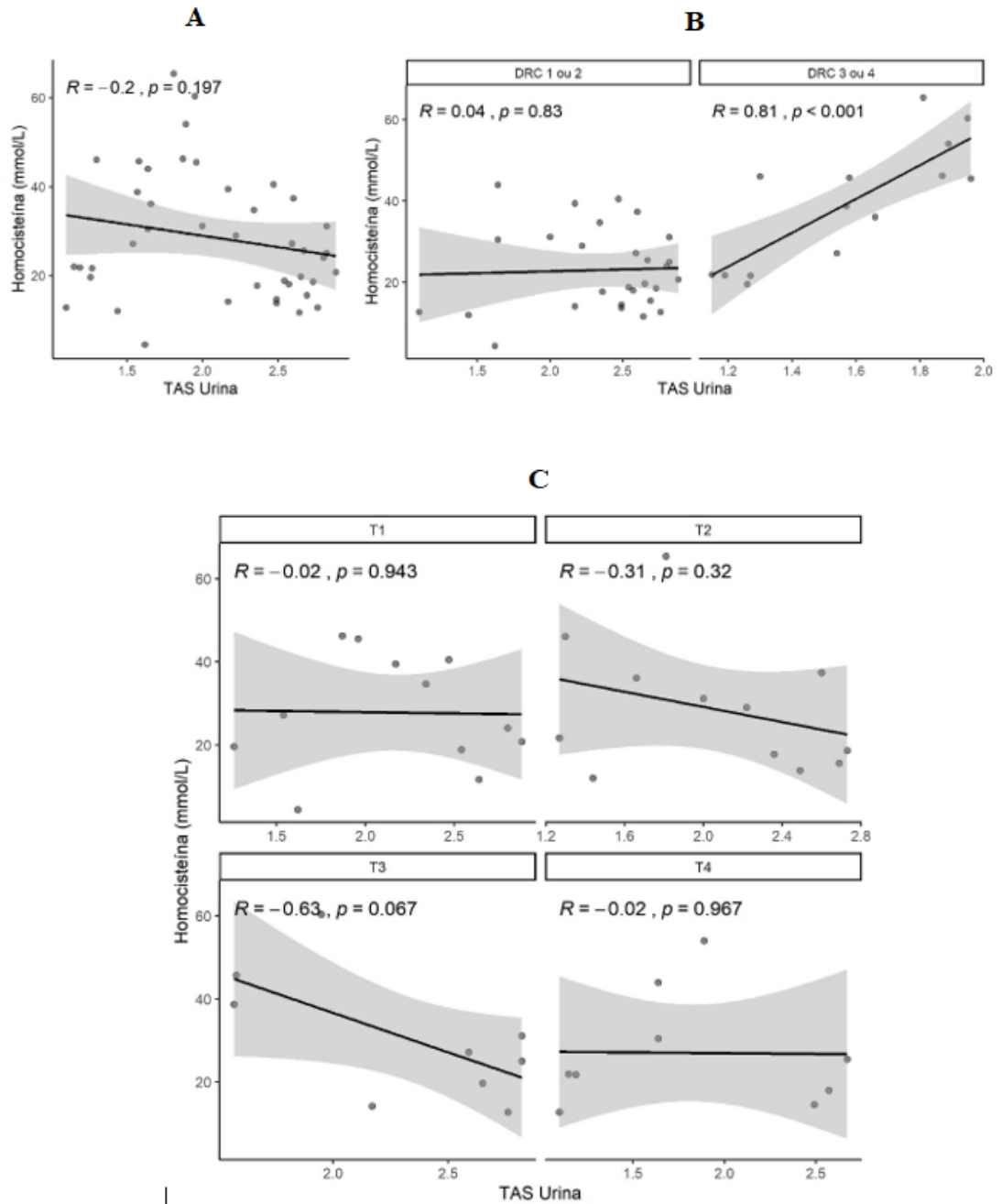


Gráfico 17. . A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e TAS urinário. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e TAS urinário para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e TAS urinário ao longo dos tempos.

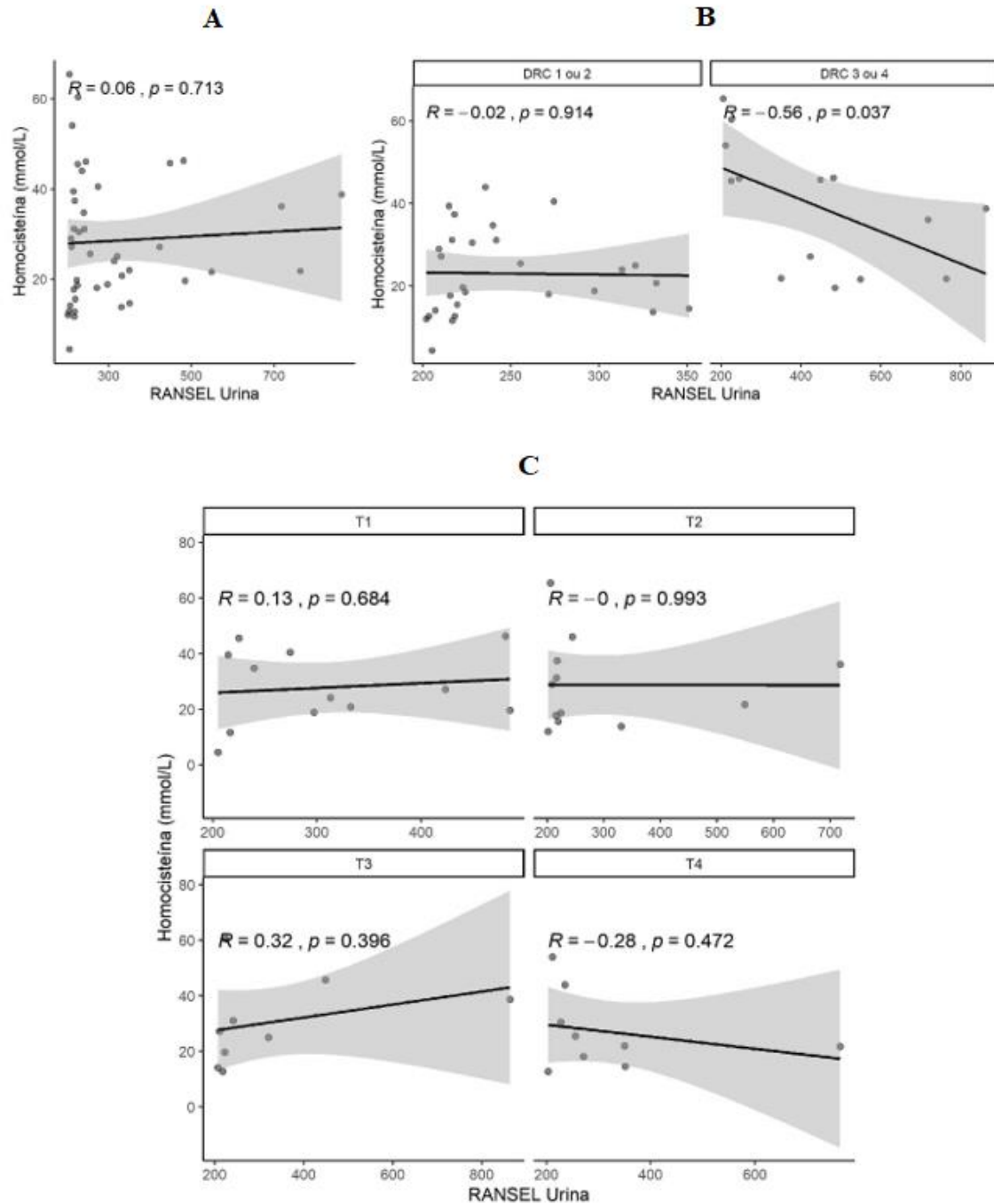


Gráfico 118. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RANSEL urinário. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RANSEL urinário para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RANSEL urinário ao longo dos tempos.

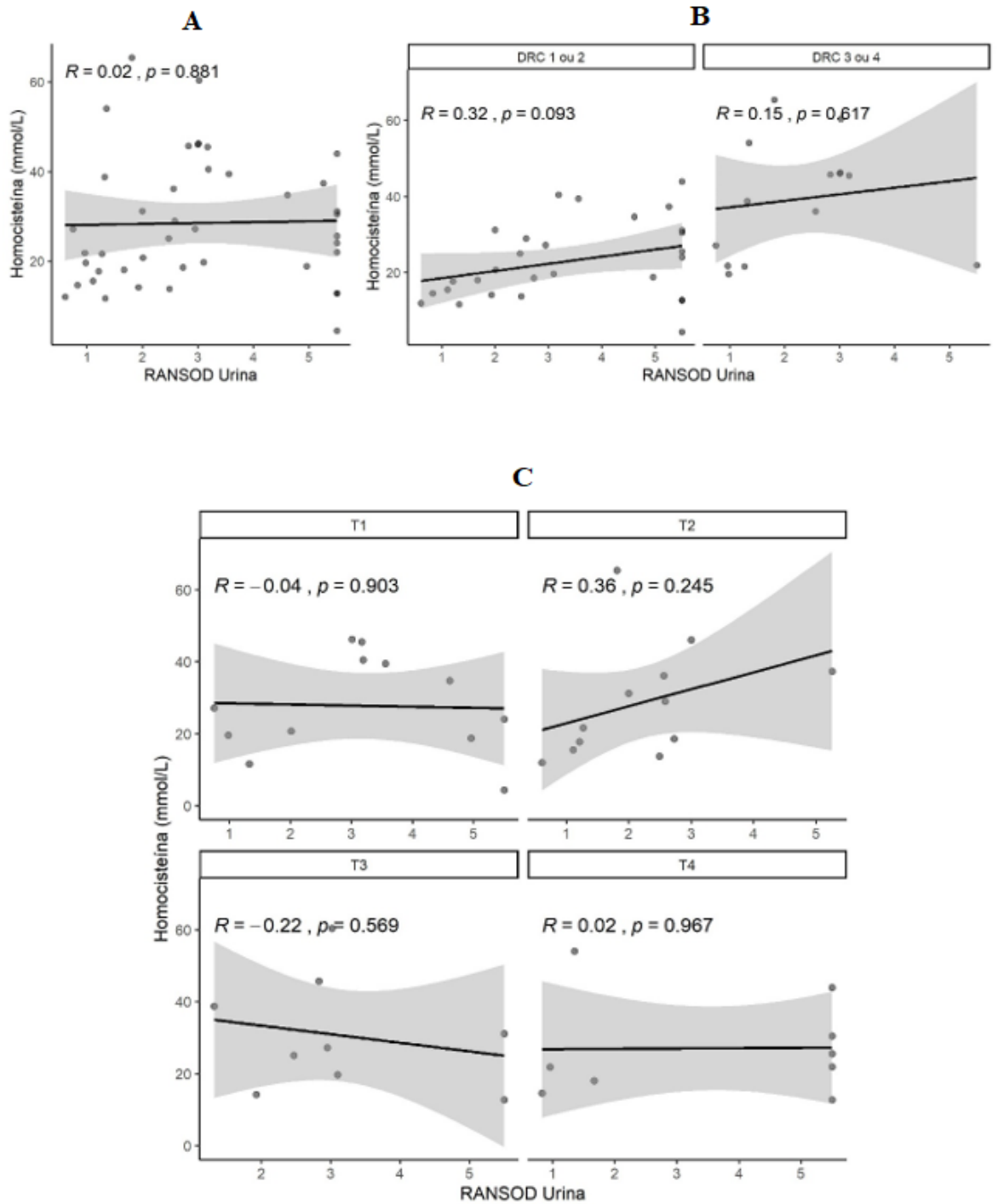


Gráfico 19. A. Correlação total entre os níveis de Homocisteína e RANSOD urinária. B. Correlação entre os níveis de homocisteína e RANSOD urinária para os diferentes grupos. C. Variação das correlações entre a homocisteína e RANSOD urinária ao longo dos tempos.

6. CONCLUSÕES:

Este foi o primeiro ensaio clínico brasileiro realizado na tentativa de se associar diretamente a DRC aos quadros de hiperhomocisteinemia. Apesar de a homocisteína ter se demonstrado elevada em pacientes portadores de DRC em relação aos grupos controle, com suas concentrações séricas aumentando de forma proporcional ao estágio da DRC, o número de pacientes totais participantes foi relativamente pequeno, sendo necessário mais estudos que corroborem os achados encontrados.

Os marcadores de função renal (SDMA, creatinina, densidade urinária e fósforo) demonstraram fraca correlação com a Hcy.

O estresse oxidativo se relaciona com a elevação das concentrações de homocisteína. Entretanto, a instituição de tratamento conservador nos animais participantes deste ensaio pode ter interferido nos resultados obtidos.

A constatação da existência de diferenças estatisticamente significativas entre indivíduos hígidos e portadores da DRC é um passo importante para os estudos futuros, tanto para a validação dos métodos e técnicas de análise, quanto para a padronização dos intervalos de referência para a espécie canina, que não se encontram ainda estabelecidos na medicina veterinária.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

A. SURESHBABU, S. W. RYTER, and M. E. CHOI, “*Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury,*” *Redox Biology*, vol. 4, pp. 208–214, 2015.

AKSOY N, AKSOY M, CAKMAK M, SERDAR GH, DAVUTOGLU V, SOYDINC S, MERAM I: Increased homocysteine in heart failure: a result of renal impairment? *Clin Chem Lab Med* 2006; 44:1324–1329.

AMMIRATI AL. Chronic Kidney Disease. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2020 Jan 13;66Suppl 1(Suppl 1):s03-s09. Doi: 10.1590/1806-9282.66.S1.3. PMID: 31939529.

ARNADOTTIR, M., HULTBERG, B., NILSSON-EHLE, P., & THYSSEL, H. (1996). *The effect of reduced glomerular filtration rate on plasma total homocysteine concentration. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 56(1), 41–46.* Doi:10.3109/00365519609088586

ARUNA, G.; DEVI, K. A. Oxidative stress in chronic renal failure. *Int J Pharm Bio Sci.* v. 5 (1), p.127–133, 2014.

AVELES P. R., CRIMINÁCIO C. R., GONÇALVES S., et al. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. *Nephron Clinical Practice.* 2010;116(4):c294–c299. Doi: 10.1159/000318792.

B. ANTUS, O. DROZDOVSKY, I. BARTA, and K. KELEMEN, “*Comparison of airway and systemic malondialdehyde levels for assessment of oxidative stress in cystic fibrosis,*” *Lung*, vol. 193, no. 4, pp. 597–604, 2013.

BENEDICTE CHRISTENSEN; HELGA REFSUM; OLAV VINTERMYR; PER MAGNE UELAND (1991). *Homocysteine export from cells cultured in the presence of physiological or superfluous levels of methionine: Methionine loading of non-transformed, transformed, proliferating, and quiescent cells in culture., 146(1), 52–62.* Doi:10.1002/jcp.1041460108

BINACHI MLP, ANTUNES LMG. *Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta*. Rev Nutr. 1999; 12(12):123-30. Doi: 10.1590/S1415-52731999000 200001.

BOCCI V: *Ozone as Janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful*. Mediators Inflammation 2004, 13(1):3-11.

BOCCI VA. *Scientific and medical aspects of ozone therapy: State of the art*. Arch Med Res. 2006; 37:425–435.

BROWN, S. A. Oxidative stress and chronic kidney disease. *Vet Clin Small Anim*. v. 38, p.157-166, 2008.

BOSTOM, A., BROSINAN, J. T., Hall, B., Nadeau, M. R. and Selhub, J. (1995) Atherosclerosis 116, 59–62

BRAUN JP, LEFEBVRE HP, WATSON ADJ. Creatinine in the dog:A review. *Vet Clin Path* 2003; 32:162–179.

CABALLERO ME et al. *Epidermal growth factor-mediated prevention of renal ischemia/reperfusion injury*. Biotec App 2000; 17: 161–165.

ÇAVIR C, KOZAT S (2016) Investigation of Homocysteine Levels in Healthy Dogs. *J Vet Sci Anim Husb* 4(3): 305

CHAUVEAU P, CHADEFAUX B, COUDE M, et al. Hyperhomocysteinemia, a risk factor for atherosclerosis in chronic uremic patients. *Kidney Int Suppl*. 1993; 41(7): S72-7.

CHE R, YUAN Y, HUANG S, ZHAANG A (2014) Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases. *AJP Ren Physiol* 306:F367–F378

CIANCIOLO, G., De Pascalis, A., Di Lullo, L., Ronco, C., Zannini, C., & La Manna, G. (2017). *Folic Acid and Homocysteine in Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease Progression: Which Comes First? Cardiorenal Medicine*, 7(4), 255–266. Doi:10.1159/000471813.

COHEN, E., MARGALIT, I., SHOCHAT, T., GOLDBERG, E., & KRAUSE, I. (2019). *The relationship between the concentration of plasma homocysteine and chronic kidney disease: a cross sectional study of a large cohort. Journal of Nephrology*. Doi:10.1007/s40620-019-00618-x.

COLGAN, S. M., & AUSTIN, R. C. (2007). Homocysteinylation of Metallothionein Impairs Intracellular Redox Homeostasis: The Enemy Within! *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(1), 8–11. Doi:10.1161/01.atv.0000254151.00086.26.

BARBATO, J. C., CATANESCU, O., MURRAY, K., DIBELLO, P. M., & JACOBSEN, D. W. (2007). Targeting of Metallothionein by L-Homocysteine: A Novel Mechanism for Disruption of Zinc and Redox Homeostasis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(1), 49–54. Doi:10.1161/01.atv.0000251536.49581.8a

COLLITTI, M.; STEFANON, B.; GABAI, G.; GELAIN, M.E.; BONSEMBIANTE, F. Oxidative Stress and Nutraceuticals in the Modulation of the Immune Function: Current Knowledge in Animals of Veterinary Interest. *Antioxidants* **2019**, 8, 28. <https://doi.org/10.3390/antiox8010028>

COWEGILL, L. D., POLZIN, D. J., Elliot, J., Nabity, M. B., SEGEV, G., GRAUER, G. F., ... VAN DONGEN, A. M. (2016). *Is Progressive Chronic Kidney Disease a Slow Acute Kidney Injury? Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(6), 995–1013. Doi:10.1016/j.cvsm.2016.06.001

D. JAMES HOUSE, E. MARGARET BROSNAN, T. JOHN BROSNAN; Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochem J* 15 November 1997; 328 (1): 287–292. Doi: <https://doi.org/10.1042/bj3280287>

DAHLEM, D.P., NEIGER, R., SCHWEIGHAUSER, A., FRANCEY, T., YERRAMALLI, M., OBARE, E. and STEINBACH, S.M.L. (2017), Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*, 31: 799-804. <https://doi.org/10.1111/jvim.14694>.

De KONING L, HU FB: Homocysteine lowering in end-stage renal disease: is there any cardiovascular benefit? *Circulation* 2010;121:1379–1381.

DOUNOUSI E., PAPAVALIIOU E., MAKEDOU A., et al. Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *American Journal of Kidney Diseases*. 2006;48(5):752–760. Doi: 10.1053/j.ajkd.2006.08.015.

DUDLEY, A., BYRON, J. K., BURKHARD, M. J., WARRY, E., & GUILLAUMIN, J. (2017). *Comparison of platelet function and viscoelastic test results between healthy dogs and dogs with naturally occurring chronic kidney disease. American Journal of Veterinary Research*, 78(5), 589–600. doi:10.2460/ajvr.78.5.589

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. RAMB. 1997; 43(1):61-8. *From cell biology to acute kidney injury,*” *Progrès en Urologie*, vol. 24, Supplement 1, pp. S4–12, 2014.

ETTINGER SJ, FELDMAN EC. *Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato*. 5. Ed. — Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004

ETTINGER SJ, FELDMAN EC. *Textbook of Veterinary Internal Medicine : Diseases of the Dog and Cat*. 8. Ed. — St. Louis, Missouri, US: Elsevier, 2017.

FERREIRA ALA, MATSUBARA LS. *Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo*. RAMB. 1997; 43(1):61-8. *From cell biology to acute kidney injury,*” *Progrès en Urologie*, vol. 24, Supplement 1, pp. S4–12, 2014.

FINKELSTEIN JD. Methionine metabolism in mammals. *J Nutr Biochem*. 1990;1:228–237

FINKELSTEIN JD, MARTIN JJ. Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32:385–9. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(99\) 00138-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(99) 00138-7).

FOKKEMA, M. R., GILISSEN, M. F., VAN DOORMAAL, J. J., VOLMER, M., KEMA, I. P. & ANDMUSKIET, F. A. (2003). "Fasting Vsnonfasting Plasma Homocysteine Concentrations for Diagnosis of Hyperhomocysteinemia," *Clinical Chemistry*, 49 (5) 818-821

FRANCIS, M. E., EGGERS, P. W., HOSTETTER, T. H., & BRIGGS, J. P. (2004). *Association between serum homocysteine and markers of impaired kidney function in adults in the United States. Kidney International*, 66(1), 303–312. Doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00732.x

FRIEDMAN AN, BOSTOM AG, SELHUB J, LEVREY AS, ROSENBERG IH. The kidney and homocysteine metabolism. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Oct;12(10):2181-2189. Doi: 10.1681/ASN.V12102181. PMID: 11562419.

GARIBOTTO G, SOFIA A, SAFFIOTI S, RUSSO R, DEFERRARI G, ROSSI D, VERZOLA D, GANDOLFO MT, SALA MR. Interorgan exchange of aminothiols in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2003;284:E757–E763.

GEDDES RF, ELLIOTT J, SYME HM. Relationship between plasma fibro-blast growth Factor-23 concentration and survival time in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2015;29:1494-1501.

GUIMARÃES, L. S. P., & HIRAKATA, V. N. 2012. Uso do Modelo de Equações de Estimativas Generalizadas na análise de dados longitudinais. *Revista HCPA*. Porto Alegre. Vol. 32, n. 4 (2012), p. 503-511.

GYURÁSZOVÁ M, GURECKÁ R, BABICKOVÁ J, TÓTHOVÁ Ľ. Oxidative Stress in the Pathophysiology of Kidney Disease: Implications for Noninvasive Monitoring and Identification of Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev*. 2020 Jan 23;2020:5478708. Doi: 10.1155/2020/5478708. PMID: 32082479; PMCID: PMC7007944.

GOBER´ G et al. *Cell survival or death after ischemia-reperfusion injury*. *Kidney Int* 1999; 56: 1299–1304.

HALLIWELL B, WHITEMAN M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2): 231-55.

HAMMERMAN MR et al. *Acute renal failure. The role of growth factors in the process of renal regeneration and repair.* *Am J Physiol* 2000; 279: 3–11.

HAO L, Ma J, STAMPFER MJ, Ren A, Tian Y, Tang Y, Willett WC, Li Z. Geographical, seasonal and gender differences in folate status among Chinese adults. *J Nutr.* 2003;133:3630–3635

HARLEY L, LANGSTON C. Proteinuria in dogs and cats. *Can Vet J.* 2012 Jun;53(6):631-8. PMID: 23204582; PMCID: PMC3354822.

HERMANN A, SITDIKOVA G. Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease. *Biomolecules.* 2021; 11(5):737. <https://doi.org/10.3390/biom11050737>

HIMMELFARB J (2005) Relevance of oxidative pathways in the pathophysiology of chronic kidney disease. *Cardiol Clin* 23:319–330.

HOKAMP, J. A., CIANCIOLO, R. E., BOGGESS, M., LEES, G. E., BENALI, S. L., KOVARSKY, M., & NABITY, M. B. (2016). *Correlation of Urine and Serum Biomarkers with Renal Damage and Survival in Dogs with Naturally Occurring Proteinuric Chronic Kidney Disease.* *Journal of Veterinary Internal Medicine, 30(2), 591–601.* doi:10.1111/jvim.13832

HOUSE, D. J., BROSANAN, E. M., & BROSANAN, T. J. (1997). Characterization of homocysteine metabolism in the rat kidney. *Biochemical Journal, 328(1), 287–292.* Doi:10.1042/bj3280287

HULTBERG, Andersson A, Sterner G. Plasma homocysteine in renal failure. *Clin Nephrol.* 1993; 40(4):230-4

JANION K, STRZELCZYK JK, WALKIEWICZ KW, BIERNACKI K, COPIJA A, SZCZEPÁNSKA E, NOWAKOSKA-ZAJDEL E. Evaluation of Malondialdehyde Level, Total Oxidant/Antioxidant Status and Oxidative Stress Index in Colorectal Cancer Patients. *Metabolites*. 2022 Nov 15;12(11):1118. doi: 10.3390/metabo12111118. PMID: 36422258; PMCID: PMC9695970.

J. DAVID SPENCE, BRADLEY L. URQUHART, HEEJUNG Bang, Effect of renal impairment on atherosclerosis: only partially mediated by homocysteine, *Nephrology Dialysis Transplantation*, Volume 31, Issue 6, June 2016, Pages 937–944, <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv380>

JIANG LJ, MARET W, VALLEE BL. The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3483–3488.

JUD P, HAFNER F, VERHEYEN N, GARY T, MEINITZER A, Brodmann M, SEINOST G, HACKL G. Age-dependent effects of homocysteine and dimethylarginines on cardiovascular mortality in claudicant patients with lower extremity arterial disease. *Heart Vessels*. 2018 Dec;33(12):1453-1462. doi: 10.1007/s00380-018-1210-9. Epub 2018 Jun 26. PMID: 29946762; PMCID: PMC6267409.

KAKIMOTO, TOSHIAKI & IWANAGA, TOMOKO & KANOUCI, HIROAKI. (2014). Plasma Homocysteine Concentrations in Dogs. *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*. 10.5171/2014.141449.

KING, J.N., TASKER, S., GUNN-MOORE, D.A. and STREHLAU, G. (2007), Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 906-916. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03042.x>

KOKLESOVA, L., MAZURAKOVA, A., SAMEC, M. *et al*. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *EPMA Journal* **12**, 477–505 (2021). <https://doi.org/10.1007/s13167-021-00263-0>

KUCHTA A., PACANIS A., KORTAS-STEMPAK B., et al. Estimation of oxidative stress markers in chronic kidney disease. *Kidney & Blood Pressure Research*. 2011;34(1):12–19. Doi: 10.1159/000321508.

KUMAR, A., PALFREY, H.A., PATHAK, R. *et al.* The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond)* **14**, 78 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12986-017-0233-z>.

LANGHORN R, KIELER IN, Koch J, CHRISTIANSEN LB, JESSEN LR. Symmetric Dimethylarginine in Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy and Diabetes Mellitus. *J Vet Intern Med*. 2018 Jan;32(1):57-63. doi: 10.1111/jvim.14902. Epub 2017 Dec 12. PMID: 29230874; PMCID: PMC5787200.

LEE, S.-G.; HYUN, C. (2012). Evaluation of homocysteine levels in dogs with chronic mitral valve insufficiency. *Veterinary Record*, 171(9), 220–220. Doi:10.1136/vr.100864

LEE, C.-M., JEONG, D.-M., KANG, M.-H., KIM, S.-G., HAN, J.-I., & PARK, H.-M. (2017). Correlation between serum homocysteine concentration and severity of mitral valve disease in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 78(4), 440–446. Doi:10.2460/ajvr.78.4.440

ROSSI, S.; ROSSI, G.; GIORDANO, A.; PALTRINIERI, S. (2008). Homocysteine Measurement by an Enzymatic Method and Potential Role of Homocysteine as a Biomarker in Dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(5), 644–649. Doi:10.1177/104063870802000520

LEVI A, COHEN E, LEVI M, GOLDBERG E, GARTY M, KRAUSE I. Elevated serum homocysteine is a predictor of accelerated decline in renal function and chronic kidney disease: a historical prospective study. *Eur J Intern Med*. 2014; 25(10): 951-5.

LING, X.C.; KUO, K.L. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Renal Replacement Therapy*. v.4:53, 2018.

LITTMAN MP. Protein-losing nephropathy in small animals. *Vet Clin Small Anim*. 2011;41:31–62.

LONG, Y., & NIE, J. (2016). *Homocysteine in Renal Injury*. *Kidney Diseases*, 2(2), 80–87. Doi:10.1159/000444900.

MEINDL, A. G., LOURENÇO, B. N., COLEMAN, A. E., & CREEVY, K. E. (2018). *Relationships among urinary protein-to-creatinine ratio, urine specific gravity, and bacteriuria in canine urine samples*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. doi:10.1111/jvim.15377

MAGNÉ, J., HUNEAU, J.-F., BORDERIE, D., MATHÉ, V., BOS, C., & MARIOTTI, F. (2015). *Plasma asymmetric and symmetric dimethylarginine in a rat model of endothelial dysfunction induced by acute hyperhomocysteinemia*. *Amino Acids*, 47(9), 1975–1982. doi:10.1007/s00726-015-1959-4

MARET W. Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/ disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:237–241.

MARET W, VALLEE BL. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:3478 –3482

MARINO C.L., LASCELLES B.D.X., VADEN S.L., GRUEN M.E., MARKS S.L. Prevalence and Classification of Chronic Kidney Disease in Cats Randomly Selected from Four Age Groups and in Cats Recruited for Degenerative Joint Disease Studies. *J. Feline Med. Surg*. 2014;16:465–472. doi: 10.1177/1098612X13511446.

MCCULLY, K. S. (2015). *Homocysteine Metabolism, Atherosclerosis, and Diseases of Aging*. *Comprehensive Physiology*, 471–505. doi:10.1002/cphy.c150021

M. De la FUENTE, “*Effects of antioxidants on immune system ageing*,” *European Journal of Clinical Nutrition*, vol. 56, pp. S5–S8, 2002.

NABITY, M.B., LEES, G.E., BOGGESS, M.M., YERRAMILI, M., OBARE, E., YERRAMILI, M., RAKITIN, A., AGUIAR, J. and RELFORD, R. (2015), Symmetric Dimethylarginine Assay Validation, Stability, and Evaluation as a Marker for the Early Detection of Chronic Kidney Disease in Dogs. *J Vet Intern Med*, 29: 1036-1044. <https://doi.org/10.1111/jvim.12835>

NERBASS, F. B., DRAIBE, S. A., & CUPPARI, L. (2005). *Hiperhomocisteinemia na insuficiência renal crônica*. *Revista de Nutrição*, 18(2), 239–249. doi:10.1590/s1415-52732005000200008

NEVES, L. B. et al. Homocisteína. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. São Paulo, v.40, n. 5, p. 311-320, out. 2004. 5. VANNUCCHI, H.; MELO, S. S. Hiperhomocisteinemia e risco cardiometabólico. *Arquivo Brasileiro de Endocrinologia Metabólica*. São Paulo, v. 53, n. 5, 2009.

NISTALA R, WHALEY-CONNEL A, SOWERS JR (2008) Redox control of renal function and hypertension. *Antioxid Redox Signal* 10:2047–2089

NOVARTIS ANIMAL HEALTH Inc. IRIS staging of CKD [5 July 2022]; http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml (2019)

PALMIERI B., SBLENDORIO V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part I. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2007;11(5):309–342.

PALMITER RD. The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8428-30. doi: 10.1073/pnas.95.15.8428. PMID: 9671693; PMCID: PMC33872.

Li X, Chen H, Epstein PN. Metallothionein protects islets from hypoxia and extends islet graft survival by scavenging most kinds of reactive oxygen species. *J Biol Chem*. 2004;279:765–771

PERNA, A. F., & INGROSSO, D. (2019). *Homocysteine and chronic kidney disease: an ongoing narrative*. *Journal of Nephrology*. doi:10.1007/s40620-019-00622-1

PERRY IJ, REFSUM H, MORRIS RW, EBRAHIM SB, UELAND PM, Shaper AG. Prospective study of serum total homocysteine concentration and risk of stroke in middle-aged British men. *Lancet*. 1995;346:1395–1398]

POLZIN D.J. Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* 2011;41:15–30. doi: 10.1016/j.cvsm.2010.09.004.

POLZIN DJ. Evidence-based step-wise approach to managing chronic kidney disease in dogs and cats. *J Vet Em and Crit Care*. 2013;23:205–215.

PRESSLER BM. Clinical approach to advanced renal function testing indogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013;43(6):1193-1208

RATLIFF BB, ABDULMAHDI W, PAWAR R, WOLIN MS. Oxidant Mechanisms in Renal Injury and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2016 Jul 20;25(3):119-46. doi: 10.1089/ars.2016.6665. Epub 2016 Apr 26. PMID: 26906267; PMCID: PMC4948213.

R CORE TEAM. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

REFSUM H, HELLAND S, UELAND PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985; 31:624–628.

ROUDEBUSH, P.; POLZIN, D.J.; ADAMS, L.G.; TOWELL T.L.; FORRESTER, S.D. An Evidence-Based Review of Therapies for Canine Chronic Kidney Disease. *J. Small Anim. Pract.* 2010, 51, 244–252.

ROSSI S, ROSSI G, GIORDANO A, PALTRINIERI S. Homocysteine measurement by an enzymatic method and potential role of homocysteine as a biomarker in dogs. *J Vet Diagn Invest*. 2008;20(5):644-649.

RUDINSKY, AJ, HARJES, LM, BYRON, J, et al. Factors associated with survival in dogs with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med*. 2018; 32: 1864– 1873. <https://doi.org/10.1111/jvim.15322>.

RUIZ-ORTEGA M, RAYEGO-MATEOS S, LAMAS S, ORTIZ A, RODRIGUES-DIEZ RR. Targeting the progression of chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2020 May;16(5):269-288. doi: 10.1038/s41581-019-0248-y. Epub 2020 Feb 14. PMID: 32060481.

SARGENT, H. J., ELLIOT, J., & JEPSON, R. E. (2020). *The new age of renal biomarkers: does SDMA solve all of our problems? Journal of Small Animal Practice*. doi:10.1111/jsap.13236

SEVENCAN, N. O., & OZKAN, A. E. (2018). *Associations between neutrophil/lymphocyte ratio, platelet/lymphocyte ratio, albuminuria and uric acid and the estimated glomerular filtration rate in hypertensive patients with chronic kidney disease stages 1–3. Archives of Medical Science*. doi:10.5114/aoms.2018.76262.

SILVA AC, de ALMEIDA BF, SOEIRO CS, FERREIRA WL, de LIMA VM, CIARLINI PC. Oxidative stress, superoxide production, and apoptosis of neutrophils in dogs with chronic kidney disease. *Can J Vet Res*. 2013 Apr;77(2):136-41. PMID: 24082406; PMCID: PMC3605930.

SORIA C, CHADEFAUX B, COUDE M, GAILLARD O, KAMOUN P. Concentrations of total homocysteine in plasma in chronic renal failure. *Clin Chem* 1990;36:2137-8

SPENCE JD. B vitamin therapy for homocysteine: renal function and vitamin B12 determine cardiovascular outcomes. *Clin Chem Lab Med*. 2013 Mar 1;51(3):633-7. doi: 10.1515/cclm-2012-0465. PMID: 23449527.

STAM, F. (2004). Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *AJP: Renal Physiology*, 287(2), F215–F223. doi:10.1152/ajprenal.00376.2003

SUEM ATS U, N., OJAIMI, C., KINUGAWA, S., WANG, Z., XU, X., KOLLER, A., RECCHIA, F. A. & HINTZE, T. H. (2007) Hyperhomocysteinemia alters cardiac substrate metabolism by impairing nitric oxide bioavailability through oxidative stress. *Circulation* 115, 255–262

SUEMATSU, N., OJAIMI, C., KINUGAWA, S., WANG, Z., XU, X., KOLLER MD, A., ... HINTZE, T. H. (2006). *Hyperhomocysteinemia Alters Cardiac Substrate Metabolism by Impairing Nitric Oxide Bioavailability Through Oxidative Stress*. *Circulation*, *115*(2), 255–262. doi:10.1161/circulationaha.106.652693

SURESHBABU, A., RYTER, S. W., & CHOI, M. E. (2015). *Oxidative stress and autophagy: Crucial modulators of kidney injury*. *Redox Biology*, *4*, 208–214. doi:10.1016/j.redox.2015.01.001

SYME H. *International Renal Interest Society (IRIS). Early CKD Diagnosis*. (2019). Available online at: http://www.iris-kidney.com/education/early_diagnosis.html (accessed April, 2021).

SZLOSEK D, ROBERTSON J, QUIMBY J, MACK R, OGEER J, Clements C, MCCRANN DJ, COYNE MJ. A retrospective evaluation of the relationship between symmetric dimethylarginine, creatinine and body weight in hyperthyroid cats. *PLoS One*. 2020 Jan 28;15(1):e0227964. doi: 10.1371/journal.pone.0227964. PMID: 31990929; PMCID: PMC6986741.

TBAHRITI HF, KADDOUS A, BOUCHENAK M, MEKKI K (2013) Effect of different stages of chronic kidney disease and renal replacement therapies on oxidant-antioxidant balance in uremic patients. *Biochem Res Int* 2013:358985

WOLLESEN, F., BRATTSTROM, L., REFSUM, H., UELAND, P. E. R. M., Berglund, L., & BERNE, C. (1999). *Plasma total homocysteine and cysteine in relation to glomerular filtration rate in diabetes mellitus*. *Kidney International*, *55*(3), 1028–1035. doi:10.1046/j.1523-1755.1999.0550031028.x

TOGAWA, T., SENGUPTA, S., CHEN, H., ROBINSON, K., NONEVSKI, I., Majors, A. K., & Jacobsen, D. W. (2000). *Mechanisms for the Formation of Protein-Bound Homocysteine in Human Plasma*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *277*(3), 668–674. doi:10.1006/bbrc.2000.3723

TRISOLINI, C., MINOIA, G., MANCA, R., RIZZO, A., ROBBE, D., VALENTINI, L. & ANDSCIORSCI, R. L. (2008). "Plasma Homocysteine Levels in Cycling, Pregnant, and Spayed Bitches," *Animal Reproduction Science*, 108 (1-2) 29- 36.

UELAND, P. M., REFSUM, H., Stabler, S. P., MALINOW, M. R., ANDERSSON, A., & ALLEN, R. H. (1993). Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clinical Chemistry*, 39(9), 1764–1779. doi:10.1093/clinchem/39.9.1764

UPCHURCH GR, Jr., WELCH GN, FABIAN AJ, FREEDMAN JE, JOHNSON JL, KEANEY JF, Jr., LOSCALZO J Homocyst(e)ine decreases bioavailable nitric oxide by a mechanism involving glutathione peroxidase. *J Biol Chem*. 1997;272:17012–17017.

VADEN, S. L., & ELLIOT, J. (2016). *Management of Proteinuria in Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease. Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46(6), 1115–1130. doi:10.1016/j.cvsm.2016.06.009

VAN GULDENER C. Homocysteine and the kidney. *Curr Drug Metab*. 2005;6:23–26.

WEHNER A, HARTMANN K, HIRSCHBERGER J. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Vet Rec*. 2008;162:141–147.

YANG, Q., Lu, Y., DENG, Y., XU, J., & ZHANG, X. (2020). *Homocysteine level is positively and independently associated with serum creatinine and urea nitrogen levels in old male patients with hypertension. Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-75073-x

YE Z, WANG C, ZHANG Q, et al. Prevalence of homocysteine-related hypertension in patients with chronic kidney disease. *J Clin Hypertens*. 2016; 2016(21): 1288

YU G, LIU X, CHEN Z, CHEN H, WANG L, WANG Z, QIU T, WENG X. Ozone therapy could attenuate tubulointerstitial injury in adenine-induced CKD rats by mediating Nrf2 and NF-κB. *Iran J Basic Med Sci*. 2016 Oct;19(10):1136-1143. PMID: 27872711; PMCID: PMC5110663.

YU M, KIM YJ, KANG DH (2010) Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress 15. *Clin J Am Soc Nephrology*.

ANEXOS:**ANEXO 1:****PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO - PAPA DE HEMÁCIAS**

1. O sangue do tubo contendo heparina de lítio (tampa verde) deve ser centrifugado a 3000 RPM por 5 min (Detalhe: a amostra deverá estar a temperatura ambiente e a rotação deve ser aumentada gradativamente, 500 rpm a cada 30'', para evitar hemólise).
2. Após centrifugação, aliquotar o plasma para ependorfs, usando pipeta de Paster, até retirar todo o plasma do tubo (identificar com nome cão, número do atendimento, data e letra P - de plasma). Cuidado para não atingir a porção sólida (papa de hemácias) durante a pipetagem.
3. Com uma pipeta de Pasteur destinada para solução salina 0,9%, acrescentar uma quantidade desta solução igual à quantidade da papa de hemácias, no próprio tubo de tampa verde, no qual o plasma foi retirado. OBS: Depositar, delicadamente, a solução fisiológica pela parede do tubo, e não diretamente sobre as hemácias.
4. Homogeneizar delicadamente, invertendo o tubo por 6 a 8 vezes.
5. Centrifugar a 3000 RPM por 10 min (Detalhe: a rotação deve ser aumentada gradativamente, para evitar hemólise (500 rpm a cada 30'')).
6. Retirar todo o sobrenadante, com a pipeta de Paster utilizada anteriormente para retirar o plasma. Descartar o sobrenadante.
7. Repetir os itens 3, 4, 5 e 6 mais duas vezes, totalizando 3 lavagens da papa de hemácias com salina a 0,9%.
8. Utilizando uma pipeta automática, com uma ponteira nova, chegar até o fundo do tubo e aspirar a papa de hemácias, transferindo-a para criotubos (identificados com nome cão, número do atendimento, data e letras He - de hemácia).
9. Colocar os criotubos em refrigerador de 2 a 8°C, por pelo menos 20 minutos, em seguida, armazená-los no freezer a -80°C.