



**Mónica Figueiredo
Fernandes**

Biomarcadores em *Canis lupus familiaris*

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**Mónica Figueiredo
Fernandes**

Biomarkers in *Canis lupus familiaris*

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros, Professora Associada com Agregação do Departamento de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa e Coorientação da Professora Ana Cristina Esteves, Professora convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
professora auxiliar C/ agregação, Universidade de Aveiro

Vogal – Arguente principal

Professora Doutora Helena Maria Vala Correia
professora coordenadora, Instituto Politécnico de Viseu

Vogal - Orientador

Professora Doutora Marlene Maria Tourais de Barros
professora associada com agregação, Universidade Católica Portuguesa

agradecimentos

Agradeço toda a dedicação nesta dissertação:

À Professora Doutora Marlene Barros, minha orientadora, por ter apostado, confiado em mim e nas minhas capacidades.

Ao Professor Doutor Nuno Rosa pelo apoio incansável que me foi prestado e por me ter motivado ao longo destes meses de trabalho.

À Professora Doutora Maria José Correia pela paciência, ajuda e motivação ao longo do percurso da tese.

À Professora Doutora Cristina Esteves, minha coorientadora, por ter incentivado e contribuído para o sucesso desta tese.

À Professora Doutora Helena Vala e Professora Doutora Cármen Nóbrega por acreditarem que este trabalho tinha futuro e contribuírem para o sucesso desta tese.

Ao Professor Doutor Joel Arrais por todo o auxílio prestado para a realização desta tese.

Aos Diretores das clínicas veterinárias da zona de Viseu que consentiram as recolhas de saliva nos cães.

Aos Alunos de Enfermagem Veterinária da Escola Superior Agrária, principalmente à Rita Gravato pelo seu excelente auxílio na recolha da saliva dos cães.

À Eng^a Carla também pela sua ajuda e motivação neste trabalho.

À Carla e Yulia por terem sido uma ajuda imprescindível neste trabalho.

Às minhas amigas Barbara, Rita e Catarina pela preocupação e força dada ao longo do projeto.

Ao Fernando e Anabela por serem uns segundos pais para mim.

Aos meus pais e irmã por serem os pilares da minha vida. Juntos alcançamos forças para ultrapassar todos os obstáculos que enfrentamos nestes últimos anos.

Ao Eduardo por ser uma das pessoas mais importantes da minha vida que nunca me deixou desistir.

palavras-chave

CanisTecOme, base de dados, proteínas, biomarcadores, saliva

resumo

Introdução- Os animais de companhia como o cão desempenham hoje um papel a nível familiar e social importante podendo atuar como agentes em programas terapêuticos e de socorrismo.

A qualidade de vida dos animais de companhia e o correspondente impacto na saúde pública pode beneficiar com o diagnóstico precoce e a intervenção terapêutica adequada.

Com a evolução das abordagens Ómicas, nomeadamente dos estudos de proteómica foi gerado um grande volume de dados que retratam o perfil de proteínas característico de diversas situações patológicas. No entanto a informação gerada encontra-se dispersa por inúmeros artigos científicos e também por bases de dados diversas. A reunião de toda a informação molecular disponível numa única base de dados permitirá a integração da informação existente, facilitando estudos que visem encontrar os mecanismos moleculares subjacentes a patologias bem como encontrar biomarcadores que permitam o diagnóstico precoce de patologias.

Objetivo- Este trabalho tem como objetivo criar uma base de dados que reúna toda a informação existente sobre os proteomas parciais de *Canis lupus familiaris*, o CanisTecOme. Com a construção da estrutura da base de dados CanisTecOme é demonstrada através de análises diversas *in silico*, a metodologia a seguir para extrair informação diversa sobre as proteínas implicadas em patologias de cão.

Estando interessados em estabelecer a saliva como fluido de diagnóstico não invasivo, foi também objetivo desta tese o estabelecimento da metodologia para a recolha, armazenamento e caracterização de amostras de saliva de cão.

Materiais e métodos- A base de dados CanisTecOme foi construída por recurso a revisão e anotação manual sobre a informação relativa à caracterização do indivíduo dador, tipo de amostra biológica, técnicas utilizadas para a identificação da proteína, e toda a informação conhecida sobre cada uma das proteínas catalogada na base de dados. O CanisTecOme tem também anotado as proteínas que já foram propostas como biomarcadores para patologias diversas.

A metodologia para o estabelecimento da recolha, armazenamento e caracterização das amostras de saliva de cão foi baseada na já estabelecida para a saliva humana.

Conclusão- A estrutura proposta para a base de dados CanisTecOme permite responder a questões como identificar:

- As patologias em cão para as quais existe informação sobre as proteínas implicadas;
- Os mecanismos moleculares comprometidos em patologias;
- A saliva contém proteínas que permitam identificar patologias sistémicas?

No que diz respeito à metodologia estabelecida para a recolha, armazenamento e caracterização de amostras de saliva esta mostrou-se com a qualidade adequada para o estabelecimento de um futuro biobanco de saliva animal.

keywords

CanisTecOme, database, proteins, biomarkers, saliva

abstract

Introduction – Pets such as the dog are important for families and for society in general acting as therapeutic agents and rescue aids.

Pets quality of life and the correspondent effect on public health may benefit from early diagnostics and targeted therapeutic actions.

The evolution of the Omics sciences, including proteomics resulted in the accumulation of a large volume of data reflecting the protein profile of different pathological situations. However, the information generated is dispersed throughout several scientific articles and data bases. Collecting all information in a single database allows data integration and management used in studies to find molecular biomarkers for early diagnosis.

Goal - To create a database with all information on the partial proteomes of *Canis lupus familiaris*, the CanisTecOme. The methodology to be used in for data management and information gathering using the CanisTecOme database is demonstrated through different *in silico* analysis.

A second objective of this work was the outlining of the basic methodology for dog saliva collection, storage and characterization. This allows the use of saliva as a minimally invasive diagnostic fluid.

Materials and methods – Manual curation and annotation of all the information related to the saliva donor, biological sample, techniques used for protein identification and all the information related to the protein identifies was performed. The CanisTecOme has also indicated whether a protein has already been proposed as a biomarker.

The methodology for the establishment of the sampling, storage and sample characterization of dogs saliva was based on what is already established for human saliva.

Conclusion – The structure proposed for the database enables the answer to the following questions:

- Which proteins have been identified in the dog as being present in a pathology?
- Which molecular mechanisms are compromised in a pathological situation?
- Are there protein in saliva which allow the identification of systemic pathologies in the dog?

Furthermore, the methods used for sampling, transport and storage of saliva were adequate for the establishment of a saliva biobank for animal saliva.

Comunicações

COMUNICAÇÕES ORAIS

Fernandes, M; Rosa, N; Correia, MJ; Vala, H; Barros, M “CanisTecOme: base de dados de proteómica do *Canis lupus familiaris*”. IV Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Oeiras, Portugal 3 a 5 de Abril 2014.

COMUNICAÇÕES EM PAINEL

Fernandes, M; Rosa, N; Correia, MJ; Vala, H; Barros, M “CanisTecOme: base de dados de proteómica do *Canis lupus familiaris*”. IV Congresso Sociedade Portuguesa de Ciências Veterinárias. Oeiras, Portugal 3 a 5 de Abril 2014.

Índice

1. Introdução.....	1
1.1 Importância dos animais de companhia na sociedade.....	1
1.2 Patologias caninas emergentes provocadas por microrganismos.....	2
1.2.1 Leishmaniose.....	2
1.2.2 Leptospirose.....	5
1.3 Relevância da proteómica para o estabelecimento do diagnóstico.....	7
1.4 Importância da Bioinformática para interpretação de dados biológicos.....	9
1.4.1 UniprotKB.....	9
1.4.2 AgBase.....	10
1.4.3 PANTHER.....	11
1.4.4 OralCard.....	11
1.4.5 Oralint.....	12
1.4.6 Cytoscape.....	12
2. Objetivos.....	13
3. Materiais e métodos.....	14
Componente <i>in silico</i>	15
3.1 Compilação do proteoma de <i>Canis lupus familiaris</i>	16
3.2 Revisão e anotação do proteoma de <i>Canis lupus familiaris</i>	19
3.3 Justificação do nome da base de dados.....	32
3.4 Caracterização funcional das proteínas exclusivas em situação de doença.....	33
3.5 Caracterização funcional das proteínas identificadas em saliva do <i>Canis lupus familiaris</i>	42
3.6 Estabelecimento das redes de interação em que participam as proteínas do <i>Canis lupus familiaris</i>	49
3.6.1 Proteínas do <i>Canis lupus familiaris</i> capazes de interagir com as proteínas da <i>Leptospira interrogans</i> causadora de Leptospirose.....	49
Componente experimental	56
3.7 Criação de uma coleção de amostras de saliva de <i>Canis lupus familiaris</i>	57
3.7.1 Estabelecimento da metodologia para a obtenção das amostras de saliva.....	58
3.7.2 Estabelecimento do processo de registos de amostras coleção de amostras de saliva.....	63
4. Resultados e discussão.....	66
Componente <i>in silico</i>	67
4.1 Compilação do proteoma de <i>Canis lupus familiaris</i>	68
4.2 Revisão e anotação do proteoma do <i>Canis lupus familiaris</i>	70

4.3 Caracterização funcional das proteínas anotadas no CanisTecOme	72
4.3.1 Proteínas implicadas em cada doença	75
4.3.2 Proteínas candidatas a biomarcadores.....	82
4.3.3 Proteínas exclusivas da saliva de <i>Canis lupus familiaris</i> candidatas a biomarcadores	99
4.4 Redes de interação em que participam as proteínas do <i>Canis lupus familiaris</i>	104
4.4.1 Interação das proteínas do <i>Canis lupus familiaris</i> com as proteínas da <i>Leptospira interrogans</i> causadora da Leptospirose	104
Componente experimental	107
4.5 Catalogação das amostras de saliva de <i>Canis lupus familiaris</i>	108
5. Conclusões	114
6. Perspectivas futuras	115
7. Bibliografia.....	116
8. Anexos.....	119

Índice de figuras

Figura 1- Ciclo de vida de <i>Leishmania infantum</i> , com indicação de percursos comprovados e não-comprovados de flebotomíneos de transmissão para cão (adaptado de Gallego et al 2011 ²).	3
Figura 2- Distribuição da infeção por <i>Leishmania infantum</i> na Europa (adaptado de Gallego et al 2011 ²).	4
Figura 3- Ciclo de infeção (adaptado de Ko et al 2009 ³).	6
Figura 4- Esquema da parede celular das Leptospiras indicando a localização de várias proteínas, lipoproteínas e LPS (adaptado de Ko et al 2009 ³).	7
Figura 5- Progressão da doença e impacto potencial de biomarcadores (adaptado de Mayeux et al 2004 ⁷).	8
Figura 6- Fontes e fluxo de dados das bases de dados das componentes do UniProt. ⁸	10
Figura 7- Fluxograma que ilustra a estratégia seguida para a elaboração do trabalho.	14
Figura 8- Pesquisa bibliográfica com uma das ferramentas usadas neste trabalho. A. Exemplo de duas das palavras-chave “dog” e “proteome” usadas no NCBI-PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) B. Resultado da pesquisa: artigos com interesse para a análise.	16
Figura 9- Pesquisa bibliográfica no UniProt (http://www.uniprot.org/) das proteínas revistas do <i>Canis lupus familiaris</i> .	17
Figura 10- Pesquisa bibliográfica no UniProt (http://www.uniprot.org/) de todas as proteínas revistas do <i>Canis lupus familiaris</i> envolvidas apenas em doença.	18
Figura 11- Organização dos campos e respetivos termos da base de dados <i>OralOma Human</i> .	19
Figura 12- Catalogação das proteínas. 1) Título do artigo e respetivas proteínas detetadas; 2) Códigos UniProt (http://www.uniprot.org/) e em que organismo estão presente; 3) Catalogação na base de dados “ <i>CanisTecOme</i> ”.	23

Figura 13- Anotação do tipo de amostra a partir da qual se identificaram as proteínas.	24
Figura 14- Anotação das características do organismo, como a raça, idade, gênero, castrado ou não, condição em que foram identificadas as proteínas (saúde/patologia) e a sua regulação.	24
Figura 15- Anotação da patologia abordada no estudo e métodos usados para identificação das proteínas.	25
Figura 16- Anotação da informação constante no artigo, como tipo de estudo, ano do artigo, código NCBI.	26
Figura 17- O código UniProtKB AC relativo à proteína “ <i>Serum albumin</i> ” do organismo <i>Canis lupus familiaris</i> .	27
Figura 18- Existência de um código <i>UniProtKB AC</i> relativa a cada proteína em que apenas um corresponde ao organismo <i>Canis lupus familiaris</i> .	27
Figura 19- Sequência de obtenção do código UniProt – BLAST. 1) Proteína identificada como outro organismo; 2) alinhamento das sequências através da ferramenta BLAST no UniProt; 3) escolha da proteína com a identidade mais próxima de 100% que indica o grau de homologia entre as proteínas, sendo o resultado final da proteína com o código correspondente ao organismo <i>Canis lupus familiaris</i> .	29
Figura 20- Existência de um código “ <i>gi number</i> ” sem correspondência a um código <i>UniProtKB AC</i> .	29
Figura 21- Exemplo de um código <i>gi</i> da proteína “ <i>Retinol-binding protein 4</i> ” sem correspondência a um código UniProt.	30
Figura 22- Resultado de um possível código UniProt da proteína “ <i>Retinol-binding protein 4</i> ”.	31
Figura 23- As imunoglobulinas não apresentam qualquer código <i>UniProtKBAC</i> associado.	31
Figura 24- Representação esquemática dos pressupostos para a atribuição do nome da base de dados <i>CanisTecOme</i> .	32

Figura 25- Metodologia de aplicação de filtros nos campos “Healthy” e “Disease” para obtenção das proteínas envolvidas em cada patologia. 33

Figura 26- Anotação em um separador de Excel das doenças e respetivas proteínas. 34

Figura 27- Pesquisa manual para encontrar possíveis proteínas exclusivas em doença. 35

Figura 28- Filtros aplicados no campo “*Biomarker*” para identificação das proteínas que cumprem esse requisito. 36

Figura 29- Ferramenta bioinformática PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). 1. Na opção “Enter IDs” colar no espaço em branco os códigos UniProtKBAC, e na opção “Select List Type” selecionar “ID List”; 2. Na opção “Select organism” deve-se selecionar o organismo de interesse; 3. Na opção “Select Analysis” selecionar “Functional classification viewed in pie chart”. 37

Figura 30- Seleção da opção “Select Ontology: Biological Process”, para se obter um gráfico circular com os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas. 37

Figura 31- Seleção de uma das porções de um processo biológico geral “Localization” do gráfico circular para obter os processos biológicos mais específicos. 38

Figura 32- Ferramenta bioinformática PANTHER. 1) Seleção do processo biológico mais específico “Transport”; 2) Obtenção das quantas e quais as proteínas associadas a este processo biológico. 39

Figura 33- Ferramenta bioinformática OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). 1) Inserção do código UniProtKBAC pertencente a uma proteína humana. 40

Figura 34- Ferramenta bioinformática OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). 1) Resultado associado à proteína “Alpha-2-HS-glycoprotein” (P02765) mostrando em que amostra foi identificada, condição de saúde em que está envolvida, o seu código OMIM, código MeshH, regulação, género, hábitos sociais, métodos de identificação, tipo de estudo, PTM, biomarcador e código NCBI. 41

Figura 35- Ferramenta bioinformática AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>) para obter as opções “GORetriever” e “GOSlim Viewer” basta selecionar o campo “Tools”. 42

Figura 36- Página inicial da ferramenta *GORetriever* da plataforma bioinformática AgBase (<http://www.aqbase.msstate.edu/>). Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. 43

Figura 37- Descarregar o ficheiro “ *GO Summary file (for use in GOSlimViewer)*” para posterior utilização na ferramenta “ *SlimViewer*”. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. 44

Figura 38- Página inicial da ferramenta informática *GoSlimViewer* obtida através da plataforma AgBase (<http://www.aqbase.msstate.edu/>). Seleção da opção “ *Generic*” na seção “ *select GoSlim Set*”. Fazer o *upload* do ficheiro descarregado na opção “ *Go Summary file (for use in GOSlim Viewer)*” na ferramenta *GoRetriever*. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. 44

Figura 39- Selecionar a opção “ *View Biological Process*”, a seguir, obtém-se os processos biológicos em que estão envolvidas as proteínas. Ao lado do nome do processo está indicado o número de proteínas envolvidas em cada um destes. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. 45

Figura 40- A) Selecionar a opção “ *View accessions for each slim id*” na página dos resultados da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer*, B) o ficheiro obtido do *GoSlimViewer* “ *View accessions for each slim id text only*” foi descarregado e aberto numa folha do Microsoft Excel 2013 (C). Figuras adaptadas da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase e do Microsoft Excel © 2013. 46

Figura 41- Construção de uma tabela dinâmica. 1) Ficheiro descarregado em formato de Excel do AgBase; 2) Itens importantes (*Input_GO_Name* e *Input_Acession*) a considerar para a construção da tabela. 47

Figura 42- Exemplo da conversão do ficheiro inicial descarregado do AgBase numa tabela dinâmica. 47

Figura 43- Resultado da conversão da tabela dinâmica numa tabela funcional. 48

Figura 44- A) Pesquisa dos termos “ *Leptospira interrogans*” na base de dados UniProt, B) ficheiro descarregado com eliminação dos organismos sem interesse ficando apenas o proteoma total da *Leptospira interrogans*. 50

Figura 45- Exemplo da utilização de filtros avançados para a obtenção dos dados de um dado proteoma com interação. 51

Figura 46- Seleção apenas das proteínas de <i>Leptospira</i> para posterior processamento no AgBase.	52
Figura 47- Ficheiro descarregado do AgBase com os processos biológicos das proteínas da <i>Leptospira interrogans</i> envolvidas na interação com as proteínas da saliva.	52
Figura 48- Importação do resultado gerado pelo Oralint, do <i>Canis lupus familiaris</i> e da <i>Leptospira interrogans</i> .	53
Figura 49- Resultado da importação dos resultados do Oralint, dividido em duas colunas, A: Fonte de interação, isto é, referente aos resultados (códigos UniProt das proteínas) do <i>Canis lupus familiaris</i> e B: Interação alvo, isto é, referente aos resultados (códigos UniProt das proteínas) da <i>Leptospira interrogans</i> .	54
Figura 50- Importação dos ficheiros correspondentes aos atributos de interesse.	54
Figura 51- Resultado da importação dos atributos de interesse dividido em duas colunas, A: Referente ao nome científico do organismo e B: Referente ao nome das proteínas.	55
Figura 52- Material absorvente adequado para a recolha de saliva (rolhões).	58
Figura 53- Procedimento realizado para adaptar o tubo para a recolha de saliva. A) Pontas de micropipeta P1000, B) Tubo de 50ml, C) Colocar as pontas no interior do tubo de 50ml e D) Resultado final: sete pontas colocadas no fundo do tubo.	59
Figura 54- Avaliação do protocolo provisório em cães da Escola Superior Agrária de Viseu. 1) Rolhões seguros por uma pinça hemostática; 2 e 3) Passar pela cavidade oral do animal durante 30-40 segundos e após recolha colocar os rolinhos nos tubos de 50ml adaptados.	59
Figura 55- Etiqueta para identificação do kit de recolha de saliva consoante cada clínica veterinária.	61
Figura 56- Kit de recolha de saliva. 1) Kit elaborado para conter os rolinhos; 2) Kit elaborado para conter os tubos adaptados; 3) Identificação de cada Kit.	61
Figura 57- Exemplo da catalogação dos tubos de recolha de saliva. A) Código da clínica, B) Dia da recolha, C) Código da raça e D) Número da amostra.	63

Figura 58- Exemplo de uma catalogação pertencente a um cão de raça portuguesa.	64
Figura 59- Esquema referente às diferentes secções a desenvolver no capítulo de resultados e discussão.	66
Figura 60- Exemplo de duas proteínas em que não foi possível associar um código UniProt.	71
Figura 61- Distribuição das proteínas depositadas na base de dados <i>CanisTecOme</i> de acordo com a raça do organismo <i>Canis lupus familiaris</i> .	74
Figura 62- Total de proteínas da base de dados <i>CanisTecOme</i> identificando o número de proteínas em estado de saúde e em que tipo de amostra biológica foram identificadas.	75
Figura 63- Abordagem utilizada para a obtenção da informação relativa à identificação de biomarcadores.	76
Figura 64- Distribuição do número de proteínas identificadas em doença, número de proteínas aumentadas (↑), número de proteínas diminuídas (↓) e sem dados qualitativos e/ou quantitativos.	77
Figura 65- Distribuição do número de proteínas identificadas nas doenças Leishmaniose (verde) e a Raiva (laranja) com maior número de proteínas anotadas no <i>CanisTecOme</i> .	80
Figura 66- Processos biológicos em que participam as proteínas exclusivas identificadas na doença Mastocitoma Cutâneo Canino.	87
Figura 67- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença "Lethal Acrodermatitis".	89
Figura 68- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença Osteoartrite.	91
Figura 69- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença Carcinoma de células transicionais.	92
Figura 70- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na Raiva.	95

Figura 71- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na Leishmaniose.	97
Figura 72- Excerto da tabela com os pares de interações entre proteínas de <i>Canis</i> e <i>Leptospira</i> previstos com o algoritmo Orallnt.	104
Figura 73- Rede de interação entre a proteína salivar do <i>Canis lupus familiaris</i> (verde) e as proteínas dos diferentes serogrupos da <i>Leptospira interrogans</i> (azul).	105
Figura 74- Rede de interação entre a proteína salivar do <i>Canis lupus familiaris</i> (verde) e as proteínas da <i>Leptospira interrogans</i> com principal enfoque no serogrupo Icterohaemorrhagiae (vermelho).	106
Figura 75- Distribuição das amostras de saliva de <i>Canis lupus familiaris</i> .	110
Figura 76- Distribuição por género das amostras de saliva de <i>Canis lupus familiaris</i> .	110
Figura 77- Gel SDS-PAGE: MM-marcador molecular Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Protein Marker, Perfil de proteínas obtido para cada amostra de saliva correspondente ao dador de acordo com a tabela 30.	113

Índice de tabelas

Tabela 1- Campos e termos da base de dados OralOme e CanisTecOme – Construção do endereço de informação. Campos iguais estão anotados com o símbolo ✓ e os campos distintos ou inexistentes com o símbolo X.	20
Tabela 2- Códigos referentes às clínicas veterinárias e a cada raça.	62
Tabela 3- Códigos a inserir nas alíquotas 250µl.	64
Tabela 4- Catologação das amostras armazenadas no repositório biológico modelo.	65
Tabela 5- Os artigos de proteômica que contribuíram para a anotação manual do CanisTecOme.	68
Tabela 6- O número de proteínas identificadas pelos artigos de proteômica organizadas de acordo com o número de proteínas identificadas por condição saúde/doença do dador.	69
Tabela 7- Lista de dois trabalhos de proteômica utilizando a saliva como amostra biológica.	70
Tabela 8- O tipo de informação anotada para cada proteína no CanisTecOme, tomando como exemplo a proteína miotrofina.	70
Tabela 9- Exemplo de uma proteína em que não foi possível anotar a raça, idade e género do dador da amostra.	71
Tabela 10- Exemplo de uma proteína em que foi possível anotar toda a informação necessária sobre o dador da amostra.	72
Tabela 11- Amostras biológicas usadas em cada um dos artigos de proteômica analisados e anotados na base de dados CanisTecOme.	72
Tabela 12- Fonte de pesquisa das proteínas identificadas em doença e anotadas no CanisTecOme.	76
Tabela 13- Número de proteínas importadas a partir do UniProt e respetivas doenças onde foram identificadas.	78

Tabela 14- Distribuição das proteínas de acordo com a doença em que foram identificadas.	79
Tabela 15- Proteínas exclusivas identificadas em doença resultantes da informação do UniProt.	83
Tabela 16- Proteínas exclusivas identificadas em doença resultantes da anotação manual de artigos de proteômica.	85
Tabela 17- Patologias com número de proteínas exclusivas superior a quatro para futura análise.	86
Tabela 18- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Mastocitoma Cutâneo Canino.	87
Tabela 19- Proteínas exclusivas identificadas na doença de "Lethal Acrodermatitis".	89
Tabela 20- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Osteoartrite.	90
Tabela 21- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Carcinoma de células transicionais.	92
Tabela 22- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Raiva.	94
Tabela 23- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Leishmaniose.	96
Tabela 24- Proteínas humanas homólogas com as proteínas exclusivas de cão para a patologia leishmaniose para determinar a possibilidade de as detetar em amostras de saliva através do OralCard.	98
Tabela 25- Caracterização funcional das proteínas exclusivas da saliva do organismo Canis lupus familiaris.	100
Tabela 26- Biomarcadores propostos para as duas patologias identificadas em fluido cerebrospinal do cão.	102
Tabela 27- Biomarcadores propostos para as patologias obesidade, insuficiência renal e babesiose canina e identificadas em soro do cão.	102
Tabela 28- Biomarcadores propostos em diversas patologias identificadas na urina do cão.	103

Tabela 29- Interações possíveis entre os organismos <i>Canis lupus familiaris</i> e <i>Leptospira interrogans</i> e posterior interação com proteínas da saliva.	105
Tabela 30-Tabela de catalogação das amostras de saliva correspondente a cada animal.	109
Tabela 31- Amostras usadas no gel SDS-PAGE.	112

Lista de abreviaturas

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

Obs. - Observações

UniProt - *The Universal Protein Resource*

UniProtKB - *The UniProt Knowledgebase*

UniProtKB AC - *UniProtKB Accession Number*

GI number - *genInfo identifier*

BLAST – *The Basic Local Alignment Search Tool*

PPI – Interações proteína-proteína

GO – *Gene ontology*

CSF – Fluido cefbrospinal

Ig - Immunoglobulina

TNF- α - Fator de necrose tumoral

IL – Interleucina

HMGB1 - High-mobility group box 1

LPS – Lipopolissacarídeo

1. Introdução

O conhecimento biológico relativo ao organismo *Canis lupus familiaris* tem evoluído de forma gradual e com o avanço das diversas técnicas como microscopia e mais recentemente a genómica e a proteómica foi possível verificar a existência de biomarcadores para determinadas patologias.

O cão como qualquer outro organismo desenvolve patologias que o podem levar à morte ou condená-lo a um estado débil. Para reverter esta condição, é necessário compreender o universo biológico do animal e, nas situações de infeção, do microrganismo que o invade. O conhecimento deste universo biológico não se resume a conhecer apenas o genoma ou o proteoma de forma isolada. É preciso conhecer a forma como o proteoma e o genoma interagem não apenas no organismo mas entre organismos. Para perceber como e porquê se desencadeia uma patologia, é preciso olhar para a mesma não só de um ponto de vista restrito como sistémico o que implica a complementação e tratamento de grandes quantidades de informação o que só é possível com a utilização das ferramentas bioinformáticas atuais.

A compilação do conjunto de proteínas que constituem o organismo permite-nos perceber que uma dada molécula ao interagir com outra/s pode desencadear uma determinada doença.

O principal desafio deste trabalho consiste em reunir informação obtida em estudos de proteómica do organismo *Canis lupus familiaris* e desenvolver metodologias que permitam transpor essa informação para um conhecimento biológico relevante que facilite a procura e interpretação de dados, construindo uma base de dados.

1.1 Importância dos animais de companhia na sociedade

Hoje em dia os animais de companhia são extremamente importantes para a nossa sociedade, e o ser humano sempre sentiu uma grande necessidade de os ter no seu dia-a-dia. Desde os tempos primórdios, viveu rodeado de animais adaptando-se a eles consoante as suas carências.

O cão é por excelência escolhido como o animal de companhia, apesar de em tempos passados ter sido usado como um auxiliar no trabalho. Este animal ao contrário do gato, por ser tão versátil, tornou-se essencial ao ser humano, quer como colaborante no trabalho, que como guia de pessoas com défices físicos sensoriais ou apenas como um ótimo companheiro.

São várias as tarefas em que os cães são utilizados: cão pastor (protege e conduz o gado); cão de guarda (alerta para situações estranhas); cão de pista e defesa (fareja e deteta substâncias ilícitas e o odor corporal); cão de defesa (protegendo o seu habitat e os seus donos) e sendo também um ótimo animal de caça.

Relativamente ao auxílio a pessoas com dificuldades, como as pessoas invisuais, o cão é considerado o seu amparo para desenvolver uma vida normal. A preparação de um animal para ser guia de invisuais é feita em escolas que proporcionam um ensino e treino para que os cães consigam desenvolver a função de auxílio.

O cão também é um excelente animal para conviver com as crianças pois promove o desenvolvimento afetivo e infantil. Está comprovado que crianças que convivam com cães são mais afetivas, inteligentes, menos agressivas, tendem a ter melhor relacionamento social, entre outros benefícios decorrentes da interação entre a criança e o cão (<http://www.redepsi.com>).

Também para uma pessoa idosa o cão é considerado um ótimo terapeuta e companheiro, assumindo um papel importante nos dias de hoje em que a solidão está cada vez mais presente e o cão ajuda a combater o sentimento de solidão preenchendo o espaço vazio deixado por familiares.

O vínculo com os animais é a força primordial de uma pessoa feliz e saudável e uma das principais armas da sociedade contra a solidão, a apatia e a depressão (<http://www.redepsi.com>).

1.2 Patologias caninas emergentes provocadas por microrganismos

Ao longo deste trabalho vamos abordar as doenças zoonóticas mais problemáticas e emergentes no cão provocadas por microrganismos, a Leishmaniose (protozoário) e a Leptospirose (bactéria).

1.2.1 Leishmaniose

A leishmaniose canina é uma das doenças transmitidas por vetores (CVBD – “*canine vector-borne diseases*”), endémica e bastante frequente em Portugal. Esta zoonose é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, em que os cães são os principais hospedeiros reservatórios da infeção para os seres humanos¹.

A transmissão é feita através de uma picada do flebótomo, um inseto de tamanho bastante reduzido, que ao picar um cão o infeta. É considerada uma doença silenciosa pois muitas vezes não é detetada a picada do inseto¹.

Esta patologia manifesta-se por um amplo espectro de sinais e diferentes graus de gravidade clínica, e não há consenso científico suficiente na gestão desta doença.

O parasita *Leishmania* completa o seu ciclo de vida em dois hospedeiros, um vetor flebotomíneo, que transmite a forma promastigota flagelado infecciosa, e um mamífero, onde a forma amastigota intracelular desenvolve e onde se multiplica¹.

Na figura 1 está descrita o ciclo de vida clássica da *Leishmania infantum* bem como os meios de transmissão incomuns.

A fase 1 corresponde ao ciclo de transmissão entre o inseto e o cão, está dividido em três partes, a forma promastigota (1a), a forma mastigota (1b) e a disseminação do parasita para os órgãos em macrófagos (1c). A fase dois corresponde aos outros modos incomuns de transmissão, podendo ser de forma vertical (2a), por transfusão de sangue (2b) e por transmissão venérea ou outros (não comprovada) que acontece de cão para cão, através de mordidas e feridas².

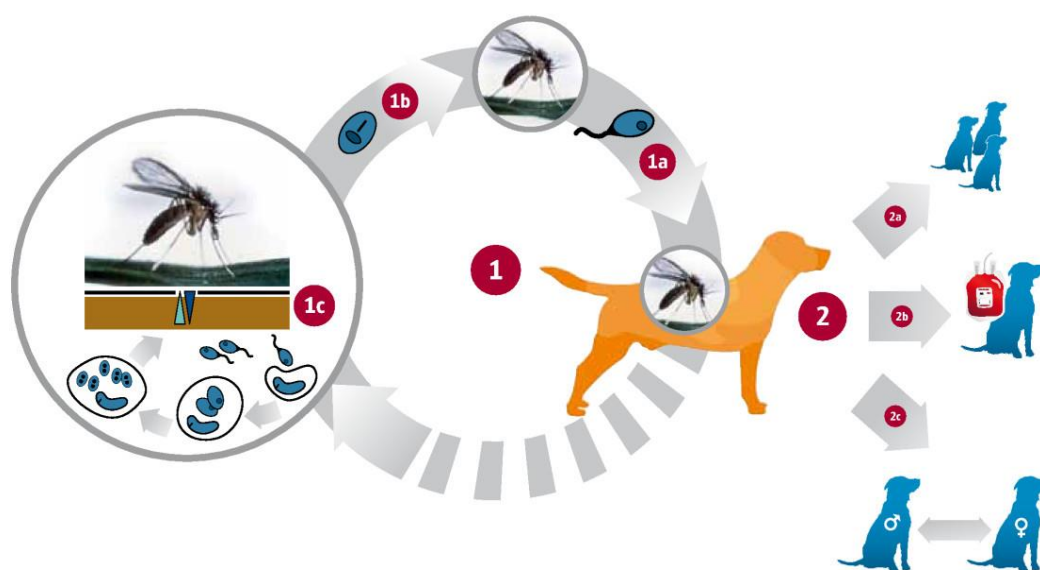


Figura 1- Ciclo de vida de *Leishmania infantum*, com indicação de percursos comprovados e não-comprovados de flebotomíneos de transmissão para cão (adaptado de Gallego *et al* 2011²).

Fatores socioeconómicos e possíveis fatores climáticos levaram a mudanças na distribuição desta patologia na Europa². A Figura 2 mostra as zonas endémicas, onde

Portugal é considerada um país com um elevado número de casos, variando de região para região².

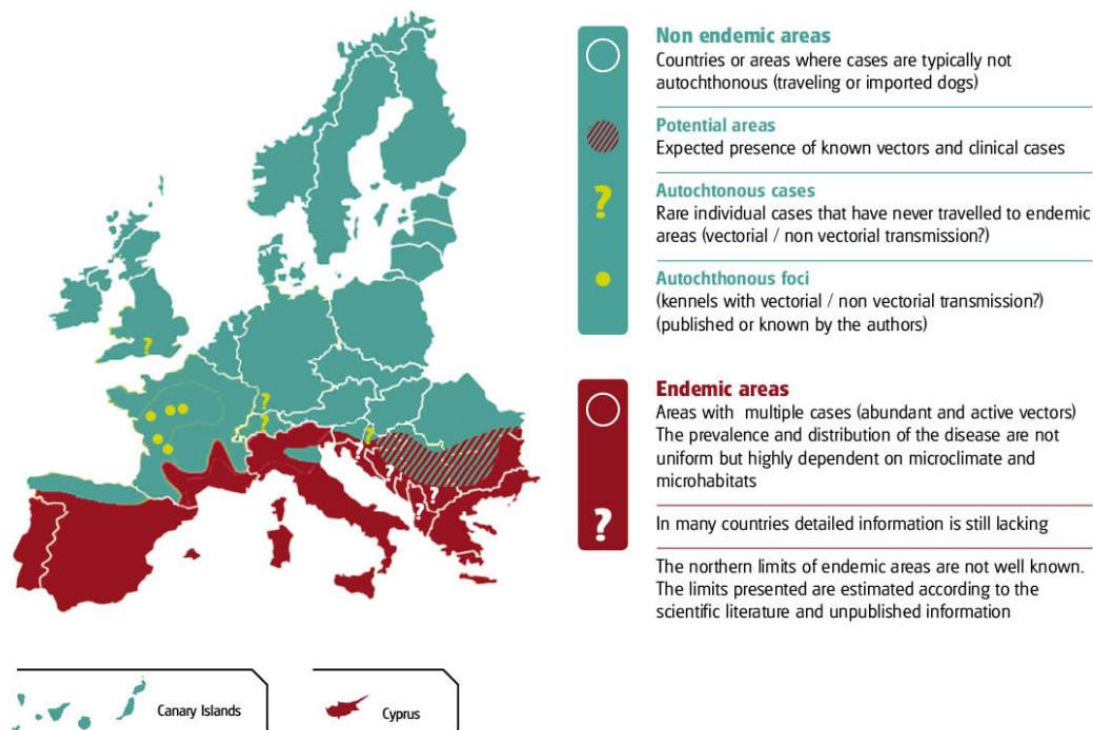


Figura 2- Distribuição da infeção por *Leishmania infantum* na Europa (adaptado de Gallego *et al* 2011²).

O diagnóstico inicial da infeção por *Leishmania* começa por conhecer a história clínica antecedente e presença de sinais clínicos compatíveis com leishmaniose, passando, posteriormente, para a análise citológica dos possíveis tecidos afetados e análises serológicas específicas¹.

Se necessário, testes mais precisos e específicos poderão ser realizados, dependendo dos resultados anteriores¹.

O tratamento desta doença passa pelo uso de fármacos. Contudo, os animais podem manter-se serologicamente e parasitologicamente positivos, sendo necessário repetir o tratamento a fim de manter a remissão dos sinais clínicos¹.

Para concluir, esta doença tem um grande impacto ao nível da saúde pública e da medicina veterinária. Devido ao seu carácter zoonótico e ao papel do cão como reservatório esta patologia mostra-se problemática ao nível da saúde pública, por outro lado a ocorrência frequente desta doença, a dificuldade no diagnóstico precoce e a

relativa falta de eficácia da terapêutica são pontos fracos que se revelam como um entrave na medicina veterinária¹.

1.2.2 Leptospirose

A Leptospirose é também uma doença zoonótica com uma distribuição mundial e conhecida como uma doença infecciosa emergente. Esta patologia é causada pela bactéria patogénica *Leptospira interrogans*³. Surtos da doença em seres humanos geralmente são causados por exposição a água contaminada pela urina de animais infetados. Esta doença atinge o ser humano mas também outros animais como o porco, ovelha e o cão, e se em humanos o conhecimento desta doença possui várias falhas, na área de medicina veterinária este facto agrava-se³.

O ciclo de infeção é iniciado pela bactéria *Leptospira interrogans* (espécie patogénica) que afeta diversos organismos³.

A figura 3 mostra o ciclo de infeção em que espécies de mamíferos libertam o microrganismo patogénico na urina e servem como reservatórios para a transmissão. O patógeno é mantido em ambientes silvestres e domésticos por transmissão entre as espécies de roedores (A). Nesses reservatórios, a infeção produzida é crónica e assintomática persistindo nos túbulos renais onde a *Leptospira interrogans* forma agregados. Leptospiras infetam o gado e os animais domésticos provocando uma série de manifestações de doenças e estados de transporte. A manutenção da leptospirose nestas populações é devida à exposição contínua aos reservatórios de roedores ou de transmissão dentro de rebanhos animais (B). A leptospirose é transmitida aos seres humanos por contato direto com animais reservatórios (C) ou exposição à água da superfície ambiental ou solo contaminado com urina (D). A *Leptospira* penetra na pele ou mucosa (1), levando à infeção pela corrente sanguínea através da qual se vai disseminar por todo os tecidos do corpo. A infeção causa uma doença febril aguda durante a fase inicial "leptospiraemic", que progride durante o final de fase "imune" causando manifestações multi-sistema graves, como disfunção hepática e icterícia (2), insuficiência renal aguda (3), síndrome de hemorragia pulmonar (4), e miocardite, meningoencefalite (5). A resposta imunológica, eventualmente, elimina o patógeno, mas as leptospiras podem persistir por períodos prolongados em locais imuno-privilegiados, como a câmara anterior e vítreo do olho e os túbulos renais, onde podem produzir, respetivamente, uveíte (7) meses após a exposição e descamação urinária semanas após a resolução da

doença (8). Os seres humanos são hospedeiros acidentais e não são eficientes na libertação de um número suficiente de leptospiros para servir como reservatórios³.

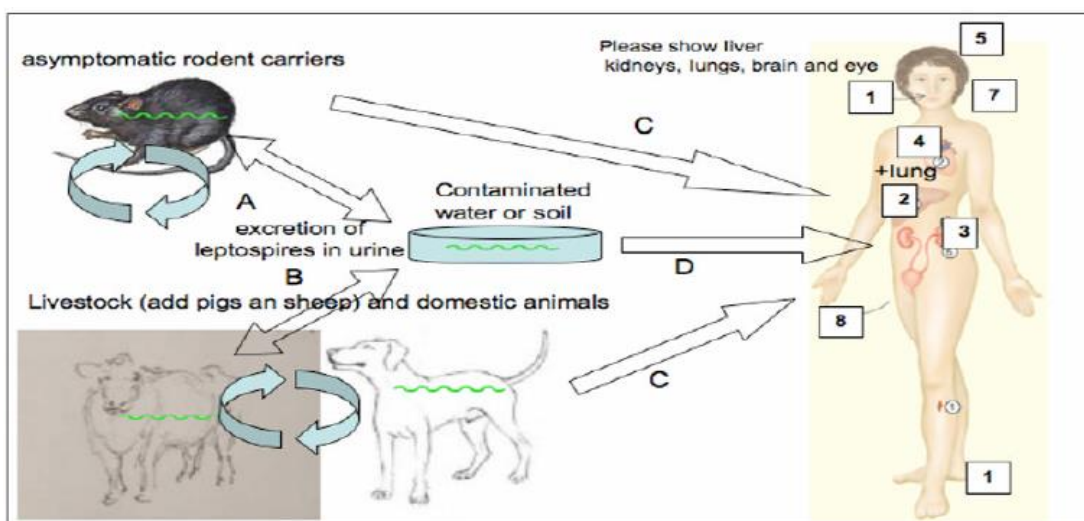


Figura 3- Ciclo de infecção (adaptado de Ko et al 2009³).

A estirpe bacteriana patogénica que provoca a Leptospirose tem a capacidade de aderir a células epiteliais renais *in vitro*. Esta adesão ocorre especialmente quando as concentrações de anticorpos homólogos são subaglutinantes⁴.

A bactéria tem na sua parede proteínas, lipoproteínas e LPS (lipopolissacarídeo) que vão permitir a adesão e fixação nas células³.

Assim é importante entender quais são estas moléculas e identificar as que podem ser considerados fatores de virulência.

A figura 4 mostra a parede celular das *Leptospiras spp.* que possui uma estrutura de dupla membrana característica das bactérias Gram-negativas. A parede celular de peptidoglicano está associada à membrana interna. A membrana externa da leptospira contém uma porina transmembranar OmpL1, e lipoproteínas LipL32, LipL36 (no interior da membrana externa), LipL41 e LigB. Este género de bactéria possui um lipopolissacarídeo (LPS), que é composto de lípido A. Vários recetores dependentes de TonB (TBDR) foram identificados por análise do genoma. Três destes TBDR foram encontrados por estarem envolvidos no transporte de citrato de ferro (Feca-come transportador), o sideróforo desferrioxamina e hemina. Ambas as funções de transporte e de indução requerem transdução de energia a partir do complexo de TonB-ExbB-EXBD na membrana interna. Como em outras espiroquetas, o endoflagelo está localizado no periplasma. A membrana interna contém o FeoAB tipo de ferro, proteínas de ligação à

penicilina (PBP), e a lipoproteína LipL31. Os homólogos dos sistemas de exportação de *E. coli* de proteínas da membrana externa (OMPs) e lipoproteínas que foram encontrados em *Leptospira*; o que inclui peptidases sinal SP1 e SP2 da membrana interna³.

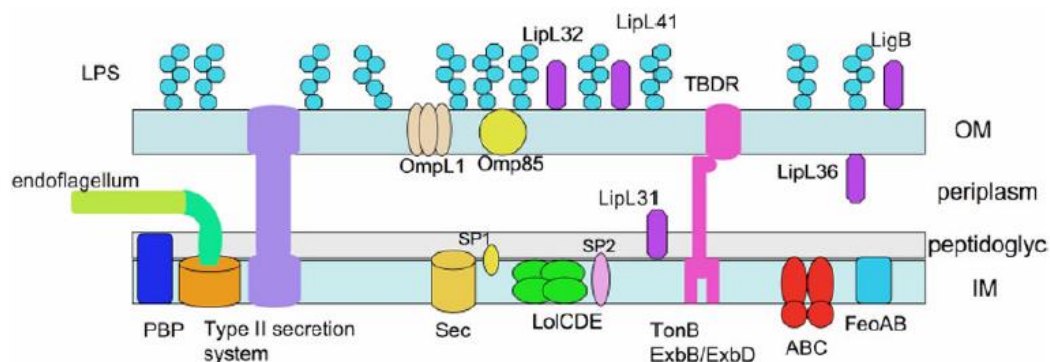


Figura 4- Esquema da parede celular das *Leptospiras* indicando a localização de várias proteínas, lipoproteínas e LPS (adaptado de Ko *et al* 2009³).

A leptospirose canina revela diferenças em relação ao ser humano, pois a infecção por *Leptospira* em cães resulta numa doença de intensidade variável, dependente de vários fatores como a estirpe infetante, a resposta imune do hospedeiro e a localização geográfica⁴.

Alguns cães desenvolvem poucos sinais clínicos relativos à doença, enquanto outros apresentam sinais graves e mesmo a morte⁴.

A espécie que leva ao desenvolvimento da Leptospirose é a bactéria patogénica *Leptospira interrogans*. Existem vários serogrupos de *Leptospiras interrogans* patogénicas, mas nem todas apresentam a mesma virulência para cada espécie animal⁵. No caso do cão os serogrupos mais predominantes nesta doença são *Canicola* e *Icterohaemorrhagiae*⁵.

Na última década, tem havido um aumento exponencial nos E.U.A e na Europa do número de casos de cães com esta patologia⁴.

Em Portugal pouco ou nada tem sido desenvolvido até aos dias de hoje, dificultando o combate e mascarando a verdadeira prevalência/incidência da doença no cão no nosso país⁴.

1.3 Relevância da proteómica para o estabelecimento do diagnóstico

A proteómica é a ciência ómica que tenta descrever o conjunto completo de proteínas (produto da expressão do genoma) e fornecer informações pertinentes para

complementar os estudos de transcriptômica e metabolômica. Daí a proteômica ser tão revelante para o conhecimento detalhado de um organismo.

Na ânsia de encontrar marcadores moleculares que auxiliem no diagnóstico precoce e no tratamento de várias doenças, muitos estudos estão focados nas alterações das proteínas envolvidas em processos moleculares relevantes.

Nos últimos anos, foram imensos os dados publicados na literatura relativos a proteômica dos fluidos biológicos em algumas espécies animais revelando que além do humano há outros organismos a serem estudados do ponto de vista da proteômica⁶.

Uma vez que as principais proteínas dos fluidos biológicos e de tecidos podem ser marcadores para o diagnóstico. Um conhecimento detalhado sobre as proteínas que fazem parte da composição dos fluidos biológicos numa determinada espécie e em diferentes condições é relevante para a para o avanço científico. Neste caso as proteínas funcionam como biomarcadores podendo ser indicadores específicos de uma dada doença fornecendo informação sobre o estabelecimento, progressão e prognóstico de determinada patologia no organismo (Figura 5) ⁶.

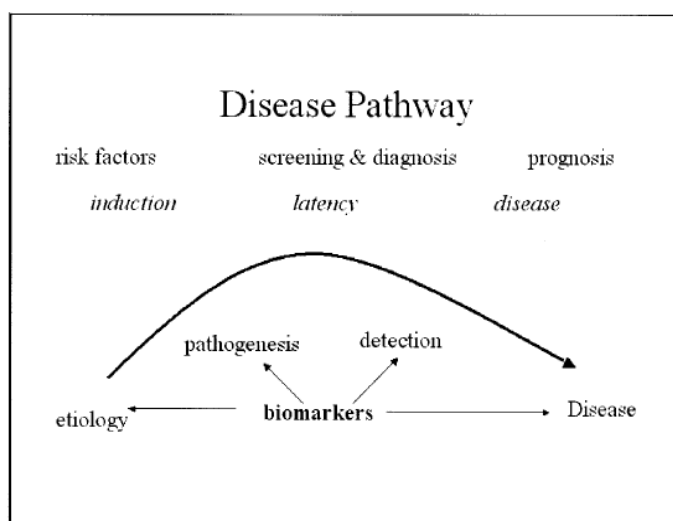


Figura 5- Progressão da doença e impacto potencial de biomarcadores (adaptado de Mayeux *et al* 2004⁷).

A compreensão de todas as funções biológicas dos componentes afetados ajuda a explicar mecanismos fisiopatológicos complexos. Sendo por isto que as proteínas são consideradas ótimos biomarcadores de uma dada condição (saúde/patologia)⁶.

Vários biomarcadores podem ser identificados em diferentes tipos de amostras biológicas. Ultimamente a análise de "proteínas chave" ou biomarcadores proteicos que

permitam o diagnóstico de determinadas patologias tem vindo a despertar cada vez mais a atenção da comunidade científica ⁷.

1.4 Importância da Bioinformática para interpretação de dados biológicos

Muitas das estratégias para a análise proteómica geram quantidades massivas de dados sendo por isso fundamental a existência de ferramentas bioinformáticas para a gestão dos dados produzidos. Assim as ferramentas bioinformáticas são instrumentos que permitem a análise integrada de dados produzidos em grande escala e que se encontram armazenados em múltiplas bases de dados. A base conceptual para o entendimento da biologia do sistema pressupõe a capacidade instrumental de integrar toda a informação existente por forma a ser possível retirar significado biológico a partir da evidência existente.

Para uma eficiente gestão da informação disponível sobre o proteoma do *Canis lupus familiaris* e posterior análise é necessário o uso de ferramentas bioinformáticas. Existem numerosas ferramentas bioinformáticas disponíveis na comunidade científica e de seguida serão brevemente descritas apenas as ferramentas que foram usadas no âmbito deste trabalho.

1.4.1 UniprotKB

Hoje em dia questiona-se sobre “como”, “quando”, e “por que” são produzidas inúmeras proteínas de forma individual num organismo vivo, como as proteínas interagem entre si e com que outras moléculas podem interagir para formar uma célula. A proteómica surge assim como ferramenta para responder a estas questões, sendo considerada uma parte fundamental de uma análise integrativa e multidisciplinar em diferentes níveis, fazendo a ponte entre os genes e o fenótipo.

No estudo completo das proteínas, que inclui a estrutura e função, os investigadores utilizam bases de dados que auxiliam na interpretação dos resultados dos estudos de proteómica.

A base de dados usada neste trabalho como suporte de informação sobre proteínas foi o UniProt (<http://www.uniprot.org/>) que inclui, atualmente, duas seções: a UniProtKB/Swiss-Prot que é anotada e revista manualmente e a UniProtKB/TrEMBL que é anotada automaticamente e não é revista⁸.

O UniProt é composto de três partes distintas: o UniProt propriamente dito que é o ponto de acesso central para informações de proteínas, as quais incluem função, classificação e referências cruzadas; o UniRef que é uma base de dados de referências não redundantes do UniProt; e o UniParc que é um arquivo do UniProt, o qual apresenta a história de todas as sequências proteicas já depositadas no UniProt (Figura 6) ⁸.

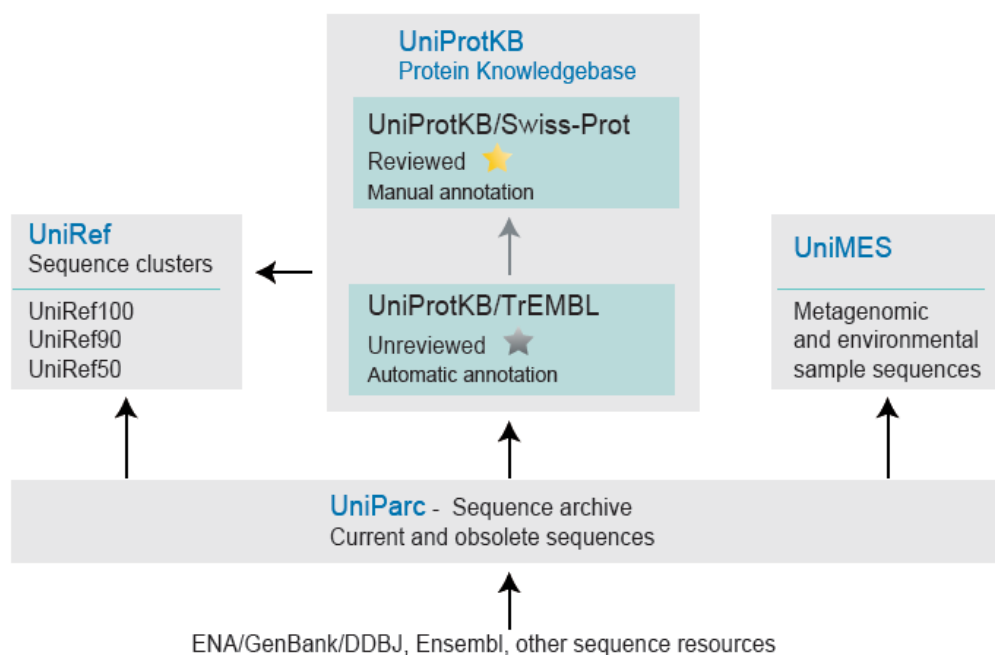


Figura 6- Fontes e fluxo de dados das bases de dados das componentes do UniProt.⁸

1.4.2 AgBase

A AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>) providencia recursos que permitem a análise funcional de produtos genéticos de plantas e animais incluindo as anotações da *Gene Ontology*.

Esta ferramenta bioinformática foi usada neste trabalho, pois é uma base de dados na qual é feita a anotação das ontologias. É possível encontrar nesta base de dados, a anotação de várias proteínas do *Canis lupus familiaris*, úteis no presente estudo ⁹.

1.4.3 PANTHER

A ferramenta bioinformática PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (<http://www.pantherdb.org/>) foi concebida para classificar proteínas (e os genes correspondentes) a fim de facilitar a análise de resultados de experiências de alto rendimento.

Esta base de dados genómica faz a ligação entre as sequências e as funções dos genes, realizando uma caracterização e classificação dos genes, de acordo com as famílias de genes, funções moleculares, processos biológicos, componente celular, classe da proteína e vias de sinalização em que os genes e os seus produtos estão envolvidos. Também esta base é sujeita a revisão por especialistas¹⁰.

Tal como o AgBase, nesta ferramenta foi possível encontrar a anotação de várias proteínas do *Canis lupus familiaris*, úteis no presente estudo⁹.

1.4.4 OralCard

O OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) é uma ferramenta bioinformática que reúne os resultados de 55 artigos com revisão manual e refletem o ecossistema molecular oral (*OralPhysiOme*) de *Homo sapiens*. Compreende informação experimental disponível a partir do proteoma oral, tanto de humano (*OralOme*) como de origem microbiana (*MicroOralOme*) estruturada em proteínas, doença e organismo.

Esta ferramenta é um recurso fundamental para os investigadores que pretendem entender as bases moleculares implicados na biologia e mecanismos de doenças da cavidade oral, podendo identificar possíveis biomarcadores a partir de amostras de saliva¹¹.

Neste trabalho foi usado o OralCard como estratégia para verificar se as proteínas exclusivas de uma dada doença e identificadas no *Canis lupus familiaris* também podiam estar presentes na saliva em humano.

1.4.5 Oralint

O Oralint (<http://bioinformatics.ua.pt/software/oralint>) é um método de previsão computacional que mostra possíveis interações proteína-proteína (PPIs) entre o hospedeiro e microrganismos da cavidade oral, permitindo no final obter um modelo de interatoma oral humano-microbiano. Este método ajuda-nos associar determinadas proteínas a doenças orais e potenciais alvos terapêuticos e biomarcadores¹².

Neste trabalho foi usado o algoritmo Oralint para fazer a previsão da interação entre as proteínas do cão e as proteínas dos microrganismos causadores das patologias em estudo.

1.4.6 Cytoscape

Os dados da análise interactiva são de difícil visualização pela sua grande quantidade. Assim foram desenvolvidas ferramentas como o Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>). Este software permite não apenas a visualização mas também a integração de redes de interação biomolecular com dados de expressão de alto rendimento e de outros dados moleculares. Embora seja aplicável a qualquer sistema de componentes moleculares e interações, esta ferramenta é mais potente quando usado em conjunto com grandes bases de dados de proteína-proteína, proteína-DNA, e das interações genéticas que são cada vez mais disponíveis para os seres humanos e os organismos modelo¹³.

Neste trabalho esta ferramenta foi utilizada para fazer a visualização e análise dos resultados do Oralint.

2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo construir um repositório de toda a informação publicada sobre proteínas identificadas em *Canis lupus familiaris*, visando a construção de um referencial para o desenvolvimento do diagnóstico molecular.

A organização e integração da informação foi conduzida cumprindo os seguintes objetivos específicos:

1. Revisão bibliográfica, compilação e anotação das proteínas identificadas em *Canis lupus familiaris*;
2. Construção de uma base de dados - o *CanisTecOme*;
3. Caracterização do proteoma do cão nomeadamente a identificação dos processos biológicos em que participam as proteínas exclusivas envolvidas em doença depositadas no *CanisTecOme*;
4. Identificação de possíveis biomarcadores;
5. Identificação e análise das redes de interação entre proteínas de espécies distintas;
6. Estabelecimento de protocolos de recolha e armazenamento de amostras de saliva;
7. Desenvolvimento de um código único de identificação de cada amostra para posterior armazenamento no futuro repositório biológico e seu uso em trabalhos futuros.

3. Materiais e métodos

Os mecanismos que permitem o funcionamento dos sistemas biológicos envolvem processos moleculares complexos. Para esclarecer esta complexidade a criação de instrumentos que integrem todo o conhecimento existente nomeadamente a informação sobre as proteínas implicadas em condições fisiológicas e também em condições decorrentes de alterações patológicas, contribuem para esclarecer os mecanismos de patogénese.

Apresentamos nesta secção as metodologias utilizadas para a criação e respetiva consulta da base de dados dedicada ao proteoma do cão – o CanisTecOme.

O fluxograma da figura 7 representa a metodologia seguida:

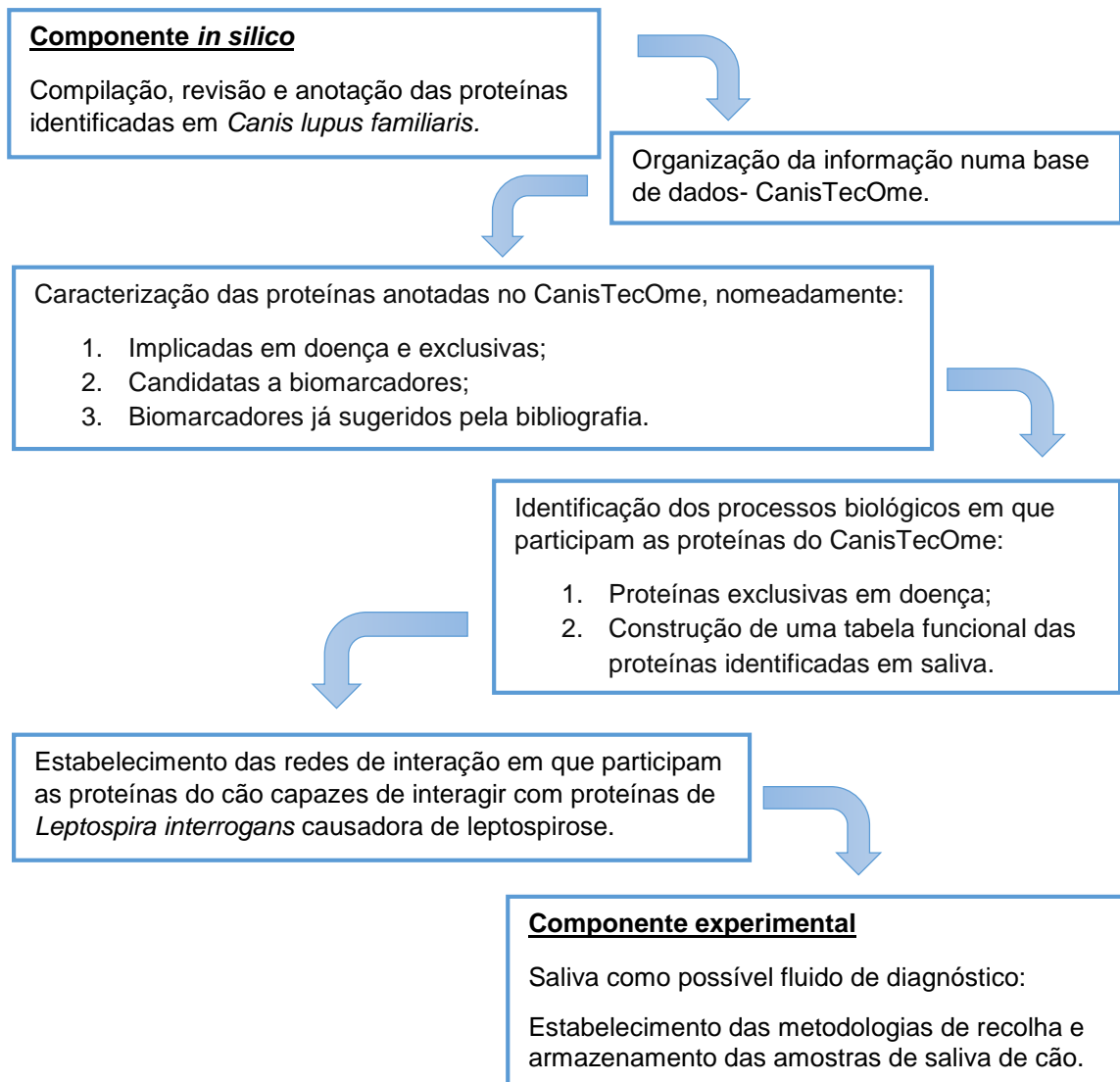


Figura 7- Fluxograma que ilustra a estratégia seguida para a elaboração do trabalho.

Componente *in silico*

3.1 Compilação do proteoma de *Canis lupus familiaris*

A consulta bibliográfica referente a artigos de proteômica e de estudos dirigidos dedicados à identificação de proteínas em *Canis lupus familiaris* foi realizada utilizando como motores de busca o *NCBI-Pubmed*, *NCBI-Pubmed Europe*, *Science direct*, usando como palavras-chave: *Dog, saliva, protein/proteome/proteom**, *Dog, protein/proteom*/proteome* e *Dog, protein/proteome/proteom*, diseases*. A figura 8 mostra um exemplo do resultado da pesquisa.

The image shows two parts of the NCBI PubMed search process. Part A is a screenshot of the search builder interface where the query '(dog) AND proteome' is entered. The search terms 'dog' and 'proteome' are shown in separate input fields, both with 'All Fields' selected as the search scope. Part B is a screenshot of the search results page. The search query '(dog) AND proteome' is visible in the search bar. The results are displayed as a list of two articles. The first article is titled 'Identification of serum biomarkers in dogs naturally infected with Babesia canis canis using a proteomic approach' and the second is 'Characterization of the canine urinary proteome'. Both articles are highlighted with blue boxes, and the letter 'B' is placed next to the second article's title.

Figura 8- Pesquisa bibliográfica com uma das ferramentas usadas neste trabalho. A. Exemplo de duas das palavras-chave “dog” e “proteome” usadas no NCBI-PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) B. Resultado da pesquisa: artigos com interesse para a análise.

Os artigos anotados na base de dados gerada por este trabalho foram publicados no período de 2005 até Junho de 2014. A bibliografia obtida constava de artigos de revisão, estudos prospectivos e ensaios clínicos, os quais permitiram a identificação das proteínas presentes em diversos fluidos e tecidos, nomeadamente urina, soro,

lágrimas, saliva, fluido cérebroespinal, biópsias das glândulas mamárias, nódulos linfáticos, ovários (fluido folicular), músculo, SNC (medula espinhal, tronco cerebral e hipocampo), fígado, pele, bexiga, próstata e também fezes. No que diz respeito ao proteoma da saliva de cão, o fluido para o qual pretendíamos obter mais informação visando a sua futura utilização no diagnóstico não invasivo, apenas foram encontrados no período de tempo referido, 2 artigos. Sendo que um dos artigos remetia para alergias no cão em que o objetivo do estudo foi avaliar a saliva como fonte de alérgenos ¹⁴ e o segundo artigo apenas caracterizava a proteína “thymosin β4” na saliva de mamíferos ¹⁵.

Para cada artigo o primeiro passo consistiu na compilação das proteínas identificadas e a sua inserção num livro de excel, visando a elaboração de uma base de dados.

À informação obtida por pesquisa bibliográfica e que foi anotada na base de dados foi adicionada a informação sobre as proteínas de cão que se encontravam depositadas no UniProt e que já tinham sido alvo de revisão manual (Figura 9).

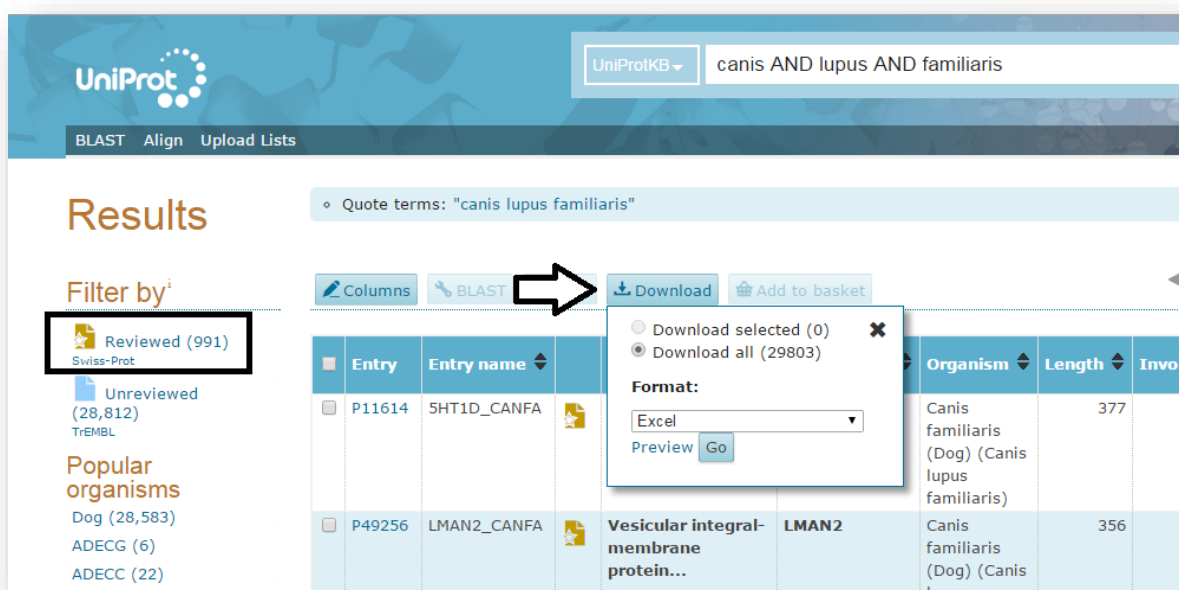


Figura 9- Pesquisa bibliográfica no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) das proteínas revistas do *Canis lupus familiaris*.

Apesar da informação anotada na base de dados ser referente às proteínas revistas de *Canis lupus familiaris*, a informação a ser usada para a análise das proteínas da base de dados foram apenas das que estavam envolvidas em doença.

Para isso no UniProt fomos pesquisar as proteínas revistas e envolvidas em doença (Figura 10).

Results

Quote terms: "canis lupus familiaris" show help for UniProtKB Basket

Filter by Columns BLAST Align Download Add to basket 1 to 25 of 29,803 Show 25

📄 Reviewed (991) Swiss-Prot

📄 Unreviewed (28,812) TrEMBL

Popular organisms

- Dog (28,583)
- ADECG (6)
- ADECC (22)
- ADECR (22)

Entry	Entry name	Organism	Length	Involvement in disease	PubMed ID	Mapped Pub
<input type="checkbox"/> P11614	SHT1D_CANFA	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)	377		2541503; 2159630; 1659418; 1758439	
<input type="checkbox"/> P49256	LMAN2_CANFA	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)	356	Vesicular integral-membrane protein...	8157011; 8205612; 8834812; 11872745; 17652092	

▶ Interaction

▶ Expression

▶ Gene Ontology (GO)

▼ Pathology & Biotech

- Allergenic properties
- Biotechnological use
- Disruption phenotype
- Involvement in disease
- Pharmaceutical use
- Toxic dose

▶ Subcellular location

▶ PTM / Processing

▶ Structure

▼ Publications

- PubMed ID
- Mapped PubMed ID

▶ Date of

▶ Family & Domains

▶ Taxonomic lineage

▶ Taxonomy Id

Figura 10- Pesquisa bibliográfica no UniProt (<http://www.uniprot.org/>) de todas as proteínas revistas do *Canis lupus familiaris* envolvidas apenas em doença.

3.2 Revisão e anotação do proteoma de *Canis lupus familiaris*

A construção da base de dados dedicada ao proteoma de cão tomou como modelo a base de dados do proteoma da cavidade oral humana, o “*OralOme*” (Figura 11), a qual pode ser consultada pela ferramenta bioinformática “*OralCard*” (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). Assim os campos/termos constantes no “*OralOme*” serviram como guia dos campos e termos que seriam necessários preencher durante o processo de revisão e anotação do proteoma de cão. No entanto foi necessário criar novos campos/termos para descrever as especificidades do proteoma de *Canis lupus familiaris*, assim como também alguns campos/ termos do “*OralOme*” não foram utilizados nesta base por não terem aplicação.

UniProtKBAC	Name	Organism	Parotid	Parotid Exosome	SM/SL	Minor	Whole Saliva	Crevicular Fluid	Mucosa	Tongue	In Vitro	Health
A0A5E4	Uncharac	Homo sapi	x		x							x
P62258	14-3-3 pr	Homo sapiens (Human)					x					x
A0L3I9	DNA repl	Magnetococcus sp. (strain MC-1)						x				x
A0LCK8	Protein tr	Magnetococcus sp. (strain MC-1)						x				x
Q04917	14-3-3 pr	Homo sapiens (Human)					x					x
P61981	14-3-3 pr	Homo sapiens (Human)					x					x
A0N5G5	Rheumat	Homo sapiens (Human)						x				x
O14746	Telomer	Homo sapiens (Human)							x			

Disease (OMIM ID)	Disease (MeSH ID)	Regulation	Age group	Gender*	Social Habits*	Methods of Sampling**	Methods of Analysis***	Type of Study	PTM	Biomarker	Citation (NCBI ID)	Obs.
			Adult								18361515	
125853	68003924	-2,3	36-62	M/F	Non-smokin	Unstimulated	Five saliva sam	Proteomics			19118452	
			36,6	M/F	nonsmokin	GCF was coll	Purified peptide	Proteomics			22623421	
			36,6	M/F	nonsmokin	GCF was coll	Purified peptide	Proteomics			22623421	
125853	68003924	-3	36-62	M/F	Non-smokin	Unstimulated	Five saliva sam	Proteomics			19118452	
125853	68003924		36-62	M/F	Non-smokin	Unstimulated	Five saliva sam	Proteomics			19118452	
260950	68055113					isolated GCF	LC-ESI-MS/MS	Proteomics			21794177	
275355	68009062	+	42-81	M/F		biopsy	immunohistochemistry/RT-PCR				17487355	

Figura 11- Organização dos campos e respetivos termos da base de dados *OralOme Human*.

A tabela 1 ilustra os campos do “*OralOme*” que foram mantidos na *CanisTecOme* e os campos que eram distintos ou inexistentes no *CanisTecOme*.

Tabela 1- Campos e termos da base de dados *OralOme* e *CanisTecOme* – Construção do endereço de informação. Campos iguais estão anotados com o símbolo ✓ e os campos distintos ou inexistentes com o símbolo ✕.

OralOme	Modificações	CanisTecOme
UniProtKBAC	✓	UniProtKBAC
Name	✓	Name
Organism	✓	Organism
Parotid exosome	✕	Serum, urine, cerebrospinal fluid, saliva, tear, biopsy from different regions of the CNS (spinal cord, brainstem, hipocampus), biopsy liver, biopsy lymphnodes, biopsy mamary gland, biopsy muscle, biopsy follicular fluid, biopsy skin, biopsy bladder, prostate and feces
SM/SL	✕	
Minor	✕	
Whole saliva	✕	
Crevicular fluid	✕	
Mucosa	✕	
Tongue	✕	
<i>In vitro</i>	✕	Breed
Health	✓	Age
Disease (OMIM ID)	✓	Gender
Disease (MesH ID)	✓	Castrated
Regulation	✓	Health
Age group	✓	Disease
Gender	✓	Regulation
Social habits	✕	Disease type
Mehods of sampling	✓	Disease name
Methods of analysis	✓	Type of microorganism
Type of study	✓	Microorganism
PTM	✕	Mehods
Biomarker	✓	Type of study
Citation (NCBI ID)	✓	Biomarker
Obs.	✓	Year of article
		Citation (NCBI ID)
		Obs.

O processo de anotação da informação referente a cada proteína identificada em cada um dos artigos consultado começa com o registo do seu código UniProtKBAC (ver no item 3.2.1. desta dissertação), seguido do nome da proteína ("*Protein name*") e do nome do organismo ("*Organism*") no qual foi identificada cada proteína.

UniProtKBAC	Protein name	Organism
--------------------	---------------------	-----------------

O campo seguinte é referente ao tipo de amostra biológica onde foi estudada a proteína. De acordo com a origem da proteína esta pode ser anotada com um X na

coluna referente a cada um dos termos correspondente ao tipo de amostra biológica ou seja: “Serum”, “Urine”, “Cerebrospinal fluid”, “Saliva”, “Tear”, “Biopsy: Lymph nodes”, “Biopsy: Mammary gland”, “Biopsy: Muscle”, “Biopsy:Ovarian (follicular fluid) e “Biopsy: Spinal cord”, “Biopsy: Brainstem”, “Biopsy: Hippocampus”, “Biopsy: Liver”, “Biopsy: Skin”, “Biopsy: Bladder”, “Biopsy: Prostate” e “Feces”. Este critério é aplicado a cada proteína identificada em cada um dos artigos consultado.

Serum	Urine	Cerebrospinal fluid	Saliva	Tear	Biopsy: Spinal cord	Biopsy: Brainstem	Biopsy: Hippocampus
Biopsy: Liver	Biopsy: Lymph nodes	Biopsy: Mammary gland	Biopsy: Muscle	Biopsy: Follicular fluid			
Biopsy: Skin	Biopsy: Bladder	Biopsy: Prostate	Feces				

Como existem várias raças dentro da mesma espécie dedicou-se um campo específico para identificar a raça de cão onde foi identificada a proteína que está a ser anotada (“Breed”). Para uma melhor caracterização do individuo dador da amostra é registada a informação relativa à idade (“Age”), género (“Gender”) e se o animal foi castrado ou não (“Castrated”). Esta última informação é anotada na base de dados com um X na coluna adequada consoante seja ou não castrado.

Breed	Age	Gender	Castrated
-------	-----	--------	-----------

Os campos seguintes continuam a caracterização do individuo dador da amostra nomeadamente a indicação se a proteína foi identificada em amostras de indivíduos saudáveis (“Healthy”) ou com patologia (“Disease”), anotando-se com um X na coluna adequada.

O campo (“Regulation”) diz respeito à informação sobre os dados quantitativos ou qualitativos da proteína, reportados no artigo. Os dados quantitativos são anotados com os respetivos valores, enquanto os dados qualitativos são anotados com “Increased” ou “Decreased”.

Relativamente ao campo (“Disease type”) é anotada a forma mais geral da doença, isto é, doença infecciosa do tipo cutânea e visceral, o campo (“Disease name”) refere-se ao nome da doença, por exemplo leishmaniose. Ambos os campos são anotados de forma descritiva.

Para as patologias promovidas por microrganismos são identificados o tipo de espécies microbianas por exemplo protozoários, sendo esta informação registada no campo “Type of microorganism”.

O campo “*Microorganism*” é relativo ao género do microrganismo, por exemplo a *Leishmania*.

Healthy	Disease	Regulation	Disease type	Disease name	Type of microorganism	Microorganism
---------	---------	------------	--------------	--------------	-----------------------	---------------

Para cada proteína são também registados os métodos empregues na identificação de cada proteína (“Methods”), bem como o tipo de estudo se de proteómica ou um estudo dirigido (“Type of study”). Na base de dados fica também registado se a proteína já foi proposta como biomarcador (“Biomarker”), sendo anotado o facto como um X.

Os três últimos campos remetem para o ano em que o artigo que contém a informação sobre as proteínas foi publicado, sendo registada a sua identificação no NCBI (“Citation NCBI ID”). A coluna referente a “Obs.” (observações) é dedicada ao registo de informações que não foi possível anotar nos outros campos mas que é importante para a interpretação dos dados (por exemplo registar que as proteínas anotadas são de um artigo de revisão).

Methods	Type of study	Biomarker	Year of article	Citation (NCBI ID)	Obs.
---------	---------------	-----------	-----------------	--------------------	------

O anexo 1 apresenta toda a base de dados criada no âmbito de presente trabalho.

Para ilustrar o processo de anotação descrito anteriormente passaremos a apresentar o procedimento para a anotação da informação relativa às proteínas identificadas em soro num artigo dedicado à obesidade em cães.

Inicialmente começou-se por inserir no campo “*UniProtKBAC*” os respetivos códigos UniProt e no campo “*Protein name*” o nome referente a cada proteína. No campo “*Organism*” inseriu-se o nome científico do organismo, *Canis lupus familiaris*, uma vez que se trata de amostras de cão (Figura 12).

1

A proteomic analysis of serum from dogs before and after a controlled weight-loss program

A. Tvarijonaviciute^a, A.M. Gutiérrez^a, I. Miller^b, E. Razzazi-Fazeli^c, F. Tecles^a, J.J. Ceron^{a,*}

Protein identification

Retinol-binding protein 4 (*Canis lupus familiaris*)
Clusterin precursor (*Canis lupus familiaris*)
Serpin peptidase inhibitor, clade A (α -1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 (*Canis lupus familiaris*)

2

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
P25473	CLUS_CANFA	Clusterin	CLU	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)
F1Q4D9	F1Q4D9_CANFA	Uncharacterized protein	RBP4	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)
A11LJ0	A11LJ0_CANFA	Alpha 1 antitrypsin		Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)

3

UniProtKBAC	Protein name	Organism
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>
F1Q4D9	Retinol.binding protein 4	<i>Canis lupus familiaris</i>
A11LJ0	Alpha-1-antitrypsin	<i>Canis lupus familiaris</i>

Figura 12- Catalogação das proteínas. 1) Título do artigo e respetivas proteínas detetadas; 2) Códigos UniProt (<http://www.uniprot.org/>) e em que organismo estão presente; 3) Catalogação na base de dados “CanisTecOme”.

De seguida anotou-se o tipo de amostras em que foram identificadas as proteínas, sendo no caso 3 proteínas, a “Clusterin”, “Alpha 1 antitrypsin” e “Retinol-binding protein”, tendo sido todas obtidas a partir do soro, colocando-se dessa forma um X na coluna correspondente ao “Serum” (Figura 13).

Serum	Urine	Cerebrospinal fluid	Saliva	Tear	Biopsy: Lymph nodes	Biopsy: Mammary gland	Biopsy: Muscle	Biopsy: Follicular fluid	Feces
x									
x									
x									

Figura 13- Anotação do tipo de amostra a partir da qual se identificaram as proteínas.

O artigo referiu que o estudo foi feito em cães Beagles fêmeas, não castradas, com idades entre 5,2-6,5 anos e que as proteínas identificadas tanto estão presentes em saúde como em patologia, encontrando-se no ultimo caso duas proteínas aumentadas e uma diminuída. A figura 14, ilustra a anotação seguida para registo da informação, considerando-se como critério de anotação referente ao aumento da expressão “*Increased in disease*” no caso das proteínas “*Clusterin*,” *Retinol-binding protein 4*” ou “*Decreased in disease*” no caso da “*Alpha-1-antitrypsin*”.

Breed	Age	Gender	Castrated	Healthy	Disease	Regulation
Beagles	(5,2-6,5)	F		x	x	Increased in disease
Beagles	(5,2-6,5)	F		x	x	Increased in disease
Beagles	(5,2-6,5)	F		x	x	Decreased in disease

Figura 14- Anotação das características do organismo, como a raça, idade, género, castrado ou não, condição em que foram identificadas as proteínas (saúde/patologia) e a sua regulação.

A doença estudada no cão foi a obesidade sendo anotado como *Obesity* na coluna correspondente à “*Disease*”. Como o artigo não menciona qualquer microrganismo como causa da doença, as colunas “*Type of Microrganism*” e “*Microrganism*” não são preenchidas com qualquer informação.

Este artigo descreve que os métodos usados neste estudo foram a electroforese em gel 2D e a espectrometria de massa, sendo esta informação anotada na coluna correspondente a “*Methods*”, mantendo os termos em inglês (Figura 15).

Disease type	Disease	Type of microorganism	Microrganism	Methods
	Obesity			Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, two-dimensional electrophoresis gel image analysis, Mass spectrometry identification and Mass spectrometry data analysis
	Obesity			Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, two-dimensional electrophoresis gel image analysis, Mass spectrometry identification and Mass spectrometry data analysis
	Obesity			Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, two-dimensional electrophoresis gel image analysis, Mass spectrometry identification and Mass spectrometry data analysis

Figura 15- Anotação da patologia abordada no estudo e métodos usados para identificação das proteínas.

Este estudo aplica técnicas de proteómica e portanto essa informação é anotada na coluna “Type of study”. Como as proteínas estudadas no artigo foram sugeridas pelo autor como marcadores da condição de obesidade, essa informação é anotada na coluna “Biomarker” com um x. Os últimos dados a anotar nesta base de dados foram o ano do artigo neste caso 2012 e a identificação no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), sendo 22591953 (Figura 16).

Type of study	Biomarker	Year of article	Citation (NCBI ID)
Proteomic	x	2012	22591953
Proteomic	x	2012	22591953
Proteomic	x	2012	22591953

Figura 16- Anotação da informação constante no artigo, como tipo de estudo, ano do artigo, código NCBI.

Para identificar e associar a cada proteína o seu código UniProtKBAC usamos a ferramenta UniProt (www.uniprot.org).

A base de dados UniProt reúne informação sobre a estrutura e a função de proteínas de todos os organismos. Atualmente inclui duas secções: a UniProtKB/Swiss-Prot que é anotada e revista manualmente e a UniProtKB/TrEMBL que resulta da anotação automática e não é revista.

As proteínas que estão anotadas no CanisTecOme possuem todas como identificador o código UniProtKB AC para garantirmos que correspondiam a proteínas já anotadas no UniProt.

A pesquisa dos códigos para serem inseridos na base de dados foi realizada na nova plataforma da ferramenta UniProt.

É inserido o nome da proteína na janela de pesquisa do UniProt, que a identifica em diversos organismos. Nessa lista é escolhido o código da “Serum albumin” identificada em *Canis lupus familiaris* (Figura 17).

UniProtKB - serum albumin

Results

Quote terms: "serum albumin"

Filter by: Columns BLAST Align Download Add to basket

1 to 25 of 566 Show 25

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P0DJ18	SAA1_HUMAN	Serum amyloid A-1 protein	SAA1	Homo sapiens (Human)	122
P08759	ALBUA_XENLA	Serum albumin A	alb-a	Xenopus laevis (African clawed frog)	606
P14872	ALBUB_XENLA	Serum albumin B	alb-b	Xenopus laevis (African clawed frog)	607
P02769	ALBU_BOVIN	Serum albumin	ALB	Bos taurus (Bovine)	607
D5H440	D5H440_ONCMY	Serum albumin 1 protein	serum albumin 1	Oncorhynchus mykiss (Rainbow trout) (Salmo gairdneri)	281
P02768	ALBU_HUMAN	Serum albumin	ALB, GIG20, GIG42, PRO0903, PRO1708, PRO2044, PRO2619, PRO2675, UNQ696/PRO1341	Homo sapiens (Human)	609
P02770	ALBU_RAT	Serum albumin	Alb	Rattus norvegicus (Rat)	608
P49822	ALBU_CANFA	Serum albumin	ALB	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)	608
P07724	ALBU_MOUSE	Serum albumin	Alb, Alb-1, Alb1	Mus musculus (Mouse)	608

Figura 17- O código UniProtKB AC relativo à proteína “Serum albumin” do organismo *Canis lupus familiaris*.

Ao longo da pesquisa dos códigos UniProt foram encontradas algumas limitações, nomeadamente alguns artigos:

1. Apresentam códigos em que a consulta no UniProt mostra que não pertencem ao organismo *Canis lupus familiaris*. A figura 18 mostra a título de exemplo que o código P12763 corresponde a uma proteína de *Salmonella typhimurium*.

Gene	AC ¹ N°	Protein name	
A2AP	P28800	Alpha-2-antiplasmin	<i>Bos taurus</i>
ACTG	Q9UW9	Actin-gamma	<i>Acremonium chrysogenum</i>
AHSG	P12763	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Salmonella typhimurium</i>
APOA1	P02648	Apolipoprotein A-I	<i>Canis familiaris</i>

Figura 18- Existência de um código UniProtKB AC relativa a cada proteína em que apenas um corresponde ao organismo *Canis lupus familiaris*.

Para proteínas em que os artigos não apresentavam qualquer código ou apresentavam um código UniProt AC de outro organismo, pesquisou-se pelo nome da proteína no UniProt associando-a ao organismo *Canis lupus familiaris*. Para algumas proteínas conseguiu-se obter de imediato o código, mas para outras esta metodologia não se adequava. Como alternativa começou-se por procurar a proteína homóloga em humano e depois realizou-se uma comparação de sequências usando ferramenta apropriada UniProt BLAST (<http://www.uniprot.org/blast/>) que encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas.

Com os resultados pesquisou-se a proteína com maior percentagem de identidade associada a *Canis lupus familiaris*. A título de exemplo a figura 19 ilustra a pesquisa realizada referente à proteína “*Alpha-2-HS-glycoprotein*” no UniProt e seleção do respetivo código UniProt referente ao humano. Seguidamente seleccionou-se e percorreu-se o “BLAST” até se encontrar sequências similares da mesma proteína em outros organismos, neste caso no *Canis lupus familiaris*.

The image displays the UniProt BLAST interface. At the top, the search term "alpha 2 hs glycoprotein" is entered. The results page shows a table with columns for Entry, Entry name, Protein names, Gene names, and Organism. The entry P02765 (FETUA_HUMAN) is identified as Alpha-2-HS-glycoprotein. Below this, the protein details for P02765 are shown, including its name, gene, and organism. The BLAST results section shows a color scale for identity percentage, ranging from 100% (red) to 0% (blue). The 'Overview' section lists several hits, with the top hit E2QUV3 (Uncharacterized protein (Canis familiaris)) highlighted in orange, indicating a 69.0% identity.

Figura 19- Sequência de obtenção do código UniProt – BLAST. 1) Proteína identificada como outro organismo; 2) alinhamento das sequências através da ferramenta BLAST no UniProt; 3) escolha da proteína com a identidade mais próxima de 100% que indica o grau de homologia entre as proteínas, sendo o resultado final da proteína com o código correspondente ao organismo *Canis lupus familiaris*.

- Utilização do código “GI number” apresentados pelo artigo (Figura 20) que não têm qualquer correspondência aos códigos UniProt UniProtKB AC.

Spot label ^a	Accession No. ^b	Protein identification
1	gil73998292	Retinol-binding protein 4 (<i>Canis lupus familiaris</i>)
2	gil50979240	Clusterin precursor (<i>Canis lupus familiaris</i>)
3	gil121583756	Serpin peptidase inhibitor, clade A (α -1 antiproteinase, antitrypsin), member 1 (<i>Canis lupus familiaris</i>)

Figura 20- Existência de um código “gi number” sem correspondência a um código UniProtKB AC.

O número GI (por vezes escrito em letras minúsculas, "gi") é simplesmente uma série de dígitos que são atribuídos consecutivamente a cada registo de sequências processado pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sitemap/sequenceIDs.html>).

Quando se utilizou o código gi da proteína "Retinol-binding protein 4", para se transpor para um código UniProtKB utilizando para o efeito uma ferramenta disponível no próprio UniProt ("ID Mapping") (<http://www.uniprot.org/uploadlists/>), não se obteve sucesso (Figura 21).

The screenshot shows the UniProt ID Mapping tool interface. At the top, there is a section titled "Upload Lists" with a sub-section "1. Provide your identifiers". A text input field contains the number "73998292". Below this, there is a button "Escolher ficheiro" and the text "Nenhum fiche... selecionado".

The next section is "2. Select options". It features two dropdown menus: "From" (set to "GI number*") and "To" (set to "UniProtKB"). A "Go" button is next to them, with a larger button below it that says "Upload your list and view results".

Below the form, there is a navigation bar with links for "BLAST", "Align", "Retrieve/ID Mapping", "Help", and "Contact". A "Show help for UniProtKB" link and a "Basket" icon are also visible.

The main content area is titled "Results" and displays a message: "Unfortunately we were unable to match any identifiers from your list. Click here to download the 1 unmapped identifier(s)". Below this, it shows "0 results in UniProtKB". A large orange box contains the text: "Sorry, no results found for your search term. Can't find what you are looking for? Please contact us".

A red arrow points from the "From" dropdown menu to the "Results" section.

Figura 21- Exemplo de um código gi da proteína "Retinol-binding protein 4" sem correspondência a um código UniProt.

Para contornar esta limitação pesquisou-se pelo nome da proteína e pelo organismo que se pretendia e só assim se obteve um código UniProtKB AC (Figura 22).

UniProt "retinol binding" AND protein AND 4

BLAST Align Retrieve/ID Mapping

Results

Filter by: Reviewed (53) Swiss-Prot, Unreviewed (106) TrEMBL

Popular organisms: Mouse (17), Human (14), Bovine (11), Rat (8), Zebrafish (2)

Other organisms: **canis** (Go), Canis familiaris [9615]

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P02753	RET4_HUMAN	Retinol-binding protein 4	RBP4, PRO2222	Homo sapiens (Human)	201
P10745	RET3_HUMAN	Retinol-binding protein 3	RBP3	Homo sapiens (Human)	1,247
P02696	RET1_RAT	Retinol-binding protein 1	Rbp1, Rbp-1	Rattus norvegicus (Rat)	135
P12661	RET3_BOVIN	Retinol-binding protein 3	RBP3	Bos taurus (Bovine)	1,286
Q75Z17	RET3_XENLA	Retinol-binding protein 3	rbp3	Xenopus laevis (African clawed frog)	1,219
P18902	RET4_BOVIN	Retinol-binding protein 4	RBP4	Bos taurus (Bovine)	183

UniProt "retinol binding" AND protein AND 4 AND organism: "Canis familie"

BLAST Align Retrieve/ID Mapping

Results

Filter by: Unreviewed (2) TrEMBL

Popular organisms: **canis** (2)

Proteomes: UP00002254 (2)

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
Z99795	Z99795_CANFA	Uncharacterized protein	ADH4	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)	379
F1Q409	F1Q409_CANFA	Uncharacterized protein	RBP4	Canis familiaris (Dog) (Canis lupus familiaris)	211

Figura 22- Resultado de um possível código UniProt da proteína "Retinol-binding protein 4".

Como as imunoglobulinas apresentam regiões variáveis com alta diversidade intra e inter-espécies poucas são anotadas com o código UniProt. Assim ao longo da base de dados vão aparecer imunoglobulinas sem qualquer código UniProtKBAC (Figura 23).

UniProtKBAC	Protein name	Organism
	Immunoglobulin heavy chains	Canis lupus familiaris
	Immunoglobulin gamma heavy chain B	Canis lupus familiaris
	Immunoglobulin gamma heavy chain C	Canis lupus familiaris

Figura 23- As imunoglobulinas não apresentam qualquer código UniProtKBAC associado.

3.3 Justificação do nome da base de dados

A base de dados dedicada ao proteoma de *Canis lupus familiaris* foi designada por CanisTecOme, tendo como pressupostos os constantes na figura 24.

Assim “Canis” porque se trata de uma base de dados dedicada apenas a *Canis lupus familiaris* (cão), “Tec” porque envolve novas tecnologias (ferramentas bioinformáticas) e “Ome” porque esta ferramenta vai ser dedicada ao proteoma em saúde e em patologia).

Para a construção da CanisTecOme recorreu-se à utilização da língua inglesa para que a base de dados possa ser consultada por toda a comunidade científica.

Toda a informação introduzida na base de dados CanisTecOme resulta de anotação manual.

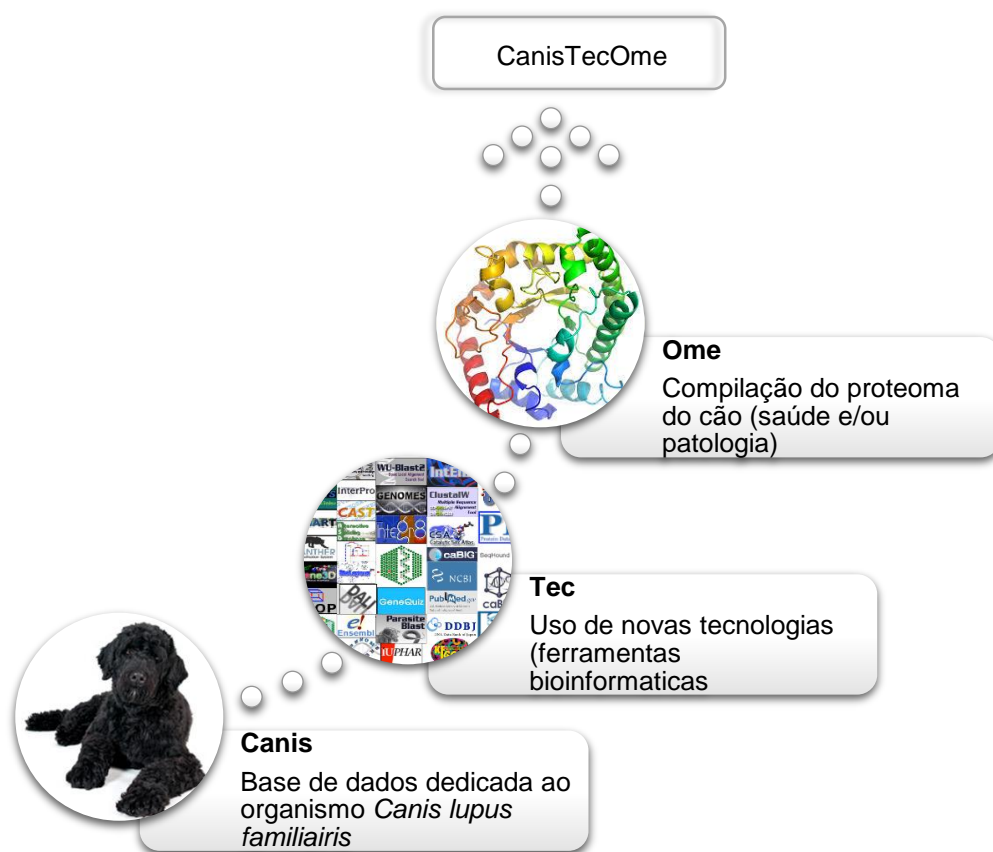


Figura 24- Representação esquemática dos pressupostos para a atribuição do nome da base de dados *CanisTecOme*.

3.4 Caracterização funcional das proteínas exclusivas em situação de doença

A base de dados *CanisTecOme* constituiu o suporte para toda a fase seguinte de caracterização das proteínas que constituem o proteoma de cão.

Numa primeira fase a análise das proteínas tinha como objetivo identificar quais as:

1. Implicadas em doença e exclusivas;
2. Candidatas a biomarcadores;
3. Biomarcadores já sugeridos pela bibliografia.

1. Proteínas exclusivas implicadas em cada doença

Como havia interesse em identificar quais as proteínas que foram identificadas em exclusivo em cada patologia entre as diversas doenças anotadas na base de dados, foram aplicados filtros nos campos “*Healthy*” e “*Disease*” (Figura 25).

The screenshot shows a software interface with a ribbon menu at the top. The 'DADOS' (Data) tab is active, and the 'Filtrar' (Filter) button is highlighted with a red arrow. Below the ribbon, a search bar contains the text 'Canine leishmaniasis'. The main area displays a data table with columns: Breed, Age, Gender, Castrated, Healthy, Disease, Regulation, and Disease. The 'Healthy' and 'Disease' columns are highlighted with a red box, indicating that filters have been applied to these fields. The table contains 12 rows of data, all with 'German shepherd and Mongrel' in the 'Breed' column and 'M/F' in the 'Gender' column. The 'Disease' column contains 'Infect' for most rows, and 'Overexpressed' for one row. The 'Regulation' column contains 'Increased' for two rows and 'Overexpressed' for one row. The 'Healthy' column is empty for all rows.

Breed	Age	Gender	Castrated	Healthy	Disease	Regulation	Disease	
German shepherd and Mongrel		M/F				x	Increased	Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x	Overexpressed	Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x	Increased	Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect
German shepherd and Mongrel		M/F				x		Infect

Figura 25- Metodologia de aplicação de filtros nos campos “*Healthy*” e “*Disease*” para obtenção das proteínas envolvidas em cada patologia.

Após aplicar os filtros obteve-se as proteínas identificadas em cada doença que estão anotadas na base de dados.

Num novo ficheiro Excel anotaram-se em cada coluna uma determinada doença e abaixo colocaram-se as respetivas proteínas como mostra a figura 26.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Acatalasemia	Acute kidney injury	Acute pancreatitis	Alergies	Alzheimer's disease	Autoimmune uveitis	Breast cancer	Canine bat
2	O97492	Q29416	T2KEN6	J9NWQ2	Q28280	Q28281	E2R5B2	P51742
3				E2QXJ0			E2RT65	T2KEN6
4				J9NZ24			P54714	F6V713
5				P49822			E2RSF2	P02648
6				O18873			Q6EIZ0	E2RES2
7				H2B3G5				E2R5W6
8				O18874				E2RE76
9				E2QXE7				F1PIX8
10				D7PBH4				J9P430
11								F1PZR4
12								E2QUV3
13								P19006
14								E2R4V3
15								P25473
16								E2R833
17								Q4GX49

Figura 26- Anotação em um separador de Excel das doenças e respetivas proteínas.

2. Proteínas candidatas a biomarcadores

Posteriormente através de uma pesquisa manual foi-se procurar a exclusividade de cada proteína. Para isso selecionou-se as teclas “Ctrl L” para localizar cada proteína nesse ficheiro.

A figura 27 exemplifica a pesquisa por uma proteína com código UniProtKBAC O97492 identificada na doença Acatalasemia. O resultado obtido apresentou que esta proteína não se encontra em qualquer das outras doenças, assim marcou-se como exclusiva através de uma cor.

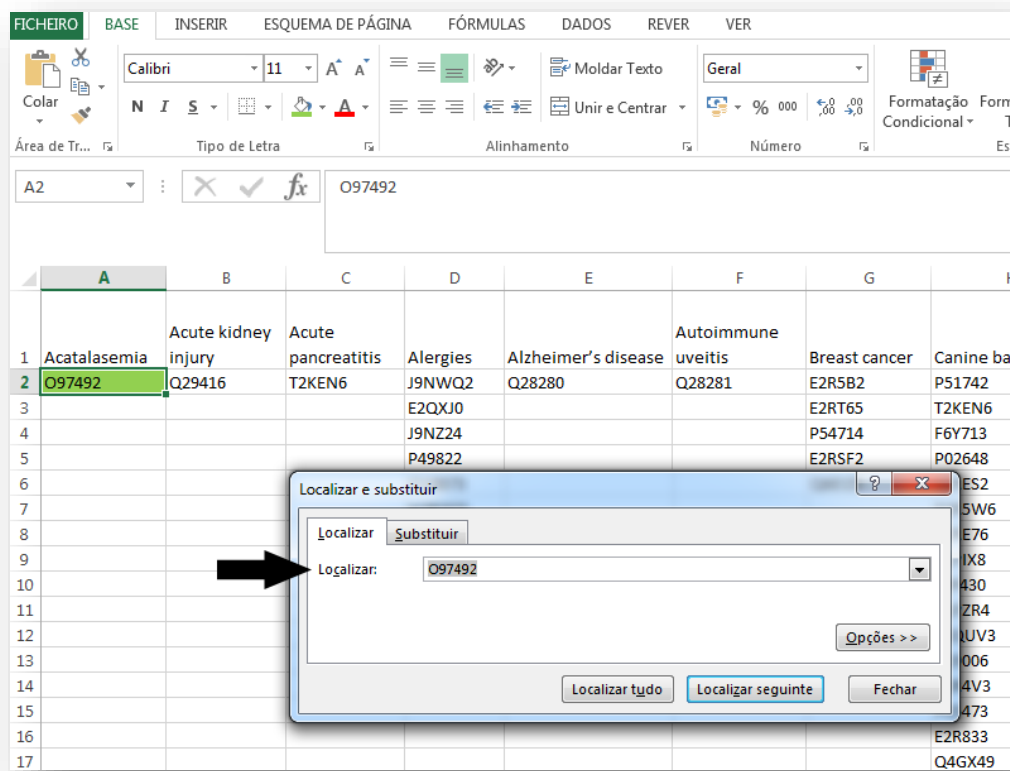


Figura 27- Pesquisa manual para encontrar possíveis proteínas exclusivas em doença.

Todo este procedimento poderia ser realizado por um programa de elaboração de diagramas de Venn, só que devido ao facto de o número de doenças anotadas na base de dados de dados ser muito elevado o programa não suportou tanta informação.

3. Proteínas sugeridas como biomarcadores pela bibliografia

Após leitura e análise de todos os trabalhos de proteómica verificou-se que alguns autores sugeriram proteínas como possíveis candidatos a biomarcadores.

Como esta informação foi anotada no *CanisTecOme* no campo "*Biomarker*" aplicaram-se neste campo filtros para seleccionar apenas as proteínas que cumpriam esse requisito (Figura 28).

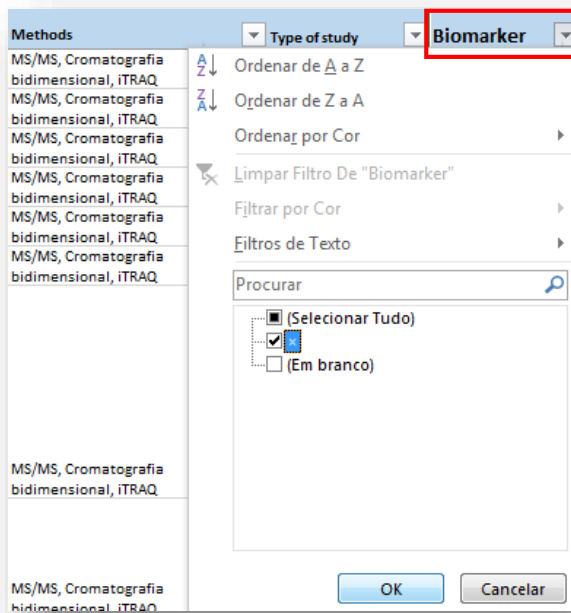


Figura 28- Filtros aplicados no campo “*Biomarker*” para identificação das proteínas que cumprem esse requisito.

Após seleção de todos os dados necessários para a posterior fase do trabalho, procedeu-se à caracterização funcional de cada proteína. Para esta fase a ferramenta usada foi o PANTHER.

Como também se tinha interesse em poder vir a usar no futuro a saliva como fluido de diagnóstico estávamos interessados em saber se para uma determinada patologia as proteínas identificadas como sendo exclusivas poderiam ser encontradas no fluido salivar. Assim as ferramentas usadas foram o BLAST do UniProt (pesquisa de homologia de proteínas) como já referido na figura 19 e o OralCard.

A. PANTHER

No sentido de esclarecer em que mecanismos funcionais participam as proteínas exclusivas de cada patologia do CanisTecOme, utilizou-se a ferramenta bioinformática PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) (<http://www.pantherdb.org/>).

Inicialmente selecionaram-se do CanisTecOme os códigos referentes as proteínas de cada patologia e exportaram-se os códigos para a ferramenta PANTHER como mostra a figura 29.

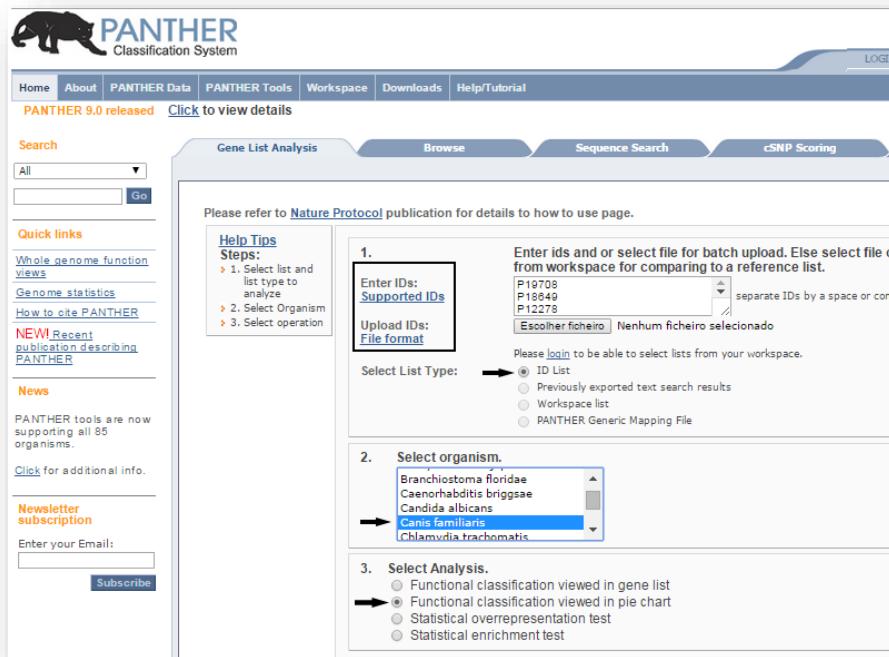


Figura 29- Ferramenta bioinformática PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>). 1. Na opção “Enter IDs” colar no espaço em branco os códigos UniProtKBAC, e na opção “Select List Type” selecionar “ID List”; 2. Na opção “Select organism” deve-se selecionar o organismo de interesse; 3. Na opção “Select Analysis” selecionar “Functional classification viewed in pie chart”.

Após a submissão dos códigos foi selecionada a opção “Select Ontology: Biological Process”, para se obter um gráfico circular com todos os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas (Figura 30).

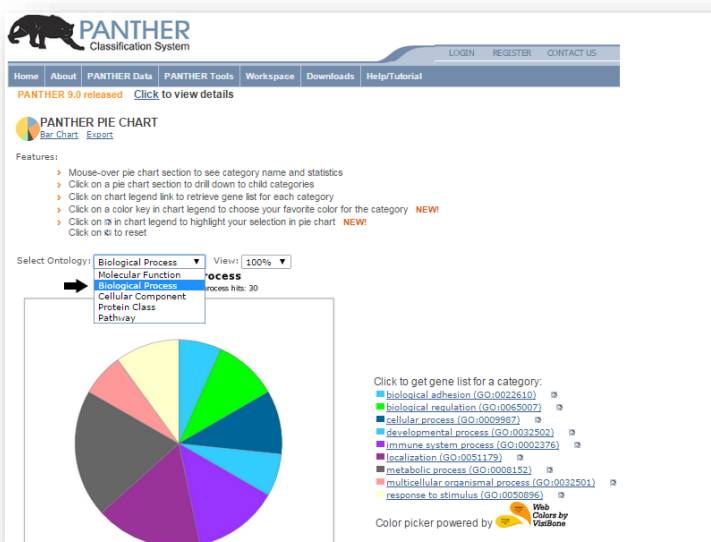


Figura 30- Seleção da opção “Select Ontology: Biological Process”, para se obter um gráfico circular com os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas.

Ao selecionar uma das porções do gráfico circular correspondente a um dos processos biológicos gerais, obtém-se os processos biológicos mais específicos associados a cada um, ou seja permite identificar “*child terms*” o que permite identificar funções mais específicas em que as proteínas de cada processo biológico participam (Figura 31).

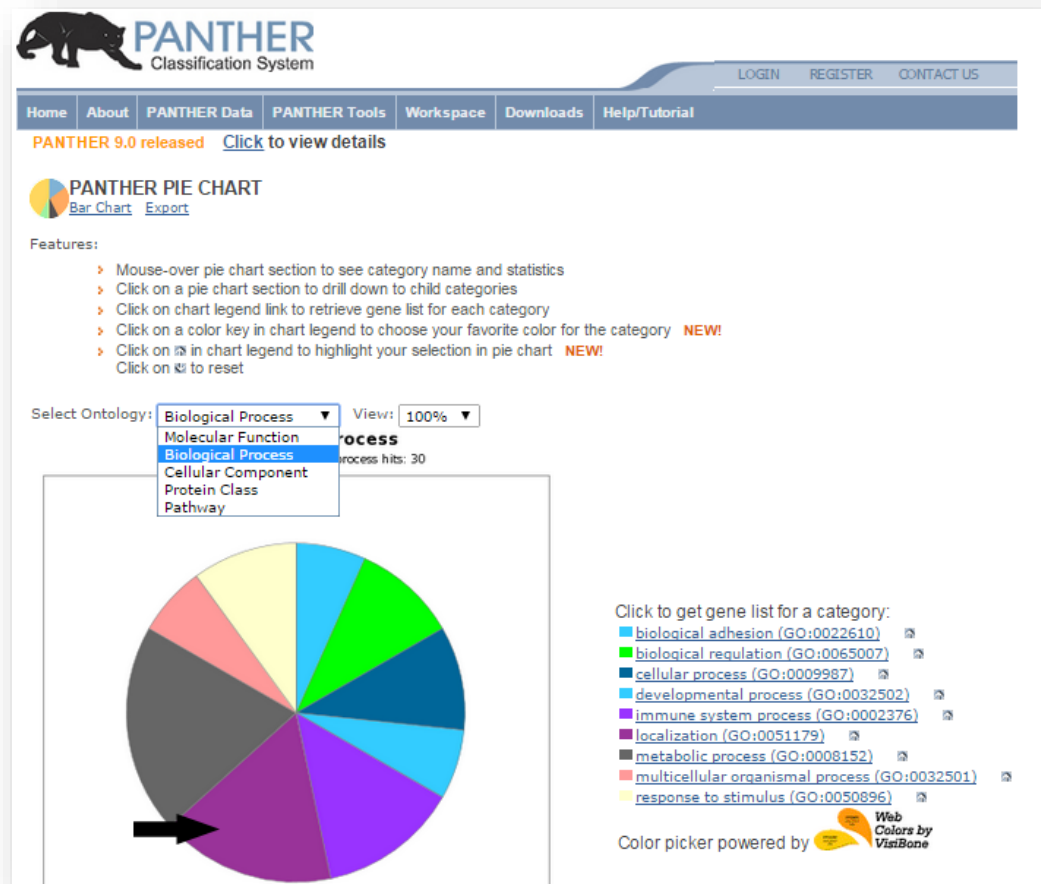


Figura 31- Seleção de uma das porções de um processo biológico geral “*Localization*” do gráfico circular para obter os processos biológicos mais específicos.

Após selecionar o processo biológico específico obtém-se quantas e quais as proteínas que estão associadas a esse processo (Figura 32).

1

Click to get gene list for a category:
transport (GO:0006810)

Color picker powered by Color by Watstone

PANTHER
Classification System

Home About PANTHER Data PANTHER Tools Workspace Downloads Help/Tutorial

PANTHER 9.0 released [Click to view details](#)

PANTHER GENE LIST [Customize Gene list](#)

Convert List to: Send list to:

Display: items per page [Refine Search](#)

Hits 1-3 of 3 [page: 1]

	Gene ID	Mapped IDs	Gene Name Gene Symbol Ortholog	PANTHER Family/Subfamily	GO Molecular Function
1.	CANFA ensembl=ENSCAF00000013205 UniProtKB=P19708	P19708	Serum amyloid A protein SAA1 ortholog	SERUM AMYLOID A-1 PROTEIN (PTHR23424.SF2)	lipid transporter activity transmembrane transporter activity
2.	CANFA ensembl=RHSCAF00000011600 UniProtKB=F6Y2P4	F6Y2P4	Uncharacterized protein ATP11B ortholog	PHOSPHOLIPID-TRANSPORTING ATPASE IP-RELATED (PTHR24092.SF37)	hydrolase activity cation transmembrane transporter activity
3.	CANFA ensembl=RHSCAF000000083240 UniProtKB=F1PAX2	F1PAX2	Uncharacterized protein CP ortholog	CEP/CLP/CLM/CP (PTHR10127.SF294)	oxidoreductase activity serine-type peptidase activity metallopeptidase activity receptor activity lipid transporter activity transmembrane transporter activity receptor binding enzyme regulator activity

2

Figura 32- Ferramenta bioinformática PANTHER. 1) Seleção do processo biológico mais específico “Transport”; 2) Obtenção das quantas e quais as proteínas associadas a este processo biológico.

B. OralCard

Como temos particular interesse em poder vir a utilizar no futuro a saliva como fluido de diagnóstico estávamos interessados em saber se para uma determinada patologia as proteínas identificadas como exclusivas poderiam ser encontradas no fluido mencionado.

Assim utilizou-se como estratégia para verificar se as proteínas exclusivas também podiam estar presentes em saliva, procurando as proteínas homólogas humanas.

Utilizou-se para o efeito o BLAST (<http://www.uniprot.org/blast/>) da ferramenta UniProt. Com a identificação das proteínas homólogas humanas estas foram pesquisadas pela ferramenta OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>) (Figura 33).

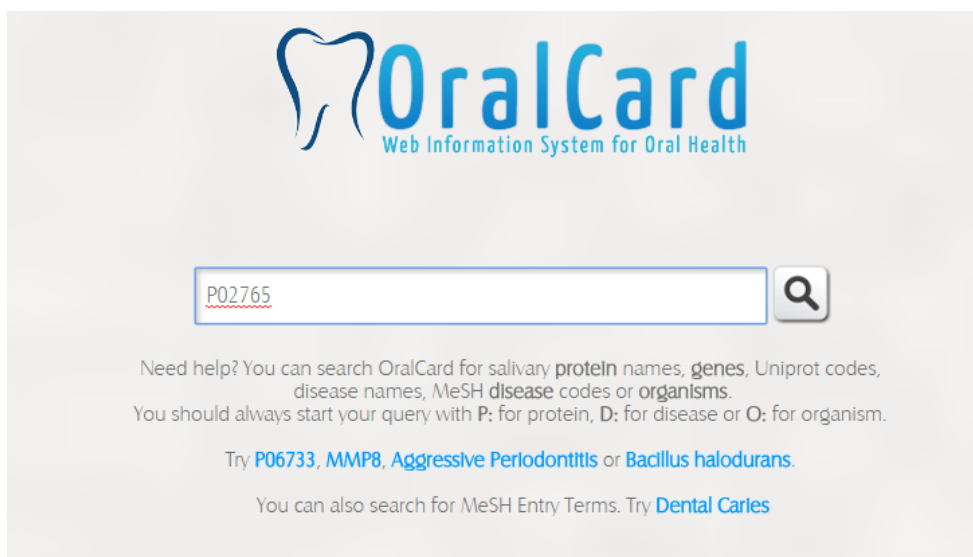


Figura 33- Ferramenta bioinformática OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). 1) Inserção do código *UniProtKBAC* pertencente a uma proteína humana.

Esta pesquisa tinha a finalidade de ver se as proteínas já tinham sido identificadas em amostras de saliva humana. Caso a proteína em análise tivesse presente na cavidade oral aparecia associada a saúde e/ou doença e a outros parâmetros (Figura 34).

OralCard

Search Results

Type	Id	Name	Action
Protein	P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	View

OralCard

Protein P02765

Alpha-2-HS-glycoprotein [+ Details](#)

Export

Source	Health	OralCard Disease	OMIM	MeSH	Regulation	Age Group	Gender	Social Habits	Sampling	Analysis	Study	PTM	Biomarker
Crevicular Fluid	true	Chronic Periodontitis		68055113		45-77	WF	All...	Each...	Nanoflow...	Proteomics		false
Parotid	true					Adult				false
SMVSL	true					Adult				false
Whole Saliva	true	Chronic Periodontitis		68055113	1,68	35-64	WF	Non-smoking...	Stimulated...	Whole...	Proteomics		false
Whole Saliva	true	Diabetes Mellitus, Type 2	125853	68003924		36-62	WF	Non-smoker...	Unstimulated...	Five...	Proteomics		false
Whole Saliva	true	Breast Neoplasms	114480	68001943	-	Adult				false
Whole Saliva	true					Adult			Glycosylation	false
Whole Saliva	true					Adult	WF	...	Unstimulated...	...		Glycosylation	false
Whole Saliva	true					Adult				false

[Diseases](#)
[Sources](#)
[Pathways](#)
[GO](#)
[UniProt](#)
[Panther](#)
[PDB](#)
[SMART](#)
[PharmGKB](#)
[BRENDA](#)
[Network](#)
[References](#)

Figura 34- Ferramenta bioinformática OralCard (<http://bioinformatics.ua.pt/OralCard/>). 1) Resultado associado à proteína “Alpha-2-HS-glycoprotein” (P02765) mostrando em que amostra foi identificada, condição de saúde em que está envolvida, o seu código OMIM, código MesH, regulação, género, hábitos sociais, métodos de identificação, tipo de estudo, PTM, biomarcador e código NCBI.

3.5 Caracterização funcional das proteínas identificadas em saliva do *Canis lupus familiaris*

No sentido de esclarecer em que mecanismos funcionais participam as proteínas do CanisTecOme, utilizou-se a ferramenta bioinformática AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>).

Inicialmente selecionaram-se do CanisTecOme os códigos de interesse referentes a cada proteína e exportaram-se os códigos para um novo Excel guardado num formato “text” (tab delimited).

O formato “text” das proteínas foi usado na ferramenta bioinformática “Go Retriever” que permite saber rapidamente as anotações GO existentes para um conjunto de proteínas, tendo o cuidado de escolher a opção “UniProt ID” na seção “Accession Type” (figura 35 e 36).



Figura 35- Ferramenta bioinformática AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>) para obter as opções “GORetriever” e “GOSlim Viewer” basta selecionar o campo “Tools”.

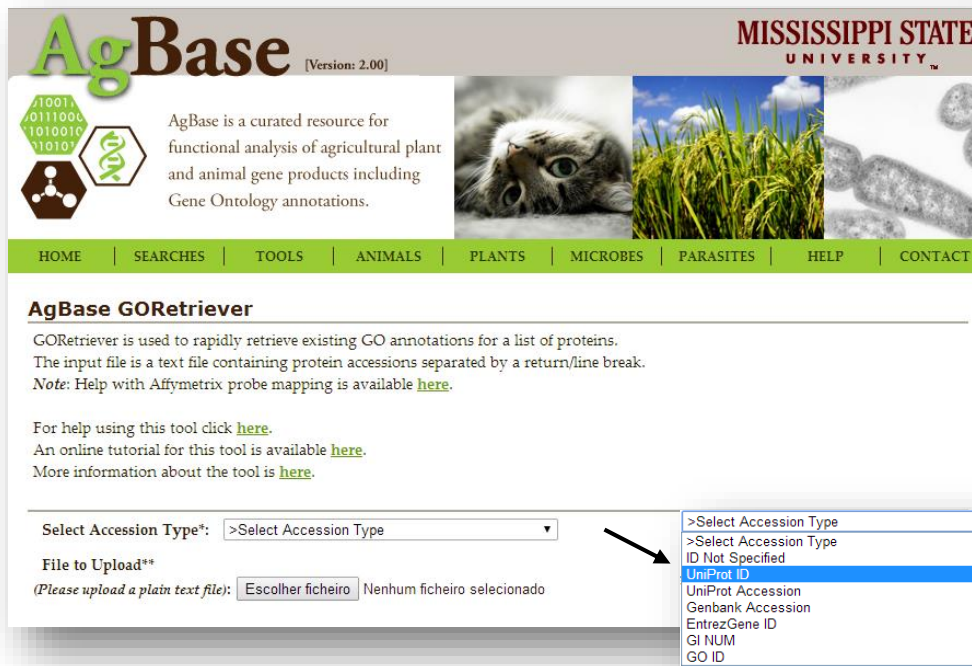


Figura 36- Página inicial da ferramenta *GORetriever* da plataforma bioinformática AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>). Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase.

Numa fase posterior, descarregou-se o ficheiro “GO Summary file (for use in GOSlim Viewer)” e realizou-se a aquisição desse ficheiro na ferramenta “SlimViewer” do Agbase selecionando a opção “Generic”. O ficheiro apresentava os códigos UniProt das proteínas, ID da ontologia bem como a classificação a que estão associadas: “P” (processo biológico), “C” (componente celular) e “M” (função molecular) (Figura 37 e 38).

O “SlimViewer” é usado para fornecer um resumo de alto nível das funções para um conjunto de dados usando um conjunto de “GO slims”, o que facilita a interpretação dos resultados. Os “GO Slims” são listas de GO, que foram selecionados a partir de todo o conjunto de termos disponíveis no projeto Gene Ontology.

AgBase [Version: 2.00] **MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY**

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MICROBES | PARASITES | HELP | CONTACT

GORetriever Results

Number of Input IDs: 11
 Input filename: COD_SALIVA.txt
 Evidence Codes to return: IC,IDA,IEA,IEP,IGI,IMP,IPI,ISS,NAS,ND,RCA,TAS,NR,EXP,ISO

[View GO annotation file in tab-delimited format\(can be opened in Excel\)](#)
[View ID List without GO annotation](#)
GO Summary file (for use in GOSlimViewer) →

	A	B	C
1	Accessions	GO: IDs	Ontological classification
2	D7PBH4	GO:00052; F	
3	D7PBH4	GO:00055; F	
4	D7PBH4	GO:00068; P	
5	E2QXE7	GO:00055; C	
6	E2QXE7	GO:00082; F	
7	E2QXJ0	GO:00082; F	
8	H2B3G5	GO:00052; F	
9	H2B3G5	GO:00055; F	
10	H2B3G5	GO:00055; C	
11	H2B3G5	GO:00068; P	
12	H2B3G5	GO:00360; F	
13	J9P127	GO:00037; F	
14	J9P127	GO:00057; C	
15	J9P127	GO:00070; P	

Figura 37- Descarregar o ficheiro “GO Summary file (for use in GOSlimViewer)” para posterior utilização na ferramenta “SlimViewer”. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web AgBase.

AgBase [Version: 2.00] **MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY**

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MICROBES | PARASITES | HELP | CONTACT

About Annotation | Tools Overview | **AgBase Search** | Bovine Gene Atlas

Community Requests & Submissions | GOProfiler | [Information click here. For help using this tool click here.](#)

Educational Resources | Genome2Seq | Select Database: All AgBase Databases and GO

Downloads & Statistics | GORetriever | Browse By: >Select name type

Array Annotation | GOanna | Enter Multiple Queries (new line separated)

Journal Database | GOanna2ga | **GOSlimViewer**

GOSlimViewer is used to provide a high level summary of functions for a dataset. The output can be charted in Excel to obtain publication quality figures. Note that records without annotation are not analyzed by GOSlimViewer.

An example of an input file is given [here](#).
 For help using the tool click [here](#).
 An online tutorial for this tool is available [here](#).
 More information about the tool can be found [here](#).
 A standalone version of the tool can be found [here](#).

Upload GO Summary File: Nenhum ficheiro selecionado
 (*Please upload text file!*)

Select GOSlim Set: Generic

	A	B	C
1	Accessions	GO: IDs	Ontological classification
2	D7PBH4	GO:00052; F	
3	D7PBH4	GO:00055; F	
4	D7PBH4	GO:00068; P	
5	E2QXE7	GO:00055; C	
6	E2QXE7	GO:00082; F	
7	E2QXJ0	GO:00082; F	
8	H2B3G5	GO:00052; F	
9	H2B3G5	GO:00055; F	
10	H2B3G5	GO:00055; C	
11	H2B3G5	GO:00068; P	
12	H2B3G5	GO:00360; F	
13	J9P127	GO:00037; F	
14	J9P127	GO:00057; C	
15	J9P127	GO:00070; P	

Figura 38- Página inicial da ferramenta informática GoSlimViewer obtida através da plataforma AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>). Seleção da opção “Generic” na seção “select GoSlim Set”. Fazer o upload do ficheiro descarregado na opção “Go Summary file (for use in GOSlim Viewer)” na ferramenta GoRetriever. Figura adaptada da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web AgBase.

Após ter escolhido a opção “View Biological Process”, obtiveram-se os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas e quantas destas estão associadas a cada processo (Figura 39).

AgBase [Version: 2.00] **MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY**

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MICROBES | PARASITES | HELP | CONTACT

GOSlimViewer Results
To download, right click a file and select Save As

To view the detail for cellular components, molecular components, and biological processes click the View accessions for each slim id link

[View Cellular Component](#)
[View Molecular Function](#)
[View Biological Process](#)
[View accessions for each slim id](#)

GO:0006461	protein complex assembly	1
GO:0006810	transport	5
GO:0006950	response to stress	1
GO:0007010	cytoskeleton organization	1
GO:0008150	biological_process	2
GO:0008219	cell death	1
GO:0044403	symbiosis, encompassing mutualism through parasitism	1
GO:0065003	macromolecular complex assembly	1

Figura 39- Selecionar a opção “View Biological Process”, a seguir, obtém-se os processos biológicos em que estão envolvidas as proteínas. Ao lado do nome do processo está indicado o número de proteínas envolvidas em cada um destes. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase. Figura adaptada da ferramenta bioinformática *GOSlimViewer* consultável no portal Web AgBase.

Essas informações foram transportadas para uma folha do Microsoft Excel 2013. Com esta informação obteve-se a informação sobre os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas e o número de proteínas envolvidas em cada um.

Assim, com objetivo de realizar uma análise referente à classificação das ontologias para cada proteína, selecionou-se a opção “View accessions for each slim id”, a seguir descarregou-se o ficheiro “View accessions for each slim id text only”, e, finalmente, organizou-se a informação obtida, abriu-se esse ficheiro numa folha do Microsoft Excel 2013 (Figura 40).

AgBase [Version: 2.00]

MISSISSIPPI STATE UNIVERSITY

AgBase is a curated resource for functional analysis of agricultural plant and animal gene products including Gene Ontology annotations.

HOME | SEARCHES | TOOLS | ANIMALS | PLANTS | MICROBES | PARASITES | HELP | CONTACT

GOSlimViewer Results
To download, right click a file and select Save As

To view the detail for cellular components, molecular components, and biological processes click the View accessions for each slim id link

[View Cellular Component](#)
[View Molecular Function](#)
[View Biological Process](#) **A**

GOSlimViewer accession detail for each slim id **B**

[View accessions for each slim id text only](#)

Index
1 Cellular Component Accessions
2 Molecular Function Accessions
3 Biological Process Accessions

GO Type	Slim_GO_ID	Slim_GO_Name	Input_Accession	Input_GOID	Input_GO_Name
2 C	GO:0005576	extracellular region	E2QXE7	GO:0005576	extracellular region
3 C	GO:0005576	extracellular region	H2B3G5	GO:0005576	extracellular region
4 C	GO:0005576	extracellular region	O18873	GO:0005576	extracellular region
5 C	GO:0005576	extracellular region	O18874	GO:0005576	extracellular region
6 C	GO:0005576	extracellular region	P49822	GO:0005576	extracellular region
7 C	GO:0005615	extracellular space	P49822	GO:0005615	extracellular space
8 C	GO:0005615	extracellular space	Q9TR98	GO:0005615	extracellular space
9 C	GO:0005737	cytoplasm	J9P127	GO:0005737	cytoplasm
10 C	GO:0043234	protein complex	P49822	GO:0043234	protein complex
11 F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0015643	toxic substance binding
12 F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0005550	pheromone binding
13 F	GO:0003674	molecular_function	O18874	GO:0005550	pheromone binding
14 F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0019825	oxygen binding
15 F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0008144	drug binding
16 F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0030170	pyridoxal phosphate binding
17 F	GO:0003674	molecular_function	D7PBH4	GO:0005549	odorant binding
18 F	GO:0003674	molecular_function	P49822	GO:0005504	fatty acid binding
19 F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0036094	small molecule binding
20 F	GO:0003674	molecular_function	D7PBH4	GO:0005215	transporter activity
21 F	GO:0003674	molecular_function	H2B3G5	GO:0005215	transporter activity
22 F	GO:0003674	molecular_function	O18874	GO:0005215	transporter activity

Figura 40- A) Selecionar a opção “ View accessions for each slim id” na página dos resultados da ferramenta bioinformática GOSlimViewer, B) o ficheiro obtido do GoSlimViewer “View accessions for each slim id text only” foi descarregado e aberto numa folha do Microsoft Excel 2013 (C). Figuras adaptadas da ferramenta bioinformática GOSlimViewer consultável no portal Web AgBase e do Microsoft Excel © 2013.

Após recolha de toda a informação do AgBase relativamente aos processos biológicos importantes para a caracterização das proteínas, usou-se o ficheiro descarregado em formato de Excel para construir uma tabela dinâmica (Figura 41).

Para a construção da tabela dinâmica os itens importantes a usar do ficheiro descarregado do AgBase são: “Input_GO_Name” e “Input_Acession” com posterior associação de cada código com o nome da proteína (Figura 41).

1

Slim_GO_ID	Slim_GO_Name	Input_Accession	Input_GOID	Input_GO_Name
GO:000003	reproduction	F1Q4D9	GO:0048807	female genitalia morphogenesis
GO:000003	reproduction	F1Q4D9	GO:0060065	uterus development
GO:000003	reproduction	F1Q4D9	GO:0008584	male gonad development
GO:000003	reproduction	F1Q4D9	GO:0060068	vagina development
GO:000003	reproduction	F1Q4D9	GO:0007283	spermatogenesis
GO:000003	reproduction	Q8WN22	GO:0035234	ectopic germ cell programmed cell death
GO:0002376	immune system process	F1P2R4	GO:0060332	positive regulation of response to interferon-gamma
GO:0002376	immune system process	P51742	GO:0050901	leukocyte tethering or rolling
GO:0002376	immune system process	P51742	GO:0002740	negative regulation of cytokine secretion involved in immune response
GO:0002376	immune system process	P51742	GO:0045670	regulation of osteoclast differentiation
GO:0002376	immune system process	P51742	GO:0030316	osteoclast differentiation
GO:0002376	immune system process	F1PIX8	GO:0001970	positive regulation of activation of membrane attack complex
GO:0002376	immune system process	Q8WN22	GO:0002328	pro-B cell differentiation
GO:0002376	immune system process	Q8WN22	GO:0030098	lymphocyte differentiation

2

Input_GO_Name	Input_Accession
sequestering of actin monomers	J9P127
transport	D7PBH4
transport	H2B3G5
transport	O18873
transport	O18874
transport	P49822
cellular response to starvation	P49822
actin cytoskeleton organization	J9P127
sequestering of actin monomers	J9P127

Figura 41- Construção de uma tabela dinâmica. 1) Ficheiro descarregado em formato de Excel do AgBase; 2) Itens importantes (*Input_GO_Name* e *Input_Accession*) a considerar para a construção da tabela.

Seguidamente toda esta informação é convertida no formato de tabela dinâmica (Figura 42).

GO				
activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process	J9P8S3	P51742		
activation of MAPK activity	P51742			
activation of MAPKKK activity	P51742			
acute-phase response	E2QUV3	E2QW61	P19006	P19708
antigen processing and presentation	F1PDJ7	Q4GX49		
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I	F1PDJ7	Q4GX49		
apoptotic signaling pathway	P51742			
aromatic compound catabolic process	E2RPW3			
autophagy	J9P8S3			
B cell lineage commitment	Q8WN22			
blood coagulation	P02677	P68213	P80009	

Figura 42- Exemplo da conversão do ficheiro inicial descarregado do AgBase numa tabela dinâmica.

Com as tabelas dinâmicas organizadas, ou seja para cada processo biológico estão associadas as respetivas proteínas que participam, foi construída uma tabela funcional

que integra para cada doença as proteínas e respetivos processos biológicos em que participam.

Esta metodologia permitiu organizar os resultados obtidos a partir das ferramentas do AgBase.

Esta tabela foi construída em Microsoft Excel recorrendo à fórmula: =IF(ISERROR(HLOOKUP(A\$1;Tab_Dinam).

A função desta tabela é simplificar a análise do papel funcional das proteínas de uma dada amostra de acordo com os seus processos biológicos gerais e específicos em que cada proteína identificada participa (Figura 43).

UniprotKBAC	P19708	P18649	P12278	F6Y2P4	P01785	H9GWY1	P40321	Q697L1
Name								
GoSlimOntology								
activation of cysteine-type endopeptidase activity involved in apoptotic process								
activation of MAPK activity								
activation of MAPKKK activity								
acute-phase response	+							
antigen processing and presentation								
antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class I								
apoptotic signaling pathway								
aromatic compound catabolic process								
autophagy								
B cell lineage commitment								
blood coagulation								
blood vessel morphogenesis								
brain development								
brown fat cell differentiation								
calcium ion transmembrane transport								+
calcium ion transport								+
carboxylic acid catabolic process								
cardiac muscle tissue development								
cation transport				+				

Figura 43- Resultado da conversão da tabela dinâmica numa tabela funcional.

3.6 Estabelecimento das redes de interação em que participam as proteínas do *Canis lupus familiaris*

Mesmo com os avanços notórios da proteómica há ainda uma necessidade em compreender o organismo ao nível sistémico, na qual uma proteína não é mais estudado como uma entidade isolada mas sim como sendo parte de uma rede complexa de interações proteína-proteína (PPIs).

Os estudos de interatómica *in silico* permitem prever interações entre proteínas contribuindo para o esclarecimento de mecanismos funcionais.

3.6.1 Proteínas do *Canis lupus familiaris* capazes de interagir com as proteínas da *Leptospira interrogans* causadora de Leptospirose

A leptospirose foi a doença abordada nesta secção dos materiais e métodos em que o principal objetivo desta secção foi prever as interações entre as proteínas da saliva de *Canis lupus familiaris* depositadas no *CanisTecOme* e as proteínas da *Leptospira interrogans* depositadas na base de dados UniProt.

O algoritmo Oralint (<http://bioinformatics.ua.pt/software/oralint>)¹² e o software Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>)¹³ foram as ferramentas usadas neste projeto.

O ponto de partida desta secção consistiu em selecionar da base de dados *CanisTecOme* os códigos UniProtKBAC de todas as proteínas anotadas e colar num novo ficheiro em formato Excel.

Posteriormente como o *CanisTecOme* é exclusivo para proteínas do cão teve de se pesquisar através dos termos “*Leptospira interrogans*” na base de dados UniProt (<http://www.uniprot.org/>) para ter acesso ao proteoma deste organismo (Figura 44).

A

UniProtKB leptospira AND interrogans

Quote terms: "leptospira interrogans"

Columns BLAST Align Download Add to basket 1 to 25 of 307,95

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
P97044	P97044_LEPPIR	DNA for 5S rRNA		Leptospira interrogans
P97042	P97042_LEPPIR	DNA for 5S rRNA		Leptospira interrogans
O50636	O50636_LEPPIR	Leptospira interrogans gene, 19kb r...		Leptospira interrogans
O50637	O50637_LEPPIR	Leptospira interrogans gene, 19kb r...		Leptospira interrogans

B

Entry	Entry name	Status	Protein names	Gene names	Organism
P97044	P97044_LEPPIR	unreviewed	DNA for 5S rRNA (Leptospira interrogans)		Leptospira interrogans
P97042	P97042_LEPPIR	unreviewed	DNA for 5S rRNA (Leptospira interrogans)		Leptospira interrogans
O50636	O50636_LEPPIR	unreviewed	Leptospira interrogans gene, 19kb regi		Leptospira interrogans
O50637	O50637_LEPPIR	unreviewed	Leptospira interrogans gene, 19kb regi		Leptospira interrogans
P97040	P97040_LEPPIR	unreviewed	Leptospira interrogans gene, 19kb regi		Leptospira interrogans
O50639	O50639_LEPPIR	unreviewed	Leptospira interrogans gene, 19kb regi		Leptospira interrogans
Q8F4I0	METX_LEPIN	reviewed	Homoserine O-acetylmeX LA_2061		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
P41394	DHAS_LEPIN	reviewed	Aspartate-semialdase LB_355		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8EXV1	SAHH_LEPIN	reviewed	Adenosylhomocyst ahcY LB_106		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8EYU4	DNLJ_LEPIN	reviewed	DNA ligase (EC 6.5.1.1) ligA LA_4119		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8F4T8	ENO_LEPIN	reviewed	Enolase (EC 4.2.1.11) eno LA_1951		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8F6A0	GLYA_LEPIN	reviewed	Serine hydroxymethyl glyA LA_1409		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8F6Y3	PDXH_LEPIN	reviewed	Pyridoxine/pyridoxal pdxH LA_1166		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8EYF0	PURT_LEPIN	reviewed	Phosphoribosylglycyl purT LA_4266		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8F6I1	SYI_LEPIN	reviewed	Isoleucine-tRNA li ileS LA_1325		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8E2D6	SYM_LEPIN	reviewed	Methionine-tRNA metG LA_3918		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q8F832	CARB_LEPIN	reviewed	Carbamoyl-phosph carb LA_0727		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q93LE9	DEF_LEPIN	reviewed	Peptide deformylase def pdf LA_2438		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
OS1941	FLAB_LEPIN	reviewed	Flagellar filament 3 flab flab2 LA_2019		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto
Q9XD14	IF1_LEPIN	reviewed	Translation initiatic if1A LA_0781		Leptospira interrogans serogroup Icterohaemorrhagiae sensu stricto

Ordenar de A a Z
Ordenar de Z a A
Ordenar por Cor
Limpar Filtros de "Organismos"
Filtros por Cor
Filtros de Texto
Procurar
 Selecionar Todos
 Bacillus sp.
 Leptospira borgpeterseni
 Leptospira interrogans
 Leptospira interrogans serogroup
 Leptospira interrogans serogroup
 Leptospira interrogans serogroup
 Leptospira interrogans serovar Au
OK Cancelar

Figura 44- A) Pesquisa dos termos "*Leptospira interrogans*" na base de dados UniProt, B) ficheiro descarregado com eliminação dos organismos sem interesse ficando apenas o proteoma total da *Leptospira interrogans*.

Tendo em consideração estes ficheiros com o proteoma de cada organismo foram assim enviados para o algoritmo Oralint.

O próximo passo constou em visualizar o resultado dado pelo Oralint e aplicar filtros avançados para detetar as possíveis interações com as proteínas da saliva anotadas no CanisTecOme (Figura 45).

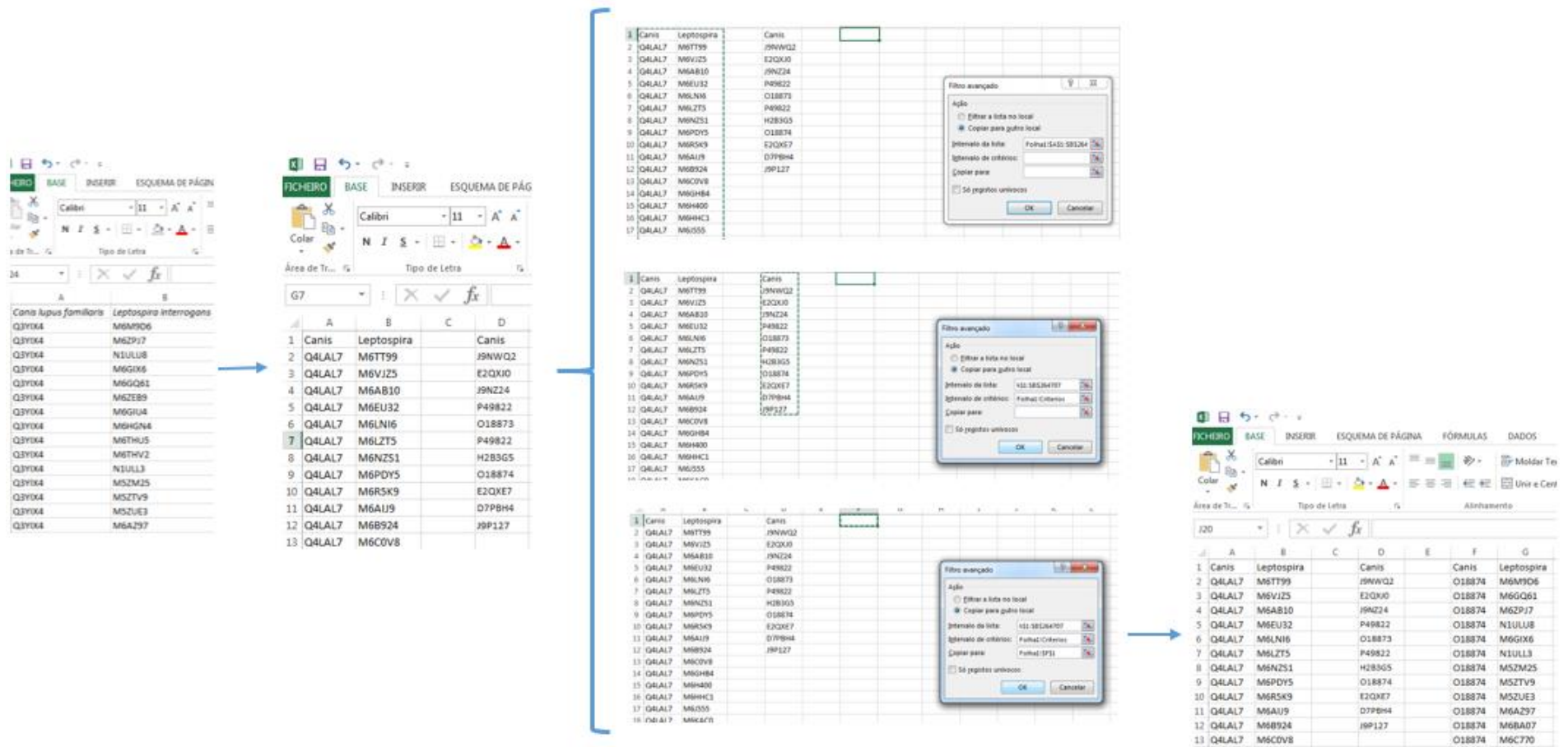


Figura 45- Exemplo da utilização de filtros avançados para a obtenção dos dados de um dado proteoma com interação.

Após as interações estabelecidas, o passo seguinte foi utilizar apenas as proteínas da *Leptospira interrogans* que têm interação com as proteínas da saliva *Canis lupus familiaris* num novo Excel e guardou-se num formato “text” (tab delimited) (Figura 46).

Canis	Leptospira	Canis	Canis	Leptospira
Q4LAL7	M6TT99	J9NWQ2	O18874	M6M9D6
Q4LAL7	M6VJZ5	E2QXJ0	O18874	M6GQ61
Q4LAL7	M6AB10	J9NZ24	O18874	M6ZPJ7
Q4LAL7	M6EU32	P49822	O18874	N1ULU8
Q4LAL7	M6LN16	O18873	O18874	M6GIX6
Q4LAL7	M6LZT5	P49822	O18874	N1ULL3
Q4LAL7	M6NZS1	H2B3G5	O18874	M5ZM25
Q4LAL7	M6PDY5	O18874	O18874	M5ZTV9
Q4LAL7	M6R5K9	E2QXE7	O18874	M5ZUE3
Q4LAL7	M6AIJ9	D7PBH4	O18874	M6AZ97
Q4LAL7	M6B924	J9P127	O18874	M6BA07
Q4LAL7	M6C0V8		O18874	M6C770
Q4LAL7	M6GHB4		O18874	M6ES99
Q4LAL7	M6H400		O18874	M6GUY1
Q4LAL7	M6HHC1		O18874	M6H978
Q4LAL7	M6J555		O18874	M6HDQ0
Q4LAL7	M6KAC0		O18874	M6IKF8
Q4LAL7	M6KJU1		O18874	M6K229
Q4LAL7	M6LE42		O18874	M6LZP9
Q4LAL7	M6MQB8		O18874	M6M7K6

Figura 46- Seleção apenas das proteínas de *Leptospira* para posterior processamento no AgBase.

Posteriormente foi realizado todo o procedimento do AgBase já explicado na secção 3.5 e num novo Excel organizaram-se os processos biológicos para poder futuramente relacionar uma determinada proteína com os seus processos (Figura 47).

GO_Type	Slim_GO_ID	Slim_GO_Name	Input_Accession	Input_GOID	Input_GO_Name
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6A090	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6APF5	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6AX06	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6BXR6	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6ENH9	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6K2Z3	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6LWL9	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6QJW7	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6R3I6	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6VEV8	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6YS70	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	Q725X4	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	Q8F2K0	GO:0042121	alginate biosynthesis
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	N1TYI9	GO:0005976	polysaccharide metabolic process
P	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	M6T430	GO:0005975	carbohydrate metabolic process

Figura 47- Ficheiro descarregado do AgBase com os processos biológicos das proteínas da *Leptospira interrogans* envolvidas na interação com as proteínas da saliva.

Após estas etapas e como as interações geradas pelo Oralint, não nos permitem visualizar através de uma imagem as interações, houve a necessidade de utilizar outras ferramentas que permitissem a visualização da informação.

A ferramenta Cytoscape 3x foi a versão usada neste trabalho que permitiu gerar uma imagem das redes de interações.

O primeiro passo consistiu na importação dos dados das interações (*Canis* e *Leptospira*) resultantes do algoritmo Oralint em formato Excel (Figura 48).

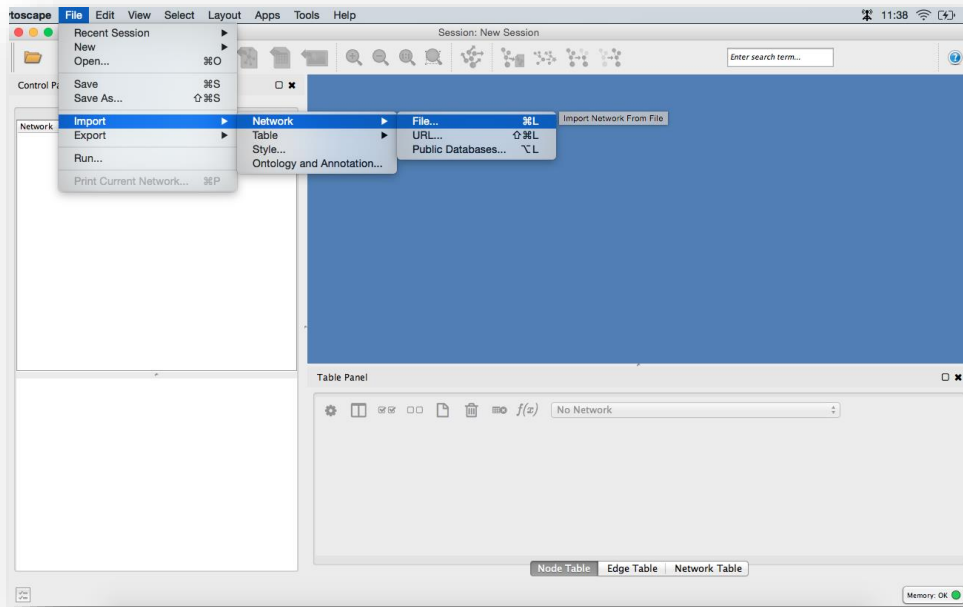


Figura 48- Importação do resultado gerado pelo Oralint, do *Canis lupus familiaris* e da *Leptospira interrogans*.

Estes resultados no Cytoscape ficaram divididos em duas colunas diferentes, cada uma referente aos organismos em estudo (*Canis familiaris* e *Leptospira interrogans*) (Figura 49).

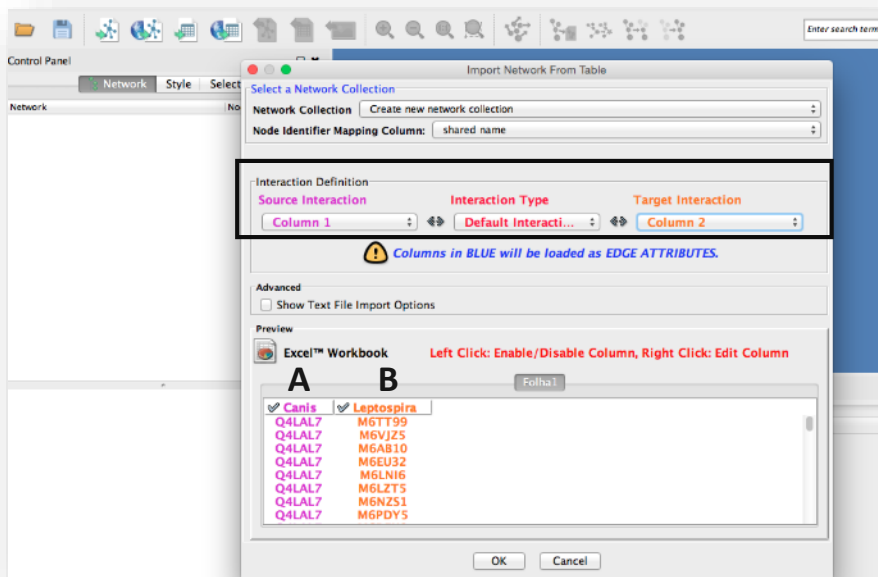


Figura 49- Resultado da importação dos resultados do Oralint, dividido em duas colunas, A: Fonte de interação, isto é, referente aos resultados (códigos UniProt das proteínas) do *Canis lupus familiaris* e B: Interação alvo, isto é, referente aos resultados (códigos UniProt das proteínas) da *Leptospira interrogans*.

Seguidamente importaram-se os primeiros atributos de interesse associando a cada código da proteína o organismo onde se identifica a proteína e o nome correspondente (Figuras 50 e 51).

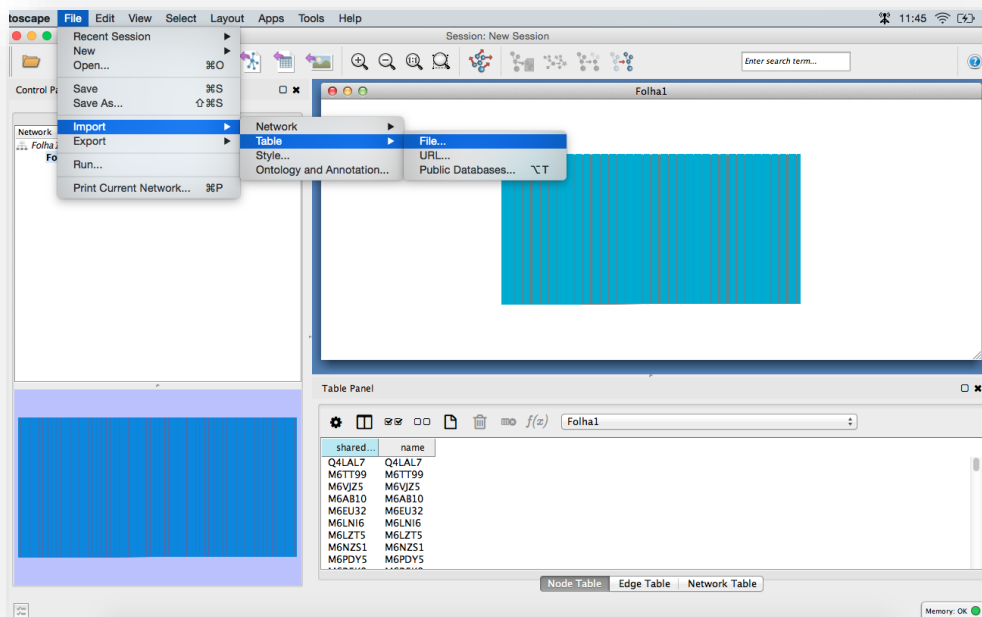


Figura 50- Importação dos ficheiros correspondentes aos atributos de interesse.

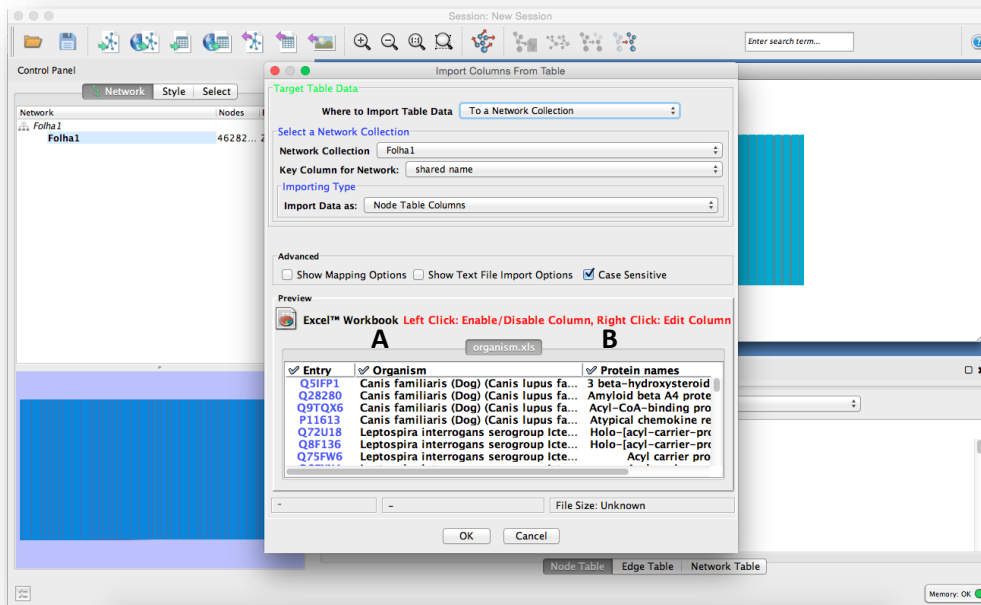


Figura 51- Resultado da importação dos atributos de interesse dividido em duas colunas, A: Referente ao nome científico do organismo e B: Referente ao nome das proteínas.

A visualização das redes de interação permitiu analisar as interações utilizando diferentes opções de perspectivas criando imagens distintas por forma a facilitar a interpretação dos resultados.

Componente experimental

3.7 Criação de uma coleção de amostras de saliva de *Canis lupus familiaris*

Durante a criação da base de dados CanisTeCome e do estabelecimento das redes de interação foi realizado também um trabalho experimental envolvendo a saliva de cães de raça portuguesa.

A escolha de cães de raça portuguesa para este trabalho foi devido à inexistência de trabalhos de proteómica usando este tipo de raças e por isso seria uma mais-valia para trabalhos futuros.

O trabalho desenvolvido neste capítulo teve como objetivos a criação de uma coleção de amostras de saliva de cães de raça portuguesa, criação e estabelecimento de protocolos de colheita, armazenamento e controlo de qualidade das amostras, bem como estabelecimento do procedimento para a catalogação das amostras.

3.7.1 Estabelecimento da metodologia para a obtenção das amostras de saliva

1. Material e protocolo de recolha da saliva

A criação de um protocolo com todo o material necessário e o processo de recolha de saliva suscitou certas preocupações que teriam de ser tidas em consideração nomeadamente como estimular a salivação do animal, a reação do cão ao procedimento de recolha, qual o material a usar na recolha e as condições de assepsia.

Após rever e analisar a bibliografia e considerar todas estas preocupações, o material mais adequado para protocolo de recolha de saliva consistia num tubo de 50ml, pinça hemostática e “rolhões”.

Os “rolhões” foram a solução mais aceitável para efetuar a recolha da saliva, pois é um bom material absorvente da saliva e é resistente, ao manuseamento e processamento posterior (Figura 52).

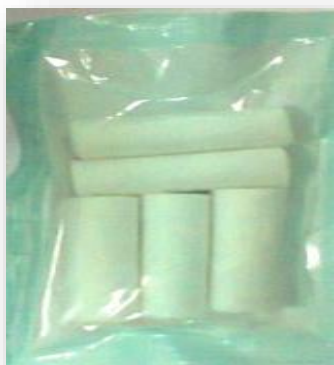


Figura 52- Material absorvente adequado para a recolha de saliva (rolhões).

Relativamente aos tubos de 50ml tiveram de ser adaptados (Figura 53) para a recolha de saliva nomeadamente para permitir uma filtração da saliva embebida no rolhão utilizando a centrifugação. Assim para o efeito foram colocadas no fundo do tubo pontas de micropipetas p1000, permitindo que os rolhões fiquem no topo. Após centrifugação a amostra da saliva desce até ao fundo do tubo, podendo ser recolhida para a realização dos teste e/ou armazenamento.

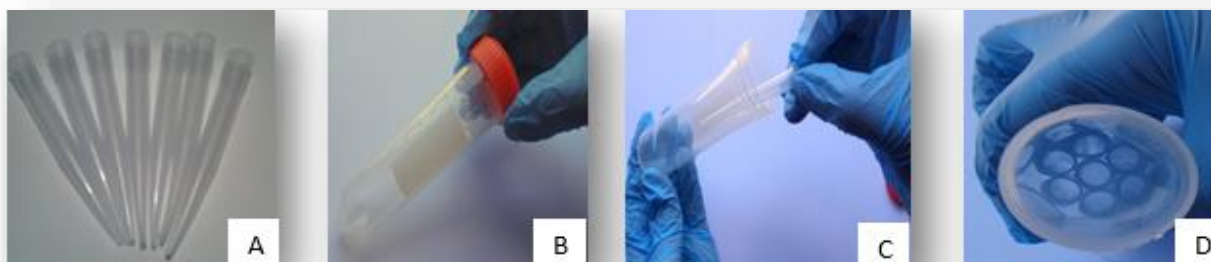


Figura 53- Procedimento realizado para adaptar o tubo para a recolha de saliva. A) Pontas de micropipeta P1000, B) Tubo de 50ml, C) Colocar as pontas no interior do tubo de 50ml e D) Resultado final: sete pontas colocadas no fundo do tubo.

Após delinear todo o material e elaborar o protocolo provisório (anexo 2) foi necessário testar no terreno para detetar possíveis imperfeições que não tenham sido perceptíveis anteriormente. A avaliação do protocolo foi realizada em seis cães pertencentes à Escola Superior Agrária de Viseu (Figura 54).



Figura 54- Avaliação do protocolo provisório em cães da Escola Superior Agrária de Viseu. 1) Rolhões seguros por uma pinça hemostática; 2 e 3) Passar pela cavidade oral do animal durante 30-40 segundos e após recolha colocar os rolhões nos tubos de 50ml adaptados.

Na análise ao protocolo verificou-se que o cão aceitou bem o material colocado na boca, não reagiu de forma agressiva e as condições em que foi realizada a recolha foram aceitáveis.

2. Recolha de saliva

A recolha de saliva dos cães foi executada pelos alunos de Enfermagem Veterinária da Escola Superior Agrária de Viseu em clínicas onde iriam estagiar. Para que tudo fosse realizado da melhor maneira elaborou-se uma carta explicativa de todo o projeto para permitir o consentimento dos diretores das clínicas (anexo 3).

3. Clínicas veterinárias

As clínicas que participaram foram apenas da região de Viseu, para que o transporte das amostras fosse realizado em condições ideais.

As clínicas da região de Viseu que participaram neste trabalho foram: o Centro Veterinário Beira Alta, Centro Veterinário Lusitânea, Clínica Veterinária Companhia de 4 Patas, Clínica Veterinária Serravet, Diogo Themudo Sociedade Unipessoal Lda., Hospital Veterinário de Viseu, SOS Animal Hospital Veterinário de Viseu e Tutti-Natura Hospital Veterinário.

4. Seleção das raças caninas

Seguidamente como o protocolo de recolha de saliva se mostrou viável e com aceitação por parte dos diretores clínicos, o próximo passo foi ponderar que raças seriam usadas neste trabalho.

Como a comunidade científica tem direcionado os seus estudos para cães de raça estrangeira, as raças em foque neste trabalho foram as raças portuguesas (Cão Serra da estrela, Cão Serra de Aires, Cão de Água, Castro Laboreiro, Rafeiro Alentejano, Fila de São Miguel, Perdigueiro Português, Podengo Português, Cão de Gado Transmontano, Barbado da Terceira e Cão do Barrocal Algarvio) e incluíram-se também a raça Golden Retriever e raças indeterminadas (denominados rafeiros) para uma comparação entre raças em trabalhos futuros.

5. Kits de recolha de saliva

Para que o material tivesse sempre organizado e fosse de fácil acesso, foi elaborado um kit de recolha que foi distribuído para cada clínica que participou no projeto. O kit de cada clinica continha a etiqueta de identificação correspondente (Figura 55).



Figura 55- Etiqueta para identificação do kit de recolha de saliva consoante cada clínica veterinária.

Este kit consistia em duas caixas, uma para conter os tubos e outra caixa para os rolhões (Figura 56).



Figura 56- Kit de recolha de saliva. 1) Kit elaborado para conter os rolhões; 2) Kit elaborado para conter os tubos adaptados; 3) Identificação de cada Kit.

6. História clínica de cada organismo

Seguidamente com os kits prontos para cada clínica foi necessário elaborar uma tabela para anotar todas as informações referentes a cada animal (anexo 4).

Foram considerados como parâmetros a registar nos campos da tabela referente à Coleção de amostras de Saliva de Cão: nome, género, idade, se era ou não castrado, tipo de comida, vacinação e desparasitação, medicação, saudável, cancro, o estado de saúde oral, leões orais ou outras doenças, se nos últimos três meses teria apresentado alguma doença e por fim a data de recolha.

Esta tabela foi concebida de forma a ser preenchida de forma rápida. A maioria dos campos a serem anotados é preenchida com X na opção a considerar.

7. Criação de um código para as amostras

Como este trabalho tinha como objetivo criar uma coleção de amostras de saliva de cão, a conceção de um código único foi fulcral para o registo das amostras obtidas.

Como as amostras eram provenientes de diferentes clínicas criou-se um código para cada clínica e também para cada tipo de raça (tabela 2).

Tabela 2- Códigos referentes às clínicas veterinárias e a cada raça.

Clínicas	Código	Raças	Código
Centro Veterinário Beira Alta	EV131409	Barbado da Terceira	BT
Centro Veterinário Lusitânea	EV131413	Barrocal Algravio	BA
Clinica Veterinária Companhia de 4Patas	EV131418	Cão de água	CA
Clinica Veterinária Serravet	EV131430	Castro Laboreiro	CL
Diogo Themudo Lda.	EV131437	Fila de São Miguel	FM
Hospital Veterinário de Viseu	EV131450	Gado Transmontano	GT
SOS Animal Hospital Veterinário de Viseu	EV131462	Perdigueiro Português	PP
Tutti-Natura Hospital Veterinário	EV131463	Podengo Português	PO
		Rafeiro Alentejano	RA
		Serra da Estrela	SE
		Serra de Aires	SA
		Golden Retriever	GR
		Indeterminada	UN

Para além dos códigos também se colocou no respetivo tubo a data em que foi feita a recolha e o número da amostra, para assim poder associar a amostra com a descrição da amostra na tabela fornecida a cada clínica.

A figura 49 mostra um exemplo de como se procedeu à identificação no tubo de cada amostra.

O código 30 corresponde à clinica Veterinária Serravet, a data 18.02 é o dia em que foi feita a recolha 18 de Fevereiro, a um cão com o código SE, que corresponde ao cão

Serra da Estrela e é a amostra número 001 pertencente a uma recolha realizada naquela clinica (Figura 57).

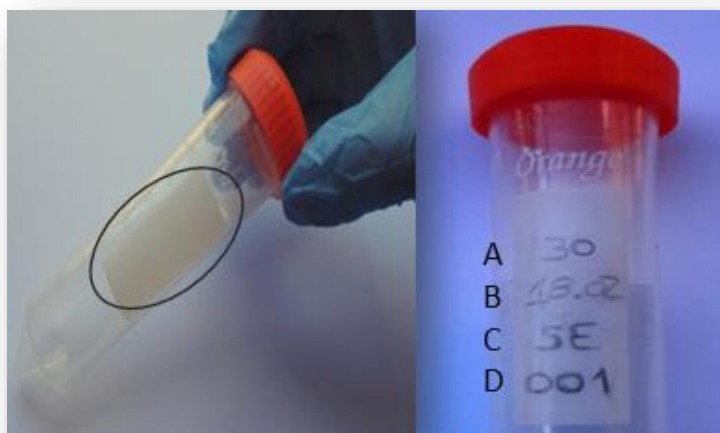


Figura 57- Exemplo da catalogação dos tubos de recolha de saliva. A) Código da clínica, B) Dia da recolha, C) Código da raça e D) Número da amostra.

3.7.2 Estabelecimento do processo de registos de amostras coleção de amostras de saliva

Para a adequada conservação das amostras após a recolha, os tubos foram colocados numa mala frigorífica com gelo ou num congelador, por um período máximo de 48h.

Cada tubo de 50ml tem uma identificação, e antes do seu armazenamento é anotado numa outra tabela a sua identificação (clínica, data da recolha, raça do cão, número da amostra e a data de armazenamento).

Seguidamente foi elaborado um protocolo de armazenamento para os procedimentos se manterem de amostra para amostra (anexo 5).

Explicando de uma forma sucinta, colocaram-se as amostras numa centrífuga a 20.000rpm durante 10 minutos a 4^oC. Após centrifugação a saliva é fracionada em alíquotas de 250µl, que mantém a identificação da amostra original. Foi criado um código de cores e de letras como evidenciado na tabela 3.

Tabela 3- Códigos a inserir nas alíquotas 250µl.

Raças Portuguesas	Letra correspondente	Número de Série	Marcadores
Barbado da Terceira	A	V	Laranja
Cão Barrocal Algarvio	B	V	Laranja
Cão de água	C	V	Laranja
Cão Serra da Estrela	D	V	Laranja
Cão Serra de Aires	E	V	Laranja
Castro Laboreiro	F	V	Laranja
Podengo	G	V	Laranja
Cão de Gado Transmontano	H	V	Laranja
Fila de São Miguel	I	V	Laranja
Rafeiro Alentejano	J	V	Laranja
Perdigueiro Português	K	V	Laranja
Outras raças			
Golden Retriever	L	V	Azul
Indeterminada	M	V	Azul

A figura 58 mostra a alíquota número 3 pertencente a uma amostra de cão da raça portuguesa Serra da Estrela com marcador laranja e com o código de identificação VD/3.



Figura 58- Exemplo de uma catalogação pertencente a um cão de raça portuguesa.

Após centrifugação são retirados com ajuda de uma pinça, os rolhões como também as pontas colocadas dentro desse tubo. Com uma pipeta P1000 são pipetadas as alíquotas de 250µl de saliva. As amostras são armazenadas numa arca a -80°C Atualmente a coleção de amostras de saliva abrange 24 amostras pertencentes a 6 raças diferentes (tabela 4).

Tabela 4- Catologação das amostras armazenadas no repositório biológico modelo.

Número da amostra	Código da clinica	Código da raça	Data recolha	Data de armazenamento	Código de armazenamento
003	30	FSM	18.02	20.02	VI1
003	50	SE	17.02	20.02	VD2
005	30	SE	11.03	18.03	VD1
004	30	UN	11.03	18.03	VM1
001	30	PP	11.03	18.03	VK1
009	30	PO	29.03	02.04	VG2
008	30	PO	29.03	02.04	VG3
010	30	UN	29.03	02.04	VM2
007	30	SE	29.03	02.04	VD3
006	30	SE	28.03	02.04	VD4
002	30	PO	17.02	20.02	VG1
001	50	GR	19.03	29.04	VL1
002	50	GR	20.03	29.04	VL2
011	30	FSM	09.04	29.04	VI2
012	30	FSM	07.05	09.05	VI3
013	30	PP	07.05	09.05	VK2
014	30	FSM	26.05	28.05	VI4
015	30	FSM	26.05	28.05	VI5
016	30	FSM	26.05	28.05	VI6
019	30	FSM	26.05	28.05	VI7
020	30	FSM	26.05	28.05	VI8
021	30	FSM	26.05	28.05	VI9
024	30	FSM	26.05	28.05	VI10
025	30	FSM	26.05	28.05	VI11

4. Resultados e discussão

O conceito do CanisTecOme foi sugerido pela primeira vez no âmbito deste trabalho, como sendo o proteoma total do *Canis lupus familiaris*. Deu-se a designação de CanisTecOme à base de dados dedicada a catalogar toda a informação relativa ao proteoma de cão. A criação desta base de dados teve como princípio catalogar toda a informação relativa às proteínas que tenham sido identificadas em amostras biológicas de cão. Para a anotação da informação no CanisTecOme foi necessário proceder à compilação dos proteomas do cão já publicados e realizar uma revisão da informação disponibilizada sobre cada proteína identificada. A vasta informação reunida permite pesquisar, integrar e visualizar a informação relativa às proteínas e mecanismos em que estas participam.

As secções dedicadas à apresentação dos resultados e discussão estão identificadas na figura 59.

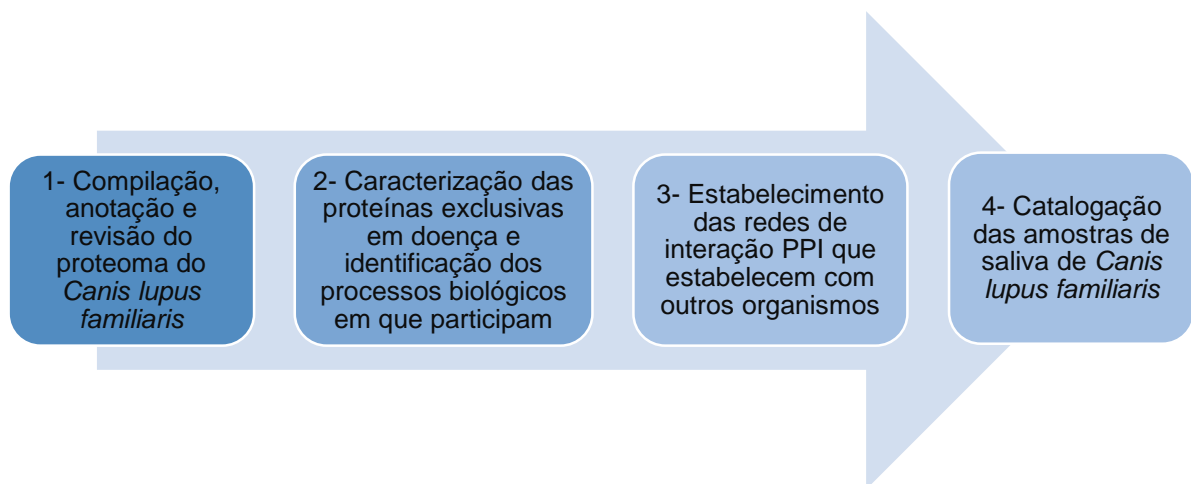


Figura 59- Esquema referente às diferentes secções a desenvolver no capítulo de resultados e discussão.

Componente *in silico*

4.1 Compilação do proteoma de *Canis lupus familiaris*

A bibliografia disponível sobre o proteoma do cão ainda não é tão extensa como a do humano. Mesmo assim, este trabalho conseguiu reunir 34 artigos de proteômica, em que o período de ano do artigo aceitável era de 2000 a 2014.

A tabela 5 lista os artigos o número de artigos de proteômica analisados em cada ano e o número de proteínas anotadas na base de dados.

Tabela 5- Os artigos de proteômica que contribuíram para a anotação manual do *CanisTecOme*.

Ano do artigo	Número de artigos	Número de proteínas identificadas
2005	2	18
2007	3	27
2008	2	12
2010	2	41
2011	4	127
2012	3	53
2013	10	107
2014	8	141

A base de dados *CanisTecOme* dedicada ao proteoma do cão contém até à data a informação disponibilizada por 34 artigos de proteômica como referido anteriormente.

A tabela 6 lista o ano de publicação dos artigos, referência bibliográfica, número de proteínas resultantes da revisão e anotação manual e o número de proteínas identificadas por condição saúde/doença do dador.

Tabela 6- O número de proteínas identificadas pelos artigos de proteômica organizadas de acordo com o número de proteínas identificadas por condição saúde/doença do dador.

Ano de publicação	Referência Pubmed	Proteínas resultantes da revisão e anotação manual	Número de proteínas identificadas		
			Saúde	Doença	Presentes em saúde e doença
2005	16244971	1		1	
2005	15902658	17		17	
2007	17438110	6		1	5
2007	17693109	12		12	
2007	19754795	9			9
2008	18319571	8		8	
2008	18164356	4			4
2010	20440645	22		22	
2010	21040564	19	19		
2011	21441719	1			1
2011	21410286	85	2	2	81
2011	21942679	40		40	
2011	22014164	1		1	
2012	22251802	37			37
2012	22591953	3			3
2012	22578690	13		13	
2013	23375365	5		5	
2013	23464525	10		10	
2013	23952327	31		31	
2013	23369383	21		10	11
2013	23369386	12	12		
2013	23532922	9		9	
2013	23499240	1		1	
2013	23262355	1	1		
2013	23582658	1		1	
2013	23831215	16		16	
2014	24553975	1		1	
2014	24566125	10		10	
2014	24885808	18		17	1
2014	24773128	70	70		
2014	24704347	10		10	
2014	24768907	26	26		
2014	24338489	5		5	
2014	24366156	1	1		

No que diz respeito ao proteoma da saliva de cão, o fluido para o qual pretendíamos obter mais informação visando a sua futura utilização no diagnóstico não invasivo, apenas foram encontrados no período de tempo referido, 2 artigos publicados ambos em 2013. Sendo que um dos artigos era dedicado a alergias no cão e tendo como

objetivo avaliar a saliva como fonte de alérgenos¹⁴ e o segundo artigo apenas se destinava à caracterização da proteína “*thymosin β4*” na saliva de mamíferos¹⁵ como mostra a tabela 7.

Tabela 7- Lista de dois trabalhos de proteômica utilizando a saliva como amostra biológica.

Amostra biológica	Ano de publicação	Referência Pubmed	Número de proteínas identificadas		Condição de saúde
			Saúde	Doença	
Saliva	2013	23464525		10	Alergias
	2013	23262355	1		Saúde

4.2 Revisão e anotação do proteoma do *Canis lupus familiaris*

Como já referido o CanisTecOme é uma base de dados que descreve todas as proteínas identificadas em *Canis lupus familiaris*, em que para cada uma das proteínas são apresentadas as informações relativas aos campos da tabela 8.

Tabela 8- O tipo de informação anotada para cada proteína no CanisTecOme, tomando como exemplo a proteína miotrofina.

UniProtKBAC	Protein name	Organism	Biopsy: Muscle	Breed	Age	Gender	Castrated
Q863Z4	<i>Myotrophin</i>	<i>Canis lupus familiaris</i>	x	Golden Retriever	0,4	-	-

Healthy	Disease	Regulation	Disease type	Disease name
	x	Overrepresented	Neuromuscular disorder	Duchenne muscular dystrophy

Type microorganism	Microorganism	Methods
-	-	<i>c</i> CAT Labeling and Mass Spectrometry, Immunoblot Assays, Real-Time Reverse Transcription PCR and Gene Ontology Annotation

Type of Biomarker study	Year of article	Citation (NCBI ID)	Obs.
Proteomic	2011	21410286	-

A base de dados CanisTecOme tem até à data anotadas 526 proteínas assinaladas juntamente com os restantes campos referidos na secção 3.2 dos materiais e métodos (anexo 1).

A falta de anotação das proteínas com os respetivos códigos UniProtKBAC em alguns artigos levaram-nos a encontrar soluções como as descritas no capítulo de material e métodos no entanto não foi possível para algumas proteínas associar-se um código.

No *CanisTecOme* estão anotadas vinte e duas proteínas sem qualquer código UniProt, como o exemplo da “*IgA heavy chain constant region*” e da “*aspartate aminotransferase 1*” (Figura 60).

UniProtKBAC	Protein name	Organism
?	IgA heavy chain constant region	<i>Canis lupus familiaris</i>
?	aspartate aminotransferase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>
F1PJW2	perilipin 4	<i>Canis lupus familiaris</i>

Figura 60- Exemplo de duas proteínas em que não foi possível associar um código UniProt.

Alguns dos artigos analisados não apresentavam características do dador em estudo, nomeadamente a raça, idade e género o que dificultou possíveis conclusões (tabela 9).

Tabela 9- Exemplo de uma proteína em que não foi possível anotar a raça, idade e género do dador da amostra.

UniProtKBAC	Protein name	Organism	Serum	Breed	Age	Gender
F6Y713	Alpha-1- acid glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	x	-	-	-

Mas nem todos os artigos apresentavam essa falta de informação. Um dos exemplos foi o estudo feito por Zamani-Ahmadmahmudi *et al* 2013 que apresenta para a proteína “Cytokeratin 10” a indicação de que foi identificada num cão fêmea, da raça Terrier com 6 anos (tabela 10).

Tabela 10- Exemplo de uma proteína em que foi possível anotar toda a informação necessária sobre o dador da amostra.

UniProtKBAC	Protein name	Organism	Biopsy: mammary gland	Breed	Age	Gender
Q6EIZ0	Cytokeratin 10	Canis lupus familiaris	x	Terrier	6	F

4.3 Caracterização funcional das proteínas anotadas no CanisTecOme

A base de dados CanisTecOme tem anotadas proteínas e para mostrar que com esta informação se consegue retirar conclusões importantes para trabalhos futuros, passaremos a exemplificar o tipo de informação que é possível obter.

A base de dados tem anotadas proteínas, que foram identificadas a partir de diferentes amostras biológicas e em diferentes condições de saúde do dador.

A tabela 11 mostra os catorze tipos de amostras biológicas usadas nos artigos de proteómica analisados neste trabalho, para identificação de proteínas.

Tabela 11- Amostras biológicas usadas em cada um dos artigos de proteómica analisados e anotados na base de dados CanisTecOme.

Amostras biológicas	
Fluidos	Tecidos
Soro	Glândulas mamárias
Urina	Músculo
Saliva	Nódulos linfáticos
Lágrimas	Ovário (fluido folicular)
CSF	SNC (medula espinhal, tronco cerebral e Hipocampo)
	Fígado
	Pele
	Próstata
	Fezes

As proteínas importadas dos artigos de proteômica analisados bem como as proteínas importadas do UniProt envolvidas em doença neste trabalho foram analisadas as amostras de diversas raças de cães, selecionadas de acordo com o tipo de patologia que cada raça pode vir a desenvolver. No entanto em alguns casos em que utilizaram dados de diversas raças, as proteínas identificadas não eram associadas a qualquer raça (Figura 61). Na figura 61 pode-se constatar o exemplo da raça Labrador Retriever que aparece associado a uma proteína em específico (barra amarelo) e no caso de uma dada proteína ser associada à raça Labrador e a outras raças (barras a verde).

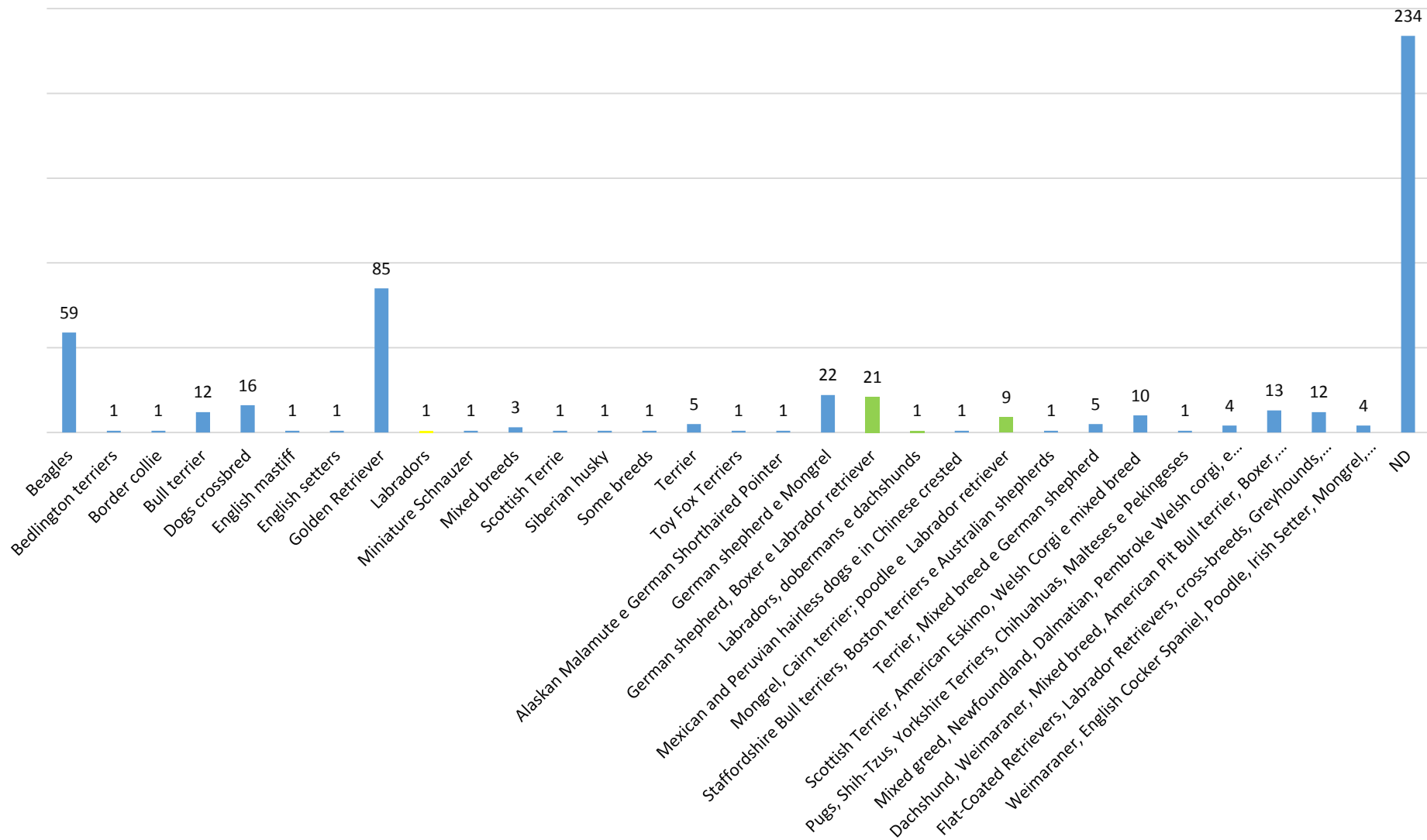


Figura 61- Distribuição das proteínas depositadas na base de dados *CanisTecOme* de acordo com a raça do organismo *Canis lupus familiaris*.

Beagle e o Golden Retriever foram as duas raças em que se identificaram maior número de proteínas.

O CanisTecOme contém até à data informação relativa a 131 proteínas identificadas em amostras de saliva, soro, urina, ovário (fluido folicular) e músculo de indivíduos saudáveis distribuídas de acordo com a informação apresentada na figura 62.

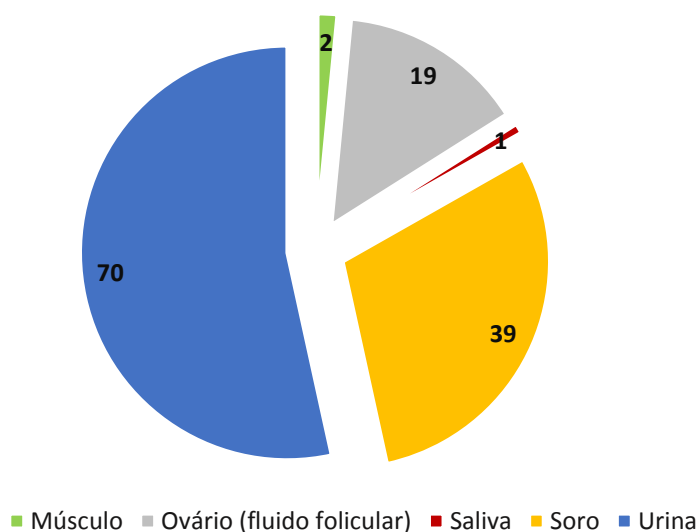


Figura 62- Total de proteínas da base de dados *CanisTecOme* identificando o número de proteínas em estado de saúde e em que tipo de amostra biológica foram identificadas.

4.3.1 Proteínas implicadas em cada doença

A identificação das proteínas que apenas existem em amostras de indivíduos com uma determinada patologia constituiu informação relevante para a pesquisa de biomarcadores (Figura 63).

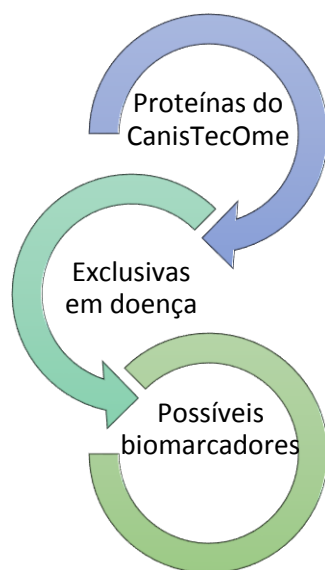


Figura 63- Abordagem utilizada para a obtenção da informação relativa à identificação de biomarcadores.

A base de dados CanisTecOme contém até agora 82 patologias em que foram identificadas proteínas distintas para cada uma delas, sendo que para 46 patologias a informação foi obtida por anotação manual e 35 foram obtidas a partir da informação revista depositada na base de dados UniProt. Para estas últimas apenas é possível pelos dados do UniProt associar a proteína a uma patologia, no entanto toda a outra informação sobre o dador de amostra e outros parâmetros não é possível obter diretamente do UniProt (Tabela 12).

Tabela 12- Fonte de pesquisa das proteínas identificadas em doença e anotadas no CanisTecOme.

Fonte de pesquisa das doenças		
UniProt	Artigos de proteómica	Comum
35	46	1

Assim com a junção da informação da anotação manual à informação recolhida diretamente do UniProt o CanisTecOme tem hoje informação relativa a 243 proteínas associadas a patologias.

A apresentação de informação quantitativa relativa às proteínas identificadas em cada patologia é de grande relevância para selecionar proteínas que pudessem ser propostas como biomarcadores. No entanto todos os artigos de proteómica consultados não apresentavam dados de quantificação, apenas dados qualitativos.

Alguns artigos apresentavam informação que a proteína estava presente em doença mas sem informação qualitativa ou quantitativa.

A figura 64 retrata o número total de proteínas identificadas em doença e a informação sobre a regulação das proteínas.

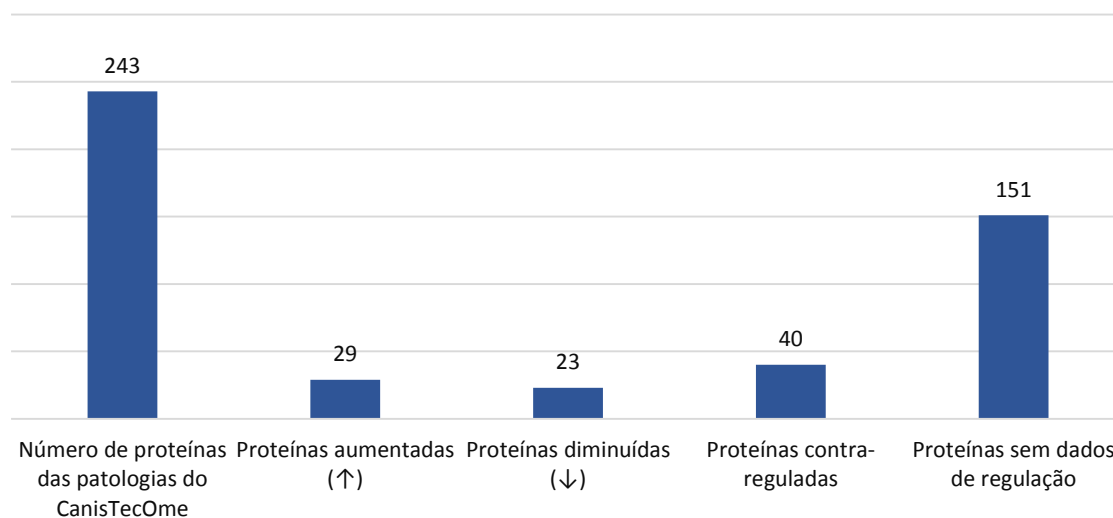


Figura 64- Distribuição do número de proteínas identificadas em doença, número de proteínas aumentadas (↑), número de proteínas diminuídas (↓) e sem dados qualitativos e/ou quantitativos.

Como referido anteriormente as proteínas anotadas no CanisTecOme foram obtidas a partir do UniProt e da revisão e anotação manual de artigos de proteómica. Assim relativamente à pesquisa realizada com a ferramenta UniProt importaram-se 37 proteínas identificadas em 36 doenças (Tabela 13).

Tabela 13- Número de proteínas importadas a partir do UniProt e respectivas doenças onde foram identificadas.

<i>Doenças</i>	<i>Número de proteínas</i>
<i>Acatalasemia</i>	1
<i>Autoimmune uveitis</i>	1
<i>Autosomal dominant retinitis pigmentosa</i>	1
<i>Autosomal recessive centronuclear myopathy</i>	1
<i>Autosomal recessive myotonia congenita</i>	1
<i>Cancer</i>	1
<i>Canine ectodermal dysplasia</i>	1
<i>Canine X-linked severe combined immunodeficiency</i>	1
<i>Cone degeneration</i>	1
<i>Congenital hypothyroidism with goiter</i>	1
<i>Copper toxicosis</i>	1
<i>Degenerative neurological diseases</i>	1
<i>Dysmyelinating disease</i>	1
<i>Epidermolysis bullosa</i>	1
<i>Fucosidosis</i>	1
<i>Globoid cell leukodystrophy</i>	1
<i>Glycogen storage disease Ia</i>	1
<i>Hematopoietic tumors</i>	1
<i>Hemophilia B</i>	1
<i>Hereditary cataract</i>	1
<i>Inherited hemolytic anemia</i>	1
<i>Megaloblastic anemia 1</i>	1
<i>Mucopolysaccharidosis type I</i>	1
<i>Mucopolysaccharidosis type VII</i>	1
<i>Narcolepsy</i>	1
<i>Neuronal ceroid lipofuscinosis</i>	2
<i>Osteogenesis imperfecta</i>	1
<i>Photoreceptor dysplasia</i>	1
<i>Primary ciliary dyskinesia</i>	1
<i>Progressive rod-cone degeneration</i>	1
<i>Rod/cone dysplasia</i>	1
<i>Secondary amyloidosis</i>	1
<i>Severe combined immune deficiency</i>	1
<i>Willebrand disease</i>	1
<i>X-linked hereditary nephritis</i>	1
<i>X-linked progressive retinal atrophy</i>	1

Das 36 doenças a “*X-linked hereditary nephritis*” é a única proteína que também tinha sido identificada por um dos artigos de proteômica analisados neste trabalho.

A consulta bibliográfica possibilitou a identificação de proteínas correspondentes a 46 doenças e cuja informação se encontra anotada na base de dados CanisTecOme. O número de proteínas identificadas em cada doença é variável (Tabela 14).

Tabela 14- Distribuição das proteínas de acordo com a doença em que foram identificadas.

Patologias	Número de proteínas
Raiva	24
Leishmaniose	24
Babesiose canina	15
Osteoartrite	14
Mastocitoma cutâneo canino	12
<i>Lethal acrodermatitis</i>	11
Linfoma multicêntrico	9
Carcinoma de células transicionais	9
Alergias	8
Carcinoma prostático	8
Dirofilariose cardiopulmonar canina	6
Lesão renal aguda induzida por cisplatina	5
Cancro mamário	5
Tumor glândula mamária	5
Linfoma	4
Piometra	3
Doença renal crónica	3
Nefropatia hereditária ligado ao X	3
Obesidade	3
Parvovirose	3
Distrofia muscular de Duchenne	2
<i>Aminoglycoside-nephrotoxicosis</i>	2
Cancro	2
<i>Ehrlichiosis</i>	2
Kennel Cough	2
Trypanosomiasis	2
Urolitíase	2
Meningoencefalite	1
Leptospirose	1
Carcinoma mamário canino	1
Diabetes mellitus	1
Doença Cushing	1
Doença de Alzheimer	1
Encefalite	1
<i>Escheichia coli sepsis</i>	1
Hemangiosarcoma	1
Hérnia de disco intervertebral	1

Hipercortisolismo	1
Hipotireoidismo	1
Insuficiência renal	1
Lesão renal aguda	1
Pancreatite aguda	1
Paniculite	1
Pielonefrite	1
Poliartrite	1

As patologias com maior número de proteínas depositadas no CanisTecOme retiradas tanto de artigos como do UniProt são a Leishmaniose e a raiva. A figura 65 apresenta o número de proteínas para cada uma das patologias mencionadas bem como o número de proteínas para as quais foram apresentados dados qualitativos sobre se a expressão se encontrava aumentada ou diminuída e ainda o nº de proteínas que foram identificadas em exclusivo em cada uma das patologias.

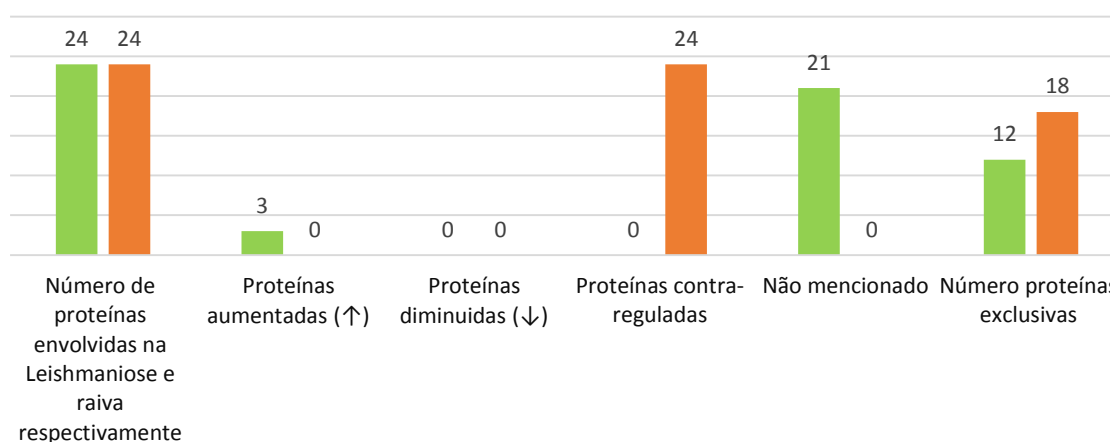


Figura 65- Distribuição do número de proteínas identificadas nas doenças Leishmaniose (verde) e a Raiva (laranja) com maior número de proteínas anotadas no CanisTecOme.

A leishmaniose canina como já referido na introdução é uma doença zoonótica, endémica e bastante frequente em Portugal. Esta zoonose é causada pelo protozoário *Leishmania infantum*, em que os cães são os principais hospedeiros reservatórios da infeção para os seres humanos¹.

A raiva também é uma doença zoonótica provocada por um vírus do género *Lyssavirus*. É uma doença grave e muitas vezes fatal, que afeta especificamente a matéria cinzenta do cérebro do cão e do seu sistema nervoso central (SNC)¹⁶.

Como estas patologias podem vir afetar o ser humano é importante haver um diagnóstico precoce para não se propagar a doença, logo a identificação de biomarcadores é essencial, bem como a descoberta de possíveis alvos terapêuticos.

4.3.2 Proteínas candidatas a biomarcadores

As proteínas candidatas a biomarcadores devem cumprir o requisito de só terem sido identificadas numa patologia (proteínas exclusivas) ou se também estiverem em saúde estando contra-reguladas ou seja aumentada numa situação e por oposição diminuída na outra situação.

A análise das proteínas candidatas a biomarcadores foi realizada considerando por um lado as proteínas cuja informação foi obtida do UniProt e para as quais não existe informação quantitativa nem qualitativa (tabela 15). A informação relativa às proteínas obtidas por anotação manual são apresentadas na tabela 16 e para estas é apresentada a informação sobre se encontram aumentadas ou diminuídas face à situação em saúde.

Tabela 15- Proteínas exclusivas identificadas em doença resultantes da informação do UniProt.

Doenças	Código UniProt	Nome da proteína	Raças
Acatasemia	O97492	Catalase	ND
Autoimmune uveitis	Q28281	S-arrestin	Some breeds
Autosomal dominant retinitis pigmentosa	P32308	Rhodopsin	English mastiff
Autosomal recessive centronuclear myopathy	Q4W1W1	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1	Labradors
Autosomal recessive myotonia congenita	Q9MZT1	Chloride channel protein 1	Miniature Schnauzer
Cancer	Q29537	Cellular tumor antigen p53	ND
Canine ectodermal dysplasia	B5RHS5	Forkhead box protein I3	Mexican and Peruvian hairless dogs e in Chinese crested
Cone degeneration	Q8MJD7	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-3	Alaskan Malamute and German Shorthaired Pointer
Congenital hypothyroidism with goiter	Q8HYB7	Thyroid peroxidase	Toy Fox Terriers
Copper toxicosis	Q8WMD0	COMM domain-containing protein 1	Bedlington terriers
Degenerative neurological diseases	O46501	Major prion protein	ND
Dysmyelinating disease	P23294	Myelin proteolipid protein	ND
Epidermolysis bullosa	Q9N281	Collagen alpha-1(XVII) chain	ND
Fucosidosis	P48300	Tissue alpha-L-fucosidase	ND
Globoid cell leukodystrophy	P54804	Galactocerebrosidase	ND
Glycogen storage disease Ia	O19133	Glucose-6-phosphatase	ND
Hematopoietic tumors	Q28350	Myc proto-oncogene protein	ND
Hemophilia B	P19540	Coagulation factor IX	ND
Hereditary cataract	Q1HGE8	Heat shock factor protein 4	Staffordshire Bull terriers, Boston terriers e Australian shepherds
Mucopolysaccharidosis type I	Q01634	Alpha-L-iduronidase	ND
Mucopolysaccharidosis type VII	O18835	Beta-glucuronidase	ND
Narcolepsy	Q9TUP7	Orexin receptor type 2	Labradors, dobermans e dachshunds
Neuronal ceroid lipofuscinosis	Q5JZQ7	. Protein CLN8	. English setters
	Q5JZQ9	. Protein CLN5	. Border collie
Osteogenesis imperfecta	Q9XSJ7	Collagen alpha-1(I) chain	ND
Progressive rod-cone degeneration	Q00LT9	Progressive rod-cone degeneration protein	ND
Rod/cone dysplasia	P33726	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta	ND
Willebrand disease	Q28295	von Willebrand factor	Scottish Terrie
X-linked hereditary nephritis	Q28247	Collagen alpha-5(IV) chain	ND
X-linked progressive retinal atrophy	Q9N1T2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	Siberian husky

Para a doença "*Neuronal ceroid lipofuscinosis*" foram identificadas duas proteínas exclusivas. Para as restantes patologias apresentam pelo menos uma proteína exclusiva da doença.

Relativamente às proteínas resultantes da anotação manual dos artigos de proteómica consultados, os dados correspondentes são apresentados na tabela 16 para as patologias com uma a quatro proteínas exclusivas. A tabela 16 associa a cada patologia as proteínas exclusivas bem como o tipo de amostra em que foram identificadas e para aquelas que possuem dados qualitativos sendo estes também apresentados.

A informação relativa às patologias com número de proteínas exclusivas superior a quatro será retratada mais a frente.

Tabela 16- Proteínas exclusivas identificadas em doença resultantes da anotação manual de artigos de proteômica.

Doenças	Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
Acute kidney injury	Q29416	IL-2	Urina	ND	ND
Alzheimer's disease	Q28280	β -amyloid	Fluido cerebroespinal	ND	ND
Breast cancer	E2RT65	Phosphoglycerate mutase 1	Soro	ND	Terrier, Mixed breed e German shepherd
Canine babesiosis	P51742	TNF- α	Soro	ND	Várias raças
Encephalitis	Q6YKA4	HMGB1 (High-mobility group box 1)	Fluido cerebroespinal	Aumentada	Beagles
Intervertebral disc herniation	E2R3H9	Protein tau	Fluido cerebroespinal	Aumentada	ND
Lymphoma	F1PNS6	Xaa-Pro dipeptidase	Glânglios linfáticos	ND	Mixed breed, Newfoundland, Dalmatian, Pembroke Welsh corgi, e Australian shepherd
Pyometra	Q9NOV1	Alkaline phosphatase	Urina	ND	ND
Renal insufficiency	E2RCE0	Cystatin C	Soro	Aumentada	Várias raças
Canine cardiopulmonary dirofilariosis	P09582	Arginine esterase precursor		ND	ND
	P60529	Hemoglobin subunit alpha	Urina	ND	ND
Multicentric lymphoma	F1PH87	α -antichymotrypsin		ND	German shepherd, Boxer e Labrador retriever
	E2QW61	Lipopolysaccharide binding protein	Soro	ND	German shepherd, Boxer e Labrador retriever
Mammary gland tumor	Q6EIZ1	Cytokeratin 2		ND	Terrier
	Q6EIV9	Cytokeratin 1		ND	Terrier
	E2RSU3	Elongation factor-like protein	Glândulas mamárias	ND	Terrier
Prostatic carcinoma	F1PIC7	GRP78		Aumentada	Mongrel, Cairn terrier; poodle e Labrador retriever
	F1PRB0	Keratin 7		Aumentada	Mongrel, Cairn terrier; poodle e Labrador retriever
	F1PW98	Keratin 8	Prostata	Aumentada	Mongrel, Cairn terrier; poodle e Labrador retriever
Cisplatin-induced AKI	F1PVW0	Lactate dehydrogenase		ND	ND
	P41324	IL-8		ND	ND
	P52203	Monocyte chemoattractant protein-1		ND	ND
	P48749	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Urina	ND	ND

Das tabelas 15 e 16 as proteínas apresentadas são exclusivas em uma determinada doença, logo possíveis candidatas a biomarcadores. Apesar de apenas seis proteínas apresentarem dados qualitativos e as restantes só serem exclusivas entre as patologias da base de dados, os dados quantitativos seriam mais promissores e assertivos para os considerar biomarcadores.

Posteriormente as patologias com mais do que quatro proteínas exclusivas foram analisadas de forma mais detalhada (tabela 17), sendo caracterizado o processo biológico em que estas proteínas participam.

Tabela 17- Patologias com número de proteínas exclusivas superior a quatro para futura análise.

Patologias	Número proteínas exclusivas
Alergias	8
Carcinoma de células transicionais	6
Leishmaniose	12
<i>Lethal acrodermatitis</i>	7
Mastocitoma cutâneo canino	5
Osteoartite	7
Raiva	18

A caracterização das proteínas serviu por forma a se identificar as proteínas que poderiam estar mais implicadas nos mecanismos de fisiopatologia da doença. Assim sendo foi novamente testada a possibilidade de biomarcadores, para os quais só existe quantificação qualitativa, aumentada (+) ou diminuída (-) (biomarcadores não quantificados).

1. Mastocitoma cutâneo canino

Esta doença é uma neoplasia de grande importância em termos de saúde em animais de companhia devido sua alta incidência, sendo mais incidente em animais de meia-idade a idosos¹⁷. A análise das proteínas exclusivas desta patologia, evidenciou existirem cinco proteínas, que foram identificadas em diversas raças, em amostras de pele, existindo dados de regulação em estado de patologia como mostra a tabela 18.

Tabela 18- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Mastocitoma cutâneo canino.

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
F1PR93	<i>WD repeat domain 1</i>	Pele	+	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle e Shar-Pei
F1P679	<i>Actin related protein 3</i>	Pele	+	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle e Shar-Pei
F1P797	<i>5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase</i>	Pele	+	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle e Shar-Pei
E2R0L9	<i>T-complex protein 1, alpha subunit</i>	Pele	+	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle e Shar-Pei
P15944	<i>Tryptase alpha/beta 1</i>	Pele	-	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle e Shar-Pei

Posteriormente para se obter a informação relativa aos processos biológicos em que participam as proteínas envolvidas em cada patologia, utilizou-se a ferramenta bioinformática PANTHER. Relativamente à doença de Mastocitoma cutâneo canino as cinco proteínas exclusivas desta doença estão envolvidas nos processos biológicos descritos pela figura 66.

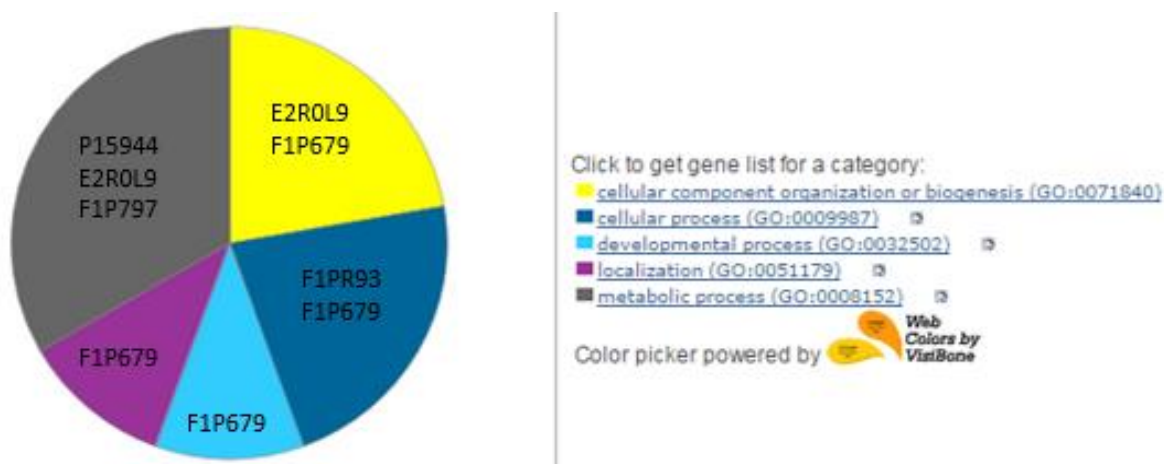


Figura 66- Processos biológicos em que participam as proteínas exclusivas identificadas na doença Mastocitoma cutâneo canino.

A ferramenta também permitiu identificar para cada proteína o seu processo biológico mais específico. Assim para cada uma das proteínas apresenta-se esse resultado:

- Proteína “*WD repeat domain 1*” (F1PR93) está envolvida no movimento de componentes celulares;
- Proteína “*Actin related protein 3*” (F1P679) está envolvida na organização da componente celular, ciclo celular, citocinese, morfogênese estrutura anatômica e no transporte;
- Proteína “*5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase*” (F1P797) envolvida no processo metabólico primário;
- Proteína “*T-complex protein 1, alpha subunit*” (E2R0L9) envolvida na biogênese da componente celular e no processo metabólico primário;
- Proteína “*Tryptase alpha/beta 1*” (P15944) está envolvida no processo metabólico primário.

Todas as proteínas exclusivas envolvidas no Mastocitoma Cutâneo Canino tem dados de regulação qualitativos em caso de patologia e são caracterizadas, por isto serem futuras candidatas a biomarcadores.

2. “Lethal Acrodermatitis”

A doença “*Lethal Acrodermatitis*” é genética e rara que afeta cães de raça bull terrier. O fenótipo é semelhante à acrodermatite enteropática em seres humanos, mas que não tem atualmente tratamento¹⁸. Por isso o diagnóstico precoce para esta doença é fundamental, constituindo a identificação de biomarcadores e/ou alvos terapêuticos em cães é essencial. A análise de proteínas exclusivas para esta patologia, mostrou que já foram identificadas sete proteínas, identificadas em cães de raça bull terrier em amostras de fígado como mostra a tabela 19.

Tabela 19- Proteínas exclusivas identificadas na doença de "Lethal Acrodermatitis".

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
F6UYJ9	<i>Calreticulin</i>	Fígado	ND	Bull terrier
F1PL97	<i>Prolyl-4-hydroxylase</i>	Fígado	-	Bull terrier
F1PBJ8	<i>Aldehyde dehydrogenase</i>	Fígado	ND	Bull terrier
Q8HZM5	<i>Glutamine synthetase</i>	Fígado	ND	Bull terrier
F1Q2N5	<i>Glutamate dehydrogenase 1</i>	Fígado	ND	Bull terrier
E2R2G3	<i>Regucalcin</i>	Fígado	ND	Bull terrier
Q6FHP5	<i>Prohibitin</i>	Fígado	-	Bull terrier

Novamente para obter os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas, utilizou-se a ferramenta bioinformática PANTHER.

Relativamente à doença de "Lethal Acrodermatitis" das sete proteínas exclusivas para esta doença, seis são caracterizadas e envolvidas em três diferentes processos biológicos (Figura 67).

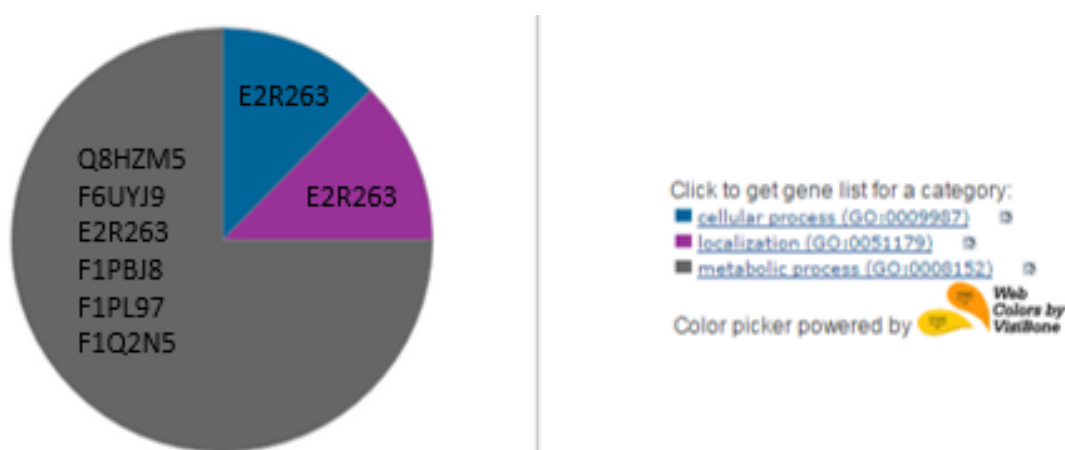


Figura 67- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença "Lethal Acrodermatitis".

Relativamente a cada proteína associou-se o seu processo biológico mais específico:

- Proteína "Regucalcin" (E2R2G3) está envolvida na comunicação celular, transporte e no processo metabólico primário.
- Proteína "Glutamine synthetase" (Q8HZM5) está envolvida no processo metabólico do composto de nitrogénio e no processo metabólico primário.
- Proteína "Calreticulin" (F6UYJ9) está envolvida no processo metabólico primário.

- Proteína “*Prolyl-4-hydroxylase*” (F1PL97) está envolvida no processo metabólico primário.
- Proteína “*Aldehyde dehydrogenase*” (F1PBJ8) está envolvida no processo metabólico primário.
- Proteína “*Glutamate dehydrogenase 1*” (F1Q2N5) está envolvida no processo metabólico primário.

Apesar não existirem dados de regulação para cinco proteínas, estas foram exclusivas entre outras patologias, por isso serem consideradas para já possíveis candidatas a biomarcadores. Das restantes proteínas a “*Prolyl-4-hydroxylase*” e “*Prohibitin*” apresentam-se diminuídas (-) em caso de patologia e apenas se sabe que a primeira proteína está envolvida no processo metabólico primário.

3. Osteoartrite

Esta doença é comum em cães de meia-idade e idosos. Trata-se de uma patologia que causa a degradação da cartilagem articular, levando à dor, inflamação e perda do movimento da articulação. Esta patologia é diagnosticada em estádios tardios e irreversíveis, quando o tratamento apenas vai diminuir a dor e a progressão da doença¹⁹.

Por isso o diagnóstico precoce para esta doença é fundamental e a identificação de biomarcadores será um bom contributo.

A identificação das proteínas exclusivas para esta patologia, mostrou que sete proteínas cumprem o requisito. As proteínas exclusivas foram identificadas em cães mestiços e foram identificadas em amostras de soro. Os dados de expressão correspondentes estão apresentados na tabela 20.

Tabela 20- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Osteoartrite.

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
F1PMM1	<i>Peroxisomal D3, D2-enoyl-CoA isomerase</i>	Soro	+	Cães cruzados
F1P6E1	<i>Complement C1s</i>	Soro	-	Cães cruzados
F1PWR2	<i>Complement C4</i>	Soro	-	Cães cruzados
E2RL01	<i>Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha</i>	Soro	-	Cães cruzados
F1Q1K9	<i>Hyaluronan binding protein 2</i>	Soro	-	Cães cruzados
J9P8M2	<i>Fibronectin preprotein</i>	Soro	-	Cães cruzados
E2QZ19	<i>Afamin</i>	Soro	-	Cães cruzados

Depois para obter os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas, utilizou-se a ferramenta bioinformática PANTHER para se obter a classificação das proteínas. Relativamente à doença de Osteoartrite das sete proteínas exclusivas para a doença apenas três estão caracterizadas e participam em seis processos biológicos (Figura 68).

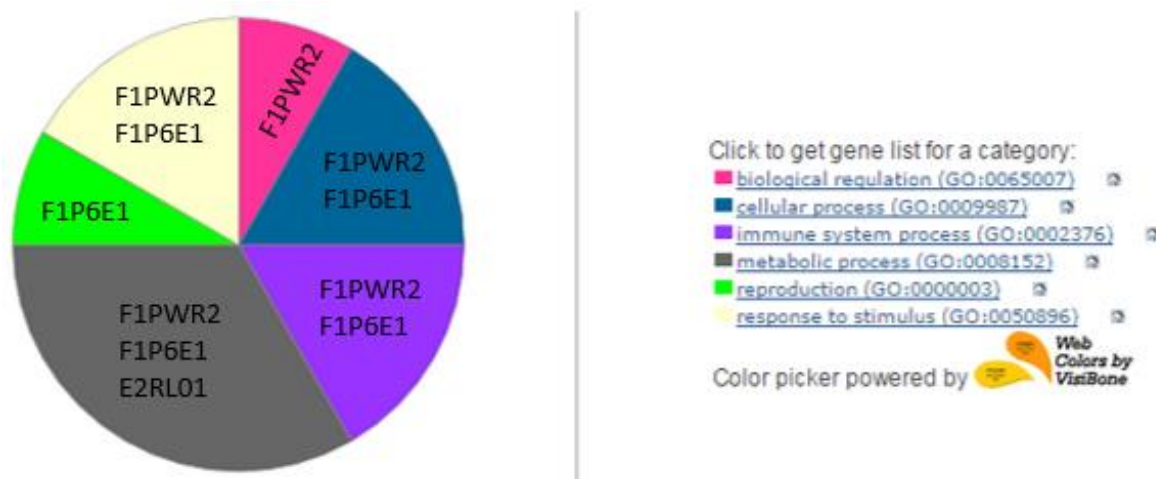


Figura 68- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença Osteoartrite.

Relativamente a cada proteína associou-se o seu processo biológico mais específico:

- Proteína “*Complement C4*” (F1PWR2) está envolvida na regulação da função molecular, processo celular, resposta imune, processo metabólico primário.
- Proteína “*Complement C1s*” (F1P6E1) está envolvida no processo celular, resposta imune, processo metabólico primário, geração de gâmetas e na resposta ao estímulo externo.
- Proteína “*Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha*” (E2RL01) está envolvida no processo metabólico primário.

Apenas três proteínas exclusivas na doença de Osteoartrite apresentam um processo em comum, estando envolvidas no processo metabólico primário.

4. Carcinoma de células transicionais

Esta doença é o cancro mais comum da bexiga urinária em cães. Geralmente é diagnosticado numa fase avançada da doença, com resposta limitada à quimioterapia. Os testes de rastreio comerciais carecem de especificidade e os processos de diagnóstico são invasivos²⁰.

Por isso o diagnóstico precoce para esta doença é fundamental. Foram identificadas seis proteínas exclusivas para a patologia em diversas raças em amostras de urina como mostra a tabela 21.

Tabela 21- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Carcinoma de células transicionais.

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
E2R002	<i>Prostaglandin reductase 1 isoform 1</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed
Q7YQC6	<i>Heat shock protein 70</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed
Q4KKT6	<i>Collagen alpha-3(VI) chain precursor</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed
F1PBZ4	<i>NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed
F1PBL1	<i>14-3-3 protein zeta/delta isoform 2</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed
Q3YIX4	<i>Phosphatidylethanolamine -binding protein 1</i>	Urina	ND	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi e mixed breed

Os processos biológicos em que as proteínas estão envolvidas foram obtidos através da ferramenta bioinformática PANTHER.

Relativamente à doença carcinoma de células transicionais, das seis proteínas exclusivas para esta doença apenas duas foram caracterizadas e estão envolvidas em dois processos biológicos (Figura 69).

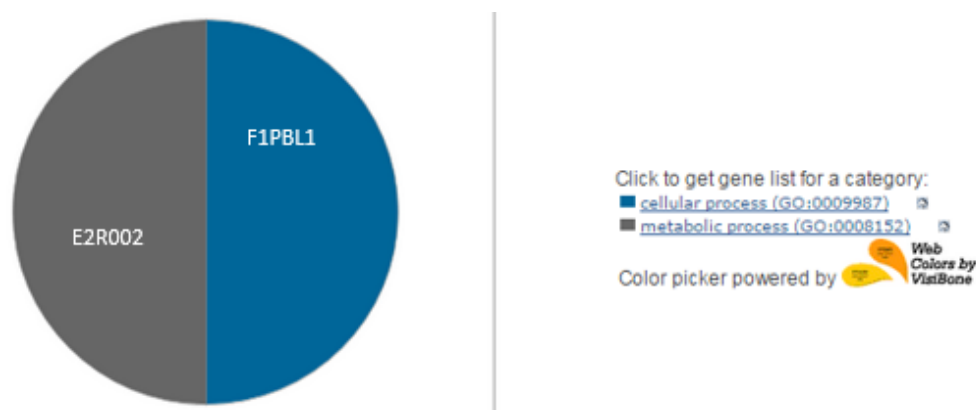


Figura 69- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na doença Carcinoma de células transicionais.

Relativamente a cada proteína associou-se o seu processo biológico mais específico:

- Proteína “*14-3-3 protein zeta\delta isoform 2*” (F1PBL1) está envolvida no ciclo celular e na comunicação celular.
- Proteína “*Prostaglandin reductase 1 isoform 1*” (E2R002) está envolvida no processo metabólico primário.

Apesar não existirem dados de regulação e a sua caracterização ser pouco elucidativa para estas seis proteínas. Apesar disto estas mostraram-se exclusivas entre outras patologias, por isso serem consideradas para já possíveis candidatas a biomarcadores. Apesar de que dados de regulação qualitativos ou quantitativos são essenciais para os considerar biomarcadores.

5. Raiva

A raiva é uma doença viral que ataca o sistema nervoso e pode causar encefalite, é considerada uma das zoonoses mais perigosas.

Esta patologia pode se manifestar de duas formas: a furiosa e a muda ou parálitica.

Na primeira, ocorrem manifestações de inquietação e excitação, na segunda incidem mais os atos depressivos do sistema nervoso¹⁶.

Para esta patologia foram identificadas dezoito proteínas. Estas foram identificadas em amostras de diferentes regiões do SNC (medula espinal, tronco cerebral e hipocampo) em estado de patologia, apresentando-se contra-reguladas em caso de raiva em fase parálitica e a fase furiosa como mostra a tabela 22.

Tabela 22- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Raiva.

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
E2RB31	<i>Oxygen-regulated protein precursor</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
E2R5B9	<i>Glutathione S-transferase Mu 3</i>	Tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
Q8MJ04	<i>Oxygen-regulated protein 1</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
B4YUE0	<i>Dynamin</i>	Hipocampo	Contra-reguladas	ND
F1PYU3	<i>Fascin 1</i>	Tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
E2RS09	<i>Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
F6UNP7	<i>NEFM protein</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
Q8HZW3	<i>Neurofilament, heavy polypeptide 200 kDa</i>	Tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
F1PQD4	<i>Septin-8</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
E2RFJ7	<i>Tubulin, alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) isoform 7</i>	Hipocampo e tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
A0A077LQA5	<i>Tubulin, alpha-1 isoform 9</i>	Tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
F1PKR3	<i>Vinculin (Metavinculin)</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
F1PCJ6	<i>Xin actin-binding repeat containing 2 isoform 1</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
E2RNB6	<i>Alpha Crystallin B chain</i>	Medula espinal, hipocampo e tronco cerebral	Contra-reguladas	ND
E2R0T6	<i>Heat shock cognate 71 kDa protein</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
P42929	<i>Heat shock protein beta-1</i>	Medula espinal	Contra-reguladas	ND
F1PUL9	<i>SARM1 protein</i>	Hipocampo	Contra-reguladas	ND
F1P9U4	<i>Dihydropyrimidinase related protein-2</i>	Medula espinal, hipocampo e tronco cerebral	Contra-reguladas	ND

Das dezoito proteínas exclusivas identificadas em raiva apenas nove foram caracterizadas e estão envolvidas em oito processos biológicos (Figura 70).

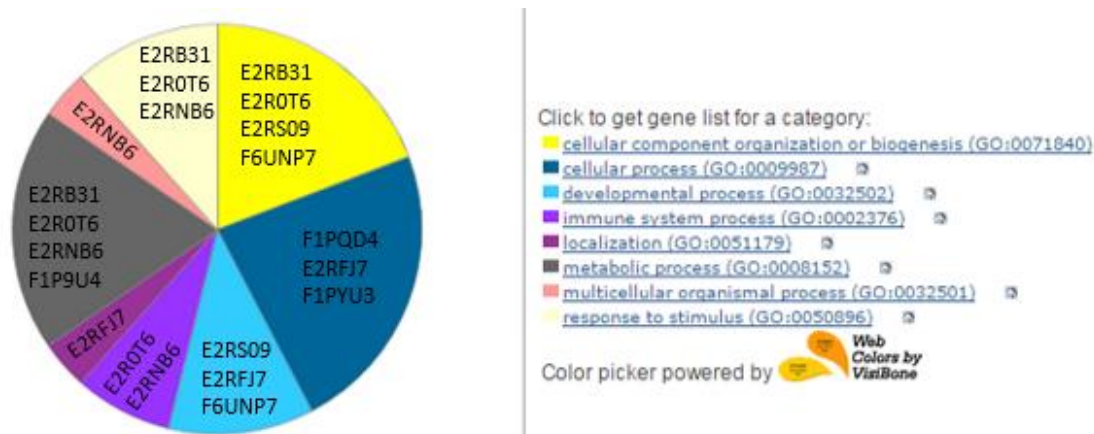


Figura 70- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na Raiva.

Relativamente a cada proteína associou-se o seu processo biológico mais específico:

- Proteína “*150KdA oxygen-regulated protein precursor*” (E2RB31) está envolvida na biogénese da componente celular, processo metabólico primário e na resposta ao stress.
- Proteína “*Heat shock cognate 71kDa protein*” (E2R0T6) está envolvida na biogénese da componente celular, sistema imune, processo metabólico e na resposta ao stress.
- Proteína “*Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1*” (E2RS09) está envolvida na organização da componente celular e na morfogénese da estrutura anatómica.
- Proteína “*NEFM protein*” (F6UNP7) está envolvida na organização da componente celular e na morfogénese da estrutura anatómica.
- Proteína “*Tubuli, alfa-2 chain isoform 7*” (E2RFJ7) está envolvida na organização da componente celular, ciclo celular, movimento da componente celular, morfogénese da estrutura anatómica e no transporte.
- Proteína “*Septin-8*” (F1PQD4) está envolvida no ciclo celular e na citocinese.
- Proteína “*Fascin 1*” (F1PYU3) está envolvida no movimento da componente celular.
- Proteína “*Alpha crystallin B chain*” (E2RNB6) está envolvida no sistema imune, processo metabólico primário, processo multicelular de um único organismo e na resposta ao stress.
- Proteína “*Dihydropyrimidinase related protein-2*” (F1P9U4) está envolvida no processo metabólico primário.

A leishmaniose canina é uma doença causada pela espécie *Leishmania infantum* e é uma zoonose potencialmente fatal nos cães caso não seja tratada.

O diagnóstico precoce é muito importante nesta patologia, pois quanto mais cedo for diagnosticada, menos disseminado estará o parasita, mais sucesso terá a terapêutica e melhor será o prognóstico².

A análise das proteínas exclusivas desta patologia, evidenciou doze proteínas, que foram identificadas nas raças Pastor Alemão e sem raça definida em amostras de soro como mostra a tabela 23.

Tabela 23- Proteínas exclusivas identificadas na doença de Leishmaniose.

Código UniProt	Nome da proteína	Tipo de amostra biológica	Dados de regulação	Raça
P12278	<i>Apolipoprotein C-II</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
F6Y2P4	<i>Probable phospholipid-transporting ATPase</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
P01785	<i>Ig heavy chain V</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
Q697L1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
E2QUS0	<i>Probable dimethyladenosine transferase</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
P01618	<i>Ig-kappa chain</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
P02677	<i>Fibrinogen beta chain</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
P56595	<i>Apolipoprotein C-I</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
Q50KA9	<i>Nucleoside diphosphate kinase A</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
E2R141	<i>Complement C8</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
Q9GLD3	<i>Transferrin receptor protein 1</i>	Soro	ND	Pastor Alemão e sem raça definida
F1PAX2	<i>Ceruloplasmin</i>	Soro	ND	ND

A ferramenta bioinformática PANTHER permitiu a classificação das proteínas de acordo com o processo biológico. Assim as doze proteínas exclusivas para esta doença apenas cinco são caracterizadas e estão envolvidas em nove processos biológicos (Figura 71).



Figura 71- Distribuição dos processos biológicos das proteínas identificadas na Leishmaniose.

Relativamente a cada proteína associou-se o seu processo biológico mais específico:

- Proteína “*Ceruloplasmin*” (F1PAX2) está envolvida na adesão celular, regulação da função molecular, comunicação celular, desenvolvimento ectoderme, desenvolvimento mesoderme, desenvolvimento do sistema, transporte, processo metabólico primário, processo multicelular de um único organismo e na resposta a um estímulo externo.
- Proteína “*Complement 8*” (E2R141) está envolvida na adesão celular, comunicação celular, resposta imune, transporte, processo metabólico e na resposta a um estímulo externo.
- Proteína “*Probable phospholipid-transporting ATPase*” (F6Y2P4) está envolvida no processo homeostático, transporte e no processo metabólico primário.
- Proteína “*Apolipoprotein C-II*” (P12278) está envolvida no transporte e no processo metabólico primário.
- Proteína “*Tubuli, alfa-2 chain isoform 7*” (E2QUS0) está envolvida no processo metabólico primário.

Apesar não existirem dados de regulação, estas proteínas foram exclusivas entre outras patologias, por isso serem consideradas para já possíveis candidatas a biomarcadores. Apesar de que dados de regulação qualitativos ou quantitativos são essenciais para os considerar biomarcadores.

Como a leishmaniose canina é endémica em Portugal. Como temos particular interesse em poder vir a utilizar no futuro a saliva como fluido de diagnóstico, estávamos interessados em saber se para esta patologia as proteínas identificadas como exclusivas poderiam ser encontradas no fluido mencionado. Até ao momento

ainda não foram utilizadas amostras de saliva para a identificação de proteínas na saliva de animais com a patologia. Assim utilizou-se como estratégia para verificar se as proteínas exclusivas também podiam estar presentes em saliva pesquisando as proteínas homólogas humanas.

Utilizou-se para o efeito o BLAST da ferramenta UniProt. Com a identificação das proteínas homólogas humanas estas foram pesquisadas pela ferramenta OralCard para ver se as proteínas já tinham sido identificadas em amostras de saliva humana (Tabela 24).

Tabela 24- Proteínas humanas homólogas com as proteínas exclusivas de cão para a patologia leishmaniose para determinar a possibilidade de as detetar em amostras de saliva através do OralCard.

UniProt <i>Canis familiaris</i>	UniProt <i>Homo Sapiens</i>	OralCard	Amostra no OralCard
P12278	P02655	Presente	Fluido crevicular
F6Y2P4	Q9Y2G3	Ausente	-
P01785	Q0ZCG6	Ausente	-
Q697L1	Q8NER1	Ausente	-
E2QUS0	Q9UNQ2	Ausente	-
P01618	P01614	Presente	Saliva
P02677	P02675	Presente	Saliva
P56595	P02654	Presente	Fluido crevicular
Q50KA9	P15531	Presente	Saliva
E2R141	P07358	Presente	Saliva
Q9GLD3	P02786	Presente	Saliva
F1PAX2	P00450	Presente	Saliva

Das doze proteínas exclusivas para a doença de leishmaniose em cão todas elas têm homologia com proteínas humanas, mas apenas seis proteínas já foram identificadas em saliva humana. As que estão presentes em fluido crevicular têm uma forte probabilidade de virem a ser identificadas em saliva.

A proteína "*Ig kappa chain V-II region Cum*" (P01614) está presente na saliva humana em situação de doença como o síndrome de Sjogren's e as cáries.

A proteína "*Apolipoprotein C-II*" (P02655) está presente no fluido crevicular humano em situação de doença como periodontite crónica e a gengivite.

A proteína "*Fibrinogen beta chain*" (P02675) está presente na saliva humana em situação de saúde e doença como a periodontite crónica, gengivite neoplasias orais e o síndrome de Sjogren's.

A proteína "*Apolipoprotein C-I*" (P02654) está presente no fluido crevicular humano em situação de doença como periodontite crónica e a gengivite.

A proteína “*Nucleoside diphosphate kinase A*” (P15531) está presente na saliva humana em situação de saúde e doença como as neoplasias orais e o síndrome de Sjogren’s.

A proteína “*Complementem component C8 beta chain*” (P07358) está presente na saliva em situação de doença como a Diabetes Mellitus tipo 2.

A proteína “*Transferrin receptor protein 1*” (P02786) está presente na saliva humana em situação de saúde e doença como a periodontite crónica.

A proteína “*Ceruloplasmin*” (P00450) está presente na saliva humana em situação de saúde e doença como a periodontite crónica e a gengivite.

De acordo com este resultado pode-se concluir que estas seis proteínas poderão ser possíveis de identificar em saliva de cão.

4.3.3 Proteínas exclusivas da saliva de *Canis lupus familiaris* candidatas a biomarcadores

Com o presente trabalho de criação do CanisTecOme temos por objetivo que possam vir a ser desenvolvidos trabalhos futuros para validar a saliva como fluido de diagnóstico, mais adequado por ser menos doloroso e invasivo para o animal. Assim uma caracterização pormenorizada das proteínas já identificadas na saliva deste organismo é essencial para a investigação que irá decorrer no futuro.

A criação de tabelas funcionais que representam a atribuição de funções biológicas específicas para as proteínas envolvidas em cada uma das patologias em estudo permite a simplificação da análise do papel funcional de cada uma das proteínas de interesse.

A tabela 25 apresenta a organização funcional para cada uma das proteínas já identificadas em amostras de saliva de cão.

Tabela 25- Caracterização funcional das proteínas exclusivas da saliva do organismo *Canis lupus familiaris*.

	UniprotKBAC	J9NWQ2	E2QXJ0	J9NZ24	O18873	H2B3G5	O18874	E2QXE7	D7PBH4
	Protein name	Uncharacterized protein (Angiopietin-related protein 5-like)	Uncharacterized protein (BPI fold-containing family A member 2)	Uncharacterized protein (Mucin-5B)	Major allergen Can f 1	Lipocalin -Can f 6 allergen	Minor allergen Can f 2	Uncharacterized protein (BPI fold-containing family A member 1)	Allergen Can f 4
GoOntology	Ontology								
Biological adhesion	Cell adhesion	+							
Cellular process	Cell communication	+					+		
Immune system process	Macrophage activation		+					+	
Localization	Transport		+		+	+	+	+	+
Metabolic process	Primary metabolic process		+				+	+	
Response to stimulus	Defense response to bacterium		+					+	
Response to stimulus	Response to pheromone						+		
Response to stimulus	Response to stress		+					+	

Como já referido a partir da construção das tabelas funcionais (Figuras 41,42 e 43) descrita anteriormente foi possível caracterizar de forma mais visual as proteínas exclusivas da saliva.

Ao contrário do que se pensa o ser humano não é alérgico ao pêlo do cão, mas sim às células de pele morta, saliva e secreções das glândulas sebáceas do animal, por isso o estudo feito por Polovic *et al* 2013 em que se detetou as dez proteínas concluiu que a saliva do cão é uma importante fonte de alérgenos.¹⁴

Das oito proteínas exclusivas identificadas em saliva que estão anotadas no *CanisTecOme*, apenas uma não foi caracterizada pelo AgBase e por essa razão não foi possível identificar a informação anotada relativa ao seu papel funcional.

A proteína *Major allergen Can f 1* (O18873) e a *Minor allergen Can f 2* (O18874) são os mais importantes alérgenos e ambas estão envolvidas no transporte e tem localização na região extracelular.

Para além das proteínas mencionadas anteriormente a proteína *BPI fold-containing family A member 2* (E2QXJ0), *BPI fold-containing family A member 1* (E2QXE7), *Lipocalin-Can f 6 allergen* (H2B3G5) e a proteína *Allergen Can f 4* (D7PBH4) estão também envolvidas no transporte.

A “*Mucin-5B*” (J9NZ24) de *Canis lupus familiaris* não está caracterizada, apenas se sabe que é uma proteína altamente glicosilada e que constitui um dos principais componentes do muco.

A proteína *Angiopoietin-related protein 5-like* (J9NWQ2) está envolvida na adesão e comunicação celular e localizada na região extracelular.

A proteína *BPI fold-containing family A member 2* (E2QXJ0) para além do transporte está envolvida na ativação de macrófagos, processo metabólico primário, resposta de defesa à bactéria e na resposta ao stress.

Conclui-se essencialmente que as oito proteínas exclusivas detetadas na saliva de cão estão maioritariamente localizadas na região extracelular e envolvidas no transporte, podendo por essa razão vir a constituir bons alvos para a identificação em ensaios de validação de biomarcadores.

4.3.4 Proteínas sugeridas como biomarcadores pela bibliografia

Após a revisão dos trinta e quatro artigos identificaram-se proteínas candidatas a biomarcadores em patologias.

A proteína tau e a proteína HMGB1 (High-mobility group box 1) são duas das moléculas identificadas no fluido cérebroespinal do cão e considerados possíveis biomarcadores da hérnia do disco intervertebral ²¹ e encefalite respetivamente ²² respetivamente (Tabela 26).

Tabela 26- Biomarcadores propostos para as duas patologias identificadas em fluido cerebrospinal do cão.

UniProtKBAC	Protein name	Cerebrospinal fluid	Disease name	Citation (NCBI ID)
E2R3H9	Protein tau	×	Intervertebral disc herniation	23499240
Q6YKA4	HMGB1 (High-mobility group box 1)	×	Encephalitis	21441719

Em outras amostras biológicas como o soro, foram também propostos biomarcadores. Para a obesidade são sugeridas as proteínas “*Clusterin*”, “*Retinol-binding protein 4*” e “*Serpin peptidase inhibitor, clade A*” que só foram identificadas em cães obesos e não em normais²³.

A “*Cystatin C*” é uma proteína considerada como um possível marcador da função renal em cães, pois o aumento da sua concentração é indicativo de progressão da insuficiência renal crónica²⁴.

As restantes dezoito proteínas representadas na tabela 27 que estão envolvidas na doença de babesiose canina também foram propostos como biomarcadores²⁵.

Tabela 27- Biomarcadores propostos para as patologias obesidade, insuficiência renal e babesiose canina e identificadas em soro do cão.

UniProtKBAC	Protein name	Serum	Disease name	Citation (NCBI ID)
P25473	Clusterin	×	Obesity	22591953
F1Q4D9	Retinol-binding protein 4 (RBP4)	×	Obesity	22591953
A11IJ0	Serpin peptidase inhibitor, clade A (α -AT)	×	Obesity	22591953
E2RCE0	Cistatin C	×	Renal insufficiency	16244971
F6Y713	Alpha-1-acid glycoprotein (AGP)	×	Canine babesiosis	24885808
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	×	Canine babesiosis	24885808
E2RES2	Antithrombin-III (AT III)	×	Canine babesiosis	24885808
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	×	Canine babesiosis	24885808
E2RE76	Apolipoprotein A-IV (APOA4)	×	Canine babesiosis	24885808
F1PIX8	Complement C3	×	Canine babesiosis	24885808
J9P430	Transferrin	×	Canine babesiosis	24885808
F1PZR4	Hemopexin	×	Canine babesiosis	24885808
E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	×	Canine babesiosis	24885808
P19006	Haptoglobin	×	Canine babesiosis	24885808
E2R4V3	Alpha-2-antiplasmin	×	Canine babesiosis	24885808
P25473	Clusterin	×	Canine babesiosis	24885808
E2R833	Leucine-rich- α 2-glycoprotein	×	Canine babesiosis	24885808
Q4GX49	Zinc-alpha-2-glycoprotein	×	Canine babesiosis	24885808
	Immunoglobulin gamma heavy chain B	×	Canine babesiosis	24885808
	Immunoglobulin gamma heavy chain C	×	Canine babesiosis	24885808
	IgA heavy chain constant region	×	Canine babesiosis	24885808
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	×	Canine babesiosis	24885808

Na urina também foram identificados possíveis biomarcadores para diversas patologias (Tabela 28), como mostra o estudo feito por Loor *et al* 2013²⁶.

Tabela 28- Biomarcadores propostos em diversas patologias identificadas na urina do cão

UniProtKBAC	Protein name	Urine	Disease name	Citation (NCBI ID)
P49822	Albumin	x	Chronic kidney disease	23952327
	Immunoglobulin G	x	Leishmaniasis	23952327
	Immunoglobulin G	x	leptospirosis	23952327
	Immunoglobulin G	x	pyometra	23952327
	Immunoglobulin G	x	hypercortisolism	23952327
	Immunoglobulin G	x	X-Linked Hereditary Nephropathy	23952327
	Immunoglobulin G	x	Chronic kidney disease	23952327
	Immunoglobulin A	x	Leishmaniasis	23952327
	Immunoglobulin A	x	leptospirosis	23952327
	Immunoglobulin A	x	pyometra	23952327
F1Q4D9	Retinol-binding protein	x	Chronic kidney disease	23952327
F1Q4D9	Retinol-binding protein	x	X-Linked Hereditary Nephropathy	23952327
F1Q4D9	Retinol-binding protein	x	urolithiasis	23952327
P19341	beta 2-Microglobulin	x	X-Linked Hereditary Nephropathy	23952327
J9NUI6	α1-Microglobulin	x	X-Linked Hereditary Nephropathy	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	x	Pyometra	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	x	aminoglycoside-nephrotoxicosis	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	x	Splatin-induced acute kidney injury	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	x	pyelonephritis	23952327
E2RTH3	Y-Glutamyltransferase	x	Pyometra	23952327
E2RTH3	Y-Glutamyltransferase	x	aminoglycoside-nephrotoxicosis	23952327
E2RTH3	Y-Glutamyltransferase	x	cisplatin-induced AKI, naturally occurring AKI	23952327
F1PVW0	Lactate dehydrogenase	x	Cisplatin-induced AKI	23952327
Q9N0V1	Alkaline phosphatase	x	Pyometra	23952327
Q862Z3	Tamm–Horsfall Protein (uromodulin)	x	Chronic kidney disease	23952327
Q862Z3	Tamm–Horsfall Protein (uromodulin)	x	urolithiasis	23952327
Q29416	IL-2	x	Acute kidney injury	23952327
P41324	IL-8	x	Cisplatin-induced AKI	23952327
P52203	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	x	Cisplatin-induced AKI	23952327
P48749	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	x	Cisplatin-induced AKI	23952327
	Keratinocyte derived chemokine (KC)	x	Cisplatin-induced AKI	23952327

4.4 Redes de interação em que participam as proteínas do *Canis lupus familiaris*

Neste trabalho foi importante ter noção da rede de interações entre proteínas. Isto porque a interação de uma determinada proteína com outra/s é essencial para os mecanismos fisiológicos que ocorrem no organismo.

4.4.1 Interação das proteínas do *Canis lupus familiaris* com as proteínas da *Leptospira interrogans* causadora da Leptospirose

O algoritmo Oralint foi essencial para esta fase do trabalho, pois foi a ferramenta que serviu para criar possíveis redes de interação entre as proteínas do *Canis lupus familiaris* com as proteínas da bactéria *Leptospira interrogans*. Deste algoritmo gerou-se um ficheiro em Excel com o resultado da interação prevista entre os proteomas dos dois organismos, resultando em 4.677 interações possíveis (Figura 72).

Canis	Leptospira
Q3YIX4	M6M9D6
Q3YIX4	M6ZPJ7
Q3YIX4	N1ULU8
Q3YIX4	M6GIX6
Q3YIX4	M6GQ61
Q3YIX4	M6ZEB9
Q3YIX4	M6GIU4
Q3YIX4	M6HGN4
Q3YIX4	M6THU5
Q3YIX4	M6THV2
Q3YIX4	N1ULL3
Q3YIX4	M5ZM25
Q3YIX4	M5ZTV9
Q3YIX4	M5ZUE3
Q3YIX4	M6AZ97
Q3YIX4	M6BA07
Q3YIX4	M6C770
Q3YIX4	M6ES99
Q3YIX4	M6GUY1
Q3YIX4	M6H978
Q3YIX4	M6HDQ0
Q3YIX4	M6IKF8

Figura 72- Excerto da tabela com os pares de interações entre proteínas de *Canis* e *Leptospira* previstos com o algoritmo Oralint.

Uma vez que a análise das 4677 interações não seria possível no âmbito desta tese focámo-nos na interação com as proteínas da saliva depositadas no CanisTecOme. Verifica-se assim um resultado de 234 interações (Tabela 29) previstas entre as proteínas de *Leptospira interrogans* e apenas uma proteína da saliva de *Canis lupus familiaris*.

Tabela 29- Interações possíveis entre os organismos *Canis lupus familiaris* e *Leptospira interrogans* e posterior interação com proteínas da saliva.

Tipos de interação	Interações possíveis
Proteínas entre os dois organismos	4.677
Proteínas salivares depositadas no CanisTecOme	234

O objetivo desta seção era a análise das interações entre as proteínas do cão identificadas na saliva e as proteínas de *Leptospira* mais especificamente os serogrupos *Icterohaemorrhagiae* e *Canicola* que levam ao desenvolvimento da leptospirose no cão.

Na figura 73 está apresentada o resultado com uma rede de interações entre a única proteína salivar com os 37 diferentes serogrupos da bactéria *Leptospira interrogans*.

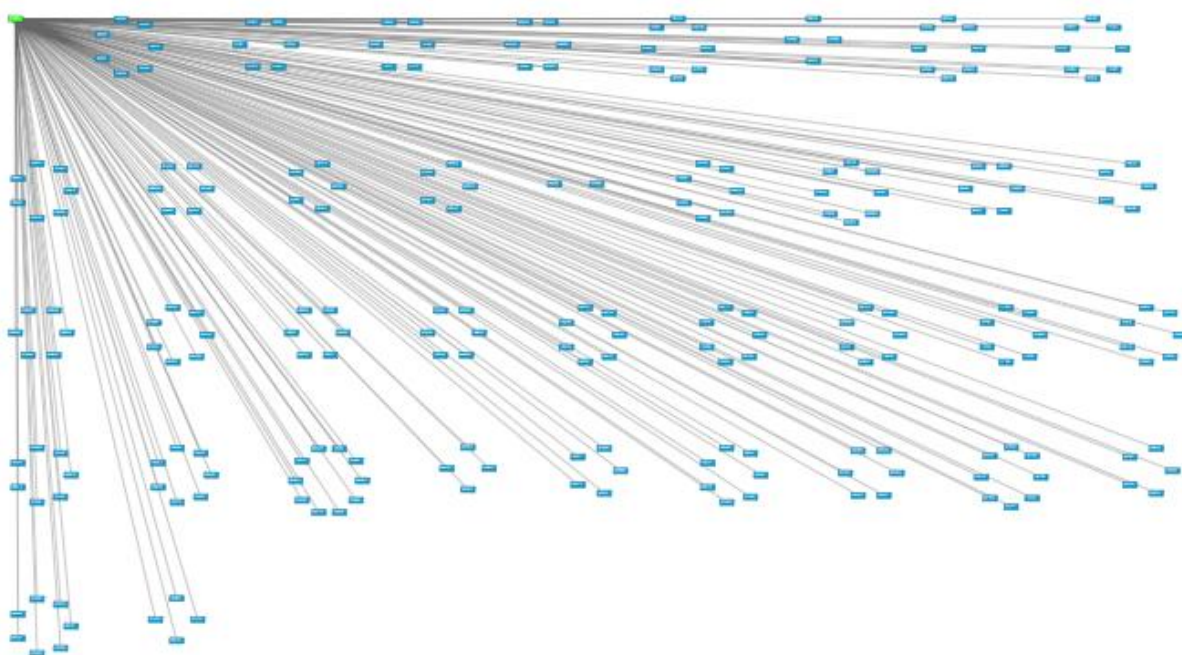


Figura 73- Rede de interação entre a proteína salivar do *Canis lupus familiaris* (verde) e as proteínas dos diferentes serogrupos da *Leptospira interrogans* (azul).

Seguidamente foi-se perceber se algumas destas proteínas de *Leptospira interrogans* pertenciam aos serogrupos de interesse (*Icterohaemorrhagiae* e o *Canicola*). Como mostra a figura 74 que surgiu como resultado de uma ampliação do resultado da figura 73 e com uma análise pormenorizada percebeu-se que a proteína salivar interage com duas proteínas que pertencem a um dos serogrupos (*Icterohaemorrhagiae*) que levam ao desenvolvimento da doença leptospirose em cães.

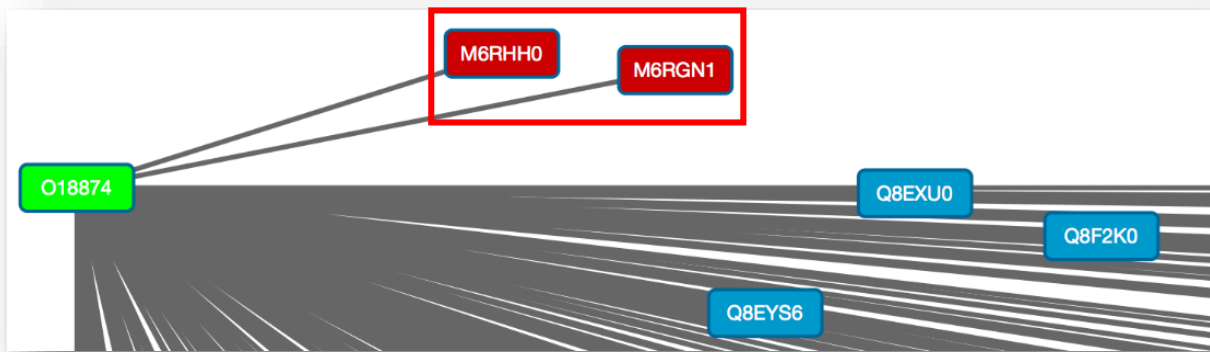


Figura 74- Rede de interação entre a proteína salivar do *Canis lupus familiaris* (verde) e as proteínas da *Leptospira interrogans* com principal enfoque no serogrupo *Icterohaemorrhagiae* (vermelho).

Para interpretar e concluir algo destas interações fomos caracterizar ao nível funcional estas três proteínas.

A proteína salivar “*Minor allergen Can f 2*” (O18874) é uma lipocalina que está envolvida na resposta a estímulos mais propriamente na resposta a feromonas, como já referido na secção 4.3.3 dos resultados e discussão.

As feromonas para o cão desempenham um papel importante no seu olfato, pois através destas substâncias conseguem detetar e ir ao encontro de uma fêmea. Estas moléculas existem na secreção vaginal volátil que anuncia o período de cio da cadela e a necessidade de um parceiro para copular²⁷.

Relativamente às proteínas “*Methyltransferase, UbiE/COQ5 family*” (M6RHH0) e “*O-methyltransferase domain protein*” (M6RGN1) da *Leptospira interrogans* do serogrupo *Icterohaemorrhagiae* estão envolvidas na metilação e este processo biológico pode levar a modificações da função de algumas proteínas, nomeadamente as histonas.

Neste caso, estas duas proteínas produzidas pela *Leptospira interrogans Icterohaemorrhagiae* podem levar a uma possível alteração da proteína salivar “*Minor allergen Can f 2*” do cão, podendo assim bloquear possivelmente a sua função, o que irá originar alteração do faro do animal. Isto é apenas uma possibilidade, pois ainda não existe bibliografia que associe estas três proteínas e são necessários estudos laboratoriais para comprovar experimentalmente esta possibilidade.

Componente experimental

4.5 Catalogação das amostras de saliva de *Canis lupus familiaris*

A etapa experimental consistiu na recolha de amostras de saliva de cão e no seu armazenamento em um repositório biológico modelo. Atualmente possui armazenadas 24 amostras de saliva de cão em que estão anotadas todas as características e a história clínica de cada animal (tabela 30).

Tabela 30-Tabela de catalogação das amostras de saliva correspondente a cada animal.

Código de armazenamento	Número amostra	Código clínica	Código raça	Nome	M (x)	F (x)	Idade	Castrado (x)	Tipo comida:			Vacinação/		Saudável	Cancro	Boa saúde oral*	Má saúde oral *	Doenças recentes
									Dieta regular	Mistura	Medicação	Desparasitação						
VI2	11	30	FSM	Kiko	x		7		x			x	x		x			
VI3	12	30	FSM	Mary		x	6	x	x			x	x		x			
VD2	3	50	SE	Nina		x	1			x		x	x		x			
VD3	7	30	SE	Lucas	x		1	x		x		x	x				x	
VG3	8	30	PO	Dick	x		5			x	x	x	x		x			x
VG1	2	30	PO	Rocha		x	12			x	x	x		x		x	x	x
VL1	1	50	GR	Teddy	x		2		x			x	x		x			
VL2	2	50	GR	Oscar	x		6		x			x	x		x			
VI1	3	30	FSM	Black	x		2			x		x	x		x			
VI4	14	30	FSM	Loba		x	7	x		x		x	x		x			
VI5	15	30	FSM	Junior	x		3	x		x	x	x					x	x
VI6	16	30	FSM	Juca	x		5			x		x	x			x		
VI7	19	30	FSM	Archie	x		5			x		x	x			x		
VI8	20	30	FSM	Rex	x		10			x		x	x			x		
VI9	21	30	FSM	Oliver	x		2	x		x		x	x			x		
VI10	24	30	FSM	Marley	x		4			x	x	x					x	x
VI11	25	30	FSM	Mel		x	6			x		x	x			x		
VG2	9	30	PO	Kikas		x	8	x	x			x	x			x		
VK1	1	30	PP	Junior	x		2		x			x	x			x		
VK2	13	30	PP	Lucas	x		1	x			x	x	x			x		
VD1	5	30	SE	Pepe	x		1			x	x	x					x	x
VD4	6	30	SE	Ted	x		5			x		x	x			x		
VM1	4	30	UN	Bonnie		x	7	x		x		x	x			x		
VM2	10	30	UN	Rex	x		9		x			x	x			x		

As amostras de saliva de cão divididas por diversas alíquotas de cães raças de Fila de São Miguel, Podengo Português, Perdigueiro Português e o Serra da Estrela, Golden Retriever e raças indeterminadas (Figura 75).

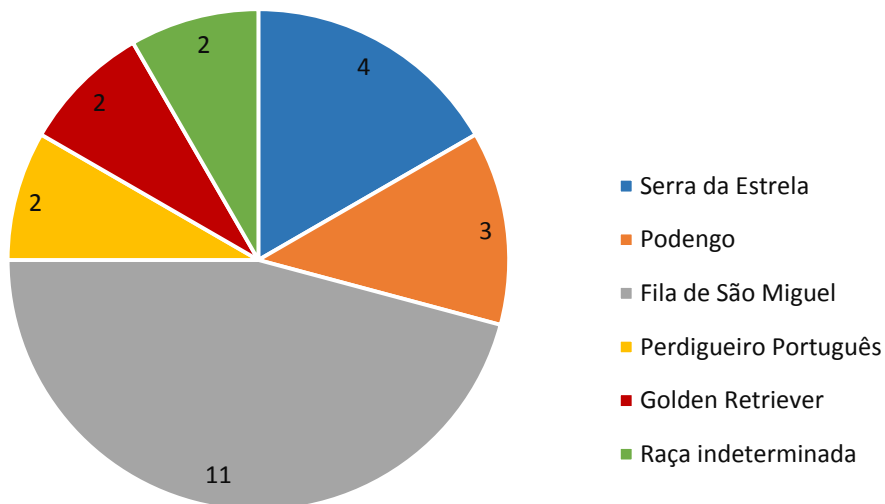


Figura 75- Distribuição das amostras de saliva de *Canis lupus familiaris*.

As amostras estão devidamente identificadas de acordo com o código único de identificação onde está anotado numa tabela bem como as informações de cada animal como referido na secção 3.7.1 de materiais e métodos.

Das 24 amostras armazenadas das várias raças portuguesas são tanto de machos como de fêmeas. A figura 76 ilustra o número de amostras de cão por género armazenadas no repositório.

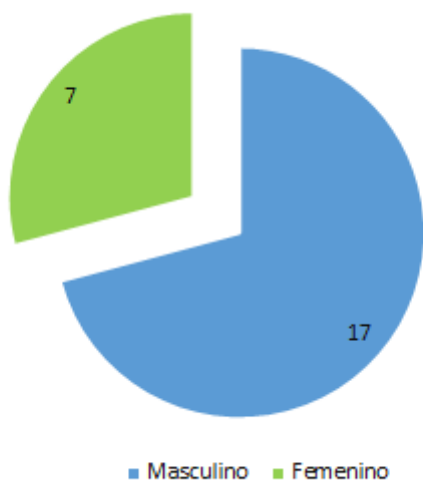


Figura 76- Distribuição por género das amostras de saliva de *Canis lupus familiaris*.

De modo a estabelecer um controlo de qualidade das amostras a incluir na coleção de amostras de saliva escolhemos a título exemplificativo oito amostras para ser avaliado o seu perfil de proteínas recorrendo a eletroforese SDS-PAGE.

As amostras usadas pertenciam a raças de cães Fila de São Miguel, Serra da Estrela, Podengo Português e o Golden Retriever, por cada raça usou-se duas amostras (Tabela 30).

Tabela 31- Amostras usadas no gel SDS-PAGE.

Amostra no gel	Número amostra	Código clinica	Código raça	Nome	Caso clinico (nº)	M (x)	F (x)	Idade	Castrado (x)	Tipo comida: Dieta regular	Tipo de comida: Mistura	Medicação	Vacinação/ Desparasitação	Saudável	Cancro	Boa saúde oral*	Má saúde oral *	Doenças recentes
1	011	30	FSM	Kiko	11	x		7		x			x	x		x		
2	012	30	FSM	Mary	12		x	6	x	x			x	x		x		
3	003	50	SE	Nina	1		x	1			x		x	x		x		
4	007	30	SE	Lucas	7	x		1	x		x		x	x			x	
5	008	30	PO	Dick	8	x		5			x	x	x	x		x		x
6	002	30	PO	Rocha	2		x	12			x	x	x		x		x	x
7	001	50	GR	Teddy	1	x		2		x			x	x		x		
8	002	50	GR	Oscar	2	x		6		x			x	x		x		

O padrão de peso molecular usado foi EZ-Run Pre-Stained Protein Marker que é ideal para géis de separação de proteínas. Após correr as amostras num gel SDS-PAGE conseguimos observar pelo resultado (Figura 77) que as amostras de saliva (1 a 8) conseguem ter uma quantidade de proteínas visualmente aceitável.

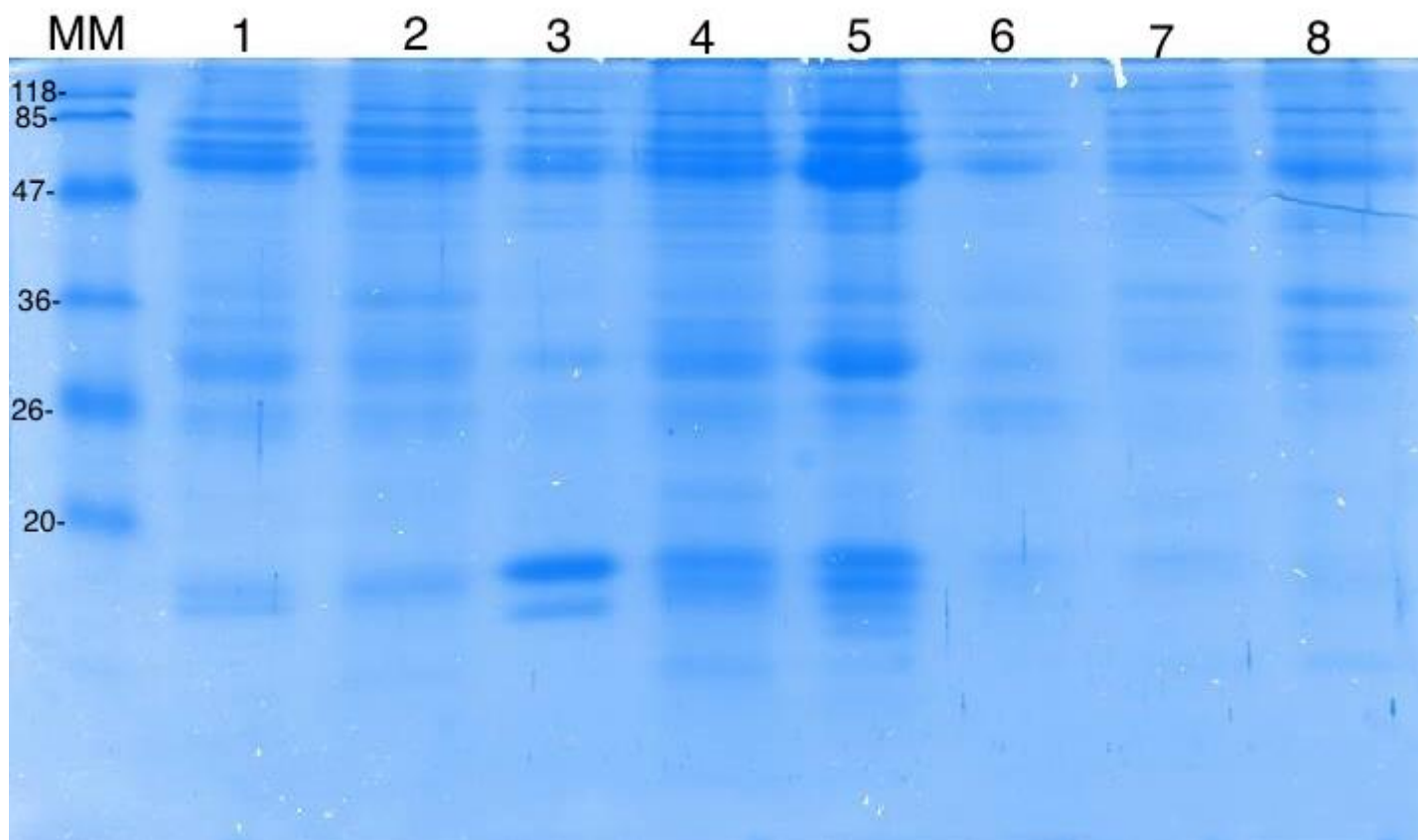


Figura 77- Gel SDS-PAGE: MM-marcador molecular Fisher BioReagents™ EZ-Run™ Prestained Protein Marker, Perfil de proteínas obtido para cada amostra de saliva correspondente ao dador de acordo com a tabela 30.

5. Conclusões

Ao longo da realização deste trabalho foi possível retirar diversas conclusões.

Algumas das dificuldades apareceram ao longo da leitura dos artigos de proteómica que causaram dificuldades na interpretação e em retirar conclusões de cada artigo. As dificuldades passaram pela falta de informação de cada animal em estudo (idade, género e raça); falta de anotação de códigos UniProt, códigos UniProt em que na maioria das vezes correspondiam a outro organismo e a falta de dados relativos à regulação proteica.

Base de dados como por exemplo o UniProt tem informação mais funcional de cada proteína, logo o CanisTecOme surgiu como uma anotação de proteínas e outras informações referentes de cada artigo.

Deste modo a elaboração de uma base de dados como o CanisTecOme era emergente na área da veterinária.

O CanisTecOme está em constante atualização, inserindo informações relevantes não só da proteína (regulação) como também do organismo onde foi identificada e entre outros.

Com análise e revisão da informação anotada no CanisTecOme, concluímos que este trabalho permitiu obter possíveis biomarcadores para determinadas patologias de acordo com uma análise de exclusividade de proteínas em doença entre as amostras biológicas. Este é um resultado, mas dados quantitativos das proteínas seriam necessários para associar a melhor proteína que caracteriza a patologia.

No que diz respeito à metodologia estabelecida para a recolha, armazenamento e caracterização de amostras de saliva esta mostrou-se com a qualidade adequada para o estabelecimento de um futuro repositório biológico de saliva animal.

6. Perspectivas futuras

Como este trabalho tem fundamento e é promissor vai continuar a ser desenvolvido no futuro.

As nossas perspetivas futuras são:

1. Continuação da pesquisa de novos dados publicados de proteómica do *Canis lupus familiaris*.
2. Atualização constante da base de dados- CanisTecOme.
3. Integração de dados quantitativos e não só qualitativo no CanisTecOme.
4. Verificar se as proteínas exclusivas em doença, sugeridas neste trabalho como biomarcadores são mesmo biomarcadores viáveis.
5. Testar a saliva *in vivo* como um promissor fluido de diagnóstico.

Um longo caminho ainda há a percorrer para perceber realmente se a saliva será mesmo um promissor fluido de diagnóstico para cão.

7. Bibliografia

1. Miguel, A. & Vieira, M. Leishmaniose Canina Estudo de casos clínicos Leishmaniose Canina Estudo de casos clínicos. (2013).
2. Solano-Gallego, L. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit. Vectors* **4**, 86 (2011).
3. Manuscript, A. & Pathogen, E. Z. NIH Public Access. **7**, 736–747 (2012).
4. Isabel, S., Lança, D. E. O. & Canina, L. Contribuição para o estudo da leptospirose canina em portugal. (2011).
5. André-Fontaine, G. Canine leptospirosis--do we have a problem? *Vet. Microbiol.* **117**, 19–24 (2006).
6. Miller, I. *et al.* In between - Proteomics of dog biological fluids. *J. Proteomics* **106**, 30–45 (2014).
7. Mayeux, R. Biomarkers : Potential Uses and Limitations. **1**, 182–188 (2004).
8. Resource, P. I. UniProt : the Universal Protein Resource About the UniProt.
9. McCarthy, F. M. *et al.* AgBase: a functional genomics resource for agriculture. *BMC Genomics* **7**, 229 (2006).
10. Thomas, P. D. *et al.* PANTHER : A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. 2129–2141 (2003). doi:10.1101/gr.772403.2
11. Arrais, J. P. *et al.* OralCard: a bioinformatic tool for the study of oral proteome. *Arch. Oral Biol.* **58**, 762–72 (2013).
12. Coelho, E. D. *et al.* Computational prediction of the human-microbial oral interactome. *BMC Syst. Biol.* **8**, 24 (2014).
13. Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–504 (2003).
14. Polovic, N. *et al.* Dog saliva - an important source of dog allergens. *Allergy* **68**, 585–92 (2013).
15. De Sousa-Pereira, P. *et al.* Characterization of thymosin β 4 in mammals' saliva. *Peptides* **40**, 1–7 (2013).
16. Thanomsridetchai, N. *et al.* Comprehensive Proteome Analysis of Hippocampus , Brainstem , and Spinal Cord from Paralytic and Furious Dogs Naturally Infected with Rabies. 4911–4924 (2011).

17. Schlieben, P. *et al.* Differences in the proteome of high-grade versus low-grade canine cutaneous mast cell tumours. *Vet. J.* **194**, 210–4 (2012).
18. Grider, A., Mouat, M. F., Mauldin, E. a & Casal, M. L. Analysis of the liver soluble proteome from bull terriers affected with inherited lethal acrodermatitis. *Mol. Genet. Metab.* **92**, 249–57 (2007).
19. Gharbi, M., Sanchez, C., Mazzucchelli, G., De Pauw, E. & Henrotin, Y. Identification of differential pattern of protein expression in canine osteoarthritis serum after anterior cruciate ligament transection: a proteomic analysis. *Vet. J.* **197**, 848–53 (2013).
20. Bracha, S. *et al.* A multiplex biomarker approach for the diagnosis of transitional cell carcinoma from canine urine. *Anal. Biochem.* **455**, 41–7 (2014).
21. Roerig, A., Carlson, R., Tipold, A. & Stein, V. M. Cerebrospinal fluid tau protein as a biomarker for severity of spinal cord injury in dogs with intervertebral disc herniation. *Vet. J.* **197**, 253–258 (2013).
22. Miyasho, T., Nakamura, K., Nomura, S., Kawasako, K. & Nakade, T. High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein is Present in the Cerebrospinal Fluid of Dogs with Encephalitis. **1**, (2011).
23. Tvarijonaviciute, A., Gutiérrez, A. M., Miller, I., Razzazi-fazeli, E. & Tecles, F. A proteomic analysis of serum from dogs before and after a controlled weight-loss program. *DAE* **43**, 271–277 (2012).
24. Antognoni, M. T., Siepi, D., Porciello, F. & Fruganti, G. Use of Serum Cistatin C Determination as a Marker. **29**, 265–267 (2005).
25. Kule, J. *et al.* Identification of serum biomarkers in dogs naturally infected with *Babesia canis canis* using a proteomic approach. 1–10 (2014).
26. Loor, J. De, Daminet, S., Smets, P., Maddens, B. & Meyer, E. Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs. 998–1010 (2013).
27. Tacanho, J. P., Manuela, M. & Tatiane, C. E. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 1–6

8. Anexos

Anexo 1

Base de datos CanisTecOme

UniProtKBAC	Protein name	Organism	Sample	Breed	Healthy	Disease	Regulation	Disease name	Biomarker	Citation (NCBI ID)
P19708	Serum amyloid-A (SAA)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×	Increased	Canine leishmaniasis		20440645
P18649	Apolipoprotein E	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P12278	Apolipoprotein C-II	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
F6Y2P4	Probable phospholipid-transporting ATPase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
PO1785	Ig heavy chain V	<i>Canis lupus</i>	<i>Serum</i>	German shepherd		×		Canine leishmaniasis		20440645

		<i>familia ris</i>		and Mongrel						
H9GWY1	Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain H4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P40321	IL-2 receptor γ -chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×	Overexpressed	Canine leishmaniasis		20440645
Q697L1	Transient receptor potential cation channel subfamily V	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×	Increased	Canine leishmaniasis		20440645
E2QUS0	Probable dimethyladenosine transferase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
E2RE76	Apolipoprotein A-IV (APOA4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P01618	Ig-kappa chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P68213	Fibrinogen alpha chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645

P02677	Fibrinogen beta chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
P56595	Apolipoprotein C-I	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
Q50KA9	Nucleoside diphosphate kinase A	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
F6UME0	Alpha-2-macroglobulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
E2R141	Complement C8	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
Q9GLD3	Transferrin receptor protein 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
Q8WN22	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
Q9TV65	Angiotensinogen	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd and Mongrel		×		Canine leishmaniasis		20440645
E2RPW3	Serum paraoxonase/arylesterase 1	<i>Canis lupus</i>	<i>Serum</i>	German shepherd		×		Canine leishmaniasis		20440645

		<i>familia ris</i>		and Mongrel						
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Pyometra		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Panniculitis		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Acute pancreatitis		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Polyarthrits		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Hemangiosarcoma		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Hypothyroidism		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Cushing Disease		18319571
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×		Diabetes mellitus		18319571

P51742	TNF- α	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Various breeds		×		Canine Babesiosis		24553975
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
P49822	Serum albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
	Immunoglobulin gamma heavy chain D	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
H9GWR8	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5-like (IGLL1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
P09582	Arginine esterase precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
	Immunoglobulin gamma heavy chain B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
P60529	Hemoglobin subunit alpha	<i>Canis lupus</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary		24566125

		<i>familia ris</i>						dirofilariosis		
P68213	Fibrinogen alpha chain	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
	Immunoglobulin gamma heavy chain A	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		Canine cardiopulmonary dirofilariosis		24566125
P54714	Trioseposphate isomerase	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>		×	×	Increased protein in disease	Lymphoma		17438110
P54714	Trioseposphate isomerase	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>		×	×	Increased protein in disease	Lymphoma		17438110
P54714	Trioseposphate isomerase	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>	Mixed greed, Newfoundl and, Dalmatian, Pembroke Welsh corgi, and Australian shepherd		×	Misregulation	Lymphoma		17438110
F1PNS6	Xaa-Pro dipeptidase	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>	Mixed greed, Newfoundl and, Dalmatian, Pembroke	×	×		Lymphoma		17438110

				Welsh corgi, and Australian shepherd						
E2R413	Macrophage capping protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>	Mixed breed, Newfoundland and, Dalmatian, Pembroke Welsh corgi, and Australian shepherd	×	×		Lymphoma		17438110
F1Q0J0	GST-P	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Lymph nodes</i>	Mixed breed, Newfoundland and, Dalmatian, Pembroke Welsh corgi, and Australian shepherd	×	×	Decreased	Lymphoma		17438110
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Tear</i>	Weimaraner, English Cocker Spaniel, Poodle, Irish Setter, Mongrel, Boxer, Pit Bull, German	×	×	Increased	Various cancers		18164356

				Shepherd, Brazilian Fila, Vizsla, Doberman Pinscher and Miniature Pinscher						
O18840	Actin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Tear</i>	Weimaraner, English Cocker Spaniel, Poodle, Irish Setter, Mongrel, Boxer, Pit Bull, German Shepherd, Brazilian Fila, Vizsla, Doberman Pinscher and Miniature Pinscher	×	×	Increased	Various cancers		18164356
	Protein in an analogous position to lacryglobulin in humans	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Tear</i>	Weimaraner, English Cocker Spaniel, Poodle, Irish Setter, Mongrel, Boxer, Pit	×	×		Various cancers		18164356

				Bull, German Shepherd, Brazilian Fila, Vizsla, Doberman Pinscher and Miniature Pinscher					
	Protein major canine allergen, analogous to lipocalin in humans	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Tear</i>	Weimaraner, English Cocker Spaniel, Poodle, Irish Setter, Mongrel, Boxer, Pit Bull, German Shepherd, Brazilian Fila, Vizsla, Doberman Pinscher and Miniature Pinscher	×	×		Various cancers	18164356
Q6EIZ0	Cytokeratin 10	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biospy: Mammary gland</i>	Terrier		×		Mammary gland tumor	23375365
Q6EIZ1	Cytokeratin 2	<i>Canis lupus</i>	<i>Biospy: Mammary</i>	Terrier		×		Mammary gland tumor	23375365

		<i>familia ris</i>	<i>gland</i>						
Q6E1Y9	Cytokeratin 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biospy: Mammary gland</i>	Terrier		×		Mammary gland tumor	23375365
E2RSU3	Elongation factor-like protein (EF-Tu)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biospy: Mammary gland</i>	Terrier		×		Mammary gland tumor	23375365
E2RSF2	Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biospy: Mammary gland</i>	Terrier		×		Mammary gland tumor	23375365
J9NWQ2	Angiopoietin-related protein 5-like	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies	23464525
E2QXJ0	BPI fold-containing family A member 2 isoform 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies	23464525
J9NZ24	Mucin-5B	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies	23464525
	IgA heavy chain constant region	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies	23464525
P49822	Albumin (Can f 3)	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies	23464525

		<i>ris</i>								
O18873	Major allergen Can f 1 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
P49822	Serum albumin precursor (Can f 3)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
H2B3G5	Allergen Fel d 4-like (Can f 6)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
O18874	Minor allergen Can f 2 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
E2QXE7	BPI fold-containing family A member 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
D7PBH4	Allergen Can f 4 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Saliva</i>	Various breeds		×		Allergies		23464525
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Chronic kidney disease (CKD)	×	23952327
	Immunoglobulin G	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Leishmaniasis	×	23952327
	Immunoglobulin G	<i>Canis</i>	<i>Urine</i>			×		leptospirosis	×	23952327

		<i>lupus familia ris</i>								
	Immunoglobulin G	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		pyometra	×	23952327
	Immunoglobulin G	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		hypercortisolism	×	23952327
	Immunoglobulin G	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		X-Linked Hereditary Nephropathy (XLHN)	×	23952327
	Immunoglobulin G	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		Chronic kidney disease (CKD)	×	23952327
	Immunoglobulin A	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		Leishmaniasis	×	23952327
	Immunoglobulin A	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		leptospirosis	×	23952327
	Immunoglobulin A	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>			×		pyometra	×	23952327
F1Q4D9	Retinol-binding protein	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Urine</i>			×		Chronic kidney disease (CKD)	×	23952327

		<i>ris</i>								
F1Q4D9	Retinol-binding protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		X-Linked Hereditary Nephropathy (XLHN)	×	23952327
F1Q4D9	Retinol-binding protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		urolithiasis	×	23952327
P19341	beta 2-Microglobulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		X-Linked Hereditary Nephropathy (XLHN)	×	23952327
J9NUI6	α1-Microglobulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		X-Linked Hereditary Nephropathy (XLHN)	×	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Pyometra	×	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		aminoglycoside-nephrotoxicosis	×	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Splatin-induced acute kidney injury (AKI)	×	23952327
	N-acetyl-β-D-glucosaminidase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		pyelonephritis	×	23952327

E2RTH3	γ-Glutamyltransferase	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Pyometra	×	23952327
E2RTH3	γ-Glutamyltransferase	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		aminoglycoside-nephrotoxicosis	×	23952327
E2RTH3	γ-Glutamyltransferase	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		cisplatin-induced AKI, naturally occurring AKI	×	23952327
F1PVW0	Lactate dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Cisplatin-induced AK	×	23952327
Q9NOV1	Alkaline phosphatase	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Pyometra	×	23952327
Q862Z3	Tamm–Horsfall Protein (uromodulin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Chronic kidney disease (CKD)	×	23952327
Q862Z3	Tamm–Horsfall Protein (uromodulin)					×		urolithiasis	×	23952327
Q29416	IL-2	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Acute kidney injury	×	23952327
P41324	IL-8	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine			×		Cisplatin-induced AKI	×	23952327

P52203	Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Cisplatin-induced AKI	×	23952327
P48749	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Cisplatin-induced AKI	×	23952327
	Keratinocyte derived chemokine (KC)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×		Cisplatin-induced AKI	×	23952327
P49822	Serum albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
P02648	Apolipoprotein A1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
A11LJ0	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
H9GWR8	Immunoglobulin k-like polypeptide	<i>Canis lupus</i>	<i>Serum</i>	German shepherd,	×	×		Multicentric lymphoma		23369383

		<i>familia ris</i>		Boxer and Labrador retriever						
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
J9PAD1	Complement C4	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
	Immunoglobulin heavy chains	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
F1PZR4	Haemopexin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever	×	×		Multicentric lymphoma		23369383

E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
F6UME0	α2 macroglobulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
P18649	Apolipoprotein E	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and		×		Multicentric lymphoma		23369383

		<i>ris</i>		Labrador retriever						
F1PH87	α-antichymotrypsin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
E2QW61	Lipopolysaccharide binding protein (LPS)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
E2RES2	Antithrombin-III (AT III)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
J9NUI6	Inter-α-trypsin inhibitor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	German shepherd, Boxer and Labrador retriever		×		Multicentric lymphoma		23369383
E2R5B2	Canine neuron-specific enolase (NSE)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Pugs, Shih-Tzus, Yorkshire Terriers, Chihuahuas, Malteses and Pekingeses	×	×	Increased	Meningoencephalitis of unknown etiology	×	22251802
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802

F1PCK2	Alpha-1-B glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2R4V3	Alpha-2-antiplasmin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
Q9TV65	Angiotensinogen	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2RES2	Antithrombin-III (ATIII)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2RE76	Apolipoprotein A-IV (APOA4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
P33703	Beta-2-glycoprotein 1 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown		22251802

		<i>familia ris</i>						etiology		
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
E2RS75	Complement factor B precursor (C3/C5 convertase)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
J9P5F0	Complement factor D precursor (C3 convertase activator)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
J9NTL7	Complement factor H precursor (H factor 1)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
E2RCJ9	Contactin 1 isoform 2 precursor isoform 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
P18649	Apolipoprotein E	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
E2RMA3	Osteonectin/SPARC	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802
F6Y3P9	Gelsolin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Cerebrosp inal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephaliti s of unknown etiology		22251802

P19006	Haptoglobin heavy chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
F1PZR4	Hemopexin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
F1PQL8	Hypothetical protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
	Immunoglobulin gamma heavy chain B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
	Immunoglobulin gamma heavy chain C	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
H9GWR8	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 1 precursor (IGLL1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2FGH6	Kallikrein 6 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2R886	Kininogen-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2R833	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 (LRG1)	<i>Canis lupus</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802

		<i>familia ris</i>						etiology		
F2Z4Q7	Pigment epithelium-derived factor (PEDF)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2RC23	Procollagen C-proteinase enhancer protein precursor (PCPE)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
A1ILJ0	Serpin peptidase inhibitor, clade A (α -AT)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
P49822	Serum albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2RPF3	SPARC-like protein 1 precursor (High endothelial venule protein)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2R5U8	Transthyretin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802

Q4GX49	Zinc-alpha-2-glycoprotein precursor (Zn-alpha-2-glycoprotein)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×		Meningoencephalitis of unknown etiology		22251802
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Beagles	×	×	Expressed significantly more before vs after weight loss	Obesity	×	22591953
F1Q4D9	Retinol-binding protein 4 (RBP4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Beagles	×	×	Expressed significantly more before vs after weight loss	Obesity	×	22591953
A11LJ0	Serpin peptidase inhibitor, clade A (α -AT)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Beagles	×	×	Decreased in disease	Obesity	×	22591953
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386

P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
P49822	Serum albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386

E2R886	Kininogen-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
A1ILJ0	Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 1 precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer,	×					23369386

				Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger						
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
J9PAD1	Complement C4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386

F1PZR4	Haemopexin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
	Immunoglobulin heavy chains	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386

H9GWR8	Immunoglobulin k-like polypeptide	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Flat-Coated Retrievers, Labrador Retrievers, cross-breeds, Greyhounds, Boxer, Italian Spinone, British Bulldog and Leonberger	×					23369386
Q6889D1	TLR-2	<i>Canis lupus familiaris</i>				×				23532922
F1PDB9	TLR-4	<i>Canis lupus familiaris</i>				×				23532922

Q512M8	TLR-9	<i>Canis lupus familiaris</i>				×				23532922
A1ILJ0	α 1-proteinase inhibitor (α1-PI)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Feces</i>			×				23532922
J9P8S3	Calprotectin (S100A8/S100A9)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×				23532922
J9P8S3	Calprotectin (S100A8/S100A9)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Feces</i>			×				23532922
E2RNM5	N-Methylhistamine (NMH)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×				23532922
E2RNM5	N-Methylhistamine (NMH)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Feces</i>			×				23532922
	Leukotriene E4 (LTE4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>			×				23532922
E2RCE0	Cystatin C	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Mix of breeds		×	Increased	Renal insufficiency	×	16244971

T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Canine Babesiosis		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Kennel Cough		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Ehrlichiosis		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Escherichia coli sepsis		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Leishmaniosis		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Leptospirosis		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Parvovirus		15902658
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>						Trypanosomiasis		15902658
P19708	Serum amyloid-A (SAA)	<i>Canis lupus</i>						Kennel Cough		15902658

		<i>familia ris</i>								
P19708	Serum amyloid-A (SAA)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Leishmaniosis	15902658
P19708	Serum amyloid-A (SAA)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Parvovirosis	15902658
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familia ris</i>							Leishmaniosis	15902658
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familia ris</i>							Trypanosomiasis	15902658
F6Y713	Alpha-1-acid glycoprotein (AGP)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Canine Babesiosis	15902658
F6Y713	Alpha-1-acid glycoprotein (AGP)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Ehrlichiosis	15902658
F6Y713	Alpha-1-acid glycoprotein (AGP)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Parvovirosis	15902658
F1PAX2	Ceruloplasmin (Cp)	<i>Canis lupus familia ris</i>							Leishmaniosis	15902658

F6Y713	Alpha-1-acid glycoprotein (AGP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
E2RES2	Antithrombin-III (AT III)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Decreased	Canine babesiosis	×	24885808
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis</i>	<i>Serum</i>			×	Decreased	Canine babesiosis	×	24885808

		<i>lupus familia ris</i>								
E2RE76	Apolipoprotein A-IV (APOA4)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
F1PZR4	Hemopexin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808

E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Concentration of Hp can be influenced	Canine babesiosis	×	24885808
E2R4V3	Alpha-2-antiplasmin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808

E2R833	Leucine-rich- α 2-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×	Increased	Canine babesiosis	×	24885808
Q4GX49	Zinc-alpha-2-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808
	Immunoglobulin gamma heavy chain B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808
	Immunoglobulin gamma heavy chain C	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808

	IgA heavy chain constant region	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>			×		Canine babesiosis	×	24885808
T2KEN6	C-reactive protein (CRP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×	×	Increased with disease	Canine babesiosis	×	24885808
E2R3H9	Protein tau	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>			×	Increased	Intervertebral disc herniation	×	23499240
Q6YKA4	HMGB1 (High-mobility group box 1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>	Beagles	×	×	Increased in disease	Encephalitis	×	21441719
F1PCV3	Angiotensin 1-converting enzyme	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

Q3HTU2	Angiotensin 1-converting enzyme 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PHI4	Aminoacylase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PAL5	Angiotensinogen	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2QXS7	S-adenosylhomocysteine	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				×	24773128
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PBT3	Fructose-bisphosphate	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
Q6UKI2	Amnionless protein precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

		<i>familia ris</i>								
Q9N2J4	Aquaporin 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×				×	24773128
E2RRS0	ADP-ribosylation factor-(like) 6	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PPR8	Argininosuccinate lyase isoform 3	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2QU08	Argininosuccinate synthetase 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RR34	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a4	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2R1W5	Atpase, H+ transporting, lysosomal 56/58 kDa, V1 subunit B1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PGZ1	UDP-Gal:bGlcNac b 1,4-galactosyltransferase 1, membrane-bound form	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PDY8	Carbonic anhydrase II	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

E2RBS1	Carbonic anhydrase IV precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2R417	Chromatin modifying protein 2B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				×	24773128
Q9GLN3	alpha 3 type VI collagen (isoform 5 precursor)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RCL5	Crystalline, I isoform (1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RDY8	Cystathionase isoform (2), [we got 1]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1P9I9	Cathepsin A (precursor)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
Q4LAL9	Cathepsin D	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
J9NSU7	Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1	<i>Canis lupus</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

		<i>familia ris</i>							
E2RNC3	Dynamin 2 (isoform 4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
E2RSE5	Dihydropyrimidinase [isoform 1]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
J9NV58	Dysferlin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
E2R612	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
Q9BEA0	Epidermal growth factor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
Q8MJD1	Elastase (2), neutrophil	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
F6XRM5	Glutamyl aminopeptidase (aminopeptidase A)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128
E2RAN6	Fructose-1, 6-bisphosphatase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				24773128

P68213	Fibrinogen, a (polypeptide isoform a-E)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
Q53VB8	Ferritin, light (polypeptide), [chain]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2REV9	(Acid) a-glucosidase preprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2R2C3	γ-glutamyltransferase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2R2C3	Glucose [6-]phosphate isomerase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1Q2D2	Glutathione synthetase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F6X9H7	4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2QX67	Hydroxyprostaglandin dehydrogenase 15-(NAD)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PZR4	Hemopexin	<i>Canis lupus</i>	<i>Urine</i>		×				×	24773128

		<i>familia ris</i>								
	Immunoglobulin-y	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×				×	24773128
F1Q0B8	Kallikrein 1 preprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
P38486	Galectin 3 [binding precursor]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
F1PHH4	[Ig superfamily containing] Leucine-rich repeat (kinase 2)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
G1K265	Lysozyme precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RQ25	Membrane metallo-endopeptidase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
J9NU82	Myosin[-6] (heavy chain 14) isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RMB9	N-myc downstream regulated gene 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

J9NVX3	Nebulin [related anchoring protein isoform S isoform 2]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2QS13	DJ-1 protein [isoform 1]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
L7N0I9	[D-3] Phosphoglycerate dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
Q29536	Pyruvate kinase (liver, and RBC isoform)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
Q52S86	Podocalyxin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RGU7	Protein kinase C (η) [& casein kinase substrate in neurons 3 isoforms]	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
J9NZU4	Prominin 1 [precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128
E2RK37	RAB3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>		×					24773128

F1Q4D9	Retinol-binding protein 4 (RBP4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×				×	24773128
E2RRC6	Radixin [moesin-binding phosphoprotein 50]	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
F6UKR7	Solute carrier family 12, member 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
Q9GKM3	Solute carrier family 3, member 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
Q862Z3	Tamm–Horsfall Protein (uromodulin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
Q9XSB8	Tripeptidyl-peptidase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
E2RGP6	Tumor susceptibility gene	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128

P63050	Ubiquitin A-52 ribosomal protein fusion product 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×				×	24773128
Q862Z3	Tamm-Horsfall Protein (uromodulin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine		×					24773128
E2R002	Prostaglandin reductase 1 isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma		24704347
E2RHG2	Peroxiredoxin-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma		24704347
F1P8G0	Fibrinogen gamma chain isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma		24704347
Q7YQC6	Heat shock protein 70	<i>Canis lupus</i>	Urine	Scottish Terrier,		×		Transitional cell carcinoma		24704347

		<i>familiaris</i>		American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed					
Q4KKT6	Collagen alpha-3(VI) chain precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma	24704347
F1PBZ4	NAD(P)H dehydrogenase [quinone] 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma	24704347
F1PBL1	14-3-3 protein zeta/delta isoform 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma	24704347
Q3YIX4	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Urine</i>	Scottish Terrier, American Eskimo,		×		Transitional cell carcinoma	24704347

				Welsh Corgi and mixed breed						
E2R413	Macrophage-capping protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma		24704347
F1PDY8	Carbonic anhydrase II	<i>Canis lupus familiaris</i>	Urine	Scottish Terrier, American Eskimo, Welsh Corgi and mixed breed		×		Transitional cell carcinoma		24704347
J9P127	Thymosin β 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	Saliva	Mixed breeds	×					23262355
P80009	Plasminogen	<i>Canis lupus familiaris</i>	Serum		×					24768907

E2RS75	Complement factor B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
	Ig γ chain (multimer)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
F1PGM9	C4b-binding protein α chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
	Ig μ chains	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907

F1PCK2	α 1B glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
E2R886	Kininogen-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
F1PZR4	Hemopexin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
	Ig α chains	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907

A1ILJ0	α 1-Antitrypsin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
E2QUV3	α 2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
E2R5U8	Transthyretin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
	Ig γ chains	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907

E2RES2	Antithrombin-III (ATIII)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
F1PDJ7	Zinc- α 2-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907
P19006	Haptoglobin β chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24768907

J9PAD1	Complement C4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
	Ig L chains	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
P19006	Haptoglobin α chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907
E2R5U8	Transthyretin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×				24768907

E2R4V3	Alpha-2-antiplasmin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
O18840	Actin-gamma	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
P02648	Apolipoprotein A-I (APOA1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2RE76	Apolipoprotein A-IV	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2RES2	Antithrombin-III (ATIII)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
Q4GX49	Zinc-alpha-2-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
J9PAD1	Complement C4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564

E2RS75	Complement factor B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
P25473	Clusterin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
F1P8G0	Fibrinogen gamma chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2R5W6	Vitamin D-binding protein (DBP)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
F6Y3P9	Gelsolin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
G1K2D9	Haptoglobin-related protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2QZQ1	Inhibitor of carbonic anhydrase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564

E2RPW3	Paraoxonase/arylesterase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
F1Q4D9	Retinol-binding protein 4 (RBP4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Follicular fluid</i>	Beagles	×					21040564
E2R5B2	α-Enolase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Terrier, Mixed breed and German shepherd		×		Breast cancer		24338489
E2RT65	Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Terrier, Mixed breed and German shepherd		×		Breast cancer		24338489
P54714	Triose phosphate isomerase (TPI)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Terrier, Mixed breed and German shepherd		×		Breast cancer		24338489

E2RSF2	Manganese superoxide dismutase (Mn-SOD)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Terrier, Mixed breed and German shepherd		×		Breast cancer		24338489
Q6EIZ0	Cytokeratin 10	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Terrier, Mixed breed and German shepherd		×		Breast cancer		24338489
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>		×					24366156
Q28280	β -amyloid	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Cerebrospinal fluid</i>			×		Alzheimer's disease		23582658
Q863Z4	Myotrophin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever		×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F6X7L0	Tropomyosin 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever		×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RQ77	Creatine kinase, mitochondrial 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

		<i>ris</i>								
F6Y713	similar to Alpha-1 acid glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R9P5	Cysteine and glycine-rich protein 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RGI4	Chloride intracellular channel 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PCK2	Alpha-1-B glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2QUV3	Alpha-2-HS-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PGY1	Putative heat shock protein HSP 90-alpha A4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1QOJ0	Glutathione S-transferase PI isozyme YD1-2YD1-2(IV-HB)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q8HY67	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
P49822	Serum albumin (allergen Can f 3)	<i>Canis</i>	<i>Biopsy:</i>	Golden	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular		21410286

		<i>lupus familiaris</i>	<i>Muscle</i>	Retriever			ed	dystrophy		
P28490	Calreticulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R9B6	Fetuin B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
J9NXT1	similar to tubulin, alpha 2 isoform 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
J9P965	PDZ and LIM domain 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1P6B7	Annexin I	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PZR4	Hemopexin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F2Z4N7	Cardiac actin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RAH4	Tropomyosin beta chain (Tropomyosin-2)	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

		<i>ris</i>								
E2RJL1	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
	aspartate aminotransferase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PJW2	perilipin 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PV96	Myosin, light chain 1, alkali; skeletal, fast	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q6TEQ7	Annexin A2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1Q3Y0	profilin 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q7YRF5	Cardiac titin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q8MJ47	Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

H9GW55	Phosphoglycerate mutase 2 (muscle)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
L7N0I7	Tubulin, beta 2C	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2R8F7	Myosin, light chain 3, alkali; ventricular, skeletal, slow	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
F1PLS4	Vimentin-like protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2QYC2	Tubulin, beta 6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2RBM2	Phosphate cytidyltransferase 1, choline. alpha	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2RKV6	Myosin binding protein H	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
Q076A8	Developmental myosin heavy chain embryonic	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
F1PYD6	Myopalladin	<i>Canis</i>	<i>Biopsy:</i>	Golden	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular	21410286

		<i>lupus familia ris</i>	<i>Muscle</i>	Retriever			ed	dystrophy		
J9NT37	Prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RAH4	Tropomyosin beta chain (Tropomyosin-2)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
J9NT16	Eukaryotic translation elongation factor 1 beta 2	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F6XIP5	Myosin, light chain 6B	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PJ63	Bridging integrator 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Overrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RRC9	Phosphoglycerate kinase 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PLG8	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-2 to C-3 short chain	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R5B2	Enolase 3 (beta, muscle)	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

		<i>ris</i>								
Q28259	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (EC 1.2.1.12)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RCY8	Aconitase 2, mitochondrial	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q076A8	Developmental myosin heavy chain embryonic	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RSI5	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein I	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
J9P7A6	Aldolase A	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2QXA3	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q076A7	Myosin-2 (Myosin heavy chain 2)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
P49824	Myosin-7 (Myosin heavy chain 7)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
Q076A4	Myosin-8 (Myosin heavy chain 8)	<i>Canis</i>	<i>Biopsy:</i>	Golden	×	×	Underreprese	Duchenne muscular		21410286

		<i>lupus familiaris</i>	<i>Muscle</i>	Retriever			nted	dystrophy		
F1PUL4	Phosphoglucomutase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PDZ7	Carbonic anhydrase III, muscle specific	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R974	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R507	Fatty acid binding protein 3, muscle and heart	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PYG8	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
B4YY02	Adenylate kinase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RRD4	Peroxiredoxin 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2QS13	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

		<i>ris</i>								
E2RR27	Ubiquinol-cytochrome c reductase hinge protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PWM7	Heat shock protein, alpha-Crystallin-related. B6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
O46674	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RNG2	similar to ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PGU1	Myosin regulatory light chain 2, skeletal muscle isoform	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
	aspartate aminotransferase 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F1PC72	voltage-dependent anion channel 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RR74	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286

P05123	Creatine kinase M-type	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
P52784	6-phosphofructokinase, muscle type (Phosphofructokinase 1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×		Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
J9P849	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2REMO	Cytochrome c-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2RKG3	Translocase of outer mitochondrial membrane 70 homologue	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2RRD1	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286
E2RRB2	ATPase, Ca ²⁺ transporting, cardiac muscle, fast twitch 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy	21410286

E2QZV5	Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R5B2	ENO1 enolase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R268	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RL61	Myomesin-3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2RMB7	Myotilin (Titin immunoglobulin domain protein)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
J9P2G7	Cofilin 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×	×	Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
E2R3Y5	Adenosine monophosphate deaminase 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>	Golden Retriever	×		Underrepresented	Duchenne muscular dystrophy		21410286
F6UYJ9	Calreticulin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109

F1PL97	Prolyl-4-hydroxylase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×	Decrease	Lethal acrodermatitis		17693109
E2RAU5	75 kDa Glucose regulated protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×	Decrease	Lethal acrodermatitis		17693109
E2RD86	ER-60 protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109
F1PBJ8	Aldehyde dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109
Q8HZM5	Glutamine synthetase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109
E2R5B2	α -enolase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109
F1Q2N5	Glutamate dehydrogenase 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109
P19006	Hatoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×	Increase	Lethal acrodermatitis		17693109
E2R2G3	Regucalcin	<i>Canis lupus</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×		Lethal acrodermatitis		17693109

		<i>familia ris</i>								
Q6FHP5	Prohibitin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×	Decrease	Lethal acrodermatitis		17693109
Q6EIZ0	Keratin 10	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Liver</i>	Bull terrier		×	Decrease	Lethal acrodermatitis		17693109
E2RB31	150 kDa oxygen-regulated protein precursor (Orp150) (Hypoxia up-regulated 1)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
E2R5B9	Glutathione S-transferase Mu 3 (GSTM3-3) (GST class-mu 3) (hGSTM3-3) isoform 1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
Q8MJ04	Oxygen-regulated protein 1; AltName: Full=Retinitis pigmentosa RP1 protein homologue	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
E2RHG2	Peroxiredoxin 1	<i>Canis lupus familia</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679

		<i>ris</i>								
Q6TEQ7	Annexin A2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
Q6TEQ7	Annexin A2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
E2RCI8	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	NS paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
E2RCI8	Annexin A6 (Annexin VI) (Lipocortin VI) (P68) (P70) (Protein III) (Chromobindin 20) (67 kDa calelectrin) (Calphobindin-II) (CPB-II) isoform 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	NS paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
	Cytochrome P450 2B12 (CYP11B12)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
B4YUE0	Dynamin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
F1PYU3	Fascin 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679

E2RS09	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
E2RS09	Glial fibrillary acidic protein, astrocyte (GFAP) isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
Q076A7	Myosin, heavy chain 2, skeletal muscle, adult	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
J9NVX3	Nebulin-related anchoring protein isoform 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
F6UNP7	NEFM protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
Q8HZW3	Neurofilament, heavy polypeptide 200 kDa	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
F1PQD4	Septin-8	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
E2RFJ7	TUBB2B protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	NS paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
A0A077LQA5	Tubulin, alpha-1 isoform 9	<i>Canis lupus</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679

		<i>familia ris</i>								
E2RFJ7	Tubulin, alpha-2 chain (Alpha-tubulin 2) isoform 7	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↓ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
F1PKR3	Vinculin (Metavinculin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
F1PCJ6	Xin actin-binding repeat containing 2 isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
E2RNB6	Alpha-Crystallin B chain (Alpha(B)-Crystallin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
E2RNB6	Alpha Crystallin B chain (Alpha(B)-Crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	NS paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
E2RNB6	Alpha Crystallin B chain (Alpha(B)-Crystallin) (Rosenthal fiber component) (Heat-shock protein beta-5) (HspB5) isoform 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
	DnaJ (Hsp40) homologue, subfamily C, member 15 (predicted), isoform CRA_b	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
E2ROT6	Heat shock cognate 71 kDa protein (Heat shock 70 kDa protein 8)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679

P41148	Heat shock protein 90 kDa beta, member 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
P41148	Heat shock protein 90 kDa beta, member 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↓furious	Rabies		21942679
P42929	Heat shock protein beta-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↑ furious	Rabies		21942679
P42929	Heat shock protein beta-1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↑paralytic; NS furious	Rabies		21942679
	Immunoglobulin heavy chain variable region	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↑paralytic; NS furious	Rabies		21942679
	Interferon alpha 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	NSparalytic; ↑ furious	Rabies		21942679
F1PUL9	SARM1 protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	NSparalytic; ↑ furious	Rabies		21942679
F1P9U4	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (CRMP-2) isoform 6 (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	NS paralytic; ↓furious	Rabies		21942679

F1P9U4	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Brainstem</i>			×	↑ paralytic; NS furious	Rabies		21942679
F1P9U4	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
F1P9U4	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Spinal cord</i>			×	↓ paralytic; ↓ furious	Rabies		21942679
F1P9U4	Dihydropyrimidinase related protein-2 (DRP-2) (Turned on after division, 64 kDa protein) (TOAD-64) (Collapsin response mediator protein 2) (CRMP-2) isoform 6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Hippocampus</i>			×	NSparalytic; ↑ furious	Rabies		21942679
F1PIX8	Complement C3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Increased in OA	Osteoarthritis (OA)		23831215

E2RE76	Apolipoprotein A-IV	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Increased and decreased in OA	Osteoarthritis (OA)		23831215
F1PMM1	Peroxisomal D3, D2-enoyl-CoA isomerase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Increased in OA	Osteoarthritis (OA)		23831215
E2R9B6	Fetuin-B	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Increased in OA	Osteoarthritis (OA)		23831215
F1P6E1	Complement C1s	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
F1PWR2	Complement C4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215

E2RL01	Acetyl-coenzyme A carboxylase alpha	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
F1Q1K9	Hyaluronan binding protein 2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
H9GWY1	Inter-alpha inhibitor H4	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
J9P8M2	Fibronectin preprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
E2QZ19	Afamin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
J9P430	Serotransferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
F1PCK2	Alpha-1B-glycoprotein	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
P49822	Serum albumin	<i>Canis</i>	<i>Serum</i>	Dogs		×	Decreased in	Osteoarthritis (OA)		23831215

		<i>lupus familia ris</i>		crossbred			AO			
	IgG, heavy chain	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Serum</i>	Dogs crossbred		×	Decreased in AO	Osteoarthritis (OA)		23831215
Q9TUP7	Orexin receptor type 2 (Ox-2-R) (Ox2-R) (Ox2R) (Hypocretin receptor type 2)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	Labradors, dobermans and dachshunds		×		Narcolepsy		
Q28281	S-arrestin (48 kDa protein) (Retinal S-antigen) (S-AG) (Rod photoreceptor arrestin)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	some breeds		×		Autoimmune uveitis		
Q6UKI2	Protein amnionless	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Megaloblastic anemia 1		
O18835	Beta-glucuronidase (EC 3.2.1.31)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Mucopolysaccharidosis type VII		
O97492	Catalase (EC 1.11.1.6)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Acatlasemia		
E2R1I5	Coiled-coil domain-containing protein 39	<i>Canis lupus</i>	Proteins imported			×		Primary ciliary dyskinesia		

		<i>familia ris</i>	from UniProt							
Q9MZT1	Chloride channel protein 1 (CIC-1) (Chloride channel protein, skeletal muscle)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	miniature Schnauzer		×		Autosomal recessive myotonia congenita		
Q5JZQ9	Ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5 (Protein CLN5)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	Border collie		×		Neuronal ceroid lipofuscinosis		
Q5JZQ7	Protein CLN8	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	English setters		×		Neuronal ceroid lipofuscinosis		
Q8MJD7	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-3 (Cone photoreceptor cGMP-gated channel subunit beta) (Cyclic nucleotide-gated cation channel modulatory subunit) (Cyclic nucleotide-gated channel beta-3) (CNG channel beta-3)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	Alaskan Malamute and German Shorthaired Pointer		×		Cone degeneration		
Q9XSJ7	Collagen alpha-1(I) chain (Alpha-1 type I collagen)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Osteogenesis imperfecta		
Q28247	Collagen alpha-5(IV) chain	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		X-linked hereditary nephritis		
Q9N281	Collagen alpha-1(XVII) chain (180 kDa bullous pemphigoid antigen 2) (Bullous pemphigoid antigen 2) [Cleaved into: 120 kDa linear IgA disease antigen homolog]	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Epidermolysis bullosa		

Q8WMD0	COMM domain-containing protein 1 (Protein Murr1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	Bedlington terriers		×		Copper toxicosis		
P19540	Coagulation factor IX (EC 3.4.21.22) (Christmas factor) [Cleaved into: Coagulation factor IXa light chain; Coagulation factor IXa heavy chain]	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Hemophilia B		
B5RHS5	Forkhead box protein I3	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	Mexican and Peruvian hairless dogs and in Chinese crested		×		Canine ectodermal dysplasia		
P48300	Tissue alpha-L-fucosidase (EC 3.2.1.51) (Alpha-L-fucosidase I) (Alpha-L-fucoside fucohydrolase 1) (Alpha-L-fucosidase 1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Fucosidosis		
O19133	Glucose-6-phosphatase (G-6-Pase) (G6Pase) (EC 3.1.3.9)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Glycogen storage disease Ia		
P54804	Galactocerebrosidase (GALCERase) (EC 3.2.1.46) (Galactocerebroside beta-galactosidase) (Galactosylceramidase) (Galactosylceramide beta-galactosidase)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Globoid cell leukodystrophy		
Q4W1W1	Very-long-chain (3R)-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1 (EC 4.2.1.134) (3-hydroxyacyl-CoA dehydratase 1) (HACD1) (Protein-tyrosine phosphatase-like member A)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	Labradors		×		Autosomal recessive centronuclear myopathy		

Q1HGE8	Heat shock factor protein 4 (HSF 4) (Heat shock transcription factor 4) (HSTF 4)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	Staffordshire Bull terriers, Boston terriers and Australian shepherds		×		Hereditary cataract		
Q01634	Alpha-L-iduronidase (EC 3.2.1.76)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Mucopolysaccharidosis type I		
P40321	Cytokine receptor common subunit gamma (Interleukin-2 receptor subunit gamma) (IL-2 receptor subunit gamma) (IL-2R subunit gamma) (IL-2RG) (gammaC) (p64) (CD antigen CD132)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Canine X-linked severe combined immunodeficiency		
Q29536	Pyruvate kinase PKLR (EC 2.7.1.40) (Pyruvate kinase isozymes L/R)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Inherited hemolytic anemia		
Q28350	Myc proto-oncogene protein (Proto-oncogene c-Myc) (Transcription factor p64)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Hematopoietic tumors		
P23294	Myelin proteolipid protein (PLP) (Lipophilin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Dysmyelinating disease		
P32308	Rhodopsin	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	English mastiff		×		Autosomal dominant retinitis pigmentosa		

Q29537	Cellular tumor antigen p53 (Tumor suppressor p53)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Found in increased amounts in a wide variety of transformed cells. p53 is frequently mutated or inactivated in many types of cancer		
P33726	Rod cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase subunit beta (GMP-PDE beta) (EC 3.1.4.35)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Rod/cone dysplasia		
Q8HYB7	Thyroid peroxidase (TPO) (EC 1.11.1.8)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt	Toy Fox Terriers		×		Congenital hypothyroidism with goiter		
O77560	Phosducin (PHD) (33 kDa phototransducing protein)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Photoreceptor dysplasia		
Q00LT9	Progressive rod-cone degeneration protein	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Progressive rod-cone degeneration		
O46501	Major prion protein (PrP) (CD antigen CD230)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Degenerative neurological diseases		
Q8WN22	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PK catalytic subunit) (DNA-PKcs) (EC 2.7.11.1)	<i>Canis lupus familiaris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Severe combined immune deficiency		
Q9N1T2	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator	<i>Canis lupus</i>	Proteins imported	Siberian husky		×		X-linked progressive retinal		

		<i>familia ris</i>	from UniProt					atrophy		
P19708	Serum amyloid A protein (SAA) [Cleaved into: Amyloid protein A (Amyloid fibril protein AA)]	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt			×		Secondary amyloidosis		
Q28295	von Willebrand factor (vWF)	<i>Canis lupus familia ris</i>	Proteins imported from UniProt	Scottish Terrie		×		Willebrand disease		
	Actin	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	SERCA 2A	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	ATPase synthase (α,β)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Cytokine C oxidase (VA,VIB)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Cytochrome b5	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Prot. bind. A. Fats	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							

	3.2-Transenoil-CoA isso.	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Dihydrolipoamide dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	OH-metil glut. CoA sin.	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Pyruvate dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Trios phosphate isomer.	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Phosphoglyc. mut.	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Isocyt. Dehydrogenase mitoc.	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Fac. Elon. Tu (PreP43)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	HSP-70 inducible	<i>Canis lupus</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							

		<i>familia ris</i>								
	Prot. Stress mit. (rel.70)	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	HSP-60	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Crystalline ab	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Farnesil di-P far.trans.	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Galac. 3(4)-fuc. Transferase	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Receptor Fc II	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Syndecan 2	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							
	Allergen Can f1	<i>Canis lupus familia ris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>							

	Cystatin C	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>						
	Protein rel. RAS	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>						
	Inosin 5'-P dehydrogenase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Muscle</i>						
F1PR93	WD repeat domain 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours	22578690
F1P679	Actin related protein 3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture,		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours	22578690

				Beagle and Shar-Pei						
E2RD86	Protein disulfide isomerase A3	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
F1P797	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
E2RB81	T-complex protein 1, epsilon subunit	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690

				terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei						
E2RCI8	Annexin A6	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
E2RAU5	Heat shock 70 kDa protein 9 (mortalin)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
E2ROL9	T-complex protein 1, alpha subunit	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed,		×	Up-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690

				American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei						
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Down-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
P49822	Serum albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Down-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690

O18840	Actin, beta	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Down-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
P15944	Tryptase alpha/beta 1	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture, Beagle and Shar-Pei		×	Down-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690
Q6TEQ7	Annexin A2	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Skin</i>	Dachshund, Weimaraner, Mixed breed, American Pit Bull terrier, Boxer, Staffordshire mixture,		×	Down-regulated	Canine cutaneous mast cell tumours		22578690

				Beagle and Shar-Pei						
E2R5B2	α -enolase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
F1PLS4	Vimentin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
P41148	Endoplasmin (GRP94)	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
F1PIC7	GRP78	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
P49822	Albumin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795

				retriever.						
F1PRB0	Keratin 7	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
P19006	Haptoglobin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
F1PW98	Keratin 8	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
J9P430	Transferrin	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biopsy: Bladder</i>	Mongrel, Cairn terrier; poodle and Labrador retriever.	×	×	Overexpressed in prostatic carcinomas	Prostatic carcinoma		19754795
E2R5B2	α -enolase	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Biospy: Mammary gland</i>			×	Overexpressed	Canine mammary carcinoma		22014164

Anexo 2

Protocolo da recolha de saliva

Material para recolha:



Tubos de 50 ml



Cotton rol



Pinça hemostática



Bata e luvas

Procedimento de recolha:

1. Identificar os tubos com um lápis;

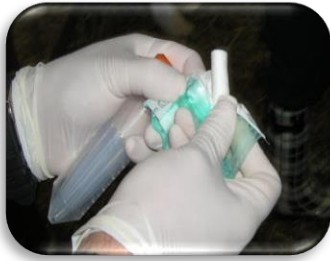


Código da clínica
Data (dia e mês)
Código da raça
Número da amostra

2. Estimular a salivação do cão com ração ou biscoito para cães;



3. Com a pinça hemostática (fórceps) agarrar o Cotton rol (2 cotton rol para cada cão);



4. Esfregar o Cotton rol na zona do vestíbulo oral entre a arcada alvéolo-dentária inferior e a bochecha do cão, durante aproximadamente 30 a 40 segundos (se necessário deixar o animal mastigar); **Nota:** Amostras não devem conter sangue.



5. Após a recolha colocar o Cotton rol no tubo de 50ml previamente etiquetado;



6. Para a adequada conservação das amostras, os frascos devem ser colocados numa mala frigorífica com gelo ou num congelador, durante 48h, no máximo. Findo este período, devem ser entregues no Laboratório de Anatomia Patológica da ESAV, para serem imediatamente conservados a menos 70oC. Em caso de impossibilidade de se deslocar à ESAV, deve contactar imediatamente:

Professora Helena Vala: hvala@esav.ipv.pt Professor Nuno Rosa: nunorosa33@gmail.com - E em caso de dúvidas com os procedimentos do protocolo, com a identificação das amostras e tabela contactar: monicafernandes@ua.pt ou monica_fernandes_20@hotmail.com

Anexo 3

Carta dirigida a Diretores clínicos

Exº Sr. Diretor Clínico

UCP e ESAV, 02 de Fevereiro de 2014

Assunto: Pedido de colaboração em projeto de investigação

No âmbito da orientação e colaboração dos trabalhos da estudante Mónica Figueiredo Fernandes para obtenção do grau de mestre em Microbiologia pela Universidade de Aveiro.

O programa de trabalhos insere-se numa parceria entre a Escola Superior Agrária de Viseu (ESAV) e a Universidade Católica Portuguesa e tem como objetivo a determinação de marcadores na saliva, com vista a desenvolver novos métodos de diagnóstico em vida.

Assim, vimos muito respeitosamente, solicitar a colaboração de V. Exa., no sentido de permitir a recolha de saliva a canídeos das raças indicadas em tabela própria, através dos estagiários da ESAV colocados em estágio na vossa instituição, a quem já demos toda a preparação e formação necessária e fornecemos o material adequado, de modo a que não haja qualquer custo para a vossa instituição e também tentando minimizar o tempo despendido no processo de colheita.

Solicitamos também, caso os resultados das análises que vamos realizar assim o justifiquem, o posterior acesso à ficha clínica do animal.

Informamos que a supervisão deste trabalho de investigação em diagnóstico em saliva é realizada pela Professora Marlene Barros (UCP) e pela Professora Helena Vala (ESAV) e que a estudante Mónica Figueiredo Fernandes se encontra à disposição de V. Exa. e dos estagiários da ESAV através do nº de telefone tal e do e-mail tal.

Consciente de que este trabalho pode vir a ter importantes repercussões futuras no desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico in vivo em Medicina Veterinária, à semelhança do já que ocorre em Medicina Humana, e que os mesmos passariam a ficar disponíveis em instituições de ensino superior na cidade de Viseu,

reforço a importância da vossa colaboração nesta fase preliminar dos estudos e agradeço antecipadamente toda a atenção e tempo que dedicar a este assunto.

Com os Melhores Cumprimentos

A responsável científica pelo projeto e
Diretora-Adjunta do Departamento de Ciências da Saúde
da Universidade Católica Portuguesa

Professora Doutora Marlene Tourais de Barros

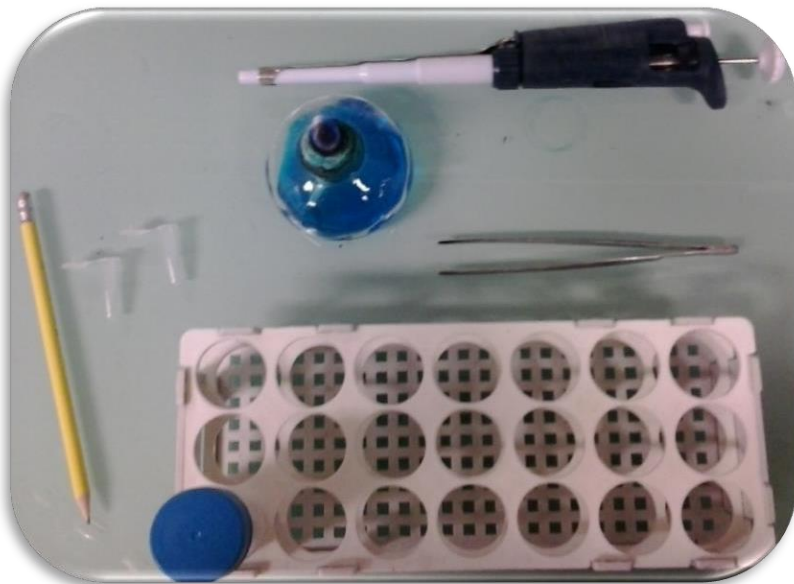
Professora Coordenadora da ESAV-IPV e responsável pelo
Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária da ESAV

Helena Maria Vala Correia

Anexo 5

Protocolo de armazenamento de amostras de saliva

Material:



Pipeta P1000; Lamparina; Pinça; Suporte para tubos de 50 ml; Tubos de 0,5 ml; Lápis e aliquotas.

Procedimento:

1. Deixar descongelar as amostras;



2. Preencher a tabela com os dados de cada amostra;

1	Numero da amostra	Código da localização	Número inicial	Número final	Data
2					
3					
4					
5					
6					

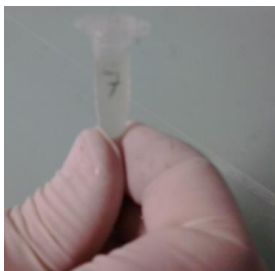
4. Preparar a centrífuga (3600 rpm; 5 minutos; -4oC e o rotor a 243);



5. Colocar as amostras na centrífuga;



6. Numerar os tubos de 0,5ml correspondente a cada amostra (a lápis na tampa e lateral);



7. Acender a lamparina, passar a pinça na chama e retirar os rolhões;



8. Com a pipeta P1000 pipetar a saliva para os tubos de póster 0,5ml;



10. Armazenar na arca a -80°C .



Anexo 6

Póster realizado para o Congresso Ciências Veterinárias

CanisTecOme: *Canis lupus familiaris* proteome database



Fernandes M^{1,2}, Rosa N¹, Correia MJ¹, Vala H^{3,4}, Barros M¹

1 Departamento de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Católica Portuguesa, Viseu, Portugal;
 2 Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal;
 3 Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal;
 4 Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Instituto Politécnico de Viseu, Portugal



Introduction

The great amount of data generated by the omic sciences can only be explored and conjugated with other data using bioinformatics tools and databases. There is a great number of databases and dedicated bioinformatics tools to explore the proteomes, genomes and transcriptomes of several animals which interact with humans and therefore have an impact on the Health of several populations.

Saliva collection



Fig 1. Saliva collection kit for dogs



Fig 2. Saliva collection in dogs

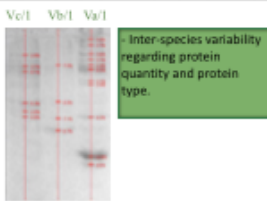
Biobank

Table 1. Clinical data for *Canis lupus familiaris*

Sample	Age	Sex	Breed	Health	Diagnosis	Pathology	Sample type	Sample source	Sample date	Sample storage	Sample analysis	Sample storage	Sample analysis
1	10	M	Labrador Retriever	Healthy			Saliva	Oral	2018	-80°C	Protein	MS/MS	1500
2	10	F	Border Collie	Healthy			Saliva	Oral	2018	-80°C	Protein	MS/MS	1500
3	10	M	Border Collie	Healthy			Saliva	Oral	2018	-80°C	Protein	MS/MS	1500



Fig 3. Biobank saliva sample characterization. A) Protein quantification by Micro BCA Protein Assay Kit (Pierce). B) SDS-PAGE gel image with protein profile in different saliva samples. Analysis performed with Quantity One 1-D Analysis software (BioRad).



Inter-species variability regarding protein quantity and protein type.

Chart 1. The *Canis lupus familiaris* proteome was recovered from the Uniprot database. The human protein homologs were determined by Biomart bioinformatics tool using oralmex, obtained from OralCard, as a reference list. The distribution of proteins by pathology was performed with the DAVID bioinformatic tool.



According to current data, the pathologies listed are candidates for a possible diagnosis through dog's saliva.

The proteins identified at the moment in the Proteome of *Canis lupus familiaris* ...

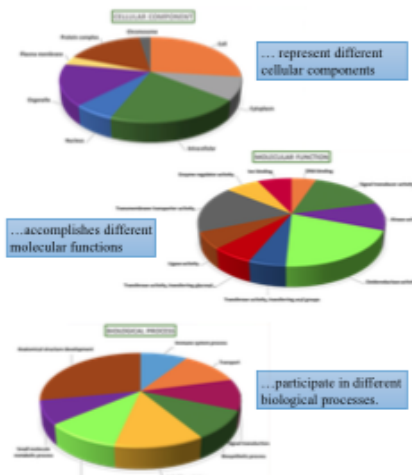


Fig. 4 Proteome of *Canis lupus familiaris* - Functional characterization. Analysis performed by AgBase GOSimViewer Tool.

CanisTecOme: Database

This database was built by the manual compilation and review of protein identified in different studies using dog samples, with the annotation of the sample characterization and proteomics techniques used.

Accession	Protein Name	Accession	Protein Name	Accession	Protein Name
Q9DQK1	Protein	Q9DQK2	Protein	Q9DQK3	Protein
Q9DQK4	Protein	Q9DQK5	Protein	Q9DQK6	Protein
Q9DQK7	Protein	Q9DQK8	Protein	Q9DQK9	Protein

References:

- Agarwal, R. et al. (2018) The Human Protein Atlas Database. *Protein Arch* 7(2), 8111-112099.
- Ames, J.P., Wu, X., Xiao, L., Garcia, E. C., Bahr, D., Collins, M. L., ... (2018) The Dog (Canis lupus familiaris) as a bioinformatic tool for the study of oral proteins. *Archives of Oral Biology*, 107, 70-75. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.11.021.
- Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists. *Nature Reviews Genetics*, 10(1), 1-9. doi:10.1038/nrg2033
- Wu, C. H., et al. (2018) AgBase: a bioinformatics tool for protein identification. *Protein Arch* 7(2), 3497-3504 (2018).

Acknowledgments: C16S015 (PE2018/013411)

Contact: Marlene Barros
 mbarros@cfb.ucp.pt

