



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À
AGROPECUÁRIA

TAMIRES VICTORIA SILVA NATIVIDADE

EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM FELINOS
DOENTES RENAIIS CRÔNICOS

BELÉM

2021

TAMIRES VICTORIA SILVA NATIVIDADE

**EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM FELINOS
DOENTES RENAIIS CRÔNICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária para obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Biotecnologia.
Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses.

**BELÉM
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

N278e Natividade, Tamires Victoria Silva
Expressão de Marcadores Inflamatórios em Gatos Doentes Renais Crônicos / Tamires Victoria Silva
Natividade. - 2021.
33 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2021.
Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses

1. Doença Renal Crônica. 2. Gatos. 3. Expressão Gênica. 4. Citocinas. I. Meneses, Andre Marcelo Conceição, *orient.* II. Título

CDD 636.089

TAMIRES VICTORIA SILVA NATIVIDADE

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária para obtenção do título de Mestre. Área de concentração: Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses - Orientador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA



Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho – Presidente
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA



Dra. Sinerey Karla Salim Aragão de Sousa - 1º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA



Profa. Dra. Elane Guerreiro Giese - 2º Examinador
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA



Dr. Dennis Lima

Prof. Dr. Dennis José da Silva Lima – Membro Suplente
UNIVERSIDADE DA AMAZÔNIA - UNAMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à todas as entidades que me guiaram até aqui.

Aos meus pais, José Augusto Natividade e Benedita Silva, que sempre acreditaram e investiram nos estudos de suas filhas, sem eles nada seria possível.

À minha irmã, Taiane Natividade, por todo o amor, suporte e por ser minha alma gêmea.

À minha irmã, Thais Andrade, por todo amor, sempre cuidar de mim e ter contribuído para minha formação desde muito cedo.

Ao meu irmão do coração, Thiago Mourão, por todo amor, suporte e por ser nosso trigêmeo.

Ao meu orientador prof. André Meneses que foi meu maior influenciador dentro da clínica e em especial da nefrologia veterinária, agradeço por tanto me ensinar nos últimos anos.

À Elem Barra e ao Prof. Ednaldo Filho do Laboratório de Biologia Molecular - Ufra por terem me apoiado no final do mestrado como ninguém, sem vocês certamente esse trabalho também não seria possível.

À banca de avaliadores Dra. Sinerey Salim, Dr. Dennis Lima e Dra. Elane Giese por toda contribuição.

À todos os professores da pós-graduação em Urologia e Nefrologia da Universidade Castelo Branco – RJ que contribuíram de maneira inestimável para minha formação.

Aos meus queridos amigos da disciplina de Genética Molecular e Bioquímica, Gabriela Ribeiro, Camille Maia e James Siqueira, obrigada pelo apoio e amizade dessa confraria.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Análises Clínicas – Ufra, Christian Machado, Lityane Moreira, Jéssica Leal, Beatriz Maciel e Beatriz Souza (a intrusa), obrigada por me fazerem feliz novamente.

À minha querida amiga, Thamara Cozzi, pela amizade e por sempre acreditar em mim (nunca vou esquecer o meu nome na lista).

Aos colegas da clínica do Hospital Veterinário Prof. Mário Dias Teixeira – Ufra, foi um grande prazer clinicar, ensinar e aprender com vocês.

Meus agradecimentos sinceros à todos que de alguma forma contribuíram para isto!

RESUMO

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma enfermidade irreversível, de caráter crônico e progressivo comum em felinos idosos, podendo afetar até 30% desta população. O diagnóstico clínico sustenta-se no histórico, exame físico e na utilização de testes hematológicos, bioquímicos, urinários e aferição de pressão arterial sistêmica (PAS). Estudos realizados em humanos e caninos já comprovaram a importância das citocinas séricas no perfil inflamatório do paciente doente renal crônico, bem como a influência destas nas manifestações clínicas e prognóstico da enfermidade. O objetivo deste estudo foi investigar o perfil sanguíneo de expressão de citocinas pró-inflamatórias em felinos diagnosticados com DRC, afim de melhor compreender o papel destas substâncias na progressão da doença renal. Foram utilizados 14 gatos, 6 pacientes eram saudáveis e 8 doentes renais crônicos, que foram analisados quanto ao hemograma, determinação de uréia, creatinina, proteína total e frações e perfil de expressão de Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1 β (IL-1 β), Fator de Necrose Tumoral - α (TNF- α) e Interferon- γ (IFN- γ). Todos os animais, de ambos os grupos, apresentaram positividade para expressão de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ . A avaliação da expressão relativa das citocinas não revelou diferença estatística significativa entre os grupos enfermo e saudável. Contudo, as variações de expressão foram maiores nos animais doentes. São necessárias novas investigações com um número maior de animais e diferentes estadiamentos da DRC para que sejam identificados os papéis da IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ no desenvolvimento e manutenção desta doença tão importante na clínica de felinos.

Palavras-chave: DRC, gatos, expressão, citocinas.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is an irreversible and progressive sickness, presenting regularly in elderly cats, affecting up to 40% of this population. Clinical diagnosis is based on personal history, physical examination and hematological, biochemical and urinary analysis, in addition to measurement of systemic blood pressure. Studies carried out in humans and canines have already confirmed the importance of serum cytokines on inflammatory profile of patients with CKD, as well as their influence on the clinical manifestations and prognosis of the disease. The aim of this study was to investigate the blood profile of pro-inflammatory cytokine expression in cats diagnosed with CKD, in order to better understand the role of these substances in progression of kidney disease. Fourteen cats were included in this study, 6 patients were healthy and 8 were chronic renal patients. All patients were analyzed for blood count, determination of urea, creatinine, serum protein and fractions and expression of Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor Necrosis Factor - α (TNF- α) and Interferon- γ (IFN- γ) mRNA. All animals from both groups were positive for IL-6 and TNF- α expression. Relative expression of cytokines did not reveal a statistically significant difference between groups. However, expression variations were greater in sick animals. Further investigations with a larger number of animals and different stages of CKD are recommended to identify the roles of IL-6, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ in development and maintenance of this very prevalent disease in feline clinics.

Key-words: CKD, cats, expression, cytokines.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 6 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 8 |
| 2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA | 8 |
| 2.2 ESTADO INFLAMATÓRIO E CITOCINAS DA DRC | 11 |
| 3. OBJETIVOS..... | 13 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL..... | 13 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 14 |
| 4.1 AUTORIZAÇÃO PARA O EXPERIMENTO | 14 |
| 4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS..... | 14 |
| 4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO | 14 |
| 4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO | 14 |
| 4.4 LOCAL DE ESTUDO..... | 14 |
| 4.5 AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS..... | 15 |
| 4.5.1 METODOLOGIA DAS ANÁLISES CLÍNICAS..... | 15 |
| 4.5.2 METODOLOGIA DAS ANÁLISES MOLECULARES..... | 15 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 16 |
| 5. RESULTADOS | 17 |
| 5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES CLÍNICO-PATOLÓGICAS | 17 |
| 5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA | 19 |
| 6. DISCUSSÃO | 21 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 24 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 25 |
| ANEXO I..... | 31 |

1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Crônica (DRC) é uma enfermidade irreversível, de caráter crônico e progressivo comum em felinos idosos, podendo afetar até 30% desta população (LULICH et al., 1992; POLZIN, 2011; SPARKES et al., 2016). São inúmeros os achados clínico-patológicos oriundos das disfunções renais e compreendem principalmente perturbações hematológicas, bioquímicas, hidroeletrólíticas e pressóricas (POLZIN, 2011; NELSON & COUTO, 2015).

O diagnóstico sustenta-se no histórico, exame físico e na utilização de testes hematológicos e urinários, bem como a aferição de pressão arterial sistêmica (PAS) (IRIS, 2019a). A biopsia renal consiste em método definitivo para diagnóstico e descrição da enfermidade, porém, ainda é pouco utilizada em virtude das complicações e riscos associados ao procedimento, tais como hemorragias, complicações anestésicas e infecções (VADEN, 2005).

A DRC encontra-se entre o grande número de enfermidades crônicas que já foram associadas à inflamação subclínica em humanos e animais (SHOELSON et al, 2007; LONTCHI-YAMAGOU et al., 2013; AKCHURIN & KASKEL, 2015; NENTWIG et al., 2016). São inúmeros os mecanismos que contribuem para a perpetuação do estado inflamatório da doença, que variam desde a hipertensão glomerular, proteinúria, liberação de citocinas inflamatórias intrarrenais e extrarrenais e que culminam no desenvolvimento de fibrose em estágios mais avançados da enfermidade (HARRIS & NEILSON, 2006).

Estudos realizados em humanos e caninos já comprovaram a importância das citocinas séricas no perfil inflamatório do paciente DRC, bem como a influência destas nas manifestações clínicas e prognóstico da enfermidade, a exemplo de estudo recente de Ackchurin e colaboradores (2019) que puderam comprovar que a expressão de Interleucina-6 (IL-6) contribui para o desenvolvimento de anemia da DRC juvenil em humanos (PORAZKO et al., 2009; RAILA et al., 2011; NENTWIG et al., 2016).

Em felinos há apenas um trabalho investigando o perfil de liberação de citocinas urinárias, utilizando o método ELISA, não havendo estudos adicionais que esclareçam o padrão de expressão sanguíneo ou renal de marcadores inflamatórios na DRC felina até o momento (HABENICHT et al., 2013).

Evidências científicas recentes comprovam que a mensuração de citocinas inflamatórias pode ser considerada um método não invasivo promissor para a avaliação das doenças renais, fornecendo informações relevantes quanto ao prognóstico de tais disfunções (SHEU et al., 2009), uma vez que a expressão de substâncias inflamatórias ou antiinflamatórias poderá

predizer a evolução clínica e desenvolvimento de novos sinais da enfermidade no paciente, a exemplo de anemia, proteinúria, etc. Desta maneira, surge a necessidade de investigar o perfil de expressão de citocinas sanguíneas em felinos doentes renais crônicos, afim de melhor compreender o papel destas substâncias na progressão da doença renal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA

A DRC é uma das enfermidades mais comumente encontradas na medicina felina (O'NIEL et al., 2014), sendo ainda mais prevalente na população felina geriátrica (SPARKES et al., 2016). O desenvolvimento da enfermidade está relacionado à inúmeras etiologias, que podem incluir intoxicações, hipóxia, glomerulonefrite crônica, pielonefrite, obstruções de trato urinário e infecções virais (SPARKES et al., 2016).

As manifestações clínicas mais comuns da enfermidade compreendem poliúria (PU), polidipsia (PD) e síndrome urêmica. Os achados ambulatoriais abrangem palidez de mucosas, desidratação e hipertensão e, por sua vez, os achados laboratoriais podem incluir o aumento das concentrações séricas de creatinina e dimetilarginina simétrica (SDMA), redução da concentração urinária, hiperfosfatemia, proteinúria e anemia normocítica normocrômica (SPARKES et al., 2016).

A Associação Internacional de Interesse Renal – IRIS (2019a) determina o estadiamento do paciente DRC em 4 estágios de acordo com a concentração sérica de creatinina e SDMA, colhida pelo menos duas vezes de pacientes normohidratados e em jejum alimentar (tabela 1). A medida que as concentrações séricas progredem, aumentam as chances de manifestações urêmicas e sinais sistêmicos.

Tabela 1 - Estadiamento IRIS de pacientes felinos DRC (Adaptado de IRIS, 2019a).

| Estágio IRIS | Concentração sérica de Creatinina (mg /dL) | Concentração sérica de SDMA (µg /dL) |
|---------------------|---|---|
| I | <1.6 | <18 |
| II | 1.6-2.8 | 18-25 |
| III | 2.9-5.0 | 26-38 |
| IV | 5.0 | >38 |

A IRIS (2019a) prevê ainda o subestadiamento dos DRCs segundo o grau de proteinúria (tabela 2) e valores de PAS (tabela 3). A proteinúria é reconhecida como um fator prognóstico negativo em animais com DRC, e apesar dos valores relação proteína creatinina urinária

(RPCU) em gatos serem menos significativos que em cães, ainda assim tem sido associados à redução da sobrevida nestes pacientes (SYME et al., 2006).

Tabela 2 - Subestadiamento IRIS de pacientes felinos DRC de acordo com o grau de proteinúria (Adaptado de IRIS, 2019a).

| RPCU | Subestadiamento |
|----------------|------------------------|
| <0,2 | Não proteinúrico |
| 0,2-0,4 | Proteinúria Limítrofe |
| >0,4 | Proteinúrico |

Tabela 3 - Subestadiamento IRIS de pacientes felinos de acordo com a pressão arterial sistêmica (Adaptada de IRIS, 2019a).

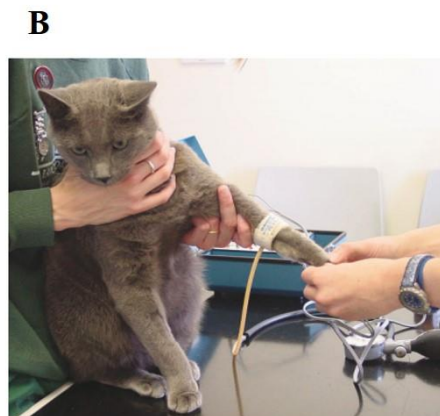
| Pressão Arterial Sistêmica (PAS) - mmHg | Subestadiamento | Risco de Lesão em Órgão Alvo |
|--|------------------------|-------------------------------------|
| <140 | Normotenso | Mínimo |
| 140-159 | Pré-hipertenso | Baixo |
| 160-179 | Hipertenso | Moderado |
| >180 | Severamente hipertenso | Alto |

A hipertensão arterial em gatos é frequentemente correlacionada às enfermidades subjacentes, como a DRC ou hipertireoidismo felino (SYME et al., 2006; ACIERNO et al., 2018). A mensuração deste parâmetro demanda profissional devidamente treinado, bem como a utilização de aparelhos apropriados (figura 1) e o diagnóstico requer valores pressóricos elevados e sustentados (SPARKES et al., 2016; ACIERNO et al., 2018).

Figura 1 – 1.A- Esfigmomanômetro, doppler e braçadeiras veterinárias utilizadas para aferição de PAS. **1.B-** Aferição de PAS em felino.



Fonte: Tradevet.



Fonte: SPARKES et al., 2016.

Esta classificação atenta-se ainda ao risco de lesão em órgãos alvo, particularmente vulneráveis à elevação de PAS, como olhos, coração, cérebro e o próprio tecido renal. As manifestações oculares mais comumente observadas são o descolamento de retina e hifema (figura 2). Nos rins, a hipertensão contribui para avanço da glomerulosclerose e perpetua as lesões renais (NELSON & COUTO, 2015; SPARKES et al., 2016).

Figura 2 - Descolamento de retina bilateral em paciente felino hipertenso.



Fonte : DOS SANTOS, 2018.

A desidratação é um achado clínico comum nestes animais e, pode ou não, estar acompanhada de distúrbios eletrolíticos, em especial a hiperfosfatemia e hipocalcemia, além de acidose metabólica. Estes pacientes podem ainda apresentar náusea, vômito e inapetência em decorrência do acúmulo de toxinas urêmicas (SPARKES et al., 2016).

Estima-se que até 65% dos felinos doentes renais crônicos desenvolverão anemia e que esta possua caráter multifatorial, onde a redução da produção de eritropoietina renal (EPO) é

fator determinante (SPARKES et al., 2016). Porém, estudos recentes em felinos sugerem fatores adicionais que podem contribuir de maneira significativa à gênese da anemia nestes pacientes, tais como a síndrome urêmica, disfunção do metabolismo de ferro sem alterações de sua concentração sérica e o estado inflamatório na DRC (CHALHOUB et al., 2011; JAVARD et al., 2017).

O tratamento da DRC felina precisa ser individualizado de acordo com as necessidades e respostas clínicas do paciente e tem como principais objetivos retardar a progressão da doença, bem como promover qualidade de vida. Dentre as principais recomendações encontram-se o manejo da desidratação, controle da PAS e proteinúria, redução da ingestão proteína e fósforo, tratamento da náusea, vômito e inapetência, correção da acidose metabólica, correção da hipocalcemia e manejo da anemia (IRIS, 2019b).

O prognóstico da enfermidade é variável segundo o estadiamento IRIS, de acordo com as concentrações séricas de creatinina, índice de proteinúria e adaptação à terapia (SPARKES et al., 2016).

2.2 ESTADO INFLAMATÓRIO E CITOCINAS DA DRC

Citocinas são proteínas produzidas por diversos tipos celulares que possuem a função de controlar respostas imunológicas e /ou inflamatórias, podendo ter papel pró e antiinflamatório (KANY et al., 2019). São inúmeros os estudos investigando o papel das interleucinas da DRC em humanos, sendo os estudos em animais mais restritos (NENTWIG et al., 2016; NOWAK et al., 2017; AKCHURIN et al., 2019).

Dentre as interleucinas pró-inflamatórias mais frequentemente investigadas encontram-se a IL-6 e IL-1 β , a primeira é produzida por uma variedade de tipos celulares (dentre elas neutrófilos, monócitos, macrófagos, células T, endoteliais, etc) e atua na resposta imune e hematopoiese. Seus níveis são geralmente baixos em condições normais, porém podem aumentar até milhares de vezes em estados inflamatórios (SCHÜTTLER & NEUMANN, 2015; ROSE-JOHN, 2018). Já a IL-1 β é produzida por monócitos, macrófagos e células pancreáticas e já foi associada à dor, inflamação e condições autoimunes (REN & TORRES, 2009; KANY et al., 2019).

O Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), por sua vez, é uma das citocinas inflamatórias de maior relevância. É produzida predominantemente por macrófagos e exerce papel fundamental no desenvolvimento de tumores e desordens imunológicas. Executa muitas funções no organismo, tais como promoção de apoptose, controle do desenvolvimento embrionário, ação

pirogênica e iniciação de necrose tumoral (CHU, 2013). O Interferon- γ (IFN- γ) é uma substância pró e antiinflamatória produzida principalmente pelas células T e NK, cujas principais funções biológicas são a ação microbicida, diferenciação de TH1 e aumento da expressão do MHC de classes I e II, assim como da apresentação antigênica às células T (ABBAS et al., 2019).

O estado inflamatório é reconhecido como parte relevante do desenvolvimento e progressão da DRC (STENVINKEL et al., 1999; AKCHURIN & KASKEL, 2015), já tendo sido associado ao maior índice de albuminúria (GUPTA et al., 2012), anemia (CHIKAZAWA & DUNNING, 2016; AKCHURIN et al., 2019), risco cardiovascular (STENVINKEL et al., 2008) e de complicações dialíticas (HENDERSON et al., 1983). Estudos anteriores conseguiram demonstrar a relação das concentrações sanguíneas de algumas citocinas com a ocorrência de disfunção ou progressão de dano renal, especialmente em cães e seres humanos (RAILA et al., 2011; OH et al., 2013; ZYGNER et al., 2014).

A concentração sérica das citocinas próinflamatórias supramencionadas já foram fortemente associadas, ou pelo menos investigadas, na DRC em pacientes humanos (OH et al., 2013; AMDUR et al., 2016; NOWAK et al., 2017; TURNER, 2017). Onde há inclusive um trabalho investigando o potencial terapêutico da utilização da ação antiinflamatória da IFN- γ como inibidor da fibrose renal (POOSTI et al., 2015) e outro sobre a inibição da citocina próinflamatória IL-1 β no curso da doença renal, tendo ambos apresentado resultados bastante promissores (NOWAK et al., 2017).

Ainda não existem trabalhos avaliando o perfil sanguíneo de expressão de citocinas em gatos com DRC, havendo apenas uma pesquisa em cães (NENTWIG et al., 2016) e um estudo em felinos investigando os níveis de citocinas urinárias, por meio de ELISA, em gatos aparentemente saudáveis *versus* gatos DRC (HABENICHT et al., 2013).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Investigar o perfil sanguíneo de expressão de citocinas em gatos com DRC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a expressão de citocinas (IL-1 β , IL-6, IFN- γ e TNF- α) em felinos saudáveis e com DRC.
- Comparar o perfil expressão de citocinas em gatos DRC *versus* gatos hígidos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AUTORIZAÇÃO PARA O EXPERIMENTO

Este trabalho possui aprovação sob número provisório da CEUA-UFRA 3284100620.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

O esforço amostral foi composto por 14 indivíduos felinos, selecionados independente de raça, sexo ou faixa etária, onde 6 compuseram o grupo 1 (grupo saudável) e o grupo 2 (grupo doente), representado por felinos com diagnóstico definitivo de DRC. Todos os pacientes foram avaliados clinicamente e por meio de exames complementares (hemograma, ureia, creatinina e proteína total e frações) bem como quanto ao perfil de expressão de citocinas por meio de RT-qPCR.

Os pacientes DRC foram adicionalmente estadiados e subestadiados quanto ao grau de azotemia, proteinúria e exames de imagem de acordo com as normas da IRIS (2019a).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Pacientes felinos com diagnóstico confirmado de DRC e pacientes clinicamente saudáveis e não azotêmicos cujos tutores assinaram o termo de consentimento para participação no experimento previamente (anexo I).

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo felinos apresentando evidência ou confirmação de enfermidade infectocontagiosa, de caráter inflamatório ou autoimune, Lesão Renal Aguda (LRA) ou DRC agudizada. A identificação de pacientes que não obedeciam aos critérios do estudo foi realizada por meio de avaliação clínica e análises clínico-patológica (hemograma, bioquímica sérica e urinálise).

4.4 LOCAL DE ESTUDO

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Análises Clínicas (LAC) e Laboratório de Biologia Molecular (LABMOL) com amostras de pacientes oriundos do Hospital Veterinário Prof. Mário Dias Teixeira (HOVET), todos localizados na Universidade Federal Rural da Amazônia (Ufra) em Belém-PA.

4.5 AVALIAÇÕES CLÍNICAS E LABORATORIAIS

4.5.1 METODOLOGIA DAS ANÁLISES CLÍNICAS

Os animais foram submetidos à jejum alimentar de 8h previamente à coleta de amostras sob cuidadosa contenção física, instituída de acordo com as normas de bem-estar animal. Foi realizada antissepsia local e venopunção utilizando agulha 25x7 acoplada à seringa de 5mL descartável. O material colhido foi em seguida distribuído em dois tubos, um contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) potássico (0,5mL) e outro com gel retrator de coágulo (1mL).

As amostras foram armanezadas em caixas de polipropileno contendo gelo (4° C) e transportadas ao LAC/Ufra, Campus Belém-PA, onde foram analisadas de acordo com técnicas rotineiras do referido laboratório conforme consta no termo de anuência. Para as avaliações hematológicas foram utilizadas as amostras em tubo de EDTA, processadas por analisador hematológico BC Vet 2800 (Mindray), além de distensão sanguínea para análise diferencial.

Quanto à bioquímica sérica, após a colheita sanguínea em tubo com gel retrator de coágulo, as amostras foram centrifugadas (500 rpm/10m) em centrífuga Oleman, modelo 90-1, onde o soro sanguíneo foi utilizado para obtenção dos parâmetros desejados de acordo com os métodos colorimétricos e cinéticos do equipamento TP Analyzer Thermoplate.

4.5.2 METODOLOGIA DAS ANÁLISES MOLECULARES

As amostras sanguíneas coletadas em tubos contendo EDTA destinadas às análises moleculares foram preservadas em solução tampão de preservação de RNA (RNA *later*) e em seguida armazenadas a -80° C até o momento do processamento para extração do material. Para extração do material genético foi utilizada a técnica do Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

A quantificação das amostras de RNA foi realizada em espectrofotômetro BioDrop (Thermo Scientific, Wilminfton, UK) com absorbância a 260nm sendo a pureza determinada pela razão A260/A230 e A260/A280. Após a quantificação as amostras de RNA foram diluídas para obter concentração igual a 50ng/μL.

As reações de RT-qPCR foram elaboradas com primers desenhados pelo software online Primer3, afim de delimitar o perfil de expressão gênica de Il-6, IL-1β, TNF-α, IFN-γ e GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) como gene endógeno. A reação foi preparada a um volume final de 10μL, contendo 5,0μL do kit Power Sybr® Green RNA-to-CT one-step (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), 0,5μL de primer Forward (10μM), 0,5μL de

primer Reverse (10 μ M), 3,0 μ L de H₂O ultra pura, 0,006 μ L de Transcriptase reversa e 1 μ L de RNA. As reações foram efetuadas utilizando o termociclador CFX96 Touch™ Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O protocolo seguiu as recomendações do fabricante do kit.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros clínico-patológicos (peso, idade, creatinina, uréia, proteínas totais e frações, albumina, hematócrito e leucócitos totais) foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de T-Student. As análises foram realizadas por meio do software RStudio 1.4.1717.

Os dados referentes à expressão gênica de IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ foram tabulados e testados quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida os níveis de expressão relativa foram comparados entre os grupos de animais saudáveis e doentes por meio do teste de Mann-Whitney com nível de significância de 0,05%. As análises foram realizadas no SAS (Versão: OnDemand).

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS DAS ANÁLISES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

A idade média do grupo controle foi de 3,83 anos (2-7 anos) com valor médio de creatinina de 1,25 mg/dL (1-1,5 mg/dL). No referido grupo haviam 3 machos e 3 fêmeas. A idade média dos felinos DRC foi de 7,5 anos (3-14 anos) e o valor médio de creatinina de 2,44 mg/dL (0,83-8,3 mg/dL) onde 4 pacientes eram machos e 3 fêmeas (tabela 4).

Os grupos apresentaram diferença estatística significativa quanto a idade, sendo o paciente DRC em média 3,67 anos mais velho que o saudável. Não houveram diferenças significativas quanto à creatinina sérica, embora o valor de creatinina tenha se apresentado maior em pacientes doentes.

Tabela 4 - Médias e desvio padrão dos parâmetros analisados e comparação entre os grupos.

| Parâmetro | Grupo 1 (Saudáveis) | Grupo 2 (Doentes) |
|-------------------|---------------------|-------------------|
| | n=6 | n=8 |
| Peso (kg) | 6,11 ± 0,783 | 4,04 ± 1,20* |
| Idade (anos) | 3,83 ± 1,44 | 7,5 ± 3,11* |
| Creatinina | 1,25 ± 0,25 | 2,44 ± 1,30 |
| Albumina | 3,26 ± 0,3 | 2,93 ± 0,338 |
| Proteínas Totais | 6,96 ± 0,755 | 6,81 ± 0,811 |
| Hematócritos | 35,5 ± 4,00 | 30,5 ± 6,22 |
| Ureia | 47,98 ± 12,20 | 104,76 ± 53,016* |
| Leucócitos Totais | 8,730 ± 1,222 | 8,101 ± 2,4310 |

Os parâmetros que ainda apresentaram diferença estatística significativa foram a uréia (47,78 mg/dL no G1 *versus* 104,76 mg/dL no G2) e peso dos pacientes (6,11kg no G1 *versus* 4,04kg no G2). Os demais indicadores analisados não demonstraram diferença estatística significativa. Dos 8 pacientes DRC, 25% foram enquadrados como IRIS I, 65,5% como II e 12,5% como IV (tabela 5). Os dados individualizados de cada paciente estudado encontram-se descritos na tabela 6.

Tabela 5 - Estadiamento dos pacientes DRC de acordo com os critérios da IRIS (IRIS, 2019a).

| Estágio | Creatinina | (%) |
|----------------|-------------------|------------|
| I | < 1,6 mg/dL | 3(33,3%) |
| II | 1,6 – 2,8 mg/dL | 5(55,5%) |
| III | 2,9 – 5,0 mg/dL | - |
| IV | > 5,0 mg/dL | 1(11,1%) |

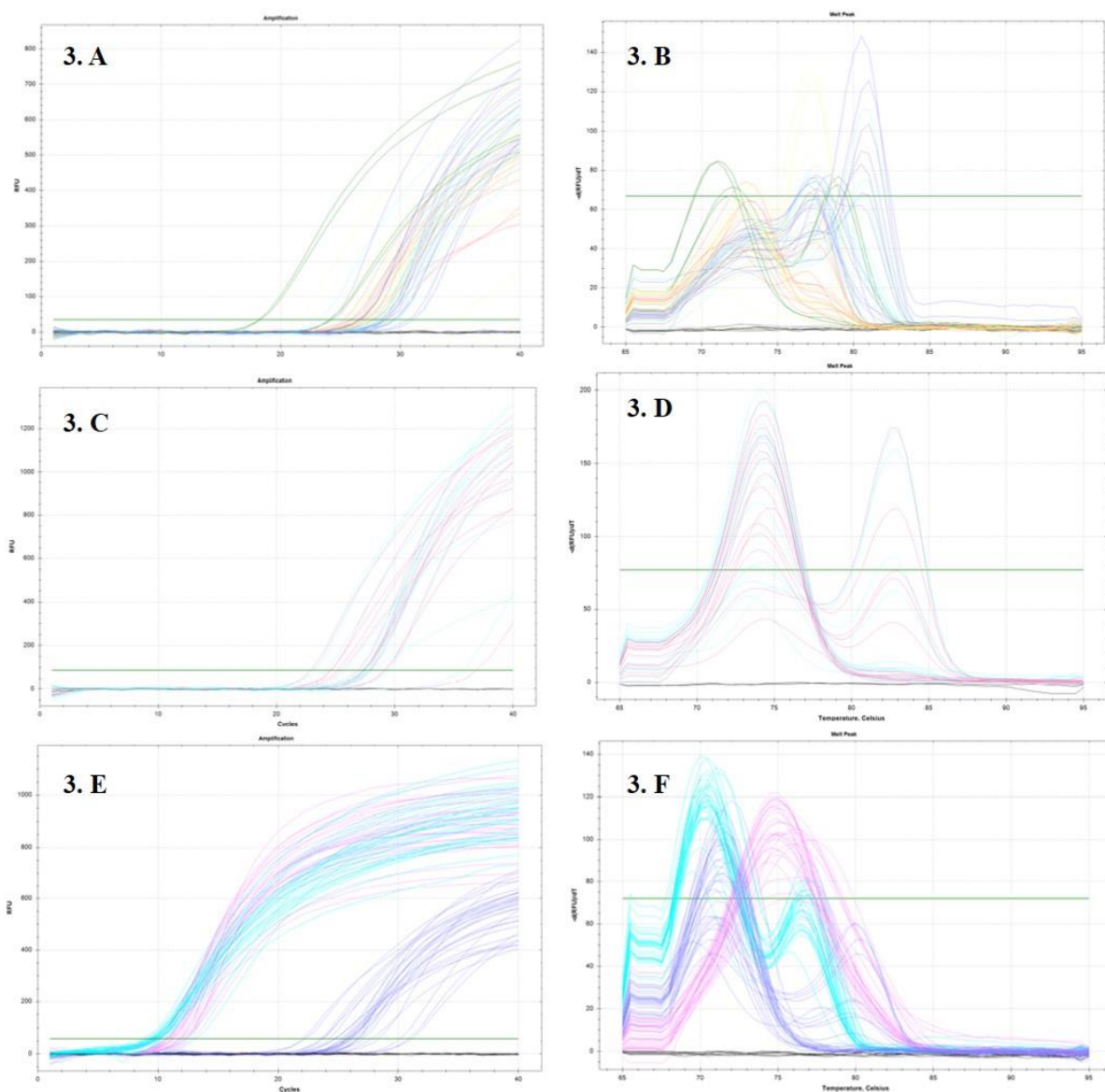
Tabela 6 - Dados dos pacientes estudados. *Creat- Creatinina; Alb- Albumina; PT- Proteína Total; Ht- Hematócrito; LT- Leucócitos Totais.

| DR C | Paciente | Creat | Alb | PT | Ht | Peso | Idade | Uréia | LT | |
|-------------|-----------------|--------------|------------|-----------|-----------|-------------|--------------|--------------|-----------|--------|
| 2 | Chico | 1 | 2,8 | 5,7 | 30 | 7,5 | 2 | 38,2 | 9,600 | |
| 5 | Grupo 1 | Belinha | 1,5 | 3,9 | 8,2 | 35 | 6,2 | 3 | 84,6 | 10,500 |
| 7 | | Magali | 1,5 | 3,2 | 6,6 | 31 | 5 | 7 | 40,1 | 5,600 |
| 9 | | Pedro | 1,3 | 3,4 | 6,4 | 38 | 6 | 3 | 46,7 | 9,100 |
| 10 | | Gorda | 1,2 | 3,4 | 8 | 45 | 5 | 5 | 39,7 | 9,400 |
| 15 | | Mick | 1 | 2,9 | 6,9 | 34 | 7 | 3 | 38,6 | 8,200 |
| 1 | Grupo 2 | Jorge | 1,8 | 2,9 | 6,9 | 36 | 5,2 | 5 | 55 | 13,050 |
| 3 | | Elton | 1,6 | 3,4 | 6,7 | 38 | 4,7 | 13 | 80,9 | 7,050 |
| 4 | | Estella | 1,63 | 2,3 | 5,5 | 32 | 3,2 | 8 | 81,1 | 9,800 |
| 6 | | Pudim | 0,83 | 2,9 | 8,3 | 37 | 7,2 | 4 | 43,7 | 6,350 |
| 8 | | Salomão | 1,7 | 4 | 8,2 | 35 | 4,5 | 4 | 59 | 8,050 |
| 12 | | Cheetara | 8,3 | 2,8 | 7,5 | 8 | 2,5 | 9 | 332,1 | 13,000 |
| 13 | | Julieta | 1,61 | 2,4 | 5,9 | 25 | 2,6 | 3 | 70,3 | 11,500 |
| 14 | | Estrela | 2,1 | 2,8 | 5,5 | 29 | 2,45 | 14 | 116 | 9,000 |

5.2 RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA

Todos os animais, de ambos os grupos, expressaram de IL-6, TNF- α , IL-1 β e IFN- γ a excessão de uma paciente (P11) que foi excluída da amostra uma vez que sua extração não forneceu RNA em concentração suficiente para realização das análises das duas primeiras citocinas (Figura 3). A avaliação da expressão relativa das citocinas não revelou diferença estatística significativa entre os grupos ($P>0,05$). Contudo, as variações de expressão foram maiores no animais doentes (Figuras 4 e 5).

Figura 3 -PCR em tempo real dos pacientes analisados. **3. A e 3. B**- PCR para IL-6 e TNF- α . **3. C e 3. D**- PCR para o gene endógeno felino GAPDH. **3.E e 3.F**. PCR para GAPDH, IL-1 β e IFN- γ .



Fonte: A autora (2021).

Figura 4.A- Expressão de IL-6 (Mann-Whitney Test; P=0,749). **4.B-** Expressão de TNF- α (Mann-Whitney Test; P=0,0886).

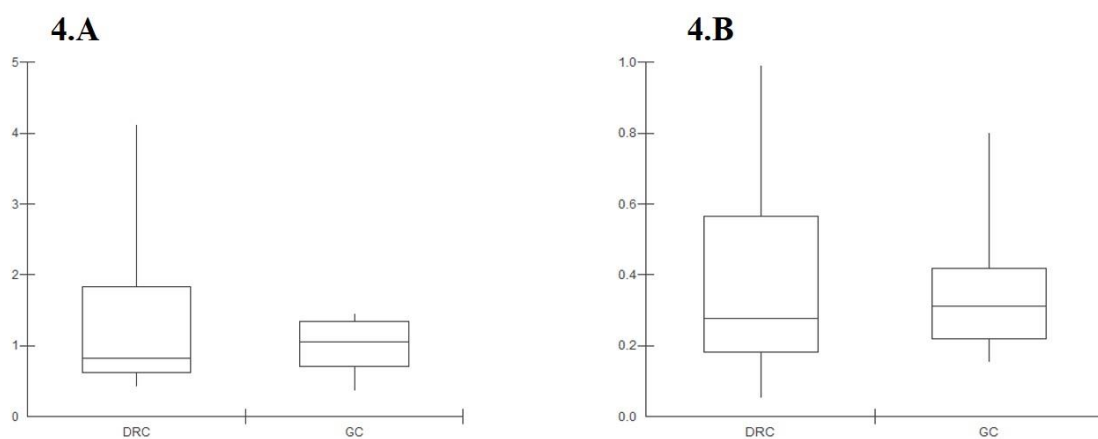
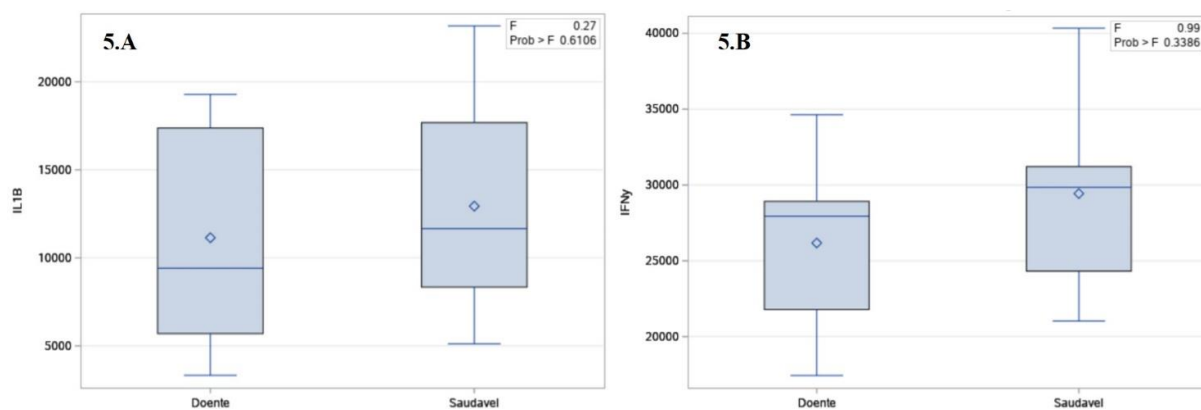


Figura 5.A - Expressão de IL-1 β (Mann-Whitney Test; P=0,6106). **5.B-** Expressão de IFN- γ (Mann-Whitney Test; P=0,3386).



6. DISCUSSÃO

Estudos anteriores já haviam demonstrado a maior prevalência de DRC em felinos idosos (MARINO et al., 2014; SPARKES et al., 2016; RAY et al., 2021), bem como a redução de peso/score corporal destes pacientes, uma vez que os episódios de anorexia, náusea ou vômito são frequentes, especialmente em estágios mais avançados da enfermidade (KING et al., 2007; IRIS, 2019a; RAY et al., 2021), informações estas que estão em conformidade com as encontradas em nosso estudo.

Neste trabalho, embora não hajam diferenças estatísticas significativas entre os grupos quanto à concentração sérica de creatinina, a média do grupo doente excedeu o valor de referência atualmente preconizado para felinos (1,6 mg/dL) (IRIS, 2019a). A azotemia tem sido relatada como um evento comum em animais DRC entre os estadiamentos II-IV (POLZIN, 2011; IRIS, 2019) fato que encontra-se em concordância com os achados deste estudo.

Dois pacientes foram considerados pertencentes ao estágio IRIS I, totalizando 25% do número de felinos doentes. Apesar de apresentarem concentração sérica de creatinina dentro dos valores de normalidade para a espécie (<1,6 mg/dL) estes pacientes obedeceram aos demais critérios necessários ao diagnóstico, tais como alterações estruturais detectáveis aos exames de imagem, hipertensão arterial, redução da densidade urinária e/ou proteinúria (SPARKES et al., 2016; IRIS, 2019a).

De acordo com Polzin (2011) a hipoalbuminemia pode ser considerada evidência de disfunção renal quando associada à proteinúria, este dados não foi identificado em nosso estudo, onde conforme ilustrado na tabela 4 os pacientes apresentam média da proteína total dentro dos valores de referência. Este fato pode estar relacionado à natureza histológica da DRC na espécie felina, que consiste em alterações tubulointersticiais e não glomerulares, sendo a ocorrência de proteinúria maciça menos comum em felinos (SYME et al., 2006; HARLEY & LANGSTON, 2012; MCLELAND et al., 2015).

O leucograma dos grupos estudados não revelou diferença estatística significativa, parâmetro já esperado visto que a DRC promove alterações sobretudo na série vermelha, provocando anemia normocítica e normocrômica nos estágios avançados da doença, mormente os estágios IRIS III e IV. Muito embora o hematócrito observado nos pacientes renais deste estudo também tenha se mantido dentro da normalidade para a espécie, resultado que pode ser explicado pela maior proporção de pacientes IRIS I e II no esforço amostral (ELLIOT & BARBER, 1998; TASKER, 2012).

Segundo Chalhoub e colaboradores (2011) a ocorrência de anemia na DRC pode atingir até 65% dos pacientes conforme a afecção progride e tem caráter multifatorial, sendo principalmente associada ao decréscimo na produção de EPO, estado inflamatório, liberação de toxinas urêmicas e perdas gastrointestinais. Estas informações são ainda corroboradas pelo fato da única paciente anêmica do estudo (P12) ser estadiada como IRIS IV.

Nentwig et al (2016) em investigação da expressão de biomarcadores urêmicos na LRA/DRC em sangue venoso foi incapaz de indicar diferenças significativas na expressão de TNF- α de pacientes com LRA *versus* CKD *versus* animais saudáveis, elemento também encontrado em nosso estudo. Por outro lado, o mesmo trabalho conseguiu comprovar o envolvimento de diversas citocinas, em especial IL-1 e TGF- β , no desenvolvimento e progressão da enfermidade. Este fenômeno pode estar associado à cronologia de liberação de citocinas no curso da doença, onde pode haver predominância de determinadas substâncias a depender do período.

Há de se ressaltar ainda que os estudos experimentais performados anteriormente que visavam investigar o perfil de expressão inflamatória em ratos avaliavam principalmente a expressão em tecido renal (SPURGEON et al., 2005; AKCHURIN et al., 2019), o que não foi realizado neste trabalho em virtude da abordagem requerer técnicas de biópsia renal, método que tem sido relacionado à riscos e dificuldades de execução, especialmente em pacientes veterinários (VADEN, 2005).

Akchurin e colaboradores (2019) em estudo translacional de expressão gênica intrarrenal em ratos e aferição de citocinas séricas em humanos conseguiu associar a expressão e liberação de IL-6 à progressão da DRC e maiores índices de anemia nestes pacientes, informação que também contrasta com as encontradas em nosso estudo, uma vez que a única paciente anêmica (P12) apresentou resultados de expressão de IL-6 semelhante aos outros animais DRC.

O estudo CRIC também já havia demonstrado valores plasmáticos elevados de IL-6 e TNF- α , tendo sido relacionado ao rápido decréscimo da função renal em pacientes humanos. Porém, a análise de expressão gênica não fez parte do escopo do referido trabalho (AMDUR et al., 2016).

As investigações quanto à contribuição da IL-1 β na DRC em humanos datam desde os anos 80 e além de já terem sido relacionadas à maiores complicações em pacientes submetidos à diálise também já foram alvo terapêutico, onde foi investigado o efeito de sua inibição no curso da DRC na espécie (NOWAK et al., 2017). Infortunadamente, nosso estudo não foi capaz de

demonstrar diferença estatística significativa entre os pacientes doentes renais e saudáveis, o que limitaria as expectativas de utilização de inibidores da IL-1 β em pacientes felinos DRC, ao menos nas condições até o momento investigadas nestes animais.

A IFN- γ , por sua vez, em virtude de seus efeitos antifibróticos, já foi experimentalmente utilizada para tratamento e prevenção de fibrose renal em estágios avançados da DRC, no entanto, apresentando efeitos colaterais importantes que podem limitar seu uso (OLDROYD et al., 1999; POOSTI et al., 2015). Embora o presente estudo não tenha conseguido comprovar maior expressão gênica da citocina em animais doentes, vale ressaltar que os diferentes resultados podem estar associados à aplicação de distintas metodologias, onde Poosti (2015) e colaboradores investigaram expressão em tecido renal e nosso estudo a expressão em tecido sanguíneo.

Métodos alternativos, possivelmente mais acurados que os sanguíneos e menos invasivos do que a biópsia para avaliação da inflamação intrarrenal são a mensuração ou expressão dos níveis urinários de citocinas, análises já executadas com sucesso na medicina humana e veterinária (HONKANEN et al., 2000; MCDUFFIE et al., 2010; HABENICHT et al., 2013; LYU et al., 2017).

Os estudos com expressão gênica de sedimento urinário tem sido predominantemente realizados em humanos (HONKANEN et al., 2000; SZETO et al., 2006) e até o momento existe apenas um estudo investigando a mensuração de citocinas em felinos, pelo método ELISA (HABENICHT et al., 2013). De toda forma ambas as análises podem ser promissoras na investigação de disfunções renais.

Até onde sabemos este é o primeiro trabalho a especular a expressão sanguínea de marcadores inflamatórios em felinos renais crônicos e compreendemos haverem limitações metodológicas que podem ter influenciado nossos resultados, tais como o pequeno esforço amostral, composto predominantemente por pacientes compensados, onde 87,5% dos pacientes correspondem à graus brandos de DRC (IRIS I-II) e a possibilidade de que as análises de expressão em tecido renal apresentem resultados mais fidedignos. Desta maneira são necessárias maiores investigações com ampliação amostral, afim de tornar a amostra mais heterogênea.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo conseguiu demonstrar a expressão sanguínea das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ em felinos DRC e saudáveis, no entanto não foi capaz de encontrar diferenças entre os grupos, tendo revelado apenas maior variação de expressão de IL-6 e TNF- α em gatos doentes renais crônicos.

As análise de expressão gênica representa uma alternativa promissora na investigação do desenvolvimento e perpetuação das doenças renais na medicina humana e veterinária. De acordo com nossos achados acreditamos serem necessárias novas investigações com ampliação de animais e diferentes estadiamentos IRIS, bem como a modificação de metodologia que permita maiores informações do status inflamatório intrarrenal, tal como a utilização de sedimento urinário ou tecido renal, para que sejam identificadas possíveis diferenças entre os grupos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9a Ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier Ltda, 2019.

ACIERNO, M. J. et al. ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, n. 6, p. 1-20, 2018.

AKCHURIN, M.; KASKEL, F. Update on inflammation in chronic kidney disease. **Blood purification**, v. 39, n. 1-3, p. 84-92, 2015.

AKCHURIN, O. PATINO, E.; DALAL, V.; MEZA, K.; BHATIA, D.; BROVENDER, S.; ZHU, Y.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; PERELSTEIN, E.; KUMAR, J.; RIVELLA, S.; CHOI, M. E. Interleukin-6 contributes to the development of anemia in juvenile CKD. *Kidney international reports*, 4(3), 470-483. Interleukin-6 contributes to the development of anemia in juvenile CKD. **Kidney international reports**, v. 4, n. 3, p. 470-483, 2019.

AMDUR, R.L.; FELDMAN, H.I., GUPTA, J.; YAN, W.; KANETSKY, P.; SHILPAK, M.; RAHMAN, M.; LASH, J.P.; TOWNSEND, R.R.; OJO, A., ROY-CHAUDHURY, A.; GO, A.S., JOFFE, M.; HE, J.; BALAKRISHNAN, V.S., KIMMEL, P.L.; KUSEK, J.W.; RAJ, D.S. AND THE CRIC STUDY INVESTIGATORS. Inflammation and Progression of CKD: The CRIC Study. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, V. 11, N. 9, P. 1546-1556, 2016.

CHALHOUB, S.; LANGSTON, C.; EATROFF, A. Anemia of renal disease: what it is, what to do and what's new. **Journal of Feline Medicine & Surgery**, v. 13, n. 9, p. 629-640, 2011.

CHIKAZAWA, S.; DUNNING, M. D. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 57, n. 7, p. 348-353, 2016.

CHU, W.M. Tumor necrosis factor. **Cancer letters**, v. 328, n. 2, p. 222-225, 2013.

DOS SANTOS, S.M.M. **Retinopatia hipertensiva em um felino doente renal crônico: relato de caso**. 2018. 60f. Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Curitibanos, 2018.

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

GUPTA, J.; MITRA, N.; KANETSKY, P. A.; DEVANEY, J.; WING, M. R.; REILLY, M.; SHAH, V.O.; BALAKRISHNAN, V.S.; GUZMAN, N.J.; GIRNDT, M.; PERIERA, B.G.;

FELDMAN, H.I.; KUSEK, J.W., JOFFE, M.M.; RAJ, D.S. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 12, p. 1938-1946, 2012.

HABENICHT, L. M.; WEBB, T. L.; CLAUSS, L. A.; DOW, S. W.; QUIMBY, J. M. Urinary cytokine levels in apparently healthy cats and cats with chronic kidney disease. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 15, n. 2, p. 99-104, 2013.

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

HARRIS, R. C.; NEILSON, E. G. Toward a unified theory of renal progression. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 365-380, 2006.

HENDERSON, L.W.; KOCH, K.M.; DINARELLO, C.A.; SHALDON, S. Hemodialysis hypotension: the interleukin hypothesis. **Blood Purification**, v.1, n.1, p. 3-8, 1983.

HONKANEN, E.O.; TEPPONEN, A.M.; GRÖNHAGEN-RISKA, C. Decrease urinary excretion of vascular endothelial growth factor in idiopathic membranous glomerulonephritis. **Kidney international**, v. 57, n. 6, p. 2343-2349, 2000.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). **IRIS Staging of CKD**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/>. IRIS Ltd. Is an independent non-profit organization limited by guarantee in the UK (Registered Number 10213173), 2019a.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS). **Treatment Recommendations for CKD In Cats**. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/>. IRIS Ltd. Is an independent non-profit organization limited by guarantee in the UK (Registered Number 10213173), 2019b.

JAVARD, R.; GRIMES, C.; BAU- GAUDREAU, L.; DUNN, M. Acute- phase proteins and iron status in cats with chronic kidney disease. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 31, n. 2, p. 457-464, 2017.

KANY, S.; VOLLRATH, J.T.; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 23, p. 6008, 2019.

KING, J.N.; TASKER, S.; GUNN-MOORE, D.A; STREHLAU, G. And BENRICH STUDY GROUP. Prognostic Factors in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21n. 5, p. 906-916, 2007.

LONTCHI-YIMAGOU, E.; SOBNGWI, E.; MATSHA, T. E.; KENGNE, A. P. Diabetes mellitus and inflammation. **Current diabetes reports**, v. 13, n. 3, p. 435-444, 2013.

LULICH, J.P.; OSBORNE, C.A.; O'BRIEN, T.D. et al. **Feline renal failure: questions, answers, questions**. The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian (USA), 1992.

LYU, L.L.; FENG, Y.; LIU, B.C. Urinary biomarkers for chronic kidney disease with a focus on gene transcript. **Chinese medical journal**, v. 130, n. 18, p. 2251-2256, 2017.

MCDUFFIE, J.E.; SABLAD, M.; MA, J.; SNOOK, S. Urinary parameters predictive of cisplatin-induced acute renal injury in dogs. **Cytokine**, v. 52, n.3, p. 156-162, 2010.

MCLELAND, S.M.; CIANCIOLO, R.E.; DUNCAN, C.G.; QUIMBY, J.M. A Comparison of Biochemical and Histopathologic Staging in Cats with Chronic Kidney Disease. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 3, p. 524-534, 2015.

MARINO, C.L.; LASCELLES, B.D.X.; VADEN, S.L.; GRUEN, M.E.; MARKS, S.L. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n; 6, p 465-472, 2014.

NELSON, R. W. & COUTO, C.G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 5.ed.Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

NENTWIG, A.; SCHWEIGHAUSER, A.; MAISSEN-VILLIGER, C.; BRUCKMAIER, R.M.; ZURBRIGGEN, A, VAN DORLAND, H.A.; FRANCEY, T. Assessment of the expression of biomarkers of uremic inflammation in dogs with renal disease. **American journal of veterinary research**, v. 77, n. 2, p. 218-224, 2016.

NOWAK, K.L.; CONCHOL, M.; IKIZKER, T.A.; FARMER, BAILEY, H.; SALAS, N.; CHAUDHRY, R.; WANG, W.; SMITS, G.; TENGESDAL, I.; DINARELLO, C.A.; HUNG, A.M. IL-1 Inhibition and Vascular Function in CKD. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 28, n. 3, p. 971-980, 2017.

OH, D.J.; KIM, H.R.; LEE, M.K.; WOO, S.Y. Profile of Human β -Defensins 1,2 and Proinflammatory Cytokines (TNF- α , IL-6) in Patients with Chronic Kidney Disease. **Kidney and Blood Pressure Research**, v. 37, N. 6, P. 602-610, 2013.

O'NEILL, D. G. *et al.* Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. **The Veterinary Journal**, v. 202, n. 2, p. 286-291, 2014.

OLDROYD, S.D.; THOMAS, G.L.; GABBIANI, G.; EL NAHAS, A.M. Interferon- γ inhibits experimental renal fibrosis. **Kidney International**, v. 56, n. 6, p. 2116- 2127, 1999.

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

POOSTI, F.; BANSAL, R.; YAZDANI, S.; PRAKASH, J. POST, E.; KLOK, P.; VAN DER BORN, J.; DE BORST, M.H.; VAN GOOR, H.; POELSTRA, K.; HILLEBRANDS, J.L. Selective delivery of IFN- γ to renal interstitial fibroblasts: a novel strategy for the treatment of renal fibrosis. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 3, p. 1029-1042, 2015.

PORAŻKO, T.; KUŹNIAR, J.; KUSZTAL, M.; KUŹNIAR, T. J.; WEYDE, W.; KURIATA-KORDEK, M.; KLINGER, M. IL-18 is involved in vascular injury in end-stage renal disease patients. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 24(2), 589-596. IL-18 is involved in vascular injury in end-stage renal disease patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 2, p. 589-596, 2009.

RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v. 23, n. 4, p. 710-715, 2011.

RAY, M.; CARNEY, H.C.; BOYNTON, B.; QUIMBY, J.; ROBERTSON, S.; DENIS, K.S.; TUZIO, H.; WRIGHT, B. 2021 AAEP Feline Senior Cats Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 7, p. 613-638, 2021.

REN, K.; TORRES, R. Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. **Brain research reviews**, v. 60, n. 1, p. 57-64, 2009.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 family cytokines. **Cold Spring Harbos perspectives in biology**, v. 10, n. 2, pa028421, 2018.

SCHÜLTTER, J.; NEUMANN, S. Interleukin-6 as a prognostic marker in dogs in an intensive care unit. **Veterinary clinical pathology**, v. 44, n. 2, p. 223-228, 2015.

SHEU, J. N.; CHEN, S. M.; MENG, M. H.; LUE, K. H. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 28, n. 10, p. 885-890, 2009.

SHOELSON, S.E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.

SPARKES, A. H. et al. ISFM consensus guidelines on the diagnosis and management of feline chronic kidney disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 3, p. 219-239, 2016.

SPURGEON, K.R.; DONOHOE, D.L.; BASILE, D.; Transforming growth factor- β in acute renal failure: receptor expression., effects on proliferation, cellularity, and vascularization after recovery from injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 288, n. 3, p. F568-F577, 2005.

STENVINKEL, P.; HEIMBÜRGER, O.; PAULTRE, F.; DICZFALUSY, U.; WANG, T.; BERGLUND, L.; JOGESTRAND, T. Strong association between malnutrition, inflammation, and atherosclerosis in chronic renal failure. **Kidney international**, v. 55, n. 5, p. 1899-1911, 1999.

STENVINKEL, P.; CARRERO, J. J.; AXELSSON, J.; LINDHOLM, B.; HEIMBÜRGER, O.; MASSY, Z. Emerging biomarkers for evaluating cardiovascular risk in the chronic kidney disease patient: how do new pieces fit into the uremic puzzle?. **Clinical journal of the American Society of Nephrology**, v. 3, n. 2, p. 505-521, 2008.

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

SZETO, C.C.; CHOW, K.M.; LAI, K.B.; SZETO, C.Y.; CHAN, R.W.Y.; KWAN, B.C.H.; CHUNG, K.Y.; LI, P.K.T.; LAI, F.M.M. Mrna Expression of Target Genes in the Urinary Sediment as Noninvasive Prognostic Indicator of CKD. **American journal of kidney diseases**. V. 47, n;4, p. 578-586, 2006.

TASKER, S. Diagnostic approach to anemia in cats. **In Practice**, v. 34, n. 7, p. 370-381, 2012.

VADEN, S. L. Renal biopsy of dogs and cats. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 20, n. 1, p. 11-22, 2005.

TURNER, J.E. Natural killers: the bad guys in fibrosis?. **Kidney international**, v. 92, n. 1, p. 9-11, 2017.

ZYGNER, W.; GÓJSKA-ZYGNER, O.; BASKA, P.; DLUGOSZ, E. Increased concentration of serum TNF alpha and its correlations with arterial blood pressure and indices of renal damage in dogs infected with *Badesia canis*. **Parasitology research**, v. 113, n. 4, p. 1499-1503, 2014.

ANEXO I



TERMO DE AUTORIZAÇÃO

Projeto intitulado:

EXPRESSÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM FELINOS DOENTES RENAIAS CRÔNICOS

Eu, _____, inscrito sobre o CPF _____, residente na Rua/Avenida _____, n° _____, complemento _____, bairro _____, município de _____, estado _____, proprietário do(s) animal(is) _____, autorizo a participação do mesmo no projeto acima intitulado e concordo com o procedimentos experimentais a serem realizados com os animais.

O projeto é coordenado pelo prof. Dr. M.V. André M C Meneses e será realizado pela M.V. Tamires V S Natividade.

Declaro que todas as minhas dúvidas foram devidamente esclarecidas.

_____, ____/____/____.

ASSINATURA