

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

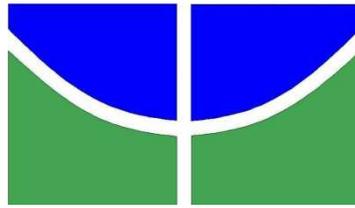
**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA DOENÇA RENAL POLICÍSTICA E DE SUAS ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE GATOS**

MARCELA CORRÊA SCALON

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2014



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA DOENÇA RENAL POLICÍSTICA E DE SUAS ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE GATOS**

MARCELA CORRÊA SCALON

ORIENTADOR: GIANE REGINA PALUDO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO:089/2014

BRASÍLIA/DF

FEVEREIRO/2014

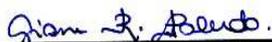
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**ESTUDO DA OCORRÊNCIA DA DOENÇA RENAL POLICÍSTICA E DE SUAS ALTERAÇÕES
LABORATORIAIS EM DIFERENTES POPULAÇÕES DE GATOS**

MARCELA CORRÊA SCALON

DISSERTAÇÃO DE Mestrado submetida ao
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO
GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO, DOUTORA (UNB)



JAIR DUARTE DA COSTA JÚNIOR, DOUTOR (UNB)



GLÁUCIA BUENO PEREIRA NETO, DOUTORA (UNB)

BRASÍLIA/DF 17 DE FEVEREIRO DE 2014

BRASÍLIA/DF, 17 DE FEVEREIRO DE 2014
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SCALON, M.C. **Estudo da ocorrência da doença renal policística e de suas alterações laboratoriais em diferentes populações de gatos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2014, 44p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Scalon, Marcela Corrêa

Estudo da ocorrência da doença renal policística e de suas alterações laboratoriais em diferentes populações de gatos. /Marcela Corrêa Scalon
Orientação de Giane Regina Paludo
Brasília, 2014. 44p

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2014

1. Doença renal policística felina. 2. Diagnóstico. 3. Gatos. 4. Testes genéticos. 5. PCR. I. Paludo, G.R. II. Doutor

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço de coração à minha família pelo amor, pela compreensão e pelo incentivo para mais essa fase da minha vida. Toda minha vida é fruto da dedicação e dos ensinamentos de meus pais Luciana e Marcelo, e grande parte da minha força foi construída ao lado de minha irmã Marina de quem tenho muito orgulho e admiração.

Obrigada a todos os meus amigos mais íntimos pela paciência, pelo amor e carinho nos momentos que precisei, obrigada pelas palavras de incentivo e por se fazerem sempre presente mesmo com o pouco tempo disponível que tive.

Obrigada aos animais que já fizeram parte da minha vida e cada um foi importante à sua maneira, sempre contribuindo para minha paixão pela veterinária e pelos animais. MUITÍSSIMO obrigada aos que permanecem alegrando minha vida e são minha família. Obrigada ainda aos passarinhos que cantaram todos os dias no prédio do laboratório alegrando o trabalho e fazendo companhia nos dias mais solitários.

Agradeço aos proprietários e gatos que participaram da pesquisa, disponibilizando seu tempo e sua boa vontade, sempre com muito interesse.

Obrigada a todos os colegas, amigos, alunos, residentes, veterinários que me ajudaram durante o processo de coleta e processamento de material, todos sempre com muita vontade de ajudar, trabalhar e aprender. Esse suporte foi essencial para o sucesso da pesquisa.

Agradeço especialmente à equipe do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária que tornaram o ambiente de trabalho um segundo lar para mim. Obrigada a todos pelos momentos de alegria, descontração, estudos e pelas constantes palavras de apoio.

Agradeço imensamente à professora e orientadora Giane pelo apoio e a oportunidade, por acreditar em mim e no meu trabalho. Sua dedicação é minha fonte de inspiração, obrigada por tudo.

**“Há poucas coisas na vida mais emocionantes
do que ser recebido por um gato.”**

Tay Hohoff

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURA.....	xii
ABSTRACT.....	2
RESUMO.....	3
INTRODUÇÃO.....	4
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
RESULTADOS.....	13
DISCUSSÃO.....	20
FABRICANTES E MARCAS REGISTRADAS.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIÇÕES

<i>ADPKD</i>	<i>Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease</i>
ALT	Alanina aminotransferase
°C	Graus Celcius
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
DRP	Doença renal policística
dl	Decilitros
dNTP	Trifosfatos de desoxirribonucleosídeos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético – anticoagulante
FA	Fosfatase alcalina
FeLV	Vírus da leucemia felina
FIV	Vírus da imunodeficiência felina
GAPDH	Gliceraldeído-3fosfato desidrogenase
g/dl	Gramas por decilitro
Hvet-UnB	Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB
mg/dL	Miligramas por decilitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
mM	Mili Molar
ng	Nano gramas
NMB	<i>New Metilene Blue</i> (Novo azul de metileno)
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
pb	Pares de base
PKD1	Gene felino responsável pela codificação da proteína policistina-1
<i>PKD</i>	<i>Polycystic Kidney Disease</i>
pmol	Picomoles
PPT	Proteínas plasmáticas totais
PT	Proteína total

RFLP-PCR	Reação em cadeia de polimerase com digestão enzimática
UnB	Universidade de Brasília
U	Unidade
VG	Volume globular
VCM	Volume corpuscular médio
μL	Micro litros

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1.	Sequência de oligonucleotídeos, gene de origem, tamanho dos produtos de amplificação e referência bibliográfica das reações de PCR utilizadas.	9
Tabela 2.	Classificação dos grupos de acordo com os sinais clínicos e as alterações hematológicas.	12
Tabela 3.	Quantidade de exames realizados para cada variável, separados de acordo com o diagnóstico molecular para DRP.	14
Tabela 4.	Total de animais e Prevalência da DRP de acordo com a procedência, gênero, raça e idade.	15
Tabela 5.	Média, desvio padrão e comparação dos parâmetros do hemograma e da bioquímica sérica entre os grupos de animais positivos (G1) e negativos (G2) para DRP identificados por meio da PCR.	16
Tabela 6.	Média, desvio padrão e comparação das urinálises entre os grupos de animais positivos (G1) e negativos (G2) e apresentação dos resultados individuais das análises de sedimentos urinários do grupo G1.	17
Tabela 7.	Ocorrência de animais positivos para DRP correlacionados com os sinais clínicos e anemias.	18
Tabela 8.	Número total de animais analisados com apresentação de sinais clínicos associados à idade.	18

Tabela 9.	Número total de animais analisados com alterações hematológicas associadas à idade.	19
Tabela 10.	Anemias correlacionadas à idade, independente do resultado da PCR-DRP.	19
Tabela 11.	Animais que apresentaram sintomas clínicos de doenças do trato urinário correlacionados de acordo com a idade, independente do resultado da PCR-DRP.	19
Tabela 12.	Correlação entre animais positivos (G1), negativos (G2) e sinais clínicos.	20

LISTA DE FIGURA

	Página
Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% dos resultados dos controles positivos das PCRs realizadas (A: PCR GAPDH, B: PCR PKD-F3/R2, C: PCR PKD1, D: RFLP-PCR utilizando a enzima MLY1). L: marcador molecular de 100pb. #1,4 e 5: controles negativos. #2 (A): controle positivo GAPDH, #3 (B): controle positivo DRP, #6 (C): controle positivo PKD1, #7 e 8 (D): controle positivo e amostra positiva para digestão enzimática MLY1, #9 (D): amostra negativa para digestão enzimática MLY1.	13

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

A presente dissertação encontra-se formatada segundo as normas do sistema de submissão de artigos para publicação na revista *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* (SAGE journals).

Estudo da ocorrência da Doença Renal Policística e de suas alterações laboratoriais em diferentes populações de gatos.

Marcela C. Scalon, Thamiris F. da Silva, Larissa C. Aquino, Filipe T. Carneiro, Máira G. da M. Lima,
Marcelle dos S. Lemos, Giane R. Paludo¹

Do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (Scalon, Silva, Aquino, Carneiro, Lima, Lemos e Paludo), Brasília, Brasil.

¹Autor para correspondência: Giane Regina Paludo, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), ICC Sul, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Cx. Postal 4508, Brasília, DF 70910-970, Brasil. giane@unb.br

Occurrence of polycystic kidney disease and laboratory findings in different cat populations

Abstract: Autosomal-dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most prevalent inherited genetic disease of cats, affecting Persian and Persian related cats. The point mutation (C→A transversion) in exon 29 of the *PKD1* gene contributes to ADPKD development and is a specific molecular target for its molecular genetic diagnosis in cats. This research developed a polymerase chain reaction (PCR) to detect this single mutation linked to ADPKD development; furthermore, clinical outcomes of tested animals were correlated to genetic test. The authors tested 334 cats (188 animals from Veterinary Hospital of Small Animal at University of Brasilia – UnB, and 146 from other areas of Distrito Federal) with 9% prevalence among samples, 33% between Persian and 7% between Brazilian long and short hair cats. There was no correlation between prevalence, age and gender. Positive animals showed hyperglobulinemia ($p=0,020$), lower lymphocytes mean count ($p=0,043$) and higher platelets mean count ($p=0,027$) than negative animals. Clinical signs associated to urinary tract disease are age related and occur more often in animals older than six years ($p=0,001$). Not always the animal carrying the mutant gene shows symptoms of ADPKD and comparison between PCR, clinical and laboratory finds shown that it is possible to detect the mutation in animals of any age, presenting symptoms or not. This research explained the mutation may occur not only in Persian and Persian-related cats, in addition provided a better knowledge to molecular analysis that allows more efficient early diagnosis of carriers.

KEY WORDS: Cats, diagnose, genetic test, polycystic kidney disease, PCR.

Estudo da ocorrência da Doença Renal Policística e de suas alterações laboratoriais em diferentes populações de gatos

Resumo: A doença renal policística (DRP) de caráter autossômico dominante é a doença genética mais prevalente em gatos, principalmente das raças persas e derivadas. A mutação pontual (transversão C→A) no exon 29 do *gene PKD1* é conhecida por contribuir para o desenvolvimento da DRP e pode ser usada como um alvo para o diagnóstico molecular específico desta doença. Neste trabalho foi desenvolvido o ensaio de PCR (reação em cadeia de polimerase) capaz de detectar essa única mutação associada ao desenvolvimento da DRP, além disso, os achados clínicos dos animais testados foram correlacionados aos resultados do teste genético. Foram avaliados 334 felinos (188 animais provenientes do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB e 146 de outras regiões do Distrito Federal) com prevalência da DRP de 9% em toda a amostragem, 33% em animais da raça persa e 7% em animais sem raça definida. Não houve correlação da prevalência com gênero e idade. O grupo de animais positivos apresentou hiperglobulinemia ($p=0,020$), média de contagem de linfócitos mais baixa ($p=0,043$) e média de contagem de plaquetas mais alta ($p=0,027$). O aparecimento de sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário foi associado à idade e ocorrem com mais frequência em animais com mais de seis anos ($p=0,001$). Nem sempre o animal portador do gene mutante apresentou sinais clínicos da DRP no momento da análise diagnóstica. A comparação feita entre PCR, achados clínicos e achados laboratoriais demonstrou que foi possível detectar a mutação em animais de qualquer idade, com apresentação ou não de sinais clínicos. Este estudo demonstrou que a mutação não se limita somente a animais da raça persa, além disso, proporcionou melhor conhecimento relacionado a testes moleculares que auxiliam de forma mais eficiente para o diagnóstico precoce de portadores.

Termos de indexação: Doença renal policística, diagnóstico, gatos, testes genéticos, PCR.

Introdução

A doença renal policística (DRP) felina, também conhecida como PKD (polycystic kidney disease) ou ADPKD (autosomal dominant polycystic kidney disease), caracteriza-se pelo crescimento de cistos no parênquima renal e, ocasionalmente, no fígado, pâncreas e baço, de tamanhos que podem variar de menos de um milímetro até mais de um centímetro.¹³

As lesões morfológicas de DRP em gatos se assemelham às mesmas lesões presentes em pacientes humanos e, nas duas espécies, o cisto renal pode se formar pela dilatação de qualquer segmento do néfron. A não diferenciação celular durante a cistogênese gera perda das características estruturais das células renais, podendo impedir a verificação da origem do epitélio cístico. Além disso, a variação na concentração de sódio, inclusive em diferentes cistos presentes em um mesmo paciente, é consistente com a cistogênese em segmentos nefróticos diversos.¹³ Essa dilatação pode ocorrer devido à hiperplasia das células epiteliais, que levam a um desenvolvimento de pólipos causando uma obstrução parcial com subsequente dilatação dos túbulos renais, o que produz as estruturas císticas. Outra discussão aborda a possibilidade de um defeito na membrana basal que promoveria flacidez na parede causando a dilatação secundária dos túbulos renais. É possível que estas duas hipóteses estejam implicadas no desenvolvimento da DRP em felinos.¹⁶ O aumento da proliferação epitelial também pode contribuir para a cistogênese, principalmente em felinos mais jovens, cessando quando os cistos se estabilizam. O aumento dos cistos estáveis pode ocorrer por outros mecanismos como a reversão da polaridade das células do epitélio tubular com translocação das bombas de sódio e potássio (Na/K) da membrana basolateral para a luminal, causando uma secreção reversa dos fluidos e consequente aumento do volume cístico.¹³ Os cistos geralmente apresentam conteúdo fluido semelhante a um transudato, ligeiramente amarelado e que pode conter fibrina, material purulento e até sangue. Microscopicamente as células epiteliais renais dos cistos se apresentam em formas cuboides, achatadas ou não, com poucas microvilosidades e sem bordas em escova. Não há relação quanto ao tamanho dos cistos e a morfologia celular.¹³

A disfunção renal, decorrente da DRP, aparece tardiamente por volta de sete anos de idade, sendo que os cistos podem estar presentes bilateralmente desde o nascimento e aumentam lentamente ao longo da vida, causando a hipertrofia dos rins e levam a redução progressiva da função renal.⁶ Com o tempo, a manifestação da DRP induz a insuficiência renal crônica já que os animais mais velhos apresentam cistos maiores e mais numerosos. Os sinais clínicos não são específicos e se assemelham aos da doença renal crônica: depressão, anorexia, perda de apetite, vômitos, poliúria, polidipsia, emaciação e hematúria.⁶ Além

disso, se os cistos se tornarem infectados em decorrência da evolução de cistite, infecção sistêmica ou punções assépticas, os animais ainda podem apresentar febre, piúria e leucocitose.^{5,16} Não há tratamento específico para a DRP, portanto os animais que apresentam a manifestação da DRP devem ser tratados como insuficientes renais crônicos.¹⁶

Gatos portadores de DRP podem ser assintomáticos no caso de envolvimento unilateral, ou serem sintomáticos quando a manifestação da doença é bilateral.⁴ A renomegalia ocorre na presença de múltiplos cistos e é muito comum em pacientes humanos que apresentam a doença. Já nos gatos, essa alteração é mais comum quando há lesões em ambos os rins. A nefrite túbulo-intersticial parece ocorrer tanto nos pacientes humanos quanto em felinos. A hematúria em gatos é causada, provavelmente por um sangramento intra-renal e é similar ao que ocorre em humanos.²⁸

Ao exame físico, os rins palpados podem apresentar tamanho aumentado e forma irregular, dependendo do estágio da doença, pois com a cronicidade e a evolução da DRP ao longo dos anos, os cistos se tornam maiores, ocupando maior parte do parênquima e deformando a estrutura física do órgão.¹⁶ O animal ainda pode apresentar desidratação e mucosas pálidas, dependendo do grau de comprometimento do parênquima renal em casos mais avançados da DRP onde há perda da função renal pelo desenvolvimento dos cistos.¹² Nos gatos com diagnóstico precoce, os achados clínicos são restritos à renomegalia bilateral e os exames laboratoriais não apresentam alterações dignas de nota, já em animais com maior comprometimento renal o perfil laboratorial é compatível com insuficiência renal crônica, onde é possível identificar graus variados de azotemia, acidose metabólica, hiperfosfatemia e anemia não regenerativa. Na urinálise é observada baixa densidade urinária, sedimento inativo e proteinúria discreta a moderada.¹⁶

Imagens obtidas por exames radiográficos, ultrassonográficos, tomografia computadorizada e urografia excretora podem ser usadas como método diagnóstico para a DRP. Além desses exames, a biópsia renal também pode ser realizada, geralmente como avaliação pós morte.^{6,16} Normalmente o exame ultrassonográfico é usado como um dos métodos mais práticos e não invasivos de diagnóstico na detecção da DRP. Porém há possibilidades dos resultados serem falso-positivos, dependendo da manifestação de outras enfermidades como abscessos renais, nefrites e neoplasias, ou falso-negativos e só podem ser feitos em animais com mais de 10 meses de idade.⁶

A DRP é uma doença predominante em gatos da raça Persa ou mestiços dessa raça, e não apresenta predisposição sexual.^{16,22} Considerando o cruzamento de persas com outras raças como siamês,

pêlo curto inglês, pêlo curto americano, entre outras, esses animais também devem ser testados para DRP.²³ No Brasil, esta doença é de difícil controle, pois não existem dados científicos quanto a sua prevalência. Os gatos de pêlo curto e sem raça definida também são comprometidos pela DRP, o que reitera a necessidade de uma investigação abrangente que relacione todas as raças de gatos neste país.^{16,32}

Aproximadamente 33 genes contêm 50 mutações responsáveis por causarem problemas de saúde ou alterações na aparência física dos gatos domésticos. Alguns atributos fenotípicos podem ser desejados, ou não, especialmente no caso de doenças. Fenótipos podem ser resultantes da manifestação de apenas um gene, da interação de vários genes, da influência do meio ambiente, ou uma combinação desses fatores. O médico veterinário pode escolher diferentes opções de tratamento e manejo clínicos, ou definir um prognóstico diferente caso o fenótipo seja comprovadamente uma herança genética. Quando a mesma condição patogênica é encontrada em outras espécies, a abordagem veterinária tem a oportunidade de usar a medicina comparativa para determinar tratamentos alternativos.²³

O caráter hereditário autossômico dominante está relacionado com três tipos de formas (**PP**, **Pp** e **pp**) do gene *PKD* (*PKD1-gene da policistina-1*). O **P** representa a forma dominante e o **p** a recessiva. Dois genes, carregados por cada indivíduo, estão relacionados ao locus para DRP, sendo um deles o materno e o outro o paterno, de forma que existem três possíveis combinações: **PP** (genotipagem homocigota positiva com fenótipo positivo), **Pp** (genotipagem heterocigota positiva com fenótipo positivo) e **pp** (genotipagem homocigota negativa com fenótipo negativo).⁶ Os animais que apresentam o perfil genético de homocigose dominante, resultado da herança do gene *PKD* proveniente da mãe e outro do pai, não sobrevivem uma vez que a doença apresenta uma forma grave e letal que provoca óbito intrauterino ou falência renal precoce.³² Pais geneticamente recessivos (**pp**) para DRP somente poderão gerar filhotes positivos para a doença se houver alguma mutação genética de ocorrência espontânea na prole.^{6,16}

Gatos que apresentam DRP são heterocigotos (presença de um gene sadio **p** e um gene mutante **P**). Desta forma, o cruzamento de dois gatos homocigotos (negativos) resulta em prole sadia. O cruzamento de um gato homocigoto (sadio) com um gato heterocigoto (atingido) resulta na prole com probabilidade de apresentar metade de gatos heterocigotos e outra metade homocigota. O cruzamento de dois gatos heterocigotos apresenta estatística de 75% da prole afetada e 25% sadia. Entre esses gatos atingidos, um terço será homocigoto dominante e, conseqüentemente, incompatível com a vida.¹⁶

Em 2004, Lyons e colaboradores identificaram a transversão C>A no exon 29 do gene felino *PKD1*, compatível com a modificação do mRNA que desencadeia a manifestação da DRP. Esta mutação genética resulta na interrupção da síntese proteica na posição 3284 do gene, sugerindo perda de 25% da porção C-terminal da proteína codificada, a policistina-1, e serve como alvo para detecção molecular da presença do gene mutante em gatos afetados pela DRP. A policistina-1 é responsável pela regulação da proliferação celular, diferenciação celular e apoptose. A redução da sua atividade favorece o surgimento de lesões e alterações no parênquima renal.³

A reação da polimerase em cadeia (Polymerase Chain Reaction – PCR) é uma técnica molecular avançada que possibilita a detecção rápida e precisa para identificação da mutação conhecida com o uso de oligonucleotídeos desenhados especificamente para a sequência genética escolhida.^{22,23} Este método diagnóstico pode ser usado para genotipagem de animais em qualquer idade, inclusive recém-nascidos, e determinar a presença da mutação genética.⁹

O estudo da DRP é muito importante por ser uma das principais causas de insuficiência renal e a mais proeminente doença hereditária felina.²⁴ O estudo da prevalência dessa enfermidade mostra uma incidência maior do que o esperado, conforme descrito nos Estados Unidos, Austrália, Inglaterra, Alemanha, França e Itália; é estimada entre 30% a 49% em toda a população mundial.^{2,8,16,23} Além disso, a DRP em gatos domésticos é muito usada como modelo para estudo desta enfermidade em humanos, pois gatos e humanos apresentam uma forte semelhança biológica, anatômica e dividem mais de 30 doenças hereditárias homólogas.²⁴ Há também outros estudos em camundongos como modelos animais, pois o padrão dominante autossômico é muito semelhante nessas espécies.¹⁸

Neste estudo foi abordada a aplicabilidade dos testes moleculares (PCR) com os seguintes objetivos: adaptação da técnica para detecção dos genes mutante e normal que identificam o indivíduo heterozigoto portador da DRP; correlacionar os métodos diagnósticos (achados clínicos, achados laboratoriais e PCR); determinação da prevalência da DRP na população de gatos estudada na região urbana e periurbana do DF pertencentes ao grupo de animais atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da Universidade de Brasília (Hvet-UnB) e o grupo amostrado nas cidades do DF durante a campanha de vacinação anti-rábica; avaliação das alterações presentes nos exames laboratoriais, achados clínicos e exame físico de animais que apresentam ou não a manifestação clínica da DRP.

Materiais e métodos

Foram utilizadas amostras de sangue de 334 gatos domésticos (*Felis catus*) para determinação da presença da mutação genética da DRP, sendo 188 amostras provenientes de animais atendidos no Hvet-UnB, e 146 amostras de animais que participaram da campanha de vacinação anti-rábica nas cidades do Distrito Federal-DF sendo 66 em Sobradinho-Fercal, 12 na Ceilândia, 41 no Gama, 4 no Guará, 12 em Planaltina, 4 em Vicente Pires, 3 em Brasília, 4 em Samambaia. Os animais foram escolhidos de forma aleatória, independentemente de idade, raça, sexo ou condição clínica e classificados em dois grupos de acordo com o resultado diagnóstico do teste molecular e pela procedência da amostra (Hvet-UnB ou campanha de vacinação anti-rábica).

Os métodos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal, CEUA - UnB (UnBDOC nº 43930/2012).

As amostras de sangue foram colhidas de sangue venoso por punção da veia cefálica ou jugular e foram acondicionadas em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para realização de hemograma e perfis bioquímicos no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hvet-UnB. As amostras foram submetidas à contagem celular em um contador automático de células^a para uso veterinário onde foi determinada a concentração de hemoglobina, o número de hemácias, leucócitos e plaquetas. Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O volume globular (VG) foi determinado pela técnica do micro-hematócrito com a utilização de capilares sem heparina e microcentrífuga.^b As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com o auxílio do refratômetro portátil (Modelo: SZJ-D). Também foram preparados esfregaços de sangue total com corante comercial tipo Romanowsky^c para realização do diferencial leucocitário e observação morfológica das células sanguíneas.

Para avaliação das análises bioquímicas foi separado soro das amostras acondicionadas em tubos sem EDTA. Foram utilizados kits bioquímicos específicos,^d seguindo recomendações do fabricante e a leitura foi realizada em um analisador bioquímico semi-automático^e para determinação dos valores séricos de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina, globulina, fósforo, frutossamina, potássio, e para determinação de proteína total e creatinina urinárias.

Como exame complementar, foram realizadas 25 urinálises de amostras colhidas por cistocentese e analisadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Hvet-UnB. A metodologia usada compreende

a determinação dos padrões físicos e químicos da urina com o uso da fita colorimétrica,^f centrifugação de 5ml de urina para sedimentação em 1ml e visualização em microscópio dos componentes presentes.

Para a realização do exame molecular (PCR) foi extraído DNA das amostras de sangue total com kit comercial,^g seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído ficou armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR.

Todas as amostras foram submetidas à PCR para confirmação da presença do gene que codifica a enzima GAPDH (gliceraldeído-3fosfato desidrogenase), para verificar a qualidade da extração, a integridade do DNA obtido e/ou a presença de inibidores da PCR. Em seguida, as amostras foram submetidas à PCR para o diagnóstico do *gene mutante PKD1* (acesso ao GenBank no. AY612847). Os oligonucleotídeos utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de oligonucleotídeos, gene de origem, tamanho dos produtos de amplificação e referência bibliográfica das reações de PCR utilizadas.

Reação/Primer	Sequência 5´-3´	Gene	Tamanho do produto	Referência
GAPDH				
GAPDH F	CCTTCATTGACCTCAACTACAT	<i>GAPDH</i>	400pb	Birkenheyer et al., 2003
GAPDH R	CCAAAGTTGTCATGGATGACC	<i>GAPDH</i>		Birkenheyer et al., 2003
PKD				
F3	AGAGGCAGACGAGGAGCACT	<i>PKD1 mutante</i>	277pb	Lee et al., 2010
R2	GCCTCGTGGAGAAGGAGGT	<i>PKD1 mutante</i>		Lee et al., 2010
PKD1				
PKD1F	CAGGTAGACGGGATAGACGA	<i>PKD1 exon 29</i>	559pb	Lyons et al., 2004
PKD1R	TTCTTCCTGGTCAACGACTG	<i>PKD1 exon 29</i>		Lyons et al., 2004

A reação do mix para a PCR da GAPDH foi composta de tampão 1X de PCR, 10ng de DNA, MgCl₂ 1,5mM, 0,2mM de cada deoxinucleotídeo^h, 1µL de cada oligonucleotídeo (10pmol) e 1,25 U de *Taq* DNA polimerase^h em um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação foi composto de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (94°C por 30 segundos, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 5 minutos, de acordo com o descrito em 2003 por Birkenheyer e colaboradores.⁷

Após a PCR para confirmação da integridade do DNA e ausência de inibidores da PCR, cada amostra foi submetida ao protocolo para detecção molecular do *gene PKD1 mutante* com os

oligonucleotídeos PKD (F3) e PKD (R2) específicos (Tabela 1). Para a composição da mistura da PCR foi utilizado tampão 1X da Taq polimerase^h, 2mM de MgCl₂, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10pmol), 0,25mM de dNTP^h (dATP, dCTP, dGTO, dTTP), 1U de Taq DNA polimerase^h e 5ng de DNA do produto de extração da amostra em um volume final de 25µL para a reação. A amplificação utilizou o protocolo tipo “Touch Down”, onde há redução gradual da temperatura de anelamento em cada ciclo, desenvolvida a partir da padronização feita em 2010 por Lee e colaboradores.²² Na etapa inicial, após prévio aquecimento da tampa do termociclador por 2 minutos, as amostras foram incubadas a 94°C por 5 minutos para ocorrer desnaturação inicial. Em seguida, as amostras passaram por 10 ciclos de 94°C por 1 minuto para a desnaturação da fita de DNA, 67°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos (diminuindo 1°C por ciclo) e 72°C por 1 minuto para a extensão das fitas. Ao término desta etapa, foram realizados 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Ao final, foi realizada a extensão final a 72°C por 10 minutos. Esta PCR gerou um produto final de 277 pares de bases apenas em amostras positivas para a mutação no *gene PKD1*.

Como um teste confirmatório de PCR para detecção molecular da mesma mutação genética encontrada com o protocolo anterior, foi realizado uma RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism – Polymerase Chain Reaction) com os oligonucleotídeos PKD1F e PKD1R (Tabela 1) em todas as amostras positivas e algumas negativas para a PCR-DRP. Neste protocolo a composição do mix foi feita com tampão 1X da Taq polimerase^h, 1,75mM de MgCl₂, 1 µL de cada oligonucleotídeo (10pmol), 0,25mM de dNTP^h (dATP, dCTP, dGTO, dTTP), 1 U de Taq DNA polimerase^h e 5ng de DNA do produto de extração da amostra em um volume final de 25µL para a reação. O protocolo de amplificação foi composto por uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 51°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 10 minutos, e gerou um produto de 559 pares de base que representa o *gene PKD1* felino com ou sem mutação. Aproximadamente 5µL do produto de amplificação foi digerido com 5U da enzima *MLY1*ⁱ, 1X NE Tampão em 10µL de volume final da reação a 37°C por 2 horas. A digestão completa da reação foi analisada em gel de agarose de 1,8 a 2%. As condições deste protocolo foram adaptadas a partir do protocolo descrito em 2004 por Lyons e colaboradores.²⁴ Quando a mutação está presente no fragmento amplificado, proporciona um sítio de restrição enzimática para a *MLY1*ⁱ que produz dois fragmentos de 316 e 243 pares de base. Todas as reações de amplificação foram realizadas no mesmo aparelho termociclador.^j

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio^l e observados sob transiluminador^k de fluorescência ultravioleta. Um marcador molecular^h com intervalos de pesos moleculares de 100pb foi incluído em cada eletroforese como um padrão de comparação de altura das bandas para determinação do tamanho do produto amplificado. O aparecimento de bandas na altura dos pares de bases esperadas foi considerado o parâmetro para classificar as amostras como positivas.

Em todas as PCRs foram utilizados como controle negativo água miliQ (estéril e desprovida de DNA). Como controles positivos, para as PCRs de DRP e GAPDH, foram utilizadas amostras de três gatos que apresentaram cistos renais em exames ultrassonográficos e fazem acompanhamento clínico para DRP.

Os procedimentos de preparação dos reagentes, processamento das amostras, amplificação e detecção do produto amplificado foram realizados em quatro ambientes distintos, propriamente localizados no Laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular (Hvet-UnB), para diminuir a possibilidade de contaminação.

Na organização dos resultados, algumas variáveis qualitativas foram recategorizadas em grupos para posteriores análises de comparação de proporção entre eles. Nos casos agrupados de acordo com os sinais clínicos, foi levada em consideração a avaliação do médico veterinário quanto ao exame clínico e histórico do gato, bem como alguns resultados de exames urinários, bioquímicos (ureia e creatinina) e ultrassonográficos. Para a classificação das anemias foi considerado, primeiramente, que um animal anêmico deve apresentar um valor abaixo do referencial para qualquer um dos parâmetros de VG, hemácias ou hemoglobina. A seguir, foram avaliadas as alterações celulares presentes no hemograma. A contagem de reticulócitos foi realizada pela técnica de coloração com Novo Azul de Metileno (NMB)^m para visualização das células em microscopia ótica. Os animais agrupados nas categorias “outras alterações” e “nenhuma alteração digna de nota”, não se apresentaram anêmicos. A Tabela 2 apresenta os critérios de classificação para os grupos analisados.

Tabela 2. Classificação dos grupos de acordo com os sinais clínicos e as alterações hematológicas.

Nome do Grupo	Sinais clínicos
Sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário	Disúria Hematúria Piúria Acompanhamento de DRC Acompanhamento de DRP Azotemia/Uremia (aumento de ureia e creatinina plasmáticos) Obstrução das vias urinárias
Outros sinais clínicos	Secreção nasal, espirros, apatia, prostração, dispneia, secreção vulvar, convulsão, abscesso, feridas na pele, fraturas, claudicações, edemas, lesões múltiplas por trauma (quedas e atropelamentos), intoxicação, vômitos, anorexia, hiporexia, caquexia, dor abdominal, distocia, aborto, deficiência de função neurológica, choque, perda de pelos, diarreia, infecções fúngicas e/ou bacterianas, lesões ulceradas na pele, nódulos, lesões oculares, FIV/FeLV, acompanhamento de quimioterapia,
Animais clinicamente saudáveis	Pré-operatórios eletivos (castração, tratamento periodontal) Avaliação geral sem descrição de sinais clínicos Doador de sangue Animal hígado
Eritrograma	Alterações
Anemia regenerativa	Metarrubricitos Anisocitose Policromasia Reticulócitos agregados acima de 40,000/ μ L
Anemia arregenerativa	Contagem apenas de reticulócitos ponteados Contagem de reticulócitos total abaixo de 40,000/ μ L
Sem anemia (Outras alterações)	Poiquilocitose, agregados plaquetários, macroplaquetas, plaquetas ativadas, neutrófilos hipersegmentados, neutrófilos tóxicos, linfócitos reativos, monócitos vacuolizados, formação em rouleaux, corpúsculos de Heinz, acantócitos, plasma hemolisado, ictérico e/ou lipêmico.
Nenhuma alteração digna de nota	-

Referências: Barger, 2003; Scherk, 2012.^{1,29}

A análise estatística foi realizada com softwares^{n.º} e a avaliação descritiva foi feita por cálculo da média e desvio padrão. Os testes Kolmogorov-Smirnova e Shapiro-Wilk foram usados para determinar a normalidade das amostras em cada categoria, separadas nos dois grupos comparados (G1-positivos X G2-negativos). O teste t-student foi utilizado para comparar valores médios nos casos em que a distribuição das variáveis era normal para os dois grupos, e o teste de Mann-Whitney U foi utilizado nos casos em que a distribuição não era normal. A diferença das proporções foi verificada pelo teste Qui-quadrado e Teste de Igualdade de Proporções, nesses casos, o valor de p é único e mostra o resultado da análise do valor total

geral de todas as frequências da tabela referenciada, a análise é de associação no sentido de determinar estatisticamente a chance da proporção encontrada ser devido ao acaso. Quando o p-valor é igual ou menor que 0,05 essa chance está calculada em 5%, então se determina, estatisticamente, que o resultado não é devido ao acaso e existe uma associação entre as variáveis relacionadas, ou seja, o resultado é devido a influência entre essas variáveis, onde uma delas pode ajudar a calcular ou a prever a chance da outra ocorrer, podendo determinar a tendência. Nos cálculos sobre razões de chance entre variáveis e proporções foi realizado Odds Ratio com cálculo de intervalo de confiança (IC). Para associações entre variáveis foi utilizado, além do Qui-quadrado, os coeficientes C de Contigência e V de Cramér. Somente os resultados que possuíram um $p \leq 0,05$ nestes testes foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados

Os controles positivos de todas as PCRs testadas (GAPDH, PKD, PKD1 e MLY1-digestão) sempre apresentaram formação de bandas na altura dos pares de bases esperadas para a sequência amplificada e os controles negativos não demonstraram sinais de amplificação (Figura 1).

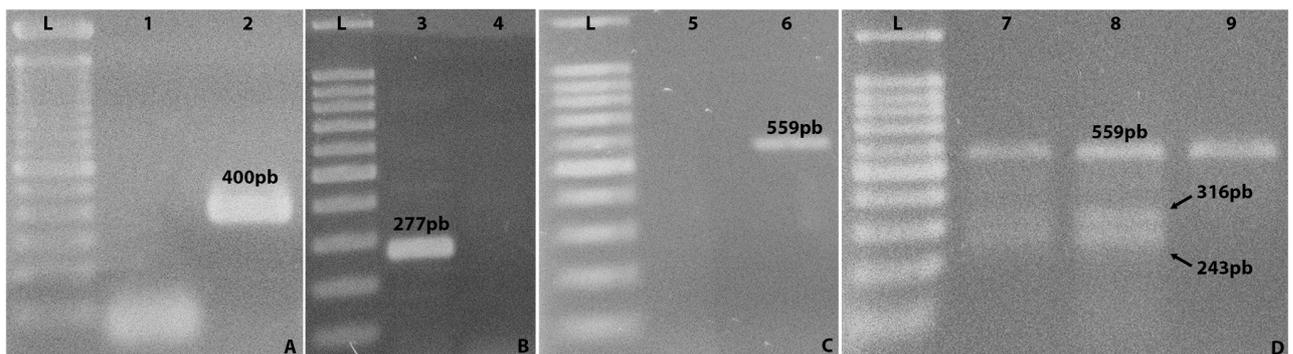


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% dos resultados dos controles positivos das PCRs realizadas (A: PCR GAPDH, B: PCR PKD-F3/R2, C: PCR PKD1, D: RFLP-PCR utilizando a enzima MLY1). L: marcador molecular de 100pb. #1,4 e 5: controles negativos. #2 (A): controle positivo GAPDH, #3 (B): controle positivo DRP, #6 (C): controle positivo PKD1, #7 e 8 (D): controle positivo e amostra positiva para digestão enzimática MLY1, #9 (D): amostra negativa para digestão enzimática MLY1.

Foram analisadas amostras de 334 animais (188 gatos atendidos no Hvet-UnB e 146 gatos residentes nas Cidades Satélites do DF), sendo 51,7% machos e 48,3% fêmeas. A idade média foi de 5,8 anos, oscilando entre 3 meses e 20 anos. Na Tabela 3 estão apresentadas as quantidades de análises realizadas para cada amostra, em cada categoria separadas em grupos de acordo com o resultado da PCR.

Tabela 3. Quantidade de exames realizados para cada variável, separados de acordo com o diagnóstico molecular para DRP.

	G1 (positivos para DRP)	G2 (negativos para DRP)	Total
PCR	30	304	334
Eritrograma	26	271	297
Leucograma	26	267	293
PPT	26	271	297
Plaquetas	26	269	295
Ureia	25	259	284
Creatinina	26	263	289
ALT	20	260	280
FA	18	173	191
PT	16	179	195
Albumina	16	187	203
Globulina	15	177	192
Fósforo	6	38	44
Frutosamina	3	12	15
Potássio	5	42	47
Urinálise	6	19	25

Onde: Proteína Plasmática Total (PPT), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA), Proteína Total Sérica (PT),

Na Tabela 4 estão apresentados o total de animais e a prevalência dos animais positivos para a PCR de DRP de acordo com procedência, gênero, raças e idade. A separação dos animais em diferentes grupos etários foi feita a partir da adaptação da tabela descrita em *Feline Life Stage Guidelines*.²¹

A chance dos animais serem positivos para DRP é três vezes maior no grupo atendido no Hvet (prevalência de 15%), e 19 vezes maior para os animais da raça Persa (prevalência de 33%), quando comparados aos grupos de animais da campanha de vacinação anti-rábica e Sem Raça Definida, respectivamente. Não houve diferença estatística com relação à idade e ao gênero.

A Tabela 5 demonstra os resultados de média, desvio padrão e comparação dos valores de hemogramas e bioquímicos entre os grupos de animais positivos e negativos para PCR de DRP.

A Tabela 6 demonstra os resultados de média, desvio padrão, comparação dos valores das urinálises entre os grupos de animais positivos e negativos para PCR de DRP, além dos resultados individuais da análise de sedimentos urinários dos animais positivos para DRP. Considerando apenas os animais que tinham exames de urinálise, somente um animal em cada grupo (G1 e G2) foi considerado clinicamente saudável. Não houve diferença estatística entre os grupos quanto aos exames de urinálises.

Tabela 4. Total de animais e Prevalência de DRP de acordo com procedência, gênero, raças e idade.

Característica	População (Total de animais)	Prevalência (Animais positivos)	Odds Ratio		P-valor	
			Estimativa	IC	Qui-Quadrado	Teste de Igualdade de Proporções
Procedência						
Campanha de vacinação	146	4%	1	-		
Hvet	188	15%	3,415	(1,3573 ; 8,5903)	0,006	0,001
Gênero						
Machos	135	13%	1	-	1	1
Fêmeas	126	13%	1	-		
Não Informado*	73	1,4%				
Raças						
Sem Raça Definida	244	7%	1	-		
Persas	30	33%	19	(6,2582 ; 57, 6842)	0,000	0,000
Siamês	8**	0%				
Outras§	3**	0%				
Não Informada*	49	6,1%				
Idade						
0-6 meses	9**	0%				
7 meses a 2 anos	44	16%				
3-6 anos	51	6%				
7-10 anos	36	20%	-	-	0,534	-
11-14 anos	18	20%				
≥15 anos	11	10%				
Não Informada*	165	6,6%				
Total	334	9%				

*Amostras que não apresentavam a informação necessária para serem classificadas na categoria referida, portanto, não incluídas na análise estatística.

** Tamanho da amostra insuficiente para análise estatística.

§1 Forest Norwegian, 1 Korat e 1 Maine Coon

Tabela 5. Média, desvio padrão e comparação dos parâmetros do hemograma e da bioquímica sérica entre os grupos de animais positivos (G1) e negativos (G2) para DRP identificados por meio da PCR.

Parâmetros	Total de exames realizados/Total do G1	DRP positivos		DRP negativos		Valores de referência	POS X NEG Valor p
		Média	DP	Média	DP		
Parâmetros hematológicos							
VG (%)		29,31	8,17	30,61	6,10	24-45†	0,543**
Hemácias (x10 ⁶ /µl)	Eritrogramas	8,30	2,95	8,29	1,79	5,0-10†	0,791**
Hemoglobina (g/dL)	297/26	10,78	3,10	11,83	2,67	8,0-15†	0,120**
VCM (fl)		37,71	9,33	37,53	5,58	39-55†	0,881*
CHCM (%)		36,54	5,28	38,55	5,20	30-36†	0,060*
Leucócitos (µl)		11.800	4.900	12.670	8.480	5.500-19.500†	0,431*
Bastonetes		9,46	48,24	23,16	110,98	0-300†	0,533*
Segmentados	Leucogramas	8607,96	4577,86	8302,88	5727,87	2.500-12.500†	0,434**
Linfócitos	293/26	1850,38	1164,12	2844,19	2468,35	1.500-7.000†	0,043*
Monócitos (µl)		554,69	726,13	356,42	479,83	0-850†	0,183*
Eosinófilos (µl)		536,85	570,67	976,78	1190,68	0-1.500†	0,063*
Basófilos		38,15	158,51	27,34	98,30	Raros†	0,735*
PPT (g/dL)	297/26	7,69	1,04	7,34	0,80	6,0-8,0†	0,108**
Plaquetas	295/26	466.730	198.009	383.408	180.141	195.000-624.000†	0,027**
Parâmetros bioquímicos							
Ureia (mg/dL)	284/25	87,44	58,61	67,76	51,23	42,8-64,2‡	0,071*
Creatinina (mg/dL)	289/26	1,85	1,19	1,58	1,95	0,8-1,8‡	0,307*
ALT (UI/L)	280/20	97	80,46	76,18	83,02	6-83‡	0,284*
FA (UI/L)	191/18	33,89	30,83	34,79	43,31	25-93‡	0,931*
PT (g/dl)	195/16	7,58	1,80	7,35	1,19	5,4-7,8‡	0,304**
Albumina (g/dl)	203/16	2,10	0,44	2,31	0,50	2,1-3,3‡	0,151**
Globulina (g/dl)	192/15	5,83	1,21	5,05	1,16	2,6-5,1‡	0,020**
Fósforo (mg/dl)	44/6	5,93	2,36	6,41	3,98	4,5-8,1§	0,918**
Frutosamina (Mol/L)	15/3	184,60	18,96	208,02	105,08	146-271#	0,386**
Potássio (mmol/L)	47/5	4,62	0,66	4,39	1,28	4,0-4,5§	0,227**

Onde * teste t-student, ** teste Mann-Whitney U, Volume Globular (VG), Volume Corpuscular Médio (VCM), Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), Proteína Plasmática Total (PPT), Alanina Aminotransferase (ALT), Fosfatase Alcalina (FA), Proteína Total Sérica (PT), Proteína urinária/Creatinina urinária (P/C). Valores de referência: Fonte: †Jain, 1993, ‡Kaneko et al., 1997, §Meyer and Harvey, 2004, #Feldman and Nelson, 2004.

Tabela 6. Média, desvio padrão e comparação das urinálises entre os grupos de animais positivos (G1) e negativos (G2) e apresentação dos resultados individuais das análises de sedimentos urinários do grupo G1.

Parâmetros urinários	Total de exames realizados/Total do G1	DRP positivos		DRP negativos		Valores de referência	POS X NEG Valor p
		Média	DP	Média	DP		
Densidade	Urinálises 25/6	1.031	11	1.024	11	1.035-1.060	0,169*
Proteínas (mg/dl)		129,17	185,43	42,89	111,4	15-30	0,173†
Glicose (mg/dl)		50	122,47	5,26	15,77	<75-125	0,117†
pH		5,75	0,52	6,08	0,71	5,5-7,5	1,000*
Proteína Total		46,35	27,31	41,09	37,95	-	0,610*
Creatinina		120,58	132,96	106,19	121,44	-	0,734*
Relação P/C		1,59	2,59	3,09	5,51	<0.5	0,622†
G1-Positivos	Sinais Clínicos	Densidade	Proteína (mg/dL)	pH	Proteína	Creatinina	Relação P/C
Animal 1	DRC	1.024	30	5,5	46	122,5	0,38
Animal 2	FeLV	1.032	500	6	-	-	-
Animal 3	Acompanhamento geriátrico	1.041	100	6,5	44,4	307,5	0,14
Animal 4	Acompanhamento DRP	1.041	100	5,5	80,9	14,8	5,47
Animal 5	Acompanhamento DRP	1.012	15	5	14,1	37,5	0,38
Animal 6	Acompanhamento DRP	1.038	30	6	-	-	-
G1-Positivos	Sinais Clínicos	Sangue Oculto (cruzes)	Células de descamação	Hemácias	Leucócitos	Bactérias	Cristais
Animal 1	DRC	4	Vesicais raras	+++	+++	++	-
Animal 2	FeLV	3	Vesicais raras	++	+	++	-
Animal 3	Acompanhamento geriátrico	-	Amostra insuficiente	++	++	-	-
Animal 4	Acompanhamento DRP	-	Vesicais raras	+	+	+++	-
Animal 5	Acompanhamento DRP	4	Ausentes	+	+	+	Oxalato de Cálcio
Animal 6	Acompanhamento DRP	4	Vesicais raras	+++	+	+++	Bilirrubina

Onde † teste t-student, * teste Mann-Whitney U Onde: (P/C) = Proteína urinária/Creatinina urinária; (-) Ausência, (+) Raros (as), (++) Leve Presença, (+++) Moderada presença. Valores de referência: Fonte: Scott and Stockham, 2008.

Quando analisados de acordo com a classificação em novas categorias, o número total de animais difere nas tabelas seguintes, pois foram incluídos apenas os animais que possuíam todos os dados relacionados às categorias avaliadas em questão. Desse modo, deve ser considerado que, de todos os animais classificados em cada grupo (sinais clínicos e anemias), nem todos apresentavam dados da categoria idade, portanto, o número de animais incluídos na respectiva análise estatística foi diferente.

Na Tabela 7 estão apresentadas a população e as proporções dos animais positivos correlacionados aos sinais clínicos e também à avaliação do hemograma quanto à presença de anemias regenerativas e arregenerativas.

Tabela 7. Ocorrência de animais positivos para DRP correlacionados com sinais clínicos e anemias.

Fatores	População (n)	Positivos (%)	P-valor (Qui-quadrado)
Sinais clínicos*			
Sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário	43	11,63	0,006
Outros sinais clínicos	87	14,94	
Animal clinicamente saudável	154	5,84	
Eritrogramas*			
Anemia regenerativa	32	12,50	0,528
Anemia arregenerativa	24	20,83	
Outras alterações	51	9,8	
Nenhuma alteração digna de nota	86	10,47	

*Os fatores para classificação de cada grupo estão apresentados na Tabela 2.

Nas Tabelas 8 e 9, os sinais clínicos e as observações dos hemogramas de todos os animais (G1+G2) foram comparadas de acordo com a idade, e correlacionadas. Houve associação apenas entre sinais clínicos e faixa etária.

Tabela 8. Número total de animais analisados com apresentação de sinais clínicos associados à idade.

Idade	Sinais clínicos			Total
	Sinais clínicos relacionados à doença do trato urinário	Sinais clínicos não relacionados à doença do trato urinário	Animal Clinicamente saudável	
7 meses a 2 anos	5	17	19	41
3-6 anos	7	27	12	46
7-10 anos	11	14	10	35
11-14 anos	10	7	1	18
Mais de 15 anos	5	1	4	10
Total	38	66	46	150

Onde Qui-quadrado=26,871 (p=0,001); C de Contigência=0,299 (p=0,001); V de Cramér=0,390 (p=0,001).

Tabela 9. Número total de animais analisados com alterações hematológicas associadas à idade.

Idade	Observações				Total
	Alterações celulares consistentes com anemia regenerativa	Outras alterações	Nenhuma alteração digna de nota	Alterações celulares consistentes com anemia arregenerativa	
7 meses a 2 anos	5	8	15	2	30
3-6 anos	9	14	17	3	43
7-10 anos	1	10	20	3	34
11-14 anos	2	7	5	4	18
Mais de 15 anos	0	3	7	0	10
Total	17	42	64	12	135

Onde Qui-quadrado=16,091 (p=0,187); C de Contigência=0,199 (p=0,187); V de Cramér=0,326 (p=0,187).

Na Tabela 10 foram separados os animais de acordo com a faixa etária e a apresentação de perfil anêmico no hemograma, essa associação incluiu todos os animais que apresentaram a característica avaliada, independente do resultado na PCR ter sido positivo ou negativo para DRP. Não foi encontrada associação entre esses dois fatores.

Tabela 10. Anemias correlacionadas à Idade, independente do resultado da PCR-DRP.

Idade	Alterações celulares consistentes com anemia regenerativa		Alterações celulares consistentes com anemia arregenerativa	
	Sim	Qui-quadrado	Sim	Qui-quadrado
7 meses a 2 anos	17%		7%	
3-6 anos	21%		7%	
7-10 anos	3%	p=0,1334	9%	p=0,2651
11-14 anos	11%		22%	

Na Tabela 11 estão apresentados os resultados da correlação de todos os animais (positivos e negativos) que apresentaram sinais clínicos de doenças relacionadas ao trato urinário, comparados por faixa etária. Houve associação entre esses dois fatores.

Tabela 11. Animais que apresentaram sinais clínicos de doenças do trato urinário correlacionados de acordo com a idade, independente do resultado da PCR-DRP.

Idade	Sinais clínicos relacionados à doença do trato urinário	
	Sim	Qui-quadrado
7 meses a 2 anos	12%	
3-6 anos	15%	
7-10 anos	31%	p=0,008
11-14 anos	56%	
Mais de 15 anos	50%	

A Tabela 12 mostra os dados correlacionados entre os sinais clínicos apresentados nos diferentes grupos (G1 e G2) de acordo com os resultados de PCR para DRP. Não houve associação entre essas variáveis.

Tabela 12. Correlação entre animais positivos (G1), negativos (G2) e sinais clínicos.

Sinais clínicos	DRP		Total	p-valor (Qui-quadrado)
	Positivo	Negativo		
Sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário	5	38	43	0,0603
Outras sinais clínicos	13	74	87	
Animal clinicamente saudável	9	145	154	
Total	27	257	284	

Discussão

Este estudo foi o primeiro relato a respeito da detecção da mutação no *gene PKD1* em gatos domésticos por diagnóstico molecular no Brasil, na região do DF. Convém ressaltar que a maioria dos dados (188 animais do Hvet) foi baseada na amostragem por conveniência que, apesar de ser uma forma acessível de avaliar animais de companhia e representar a população atendida em clínicas e/ou hospitais, possivelmente introduziu desvios nos resultados. Portanto, não se podem extrapolar os resultados deste estudo para toda a população de gatos domésticos do DF.

De acordo com a PCR, na amostragem total deste estudo foi encontrada a ocorrência de 9% dos animais portadores da mutação genética relacionada à DRP. Este resultado difere do resultado com 5,4% de prevalência para DRP em um estudo realizado no Brasil, na região de São Paulo onde o único meio diagnóstico usado foi o exame ultrassonográfico.²⁷

A prevalência encontrada na população de gatos atendidos no Hvet-UnB foi de 15%, independentemente de raça, e esse percentual é estatisticamente diferente do grupo de animais da campanha de vacinação anti-rábica (4%), isso pode ser esperado pois pacientes de clínicas e/ou hospitais veterinários tendem a apresentar alguma doença e/ou sinal clínico, e portanto, mais chances de serem diagnosticados com alguma enfermidade.

No grupo de gatos da raça Persa, a prevalência da mutação foi de 33%, valor próximo aos descritos na literatura que compreendem 30% a 49% dos animais provenientes da raça persa e derivadas desta raça em todo o mundo.^{20,22,24,27} A maioria das pesquisas utiliza grupo de gatos de raça pura e cerca de 80% das raças tem alguma influência da linhagem de gatos persas²⁴, inclusive os animais que não tem pedigree, muitas vezes, tem inter cruzamentos com persas e/ou descendentes dessa raça. Há preocupação em testar

todos os animais, pois diferentes raças apresentaram diferentes resultados quanto à ocorrência da mutação e nenhum estudo foi realizado com PCR em animais sem raça definida.² Neste estudo foi encontrada a ocorrência de 7% da mutação em animais sem raça definida, uma prevalência maior que a de 1,1% relatada no outro estudo onde os animais foram diagnosticados apenas por ultrassom. Estes dados corroboram com a sugestão de que a mutação já está presente em outras linhagens da população de gatos domésticos.^{23,25,27} Os animais das outras raças avaliadas neste estudo não apresentaram resultado positivo para a PCR, mas o número desses animais foi pequeno para ser incluído na análise estatística como representativo para as respectivas raças, no entanto, em futuros estudos, grupos de diferentes raças devem ser testados e avaliados para a presença e prevalência da mutação. Os testes genéticos são ferramentas importantes e devem ser usados para prevenir e potencialmente erradicar a ocorrência de doenças na população estudada.²³

Um estudo realizado apenas com animais da raça Maine Coon revelou a ocorrência de DRP, detectada por exames ultrassonográficos e acompanhamento clínico da doença, onde os animais também foram testados geneticamente para a presença da mutação descrita para Persas. Nenhum Maine Coon com DRP apresentou a mutação, mesmo que, a princípio, assumiu-se que a doença poderia ser introduzida na raça por intercruzamento com Persas. A conclusão foi de que a DRP em Maine Coons não é causada pelo mesmo alelo conhecido para a DRP em Persas, além disso, pode apresentar um aspecto hereditário mais complexo do que a dominância autossômica comumente relatada.¹⁹ No presente estudo, foi testado o DNA de um gato da raça Maine Coon com resultado negativo para a mutação do *gene PKD1*. Com este resultado de apenas um animal desta raça, não podemos inferir uma associação à aplicabilidade desta análise molecular específica, já que não há outras informações diagnósticas para determinar se o animal é portador ou não de DRP. Mas, de acordo com o estudo acima citado, gatos da raça Maine Coon, mesmo quando portadores de DRP, provavelmente não apresentam a mesma mutação relacionada aos persas.

A presença da mutação avaliada neste estudo é a que maior representa a ocorrência da DRP em gatos. No entanto, há descrição de outras mutações em diferentes *exons* do *gene PKD1* e também a ocorrência de DRP por fatores não relacionados à herança genética.^{24,31} Quando comparada à DRP em humanos, sabe-se que 85% dos casos são consequência da mutação no cromossomo 16p13.3 do *gene PKD1* e os 15% restantes causados pela mutação do cromossomo 4q21-23 do *gene PKD2*; acredita-se que algo semelhante, geneticamente, pode ocorrer em gatos.

Para a realização do diagnóstico molecular, a técnica desenvolvida neste estudo foi adaptada a partir de outra técnica que utilizou a PCR multiplex, mais simplificada e que teria os mesmos resultados da RFLP-PCR, relatada diversas vezes em todos os outros estudos realizados anteriormente para diagnóstico do *gene PKD1 mutante* em gatos domésticos.^{22,24,32} A comparação realizada entre esses métodos foi essencial para confirmar que uma técnica de PCR mais simples tem os mesmos resultados da técnica RFLP-PCR mais complexa e mais onerosa. Na realização da PCR-GAPDH, o objetivo foi determinar a qualidade do produto de DNA extraído e, dessa forma, garantir que a PCR diagnóstica seja mais confiável.

Animais da raça persa e de outras raças derivadas de persas devem ser testados para DRP antes de se reproduzirem. Mesmo que os criadores sejam orientados a nunca inter cruzarem dois animais positivos, isso pode acontecer por diversas razões: (1) os sinais clínicos de DRP ainda não apareceram; (2) muitos criadores desconhecem a doença e sua importância; (3) o ultrassom pode não estar disponível ou ser inacessível financeiramente; (4) as decisões sobre a reprodução são feitas antes de um diagnóstico preciso; (5) a doença é altamente prevalente; muitos gatis podem facilmente perder cerca de 40% de suas matrizes. O teste genético para a DRP felina proporciona ao criador um apurado e eficiente meio de selecionar seus reprodutores e de remover a DRP da sua população.²⁴ Infelizmente, muitos criadores evitam realizar o diagnóstico por receio de perderem seus reprodutores e este foi um obstáculo para esta pesquisa, já que um dos objetivos seria avaliar alguma população de gatil reprodutor da raça persa, pois nenhum criador concordou em participar da pesquisa.

Não houve diferença na correlação dos grupos com o gênero ($p=1$), indicando que a mutação genética não tem predisposição sexual, por ser uma doença de caráter autossômico dominante, o que está de acordo com descrições anteriores.^{13,16} Da mesma forma, a característica idade não teve correlação com a presença da mutação genética ($p=0,534$), mas apresenta associação ($p<0,001$) com o aparecimento dos sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário, mesmo que fraca (C de Contigência = 0,299 e V de Cramer = 0,390), o que pode facilmente ser explicado pelo fato de que a DRP pode provocar o aparecimento de cistos em animais jovens, mas a manifestação clínica da doença não ocorre antes da meia idade.¹³

Na análise do eritrograma, as médias dos grupos de animais positivos e negativos não apresentaram diferenças em nenhum parâmetro (Tabela 5). Os valores de VG, hemácias e hemoglobina permaneceram na faixa dos valores de referências. As médias de VCM ficaram abaixo do valor de referência e as médias de CHCM acima, o que pode ser explicado pela hemodiluição ou hemólise das

amostras. A hemodiluição é comum quando a quantidade de sangue misturada ao EDTA é pouca em comparação à quantidade indicada no tubo de colheita. A hemólise pode ocorrer tanto no momento da punção venosa quanto na manipulação da amostra após a colheita, o que pode indicar algum erro de técnica, já que todos os outros parâmetros de eritrograma estavam normais.

Com relação ao leucograma, os grupos não apresentaram médias diferentes, com exceção dos linfócitos ($p=0,043$). Embora os valores das médias de todos os parâmetros estivessem dentro dos valores de referência, a média de linfócitos do grupo dos animais positivos foi significativamente menor do que os animais negativos. Esse achado pode ser compatível com o quadro de estresse, possivelmente dor, provocada pelos cistos renais em formação. O efeito de estresse pode causar linfopenia¹, mas, neste estudo, o valor obtido permanece próximo ao limite inferior para contagem de linfócitos, no entanto, os animais positivos não apresentam, necessariamente, valores clínicos sugestivos de doença renal.

Na avaliação de trombócitos, as médias dos grupos de animais positivos e negativos foram significativamente diferentes ($p=0,027$) ainda que estejam dentro dos valores de referência. O grupo de animais positivos apresentou média maior, o que pode ser influenciado por fatores como a trombocitose reativa, geralmente encontrada em diversas condições como inflamações agudas ou crônicas, deficiência de ferro e hiperadrenocorticismos¹, não indicando exatamente uma condição clínica, mas talvez um processo inicial que deve ser monitorado e acompanhado nesses animais que apresentam a mutação genética para a DRP.

Para os parâmetros bioquímicos, a única diferença na comparação de médias foi na avaliação das globulinas (Tabela 5, $p=0,020$), onde o grupo de animais positivos apresentou valor acima da referência e maior do que o grupo de animais negativos. O aumento da concentração de globulinas pode ser avaliado como indicativo de processos inflamatórios, geralmente respostas inespecíficas de fase aguda que também podem ser associadas a outros marcadores como albumina, proteína C-reativa, transferrinas e haptoglobinas.^{11,26} Cabe ressaltar que a maioria dos animais que compõem a amostra foi proveniente do hospital veterinário, o que possivelmente introduziu desvios nos resultados pois eles apresentam enfermidades que podem desencadear alteração dos parâmetros avaliados, com resultados individuais fora dos valores de referência. A maioria das condições clínicas descritas anteriormente foram relatadas no grupo de animais atendidos no Hvet-UnB e as primeiras alterações fisiológicas estão diretamente relacionadas com o aumento na concentração de globulinas.^{11,26}

Mesmo sem diferença significativa entre as médias dos outros parâmetros bioquímicos, pode-se observar um valor médio acima dos valores de referência nos parâmetros de funções renais e hepáticos do grupo de animais positivos para DRP. Desses animais, dois apresentavam cistos hepáticos (confirmados em ultrassom), um apresentava lipidose hepática, dois foram diagnosticados e apresentavam sinais de anemia por FeLV e infecção por *Mycoplasma sp.*, além de três animais com cistos renais também confirmados por ultrassom. Esses indivíduos provavelmente provocaram os desvios das médias de ureia, creatinina e ALT, já que esses parâmetros aumentam nas condições clínicas descritas.^{10,15,31}

Quando comparadas as médias para os parâmetros urinários não foram observadas diferenças, mas, para esta análise, o número de exames foi bem menor (25 amostras) podendo não refletir um resultado biológico condizente com a realidade do total da amostragem. Além disso, os animais que possuem dados dos exames urinários foram animais com históricos e/ou evidências que sugerem alguma doença ou acompanhamento de condição clínica relacionada ao trato urinário. Pode-se observar que as médias dos dois grupos para a densidade urinária apresentam valores abaixo do referencial e proteinúria no grupo dos animais positivos com valor acima do referencial, podendo indicar concentração inapropriada de urina, muitas vezes relacionada à perda da função renal.³¹ Dessa forma podemos explicar também as taxas de relação Proteína/Creatinina urinárias acima dos valores de referência, podendo ser aceitável até 1 dependendo da variação individual e do acompanhamento do portador de DRP.³⁰ Dois animais do grupo de negativos apresentaram valores muito altos (8,43 e 14,75) para relação P/C e histórico clínico de doença do trato urinário inferior, o que, com certeza causou o desvio para um valor maior que a média do grupo dos positivos. Para melhor entendimento, foram apresentados na Tabela 6 os resultados individuais das urinálises dos animais positivos onde apenas dois deles não apresentaram doença renal, indicando a importância do acompanhamento para os animais que já foram diagnosticados com a doença.

Quando diagnosticados para doença renal, os gatos podem apresentar diferentes estágios clínicos, desde a insuficiência renal aguda, até a falência renal crônica, entre outros fatores, mas que alteram a integridade da fisiologia renal.²⁴ Outro fator muito comum em estágios avançados, e às vezes subclínicos, de doença renal é a anemia não regenerativa devido à falta de eritropoietina.¹⁴ E esses fatores podem aparecer ao longo dos anos nos casos de DRP.¹⁶ Como o critério de amostragem desta pesquisa foi aleatório para a condição clínica dos animais, foi realizada posterior recategorização para correlacionar os sinais clínicos e as anemias com a idade e a positividade da mutação do *gene PKD1* em felinos domésticos. Os grupos foram avaliados separadamente para sinais clínicos e anemias, e, para este último não foi

encontrada associação com a positividade (Tabela 7, $p=0,528$), provavelmente porque a amostragem não teve representação significativa de animais em condições de doença renal crônica em estágio final. A diferença entre as proporções foi estatisticamente significativa para positividade e sinais clínicos (Tabela 7, $p=0,006$). De todos os animais clinicamente saudáveis, 5,84% foram positivos para DRP, indicando que a PCR é uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce. Dos animais com sinais clínicos não relacionados a doenças renais, 14,94% tem a mutação no *gene PKD1*, indicando também que, mesmo com a presença da mutação, não necessariamente o animal desenvolveu a doença naquele momento em que foi realizado o diagnóstico molecular para DRP, mas, nesses casos, os sinais apresentados podem ser a manifestação inicial, principalmente quando compreendem dor abdominal, anorexia, hiporexia, apatia e vômitos. Dos animais com sinais clínicos de doenças do trato urinário, 11,63% apresentavam a mutação genética para DRP. Este resultado indica que, nem sempre um animal doente tem a predisposição genética. O valor estatístico indica que a diferença das proporções não ocorre devido ao acaso, ou seja, os animais positivos podem apresentar uma maior predisposição para alguma alteração clínica. Como os sinais clínicos da DRP são inespecíficos, nem sempre o animal é avaliado como portador de doença renal ou doenças do trato urinário, mas sua condição clínica pode sugerir estágio inicial para essas doenças. Além disso, o animal pode possuir mais do que uma mutação genética relacionada a doenças e nem sempre o veterinário tem acesso a todos os métodos para diagnóstico diferencial. Entretanto, a PCR está cada vez mais acessível e deve ser usada para um diagnóstico precoce, principalmente para a seleção de reprodutores, mas também como forma de prever, monitorar e proporcionar melhor qualidade de vida para os animais positivos que podem desenvolver a doença renal.²³

Para uma análise mais abrangente, foi feita a correlação de todos os animais, independente da positividade para a mutação no *gene PKD1*, separados por faixa etária, sinais clínicos e anemias (Tabelas 8, 9, 10 e 11). Na associação da idade com anemias, não foi encontrada diferença (Tabela 9, $p=0,187$; Tabela 10, $p=0,1334$ e $p=0,2651$), já que as proporções entre os grupos foram estatisticamente iguais, compatível com os resultados obtidos das médias dos parâmetros hematológicos. Este resultado pode indicar que a idade não exerce influência na anemia, e que, nos casos dos animais portadores de enfermidades, pode existir uma compensação para os parâmetros das análises clínicas. Na avaliação da anemia, a compensação pode acontecer ao longo do tempo de acordo com a evolução de processos inflamatórios e/ou doenças renais, mas nos casos mais crônicos a anemia é um indicativo de perda de função renal, com prognóstico ruim e pouco tempo de sobrevivência em animais com DRP.¹⁴ Para a associação

das idades com os sinais clínicos, a diferença das proporções foi estatisticamente significativa (Tabela 8, $p=0,001$; Tabela 11, $p=0,008$), indicando a relação de que o aparecimento de sinais clínicos relacionados a doenças do trato urinário em gatos está associado à idade, e pode ocorrer com maior frequência a partir dos sete anos. Essa relação é frequentemente relatada por diversos autores, principalmente na descrição de doenças renais.^{14,16,24,25,31}

Para verificar se a condição clínica poderia estar influenciada de acordo com o resultado da PCR, foi feita uma análise com os grupos de animais negativos e positivos associados de acordo com os grupos de sinais clínicos (Tabela 12, $p=0,0603$) e não foi encontrada diferença entre os grupos. Esse resultado pode sugerir que, nos gatos, a doença renal é uma condição que pode ocorrer em diferentes ocasiões ambientais, além da predisposição genética, e está presente na população como um todo.^{8,25,31} A avaliação dos parâmetros renais por medidas como a densidade urinária, creatinina sérica e ureia sérica pode ser fraca considerando que esses valores não apresentam alterações até que exista uma significativa perda da função renal (aproximadamente 75%) e porque eles também podem refletir fatores não renais, por exemplo, em decorrência de enfermidades como diabetes, hipertireoidismo e úlceras gastrointestinais.²⁹ Por isso devem ser sempre associados aos demais parâmetros e ao histórico clínico. A preocupação em monitorar um animal portador, mesmo sem apresentação de sinais clínicos para DRP, é importante e pode ajudar o clínico a definir os valores médios individuais a partir dos quais podem ser acompanhadas pequenas alterações que possivelmente indiquem o início da manifestação da doença. Parâmetros como linfócitos, globulinas, plaquetas e urinálises devem ser associados aos outros fatores mais usados como ureia, creatinina e ALT séricas.

O médico veterinário deve ser capaz de fornecer aos proprietários e criadores o conhecimento base para diagnósticos e tratamentos de problemas genéticos e, além disso, esclarecer as ramificações frente ao resultado do teste e ser consciente do sofrimento e dor considerável que essa notícia pode trazer, pois, nos casos de doenças como a DRP, a identificação da mutação genética pode ser sinal de morte prematura ou sobrevida do animal não saudável. O proprietário e/ou criador consciente pode ajudar a esclarecer e encorajar outros proprietários a fazerem o teste e melhorar a condição para diminuição da prevalência da doença na população de felinos domésticos, além de facilitar o entendimento de que o animal portador necessita de cuidados veterinários e avaliações clínicas mais frequentes.¹⁷ O estudo da DRP é essencial para o controle dos portadores, já que a maneira mais simples de eliminar a transmissão do gene é

esterilizar os animais atingidos e o diagnóstico molecular é a ferramenta mais valiosa para o diagnóstico precoce eficiente.

Os resultados obtidos durante a pesquisa permitiram concluir que a adaptação da técnica de PCR, para detecção da mutação genética encontrada no *gene PKD1* em felinos domésticos, foi realizada com sucesso e pode ser usada como método diagnóstico na rotina clínica. Além disso, a correlação feita entre PCR, sinais clínicos e achados laboratoriais comprova que foi possível detectar a mutação genética em animais que apresentam ou não manifestações clínicas de DRP. A prevalência de 9% na população total e 7% em gatos sem raça definida indica que a presença da mutação não se limita apenas a animais de raça. Para o grupo de gatos da raça persa, a prevalência de 33% é alta e compatível com as descrições de outros estudos realizados em diversos países com animais da mesma raça. O estudo também conclui que a presença da mutação genética não indica, necessariamente, que o portador apresenta a manifestação clínicas da DRP, assim como animais não portadores podem apresentar sinais clínicos de doenças relacionadas ao trato urinário, incluindo doença renal.

Fabricantes e marcas registradas

- a. ABC Vet-Horiba[®] ABX diagnostics, Brazil.
- b. CELM[®] Mod. MH, Barueri, São Paulo, Brazil.
- c. Instant-Prov NewProv[®], Pinhais, Paraná, Brazil.
- d. Labtest[®], Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil.
- e. Bioplus[®] Bio2000, Barueri, São Paulo, Brazil.
- f. Combur-test, Roche[®], Indianapolis, IN.
- g. Illustra Blood genomicPrep Mini Spin kit, GE Healthcare[®], Piscataway, NJ.
- h. Invitrogen[®], Vila Guarani, São Paulo, Brazil.
- i. New England Biolabs[®], Ipswich, MA.
- j. Biorad[®] C1000[™] Thermal Cycler, Hercules, CA.
- k. UV Transilluminator UVP[®], Upland, CA.
- l. Vetec, Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO.
- m. NMB Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO.
- n. Microsoft[®] Excel, Cambridge, MA.
- o. IBM[®] SPSS Statistic 19, Stamford, CT.

Referências

- 1 Barger AM: 2003, The complete blood cell count: a powerful diagnostic tool. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 33:1207-1222.
- 2 Barthez PY, Rivier P, Begon D: 2003, Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France. *J Feline Med Surg* 5:345-347.
- 3 Bastos AP, Piontek K, Silva AM, et al.: 2009, Pkd1 haploinsufficiency increases renal damage and induces microcyst formation following ischemia/reperfusion. *J Am Soc Nephrol* 20:2389-2402.
- 4 Beck C, Lavelle RB: 2001, Feline polycystic kidney disease in Persian and other cats: a prospective study using ultrasonography. *Aust Vet J* 79:181-184.
- 5 Biller DS: 1994, Polycystic Kidney Disease. *In: Consultations in Feline Internal Medicine*, ed. August JR, 2^a ed., pp. 325-330. WB Saunders, Philadelphia.
- 6 Biller DS, DiBartola SP, Eaton KA, et al.: 1996, Inheritance of polycystic kidney disease in Persian cats. *J Hered* 87:1-5.
- 7 Birkenheuer AJ, Levy MG, Breitschwerdt EB: 2003, Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. *J Clin Microbiol* 41:4172-4177.
- 8 Bonazzi M, Volta A, Gnudi G, et al.: 2007, Prevalence of the polycystic kidney disease and renal and urinary bladder ultrasonographic abnormalities in Persian and Exotic Shorthair cats in Italy. *J Feline Med Surg* 9:387-391.
- 9 Bonazzi M, Volta A, Gnudi G, et al.: 2009, Comparison between ultrasound and genetic testing for the early diagnosis of polycystic kidney disease in Persian and Exotic Shorthair cats. *J Feline Med Surg* 11:430-434.
- 10 Center SA: 2007, Interpretation of Liver Enzymes. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 37:297-333.
- 11 Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S: 2005, Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology* 34:85-99.
- 12 DiBartola SP, Rutgers HC: 1994, Diseases of the kidney. *In: The Cat: Diseases and Clinical Management*, ed. Sherding RG, 2^a ed., p. 2046. Churchill Livingstone, New York, NY.
- 13 Eaton KA, Biller DS, DiBartola SP, et al.: 1997, Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian and Persian-cross cats. *Vet Pathol* 34:117-126.

- 14 Elliott J, Barber PJ: 1998, Feline chronic renal failure: clinical findings in 80 cases diagnosed between 1992 and 1995. *Journal of Small Animal Practice* 39:78-85.
- 15 Emeigh Hart SG: 2005, Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52:30-45.
- 16 Ferreira GS, Galvao ALB, Socha JJM: 2010, Atualização em doença renal policística felina. *Acta Veterinaria Brasilica* 4.
- 17 Fowler KJ, Sahhar MA, Tassicker RJ: 2000, Genetic counseling for cat and dog owners and breeders--managing the emotional impact. *J Am Vet Med Assoc* 216:498-501.
- 18 Garcia-Gonzalez MA, Menezes LF, Piontek KB, et al.: 2007, Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway. *Hum Mol Genet* 16:1940-1950.
- 19 Gendron K, Owczarek-Lipska M, Lang J, Leeb T: 2013, Maine Coon renal screening: ultrasonographical characterisation and preliminary genetic analysis for common genes in cats with renal cysts. *J Feline Med Surg* 15:1079-1085.
- 20 Helps CR, Tasker S, Barr FJ, et al.: 2007, Detection of the single nucleotide polymorphism causing feline autosomal-dominant polycystic kidney disease in Persians from the UK using a novel real-time PCR assay. *Molecular and Cellular Probes* 21:31-34.
- 21 Hoyumpa Vogt A, Rodan I, Brown M, et al.: 2010, AAFP-AAHA: Feline Life Stage Guidelines. *Journal of Feline Medicine & Surgery* 12:43-54.
- 22 Lee YJ, Chen HY, Wong ML, Hsu WL: 2010, Molecular detection of autosomal-dominant feline polycystic kidney disease by multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest* 22:424-428.
- 23 Lyons LA: 2010, Feline genetics: clinical applications and genetic testing. *Top Companion Anim Med* 25:203-212.
- 24 Lyons LA, Biller DS, Erdman CA, et al.: 2004, Feline polycystic kidney disease mutation identified in PKD1. *J Am Soc Nephrol* 15:2548-2555.
- 25 Malik R: 2001, Genetic diseases of cats. *J Feline Med Surg* 3:109-113.
- 26 Murata H, Shimada N, Yoshioka M: 2004, Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168:28-40.

- 27 Ondani AC, Carvalho MB, Brum AMd, Pereira ML: 2009, Prevalência de Doença Renal Policística em gatos domésticos da região de Jabotcabal-São Paulo-Brasil. *Veterinária Notícias* 15:89-94.
- 28 Pedersen KM, Pedersen HD, Haggstrom J, et al.: 2003, Increased Mean Arterial Pressure and Aldosterone-to-Renin Ratio in Persian Cats with Polycystic Kidney Disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:21-27.
- 29 Scherk M: 2012, Managing the cat with concurrent and chronic diseases. The Upper Urinary Tract. *In: The Cat: Clinical Medicine and Management*, ed. Little SE, pp. 935-976. Saunders Elsevier Inc., St. Louis, Missouri.
- 30 Scott MA, Stockham SL: 2008, Urinary System. *In: Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, ed. Scott MA, 2^a ed., p. 907. Blackwell Publishing Ltd., Iowa, USA.
- 31 White JD, Norris JM, Baral RM, Malik R: 2006, Naturally-occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases. *Australian Veterinary Journal* 84:188-194.
- 32 Young A, Biller D, Herrgesell E, et al.: 2005, Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region. *Mammalian Genome* 16:59-65.