



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA**

**USO DA PCR NA IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL  
POLICÍSTICA EM GATOS DO DISTRITO FEDERAL E SUAS  
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

**BRASÍLIA**

**2013**

**THAMIRIS FIGUEIREDO DA SILVA**

**USO DA PCR NA IDENTIFICAÇÃO DA DOENÇA RENAL  
POLICÍSTICA EM GATOS DO DISTRITO FEDERAL E SUAS  
ALTERAÇÕES LABORATORIAIS**

**Monografia apresentada para a  
conclusão do Curso de Medicina  
Veterinária da Faculdade de  
Agronomia e Medicina Veterinária da  
Universidade de Brasília**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Giane Regina  
Paludo**

**BRASÍLIA  
2013**

da Silva. Thamiris Figueiredo

Uso da PCR na Identificação da Doença Renal Policística em Gatos do Distrito Federal e suas Alterações Laboratoriais / Thamiris Figueiredo da Silva: Orientação de Giane Regina Paludo – Brasília – 2013

43f.:il

Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. 2013

### **Cessão de Direitos**

Nome do Autor: Thamiris Figueiredo da Silva

Título da Monografia de Conclusão de Curso: Uso da PCR na Identificação da Doença Renal Policística em Gatos do Distrito Federal e suas Alterações Laboratoriais

Ano: 2013

É concedida a Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.



Thamiris Figueiredo da Silva

Thamiris Figueiredo da Silva

Nome do autor: DA SILVA, Thamiris Figueiredo

Título: Uso da PCR na Identificação da Doença Renal Policística em Gatos do Distrito Federal e suas Alterações Laboratoriais

Monografia de Conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em: 18 / 11 / 13.

Profª Drª Giane Regina Paludo

Julgamento: Aprovada

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: Giane R. Paludo

Profª Msc. Christine Souza Martins

Julgamento: Aprovada

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: Christine Souza

Profª Msc. Larissa Campos Aquino

Julgamento: Aprovada

Instituição: Universidade de Brasília

Assinatura: Larissa Campos Aquino

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado forças para conseguir chegar até este momento, e sempre estar intercedendo por mim e abençoando.

Ao meu pai Carlos, que mais do que nunca é um exemplo de integridade e amor, me dando toda a educação e me ensinando a correr atrás dos meus sonhos, fornecendo tudo o que eu preciso para chegar até eles.

À Minha madrasta Eliane, por me amar muito, me ajudar sempre, ser minha confidente e sempre acreditar na minha capacidade.

À minha mãe Lilia, já falecida, pelos primeiros ensinamentos, pela minha criação e amor incondicional enquanto pode.

Aos Meus irmãos de sangue e de coração, Alexandre, Ramiro e Rafael, pelo carinho, companheirismo e amizade. E aos meus sobrinhos Luísa e Joaquim, por serem as pessoas mais fofas da minha vida.

À todos meus amigos, em especial o pessoal do Grupo N.A.T.A.L., que foram o caminho para me encontrar, sempre me oferecendo um ombro amigo e palavras confortadoras, não me julgando, e sempre me divertindo.

Minhas amigas Wanessa e Fernanda, que sempre estão dispostas a ouvir minhas lamurias, me divertindo mesmo em momentos tensos. E principalmente a minha amiga Priscila, por ter me acompanhado esses dois últimos anos, sempre me incentivando, se mostrando interessada quando eu falava da veterinária, me pedindo conselhos e opiniões sobre os animais dela, e sendo uma ótima amiga.

À minha orientadora, professora Giane, pela oportunidade de aprender mais, pela orientação e por todo apoio. Também agradeço a Professora Simone, por não deixar eu desistir da veterinária, me dando ótimas oportunidades.

À Marcela, por ter dado a oportunidade de aprender muito mais sobre a PCR, sempre com muita paciência, e por toda confiança que depositou em mim.

E finalmente agradeço as pessoas que fazem parte do meu dia a dia, os residentes de patologia clínica veterinária e a Thaís “Shiva”, me divertindo e contagiando com a alegria. Sempre dispostos a me ensinar e esclarecendo minhas dúvidas. Principalmente ao Filipe, a Simone e a Wanessa, que me incentivam mais e mais a investir na área que eu adoro, a Patologia Clínica.

“Você pode ter qualquer coisa que você queira, se você quer o bastante.

Você pode ser qualquer coisa que você queira ser,

Fazer qualquer coisa que você decidiu conseguir,

Se você manter o seu desejo com firmeza de propósito.”

*Abraham Lincoln*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. GENÉTICA DA DRP .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 MUTAÇÃO GENÉTICA.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 CISTOGÊNESE.....</b>	<b>14</b>
<b>3. SINAIS CLÍNICOS .....</b>	<b>16</b>
<b>4. DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>17</b>
<b>5. TRATAMENTO .....</b>	<b>18</b>
<b>6. PROGNÓSTICO .....</b>	<b>19</b>
<b>7. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>8. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>10. DISCUSSÃO .....</b>	<b>34</b>
<b>11. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>39</b>
<b>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>40</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADPKD – Autosomal Dominante Polycystic Kidney Disease (Doença Renal Policística Autossômica Dominante)

Pb - Pares de Bases

PCR - Reação da Polimerase em Cadeia

PKD - Polycystic Kidney Disease (Doença do Rim Policístico)

UnB – Universidade de Brasília

HVet – Hospital Veterinário

DF – Distrito Federal

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ALT – Enzima alanina amino transferase

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

VG – Volume globular

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

VCM – Volume corpuscular médio

PPT – Proteínas plasmáticas totais

DP - Desvio Padrão

GAPDH – Enzima gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase

FA – Fosfatase Alcalina

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

Mg – Magnésio

LPCV - Laboratório de Patologia Clínica Veterinária

SRD - Sem Raça Definida.

RPC – Relação Proteína:Creatinina Urinária

## RESUMO

DA SILVA, T. F. Uso da PCR na Identificação da Doença Renal Policística em Gatos do Distrito Federal e suas Alterações Laboratoriais (Use of PCR in Identification of Polycystic Kidney Disease in Cats of the Distrito Federal and its Disorders Laboratory). 2013. 43p. Monografia (Conclusão do curso de Medicina Veterinária) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF.

A doença renal policística (DRP) felina, também conhecida como PKD (polycystic kidney disease), é a doença de herança genética mais predominante em gatos, principalmente da raça Persa ou mestiços dessa raça. Caracteriza-se pela presença de cistos de vários tamanhos que podem ocorrer no córtex ou na medula renal. O presente trabalho propôs a utilização de novas ferramentas moleculares (PCR) para o diagnóstico precoce da DRP em felinos. Foram utilizadas amostras de sangue total de 229 gatos domésticos, sendo 188 amostras de animais atendidos no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB e 41 amostras provenientes de um laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Gama. No laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UnB, parte das amostras foram submetidas a hemograma completo, testes bioquímicos e o restante na PCR para a identificação dos animais portadores de DRP (mutação). Das amostras colhidas, 48,5% eram fêmeas, 48,5% machos e em 3% o sexo não foi informado. A idade média foi de 6,3 anos, oscilando entre 2 meses e 20 anos. Desses 229 animais, 11,8% foram positivos para PKD1, desses 88,9% provenientes do Hospital Veterinário da UnB, e 11,1% proveniente do Laboratório do Gama. De acordo com as proporções, nenhum parâmetro hematológico e bioquímico diferiu entre os gatos com a mutação e sem a mutação. Os resultados obtidos durante a pesquisa permitiram concluir nos animais avaliados que: a mutação genética para DRP não foi observada somente na raça persa, mas também em raças que podem ter sido inter cruzadas com a linhagem persa, os animais positivos nem sempre apresentam sintomas clínicos e alterações nos exames laboratoriais o que caracteriza o estado de portador da doença e a PCR é uma importante ferramenta diagnóstica precoce para DRP.

**Palavras-chave:** PKD, Doença do Rim Policístico, DRP, Felinos, PCR, Diagnóstico;

## ABSTRACT

DA SILVA, T. F. Use of PCR in Identification of Polycystic Kidney Disease in Cats of the Distrito Federal and its Disorders Laboratory (Uso da PCR na Identificação da Doença Renal Policística em Gatos do Distrito Federal e suas Alterações Laboratoriais). 2013. 43p. Monograph (Degree in Veterinary Medicine) - College of Agronomy and Veterinary Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF.

Feline polycystic kidney disease (PKD) is a genetic disease prevalent in cats, especially the Persian breed or crossbreed of that race, characterized by the presence of cysts of various sizes, which can occur in the renal cortex or medulla. This paper proposed the use of new molecular tools (PCR) for early diagnosis of PKD in cats. We used blood samples from 229 cats, 188 samples of animals treated at the Small Animal Veterinary Hospital of UnB and 41 samples came from a Veterinary Clinical Pathology Laboratory at Gama. At the Clinical Pathology Laboratory in the Small Animal Hospital of UnB, part of the samples was subjected to complete blood count (CBC), biochemical tests and the remainder in PCR for the identification of animals with PKD (mutation). From the samples, 48.5% were females, 48.5% males and 3% the gender was not informed. The mean age was 6.3 years, ranging from 2 months to 20 years. Of these 229 animals, 11.8% were positive for PKD1, 88.9% of them from the Veterinary Hospital of UnB, and 11.1 % from the Laboratory at Gama. Accordingly to the proportions, no biochemical and hematological parameters differed among cats with and without the mutation. The results obtained during the research led to the following conclusions about the evaluated animals: the genetic mutation for PKD was not only observed in the Persian breed, but also in races that may have been intercrossed with Persian lineage; the positive animals do not always present clinical signs and changes in laboratory tests, characterizing the carrier state of the disease; and the PCR is an important early diagnostic tool for PKD.

**Keywords:** PKD, Polycystic Kidney Disease, DRP, Felines, PCR, Diagnosis

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Renal Policística (DRP) é considerada uma importante causa de insuficiência renal (CANNON et al., 2001). Ela é uma doença hereditária de caráter autossômico dominante (GONZALES et al., 2007), caracterizada pela substituição de porções significativas do parênquima renal por múltiplos cistos (FISCHER, 2004), que culminam com insuficiência renal crônica (BILLER et al., 1996). Esta doença já foi descrita em humanos, camundongos e gatos, onde observou-se que o padrão dominante autossômico é muito semelhante entre essas espécies sendo que os modelos animais têm sido usados como padrão para os estudos da DRP humana (GONZALES et al., 2007). Acomete diferentes raças de gatos, mas é particularmente prevalente em animais da raça Persa (BILLER et al., 2002; DIBARTOLA, 2000). Nesta raça, assim como nas raças originadas de cruzamentos de Persas, como a Himalaia foi comprovado que esta doença está relacionada a um caráter hereditário autossômico dominante (BILLER et al., 2002; EATON et al., 1997).

Nos humanos a doença apresenta-se sob a forma de caráter dominante (DRP adulta) e a de caráter recessivo (DRP infantil). Estas formas estão relacionadas com a idade da manifestação dos sinais clínicos, e não com a idade do desenvolvimento das lesões renais (NORSWORTHY, 2004). Há relatos de uma forma recessiva da DRP em gatos, porém as manifestações dos sinais clínicos e morte do animal ocorreram antes de oito semanas de vida, apresentando alterações macroscópicas e microscópicas compatíveis com a forma dominante da DRP (CROWELL et al., 1979). Assim sendo, a manifestação genética mais comum da doença renal policística em felinos é a forma dominante, presente com maior frequência em animais da raça Persa e mestiços de Persa (BILLER et al., 1996).

Os sinais clínicos são variáveis, estando associados ao crescimento dos cistos e a progressiva compressão do parênquima que causa a insuficiência renal (BILLER et al., 1994). Os gatos portadores de DRP podem ser assintomáticos, caso o comprometimento seja unilateral, ou demonstrar sinais de insuficiência renal, quando for bilateral (BECK & LAVELLE, 2001).

Atualmente, somente a análise laboratorial não é capaz de confirmar ou excluir um diagnóstico de DRP, já que nenhuma alteração sanguínea ou urinária é específica para essa doença. O diagnóstico baseia-se no exame diferencial das

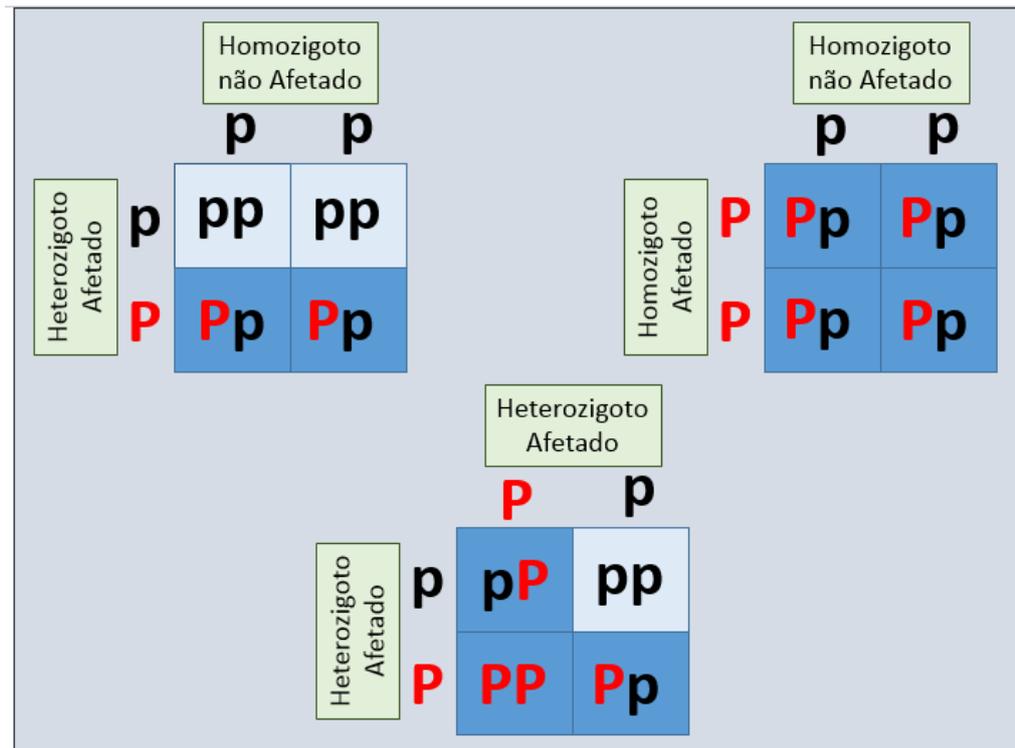
afecções que levam à nefromegalia e à insuficiência renal (CARVALHO, 2004), neste caso é utilizado método diagnóstico por imagem (BILLER et al., 1994).

Estudos de prevalência em gatos de todo o mundo mostram que esta enfermidade é mais frequente do que se imaginava (CANNON et al., 2001), denotando a importância do presente estudo.

## 2. GENÉTICA DA DRP

A DRP é a doença genética mais prevalente em gatos e, em 2004, a mutação genética responsável pela DRP foi identificada em um grupo de gatos da raça Persa nos Estados Unidos. Com a base genética elucidada, tornou-se possível o diagnóstico através de métodos moleculares, tais como a reação da polimerase em cadeia (PCR), PCR em tempo real (Real-Time PCR) e PCR-RFLP (Análise de polimorfismo por restrição de fragmento) (HELPS et al., 2007).

A proteína policistina-1, que é codificada pelo gene independente localizado no cromossomo distinto PKD1 é encontrada em células epiteliais tubulares (néfron distal). Atualmente, a função dessa proteína é desconhecida, mas sabe-se que contém domínios que estão envolvidos em interações célula-célula e célula-matriz. O caráter hereditário autossômico dominante está relacionado ao gene PKD1, 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 homozigota positiva com fenótipo positivo), **Pp** (genotipagem heterozigota positiva com fenótipo positivo) e **pp** (genotipagem homozigota negativa com fenótipo negativo) (Figura 1) (BILLER et al., 1994). Os animais homozigotos dominantes (**PP**) portadores de um gene DRP proveniente do pai e outro da mãe não sobrevivem. Estes animais possuem uma forma grave e letal da doença que apresenta óbito intrauterino ou falência renal precoce (YOUNG et al., 2005). Pais geneticamente recessivos (**pp**) para DRP somente poderão gerar filhotes positivos para a doença se houver alguma mutação genética (BILLER et al., 1994).



**Figura 1.** Exemplo de Cruzamentos entre animais Heterozigotos e Homozigotos. (Fonte: Arquivo pessoal)

Todos os gatos afetados são heterozigotos (possuem um gene sadio e um gene atingido). Desta forma, o cruzamento de dois gatos negativos (homozigotos recessivos) resulta em gatos sadios. O cruzamento de um gato sadio (homozigoto recessivo) com um gato portador (heterozigoto) apresenta a probabilidade de metade de gatos sadios e outra metade de gatos afetados. O cruzamento de dois gatos com DRP (heterozigoto) produz estatisticamente 75% de gatos atingidos pela doença e 25% de gatos sadios. Entre os gatos atingidos, um terço será homozigoto dominante e, portanto, não viável (ROUX & DESCHAMPS, 2005).

A prevalência DRP em gatos da raça Persa é estimada entre 30% a 38% em toda a população mundial. Considerando a possibilidade de cruzamentos de Persas com outras raças como Siameses, pêlo curto inglês, pelo curto americano, entre outras, justifica-se a necessidade de também testar animais destas raças para DRP (LYONS et al., 2004). No Brasil, esta doença é de difícil controle, pois não existem dados científicos quanto a sua prevalência. Os gatos de pelo 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 (YOUNG et al., 2005).

## 2.1 MUTAÇÃO GENÉTICA

A mutação genética que caracteriza a expressão da DRP em felinos está relacionada com uma troca das bases de nucleotídeos C>A no exon 29 do gene *PKD1* (polycystic kidney disease) em felinos domésticos. O resultado desta troca causa a interrupção da síntese proteica na posição 3284 do gene, sugerindo uma perda de 25% da porção C-terminal da proteína codificada, a policisteína-1. Esta mutação serve como alvo para detecção molecular da presença do gene mutante em gatos afetados pela DRP.

O uso da raça persa no desenvolvimento de outras raças pode ter introduzido o gene mutado nas mesmas, porém tem sido demonstrado que o gene para DRP não segrega com os genes responsáveis por produzir pêlos longos ou aspecto braquicefálico (CANNON et al., 2001).

## 2.2 CISTOGÊNESE

O cisto renal é uma dilatação de algum segmento do néfron. Uma das teorias desta dilatação é a ocorrência de hiperplasia das células epiteliais, que pode levar ao desenvolvimento de pólipos e causar uma obstrução parcial, e subsequente, dilatação dos túbulos renais produzindo as estruturas císticas. Discute-se também a possibilidade de um defeito na membrana basal, que promoveria flacidez na parede e dilatação secundária dos túbulos renais (EVAN et al., 1979). É possível que as duas hipóteses impliquem no desenvolvimento da doença (BILLER, 1994).

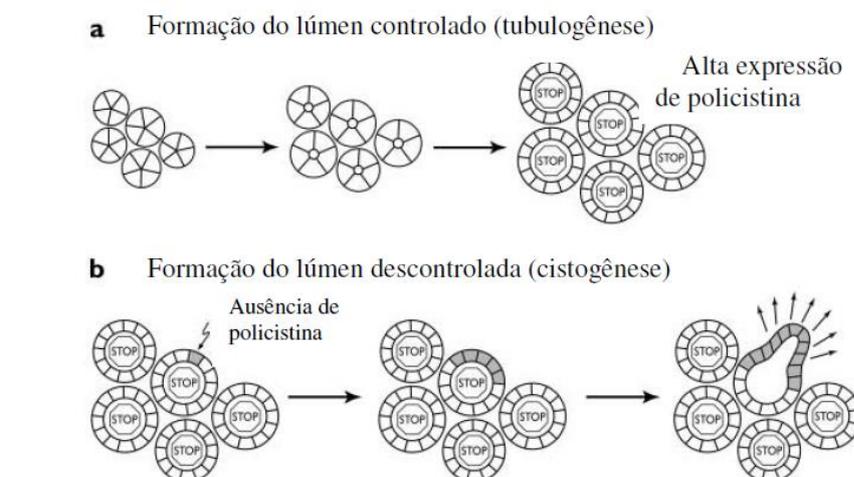
Os cistos renais originam-se nos epitélios dos néfrons e sistemas coletores, que estão forrados por uma única camada de células que apresentam altos índices de proliferação celular sendo a taxa de mutação somática, das células epiteliais do rim, de aproximadamente  $2 \times 10^{-4}$  (IGARASHI e SOLMO, 2002).

As estruturas tubulares do rim originam-se de dois tecidos: dos néfrons que

são derivados do mesênquima metanefrogênico e dos túbulos coletores que se originam de brotos uretéricos. A diferenciação do mesênquima metanefrogênico é especial, porque uma célula mesenquimal tem que se transformar em uma estrutura epitelial com lúmen. Para este processo deve haver um sinal que ative a formação do lúmen e outro para que o processo cesse, quando a formação do lúmen já estiver estabelecida, a expansão dos túbulos é finalizada e as células circunvizinhas são degradadas. A cistogênese (Figura 2), pode ser considerada como um processo de falha no sinal de parada de formação do lúmen (GALLGHER et al., 2002).

Embora todas as células no néfron carreguem a mesma mutação na sua linha germinativa, somente alguns cistos surgem, por néfron. Muitos néfrons aparecem completamente normais, definindo a doença policística como focal. Uma explicação para isto, está no fato de que um gene danificado é herdado de um genitor e outro gene selvagem (sem a mutação) é herdado do outro. Durante a vida do indivíduo, o gene selvagem sofre uma mutação somática e torna-se inativado, o gene mutante, então, começa a se manifestar. Estudos mostraram que cistos renais em pacientes, exibem perda de heterozigotidade devido à perda do alelo selvagem. Assim, enquanto o padrão da herança é dominante, a doença acontece por mecanismos moleculares recessivos (IGARASHI e SOLMO, 2002).

Considera-se também, a possibilidade de que as células tubulares sejam predispostas à cistogênese (Eaton et al., 1997). Fatores genéticos e agentes endógenos ou exógenos, como as substâncias químicas, também favorecem a cistogênese (LULICH et al., 1995).



**Figura 2.** Provável esquema da cistogênese em humanos (GALLGHER et al., 2002).

Os cistos geralmente contêm fluido semelhante a um transudato, ligeiramente amarelado, mas pode haver também a presença de fibrina, material purulento e até sangue. Na avaliação microscópica, as células epiteliais renais dos cistos são cubóides e cuboídes achatadas, apresentando poucas microvilosidades e não apresentam bordas em escova. Porém, não há nenhuma relação quanto ao tamanho dos cistos e a morfologia celular (EATON et al, 1997).

### **3. SINAIS CLÍNICOS**

Os sinais ocorrem por volta de três a dez anos de idade. Eles não são específicos e se assemelham aos da insuficiência renal crônica: letargia, depressão, anorexia, vômito, perda de apetite, perda de peso, poliúria, polidipsia, hematúria e emaciação (BILLER et al., 1994; LULICH et al., 1995). Se os cistos tornarem-se infectados, os animais poderão apresentar febre, piúria e leucocitose (CRAWFORD, 1993).

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 uma redução progressiva da função renal (BILLER et al., 1994).

A renomegalia ocorre na presença de múltiplos cistos e é muito comum em pacientes humanos que apresentam a doença, mas 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 à que ocorre em humanos (PEDERSEN et al., 2003).

Com o tempo, a manifestação da DRP induz a insuficiência renal crônica. O tamanho dos cistos pode variar de menos de um milímetro até mais de um centímetro. Os animais mais velhos apresentam cistos maiores e mais numerosos. Além dos rins, o fígado e o pâncreas também pode apresentar a formação dos cistos (BILLER et al., 1996).

Ao exame físico, dependendo do estágio da doença, os rins palpados apresentam-se grandes e irregulares (BILLER et al., 1994). Os sinais vão depender do grau de comprometimento do parênquima renal (SCHERDING, 1994). O tipo e a gravidade dos sinais clínicos e achados laboratoriais dependem da presença ou não de insuficiência renal crônica. Em animais em que o diagnóstico é precoce, os

achados clínicos se restringem à nefromegalia bilateral e os exames laboratoriais não apresentam alterações dignas de notas (BILLER et al., 1994).

#### **4. DIAGNÓSTICO**

Em gatos em que o diagnóstico é precoce, os achados clínicos ficam restritos à nefromegalia bilateral, 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 observado baixa densidade urinária, sedimento e proteinúria discreta a moderada (FERREIRA et al., 2010).

O diagnóstico precoce é importante por permitir a identificação e o tratamento precoce dos animais que sofrem de insuficiência renal crônica, além de identificar gatos portadores do gene mutante antes que sejam usados para a reprodução. Uma vez que os sinais de DRP aparecem tardiamente, os gatos portadores deste gene mutante, podem viver e se reproduzir muitos anos antes de desenvolverem a doença e, com isso transmitirem a doença a seus descendentes. O diagnóstico precoce associado à esterilização dos animais portadores pode auxiliar na eliminação desta doença da população felina (BILLER et al., 1994).

A DRP pode ser diagnosticada facilmente pelo método ultrassonográfico (Figura 3), no entanto a precisão e confiabilidade do resultado dependem da experiência dos operadores que realizam e interpretam o exame. Com o avanço da doença, a identificação dos animais positivos consiste na visualização de estruturas esféricas, anecóicas e regulares em região cortical e/ou medular, geralmente bilateral. Cistos que apresentam complicações como hemorragia ou infecções, normalmente apresentam conteúdos ecoicos e hipoecóicos e paredes delgadas; nestes casos deve ser feito diferencial com linfomas, hematomas e abscessos renais (BILLER et al., 1996).



**Figura 3.** Presença de cistos no rim esquerdo. (Fonte: Foto cedida pela Prof<sup>a</sup> Msc. Christine Souza Martins)

Os testes genéticos apresentam mais especificidade para o diagnóstico de DRP, entretanto, isto não significa o fim da exploração diagnóstica por ultrassom, pois ele ainda vai ser utilizado para o monitoramento da lesão, para avaliação da severidade nos animais positivos para DRP e detecção de outras causas para a formação do cisto renal (HELPS, 2007). O diagnóstico molecular para a detecção de doenças em gatos domésticos ainda é novidade para muitos veterinários e a sua aplicação na rotina clínica deve ser tão importante como outros procedimentos diagnósticos (LYONS et al., 2004). O diagnóstico molecular é uma realidade cada vez mais presente na medicina veterinária. O DNA do gato é facilmente coletado por swab oral ou punção venosa. A PCR é um exame diagnóstico que identifica a mutação conhecida com o uso de oligonucleotídeos desenhados especificamente para a sequência genética escolhida. (LEE et al., 2010; LYONS et al., 2004).

## 5. TRATAMENTO

Não há tratamento específico para doença renal policística. Portanto, os animais devem ser tratados como insuficientes renais crônicos (FELDHAHN, 1995). O interstício renal ou o cisto pode predispor a infecções secundárias, e quando presente a infecção é um fator agravante dos sintomas de dor, anorexia e apatia. Mesmo frente a um resultado negativo de urocultura a possibilidade de infecção não deve ser descartada, uma vez que os cistos infectados podem ser do tipo que não se comunicam com o sistema coletor (BILLER et al., 1994). A infecção deve ser tratada com antibióticos que penetram na parede do cisto (BILLER et al., 1994; LULICH et al., 1995). Acredita-se que antibióticos lipofílicos tenham maior penetração. Em humanos, os mais utilizados são sulfa-trimetoprim, cloranfenicol e quinolonas (norfloxacina e ciprofloxacina) (BILLER et al., 1994).

A redução do tamanho dos cistos, potencialmente resulta em diminuição da pressão sanguínea sistêmica, uma vez que os cistos grandes podem comprimir os vasos renais causando assim uma hipertensão. Essa Redução dos cistos melhora o prognóstico do animal e diminui a dor do mesmo (BILLER et al., 1994).

A realização da punção aspirativa dos cistos devem ser realizada guiada por ultrassom em gatos com DRP. A aspiração é feita em decúbito lateral, sob anestesia de curta duração com a utilização de cateteres inseridos no interior dos cistos sob constante visualização ultrassonográfica e condições assépticas. Retira-se todo o volume de fluido possível de cada um dos cistos maiores. O tempo de execução, considerando os dois rins, é de aproximadamente trinta minutos. Após a recuperação anestésica, o animal volta para casa sem nenhuma recomendação especial, exceto o esclarecimento de que o animal poderá apresentar hematúria nas primeiras 24 horas após procedimento. Cinco dias depois, o paciente apresenta sinais de menor desconforto e melhor disposição, observada pelo aumento de apetite e atividade do animal. Mas essa técnica deve ser bem pensada antes de ser feita, pois ao fazer o procedimento o veterinário poderá levar contaminação para o interior dos cistos e tecidos adjacentes, resultando assim em uma infecção, piorando o prognóstico do animal. (GONZALEZ & FRÓES, 2003).

## 6. PROGNÓSTICO

O prognóstico para gatos portadores da doença renal policística deve ser sempre reservado. No entanto, a sintomatologia clínica relacionada à insuficiência renal crônica terminal relaciona-se com a quantidade de cistos que o animal possui. O prognóstico depende do estágio de evolução da doença renal crônica, da resposta do gato ao tratamento inicial e do desejo do proprietário em dar continuidade ao tratamento (NORSWORTHY, 2004).

## 7. OBJETIVOS

A presente pesquisa teve como objetivos:

- A utilização de uma nova ferramenta molecular (PCR) para o diagnóstico precoce da doença renal policística em felinos (DRP).
- Determinar a prevalência da Doença Renal Policística na população de gatos do Distrito Federal e correlacioná-la com alterações laboratoriais.

## 8. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de sangue de 229 gatos domésticos (*Felis catus*), 188 amostras de animais que foram atendidos na clínica médica ou cirúrgica no Hospital Veterinário da UnB, e 41 amostras provenientes de um Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Gama. As amostras foram colhidas independente de raça, sexo, idade, condição clínica ou acesso à rua. Os métodos experimentais deste projeto foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UnB (UnBDOC nº 43930/2012).

As amostras foram acondicionadas em tubos com e sem anticoagulante (EDTA), e encaminhadas ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do HVet – UnB. Das amostras provenientes do Gama, 7 apresentavam os resultados do hemograma, então das 41 amostras utilizadas para a PCR, somente o hemograma

de 7 animais foram utilizadas nas análises estatísticas. Dos animais positivos, somente 4 deles apresentavam urinálise.

## ETAPA I – Hematologia e Bioquímica

### Etapa 1.1 Hematologia

As amostras que chegaram ao LPCV HVet-UnB foram devidamente identificadas e processadas para a realização de hemograma. Tais procedimentos seguiram o protocolo estabelecido pelo próprio laboratório.

Amostras com anticoagulante (EDTA) foram utilizadas para hemogramas, onde foram submetidas a um contador semi-automático de células para uso veterinário (ABC Vet - Horiba ABX diagnostics, Brasil) (Figura 4), para determinação do número de hemácias, concentração de hemoglobina, número de plaquetas, e número de leucócitos. A técnica de microhematócrito disponibilizou o valor do volume globular (VG) e o refratômetro o valor das proteínas plasmáticas totais (PPT). Os índices de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O diferencial leucocitário foi realizado por meio da microscopia óptica a partir da contagem de 100 células em esfregaço corado com panótico (NewProv®). O restante do sangue foi congelado (-20°C) para posterior extração do DNA.



**Figura 4.** Contador Semi-automático ABC Vet - Horiba ABX diagnostics, utilizado na rotina do LPCV HVet-UnB.

## Etapa 1.2 Bioquímica Sérica

As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas e o soro foi utilizado para a determinação da concentração da bioquímica sérica: uréia, creatinina, ALT, FA, proteínas totais, albumina e globulina, realizadas em um aparelho semi-automático (Figura 5) (Bio2000 - Bioplus) utilizando kits bioquímicos específicos (Labtest ®), seguindo as orientações do fabricante.



**Figura 5.** Aparelho semi-automático Bio2000 – Bioplus, utilizado na rotina do LPCV HVet-UnB.

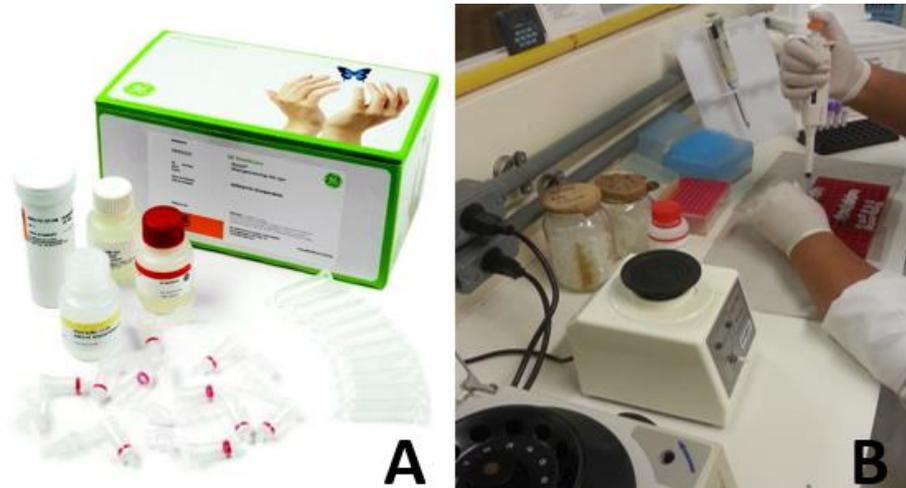
## ETAPA II – PCR

A identificação de animais DRP foi efetuada por meio da reação de polimerização em cadeia (PCR), no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular na UnB.

### Etapa 2.1 Extração de DNA

O restante do sangue com EDTA, foi centrifugado separando o plasma dos outros componentes sanguíneos obtendo-se 2 frações, uma de plasma e outra contendo os componentes sanguíneos.

A fração de 200 $\mu$ L dos componentes sanguíneos foi utilizada para a extração de DNA, essa extração foi executada por meio de kit comercial específico (Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare) (Figura 6), de acordo com o protocolo do fabricante.



**Figura 6.** Kit semelhante ao utilizado para extração de DNA no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular na UnB (A). Uma das Etapas de extração de DNA (B).

## Etapa 2.2 PCR PARA GAPDH

Para verificar a qualidade das amostras de DNA extraídas e detectar a presença de inibidores da PCR foi realizada utilizando-se oligonucleotídeos específicos para o gene da enzima GAPDH, e resultando em um produto de 400pb.

As reações tinham como volume final 25  $\mu$ L contendo:

- 17,3  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milliQ;
- 1X de tampão de PCR;
- 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- 0,4  $\mu$ M do oligonucleotídeo F;
- 0,4  $\mu$ M do oligonucleotídeo R;
- 0,2 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP);
- 0,8 U de Taq DNA polimerase;
- Cerca de 10ng de DNA da amostra a ser testada.

O equipamento utilizado para amplificação do gene foi o termociclador C1000™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad®) com o seguinte protocolo: desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos seguida de 40 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C por 5 minutos.

**Tabela 1.** Sequências de oligonucleotídeos para a GAPDH.

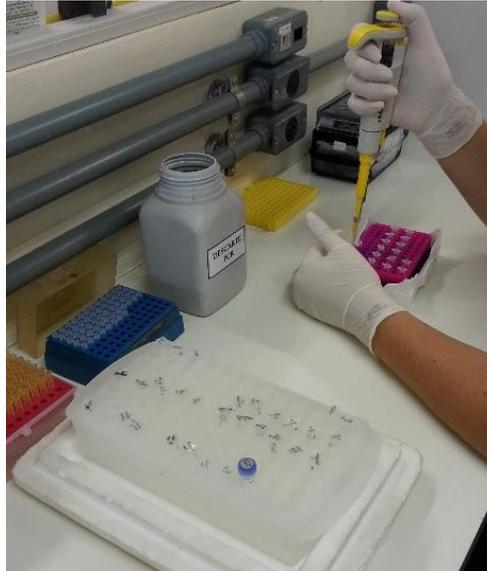
GAPDH	Sequências
GAPDH-F	5' – CCTTCATTGACCTCAACTACAT - 3'
GAPDH-R	5' – CCAAAGTTGTCATGGATGACC - 3'

### Etapa 2.2.1 PCR PARA PKD1

Na PCR para a identificação dos animais portadores da DRP foram utilizados oligonucleotídeos que foram desenhados especificamente na mutação e anelam na região terminal 3' do alelo mutante que contém o ponto de troca das bases de nucleotídeos C>A (acesso ao GenBank no. AY612847). As condições da PCR (temperatura de anelamento, concentrações dos reagentes, número de ciclos) foram determinadas experimentalmente a partir de controles positivos (DNA de animal portador da DRP comprovado por meio de ultrassonografia).

As reações tinham como volume final 25 µL contendo (Figura 8):

- 18,55 µL de H<sub>2</sub>O milliQ;
- 1X de tampão de PCR;
- 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>;
- 0,3 µM do oligonucleotídeo PKDF3;
- 0,3 µM do oligonucleotídeo PKDR2;
- 0,2 mM de cada desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP);
- 1U de Taq DNA polimerase;
- Cerca de 10ng de DNA da amostra a ser testada.



**Figura 8.** Preparação da mistura da PCR.

O equipamento utilizado para amplificação do gene foi o termociclador C1000™ *Thermal Cycler* (Bio-Rad®) e seguiu o seguinte protocolo de *Touchdown*: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguida de 10 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto diminuindo 1°C a cada ciclo e 72°C por 1 minuto) mais 30 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto, 59°C e 72°C por 1 minuto) e extensão final de 72°C por 10 minutos.

**Tabela 2.** Sequências dos oligonucleotídeos utilizados no método de diagnóstico molecular da doença renal policística.

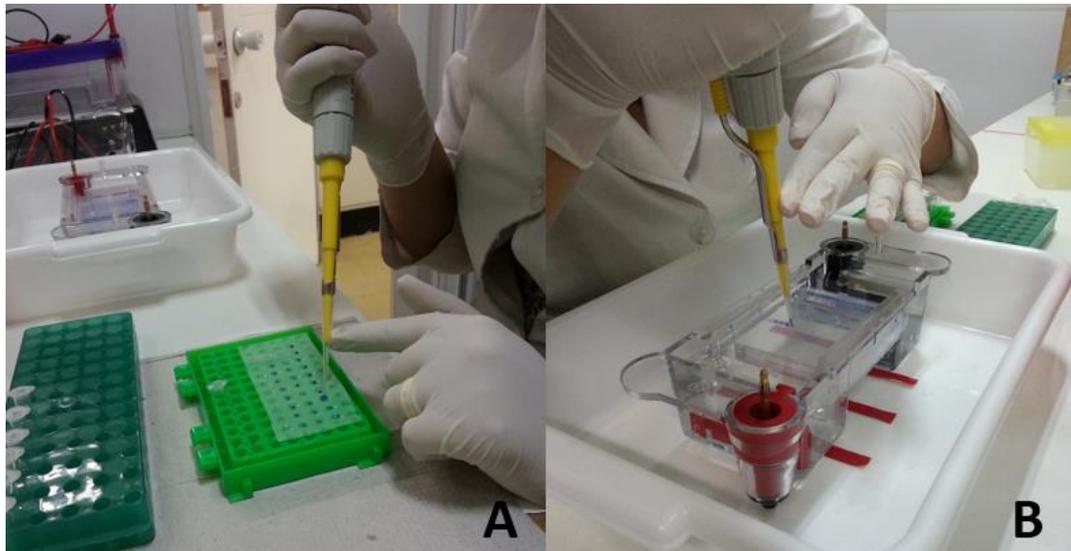
PKD1	Sequências
F3*	5' -AGAGGCAGACGAGGAGCACT- 3'
R2	5, -GCCTCGTGGAGAAGGAGGT-3'

\* F3 foi desenhado para anelar especificamente no alelo mutante. (LEE et al., 2010)

### Etapa 2.3 Eletroforese

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (invitrogen™) a 1,5%. Depois de prontos, os géis foram corados no brometo de etídeo 0,3 µg/mL por aproximadamente 20 minutos. Os resultados foram visualizados através de fotodocumentador de luz ultravioleta (UVP®), sendo

consideradas positivas as amostras que apresentaram produtos cujos tamanhos eram correspondentes a aproximadamente 277 pb comparados com marcador de peso molecular 100pb (*EasyGen*®).



**Figura 9.** Produto da PCR sendo homogeneizado com o tampão de amostra (A). Produto final da homogeneização sendo colocado no gel de agarose. (B)

Como controle negativo foi utilizado água a fim de excluir a ocorrência de contaminações nos reagentes. A amostra de DNA de um gato positivo previamente diagnosticado para PKD1, confirmado por meio de ultrassonografia serviu como controle positivo.

#### **Etapa 2.4 Análise Estatística**

Para as análises estatísticas, foram utilizados os valores de média, desvio padrão, teste f e teste t. De todos os resultados hematológicos e bioquímicos. O dado mais importante obtido foi o **valor p**, que era obtido através do teste t. Em termos gerais, um **valor-p** maior que 0,05 leva assim à aceitação da hipótese nula. Aceitar a hipótese nula, é aceitar que a diferença de resultados entre o grupo positivo e negativo, é vista facilmente.

Não podemos comprovar que os animais testados eram hígidos, por isso, os resultados estatísticos podem sofrer influência de animais com outras doenças que não sejam a Doença Renal Policística.

Todos os testes foram realizados utilizando o programa *Microsoft® Office Professional Plus 2013*.

## 9. RESULTADOS

Foram analisadas amostras de 229 animais, sendo 188 amostras obtidas do Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UnB e 41 amostras de um laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Gama, dos quais 48,5% eram fêmeas, 48,5% machos e 3% não foi informado o sexo. A idade média foi de 6,3 anos, oscilando entre 2 meses e 20 anos. Na tabela 3 estão apresentadas as características referentes a sexo e idade. Das amostras provenientes do Gama, não foi obtida informação sobre idade dos animais. Dos animais testados no total 11,8% foram positivos, na tabela 4 estão representados os animais que foram positivos no HVet-UnB e no LPCV Gama separadamente. Na tabela 5 estão apresentadas as raças dos animais positivos e negativos.

Deve-se lembrar ainda que nem todas as amostras obtidas do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária do Gama, possuíam os dados dos hemogramas e bioquímicos, por isso os dados podem estar com uma média, desvio padrão e valor p um pouco alterados.

**Tabela 3.** Número total de animais de acordo com cada característica avaliada separados conforme o grupo de amostras colhidas no Distrito Federal entre 2012 e 2013.

<b>Características</b>	<b>HVET-UnB</b>	<b>Gama</b>
<b>Idade</b>		
<b>&lt; 2 anos</b>	22	1
<b>2-8 anos</b>	77	4
<b>&gt; 8 anos</b>	37	-
<b>Não Informado</b>	52	36

<b>Gênero</b>		
<b>Fêmeas</b>	90	21
<b>Machos</b>	96	15
<b>Não Informado</b>	2	5
<b>Total de Gatos Avaliados</b>	188	41

**Tabela 4.** Número total de animais positivos e negativos de acordo com o resultado na PCR.

<b>Características</b>	<b>HVET-UnB</b>	<b>Gama</b>
<b>Negativos</b>	164 (87,2%)	38 (92,7%)
<b>Positivos</b>	24 (12,8%)	3 (7,3%)
<b>Total</b>	188	41

**Tabela 5.** Raças dos animais testados do HVET-UnB.

<b>Características</b>	<b>HVET-UnB</b>
<b>Negativos</b>	<b>164</b>
<b>Raças</b>	
<b>SRD</b>	126/188 (67%)
<b>Persa</b>	19/188 (10,1%)
<b>Siamês</b>	8/188 (4,4%)
<b>Korat</b>	1/188 (0,5%)
<b>Himalaia</b>	1/188 (0,5%)
<b>Maine Coon</b>	1/188 (0,5%)
<b>Forest Norwegian</b>	1/188(0,5%)
<b>Não Informado</b>	7/188 (3,7%)
<b>Positivos</b>	<b>24</b>
<b>Raças</b>	
<b>Persa</b>	10/188 (5,3%)
<b>SRD</b>	14/188 (7,5%)
<b>Não Informado</b>	-

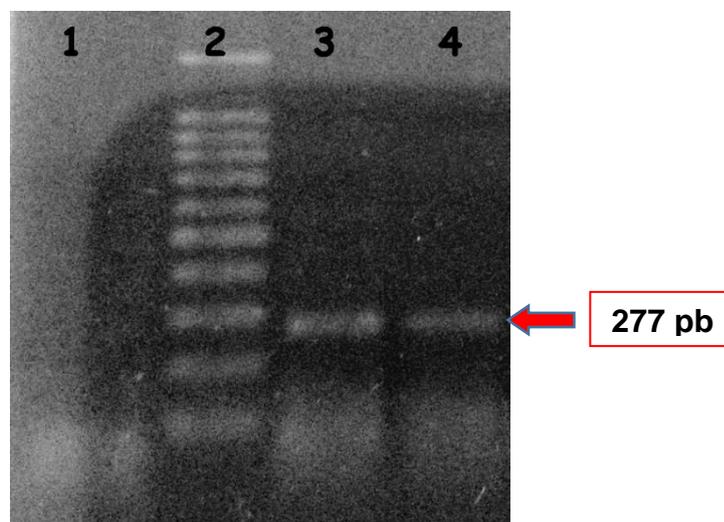
SRD – Sem Raça Definida

Das amostras obtidas do Laboratório do Gama, não foram obtidas informações sobre as raças do animais testados.

**Tabela 6.** Idade dos animais acometidos pela PKD1 confirmados pela PCR.

Características	Animais Positivos
<b>Idade</b>	
< 2 anos	4 (14,8%)
2-8 anos	8 (29,6%)
> 8 anos	5 (18,5%)
Não Informado	10 (37,1%)
<b>Total</b>	<b>27</b>

O controle positivo da PCR testada sempre apresentou produto na altura dos pares de bases esperadas para a sequência amplificada (277pb). O controle negativo (H<sub>2</sub>O - Água) não apresentou amplificação (Figura 10).



**Figura 10.** Detecção de mutação de PKD1 na eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídio 0,01% utilizando oligonucleotídeos específicos para a anelar na mutação PKD1, o produto (277 pb, seta), representando o alelo mutante, foi amplificado a partir de duas amostras com a mutação do gene (3-4). Colunas: 1: Controle Negativo (H<sub>2</sub>O), 2: Marcador molecular de 100pb, 3: Controle Positivo e 4: Amostra positiva para a mutação do gene PKD1.

## Hematológico

A tabela 7 demonstra a média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos para animais PKD1 positivos e PKD1 negativos e a tabela 8 apresenta o percentual de animais acima, dentro e abaixo dos valores de referência para cada padrão hematológico acompanhados das estimativas estatísticas.

**Tabela 7.** Valores das médias, desvio padrão e comparação dos valores hematológicos entre os animais PKD1 com mutação (PKD1+) e sem mutação (PKD1-) identificados por meio da PCR.

Parâmetros Hematológicos	PKD1 +		PKD1 -		Valor de Referência <sup>1</sup>	Valor P
	Média	DP	Média	DP		
VG (%)	29,9	8,3	30,4	6,6	24 - 45	0,75
Hemácias (x 10 <sup>6</sup> µL)	8,6	3,1	8,1	1,9	5,0 - 10	0,51
Hemoglobina (g/dL)	10,8	3	11,3	2,6	8,0 - 15	0,41
VCM (fl)	37,4	10,1	38,2	5,9	39 - 55	0,75
CHCM (%)	36,2	5,5	37	3,1	30 - 36	0,57
Leucócitos (µL)	12	5,4	11,5	9,2	5,5 - 19,5	0,71
Segmentados (µL)	8861	4936	8212	6165	2500 - 12500	0,64
Linfócitos (µL)	1895	1164	1962	1526	1500 - 7000	0,85
Monócitos (µL)	392	314	314	377	0 - 850	0,37
Eosinófilos (µL)	524	619	714	1175	0 - 1500	0,25
PPT (g/dL)	7,8	1,1	7,4	0,7	6,0 - 8,0	0,11
Plaquetas	473524	201987	386402	191688	195000 - 624000	0,054

<sup>1</sup>JAIN, 1993.

**Tabela 8.** Proporção de gatos com valores hematológicos acima, dentro e abaixo dos valores de referência, entre gatos PKD1 com mutação (PKD1+) e sem mutação (PKD1-) na PCR.

Parâmetros Hematológicos		PKD1 + (%)	PKD1 - (%)	Valor p
<b>VG (%)</b>	Abaixo	23,8	10,6	0,74
	Normal	76,2	87,6	0,43
	Acima	-	1,8	-
<b>Hemácias (x 10<sup>6</sup>µL)</b>	Abaixo	9,5	6,5	0,26
	Normal	57,2	80,6	0,72
	Acima	33,3	12,9	0,13
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	Abaixo	9,5	8,2	0,25
	Normal	85,7	86,5	0,58
	Acima	4,8	5,3	*
<b>VCM (fl)</b>	Abaixo	61,9	65,3	0,024
	Normal	33,3	32,9	0,29
	Acima	4,8	1,8	*
<b>CHCM (%)</b>	Abaixo	-	1,8	-
	Normal	52,4	34,7	0,061
	Acima	47,6	63,5	0,5
<b>Leucócitos (µL)</b>	Abaixo	9,5	12,4	0,56
	Normal	80,9	78,8	0,26
	Acima	9,5	8,8	0,55
<b>Segmentados (µL)</b>	Abaixo	4,8	5,4	*
	Normal	80,9	74,7	0,053
	Acima	14,3	19,9	0,76
<b>Linfócitos (µL)</b>	Abaixo	47,6	46,4	0,13
	Normal	52,4	53	0,63
	Acima	-	0,6	-
<b>Monócitos (µL)</b>	Abaixo	-	-	-
	Normal	95,2	94	0,062
	Acima	4,8	6	*
<b>Eosinófilos (µL)</b>	Abaixo	-	-	-
	Normal	90,5	88,6	0,28
	Acima	9,5	11,4	0,74
<b>PPT (g/dL)</b>	Abaixo	-	1,8	-
	Normal	47,6	74,1	0,061
	Acima	52,4	24,1	0,085
<b>Plaquetas</b>	Abaixo	9,5	12,4	0,96
	Normal	61,9	74,6	0,11
	Acima	28,6	13	0,28

\*Os valor p não foi encontrado, pois em um dos grupos possui amostra insuficiente para a realização do teste.

## Bioquímicos

A Tabela 9 demonstra a média e desvio padrão dos parâmetros bioquímicos para animais PKD1 com mutação e PKD1 sem mutação e a tabela 10 apresenta o percentual de animais acima, dentro e abaixo dos valores de referência para cada padrão bioquímico acompanhados das estimativas estatísticas.

**Tabela 9.** Valores das médias, desvio padrão e comparação dos valores bioquímicos entre os animais PKD1 com mutação (PKD1+) e sem mutação (PKD1-) identificados por meio da PCR.

Parâmetros Bioquímicos	PKD1 +		PKD1 -		Valor de Referência <sup>1</sup>	PKD1+ x PKD1- Valor p
	Média	DP	Média	DP		
Uréia (mg/dL)	78,1	45,8	76,2	62,6	42,8 - 64,2	0,9
Creatinina (mg/dL)	1,7	1	2	2,4	0,8 - 1,8	0,4
ALT (UI/L)	104,9	81	88,4	93	28 - 83	0,47
FA (UI/L)	82,1	191,6	39,7	52,1	25 - 93	0,38
Proteína Total (g/dL)	7,7	1,9	7,3	1,2	5,4 - 7,8	0,45
Albumina (g/dL)	2,2	0,4	2,4	0,5	2,1 - 3,3	0,13
Globulina (g/dL)	5,9	1,3	4,8	1,1	2,6 - 5,1	0,004

<sup>1</sup>KANEKO, 1997.

**Tabela 10.** Proporção de gatos com valores bioquímicos acima, dentro e abaixo dos valores de referência, entre gatos PKD1 com mutação (PKD1+) e sem mutação (PKD1-) na PCR.

Parâmetros Bioquímicos		PKD1 + (%)	PKD1 - (%)	Valor p
Uréia (mg/dL)	Abaixo	20	20,9	0,23
	Normal	25	34,8	0,3
	Acima	55	44,3	0,72
Creatinina (mg/dL)	Abaixo	-	8,6	-
	Normal	66,7	69,3	0,35
	Acima	33,3	22,1	0,24
ALT (UI/L)	Abaixo	5,6	5	*
	Normal	55,6	73,8	0,11
	Acima	38,8	21,2	0,48
FA (UI/L)	Abaixo	52,9	56,5	0,69
	Normal	35,3	36,1	0,50
	Acima	11,8	7,4	0,38
Proteína Total (g/dL)	Abaixo	7,1	1,8	*
	Normal	42,9	72,8	0,58
	Acima	50	25,4	0,54
Albumina (g/dL)	Abaixo	28,6	19,8	0,85
	Normal	71,4	75,2	0,17
	Acima	-	5	-
Globulina (g/dL)	Abaixo	-	1,8	-
	Normal	38,5	65,2	0,25
	Acima	61,5	33	0,12

\*Os valor p não foi encontrado, pois em um dos grupos possui amostra insuficiente para a realização do teste.

**Tabela 11.** Resultado da urinálise de 4 animais positivos para a mutação na PCR. Todos coletados por cistocentese.

Animal	Densidade	Proteína (mg/dL)	pH	Sangue Oculto (Cruzes)	Bioquímicos		
					Proteína	Creatinina	U (P:C)
1	1024	30	5,5	4	46	122,5	0,38
2	1032	500	6	3	0	0	0
3	>1040	100	6,5	0	44,4	307,5	0,14
4	>1040	100	5,5	0	80,9	14,8	5,47

Animal	Células de descamação	Hemácias	Leucócitos	Bactérias	Cristais
1	Vesicais Raras	+++	+++	++	-
2	Vesicais Raras	++	+	++	-
3	Amostra insuficiente	++	++	-	-
4	Vesicais raras	+	+	+++	-

- Ausência; + Raros(as); ++ Leve Presença; +++Moderada Presença;

## 10.DISSCUSSÃO

Ressalta-se que a maior parte dos dados foram baseados em uma 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 pode extrapolar os resultados deste estudo para toda população de gatos domésticos do DF.

Como citado por Gonzales & Froés (2003) e Young et al (2005) não existe dados científicos quanto a prevalência de DRP no Brasil, o que torna difícil o seu controle no país. Na França, Barthes et al (2003) encontraram em 310 gatos a prevalência da DRP de 41,8% em gatos da raça persa, 39,1% em gatos sem raça definida e nula em outras raças. Na presente pesquisa a prevalência da DRP nos 229 gatos foi de 37% em gatos da raça persa, 51,9% naqueles sem raça definida e nula em outras raças. O que acaba sendo bem próximo ao encontrado por Barthes et al (2003) nos gatos da raça persa, mas a prevalência nos gatos sem raça definida

foi maior na presente pesquisa do que os valores encontrados pelo pesquisador na França, Isto pode ser explicado pelo fato de no Brasil existirem mais gatos Sem Raça Definida, e também confirma a informação fornecida por Ferrante (2004), que fala sobre a necessidade de uma investigação mais abrangente em relação a ocorrência de DRP em todas as raças presentes no país.

Com os dados observados nesta pesquisa nos gatos que possuem a mutação no gene PKD1, podemos inferir o que Beck & Lavelle (2001) afirmaram, de que os gatos portadores de DRP podem ser assintomáticos, baseado nos resultados que foram obtido nos exames realizados, caso o comprometimento seja unilateral, ou demonstrar sinais de insuficiência renal, quando for bilateral. Como não possuímos os dados de ultrassom dos animais, não podemos confirmar a extensão do comprometimento renal dos mesmos. De acordo com Biller et al (1994) o tipo e a gravidade dos sinais clínicos e achados laboratoriais dependem da presença ou não de insuficiência renal crônica. Em animais em que o diagnóstico é precoce, os achados clínicos se restringem à nefromegalia bilateral e os exames laboratoriais não apresentam alterações dignas de notas.

Nos exames laboratoriais é possível identificar graus variados de azotemia, acidose metabólica e anemia não regenerativa (BILLER et al., 1994), mas nos achados da presente pesquisa, de acordo com a tabela 9, somente a ureia estava levemente aumentada nos animais positivos, mas os animais negativos também possuíam um leve aumento nesse parâmetro, o que se pode inferir que como foi visto anteriormente os animais testados não eram hígidos, então os animais negativos poderiam ter outras doenças que afetassem a função renal, que não fosse a DRP, indicando assim o leve aumento da uréia, outro fator seria que a ureia possa estar aumentada no caso de animais com ingestão de uma dieta com alto teor proteico, com isso uma maior quantidade de aminoácidos é absorvida no trato gastrointestinal após a digestão das proteínas, caso a quantidade de aminoácidos exceda a necessidade nutricional do animal, esse excesso será desaminado no fígado (THRALL et al., 2006), aumentando o valor da ureia que foi observada nos exames bioquímicos e ainda uma explicação para o fato de existirem uma alta porcentagem de animais com a ureia aumentada(tabela10) e a creatinina não seguir o mesmo padrão de aumento, é pelo fato de que a concentração sérica da uréia tende a aumentar antes da creatinina em casos de lesão renal.

Aproximadamente 23% (tabela 8) dos animais positivos apresentaram anemia

(baseado no Volume Globular), uma das explicações poderia ser explicado pelos rins serem os principais produtores de eritropoietina, citocinina regulatória da eritropoiese. A insuficiência renal crônica leva, geralmente, a uma deficiência de eritropoietina. Quando a sua concentração é baixa, a produção é comprometida e há uma anemia hipoplásica, devido a uma diminuição do número de eritrócitos. (THRALL et al., 2006) Grande parte dos animais positivos e negativos apresentaram uma hiperchromia (aumento do CHCM), mas como a hiperchromia real não existe, porque a síntese de precursores de eritrócitos para quando atinge uma concentração ótima de hemoglobina no citoplasma (STOCKHAM et al., 2008). Desta forma, amostras hemolisadas são a causa comum do aumento do CHCM. Alternativamente, exemplos comuns de aumento da turbidez, que interferem na avaliação do CHCM são lipemia e um grande número de corpúsculos de Heinz em gatos (THRALL et al., 2006). Erro na calibragem do contador semi-automático de células (ABC Vet - Horiba ABX diagnostics) também poderia justificar o aumento do CHCM.

De acordo com a Tabela 9, um dos parâmetros estava aumentado no animais positivos, as Globulinas, mas como nem todos os animais eram hígdidos, não podemos descartar outros processos infecciosos, que não envolvessem os rins ou os cistos, que levassem a esse aumento.

Os resultados hematológicos e bioquímicos dos animais com a mutação no gene PKD1 não foram significativamente diferentes dos animais que não possuíam o mutação no gene PKD1 ( $p > 0,05$ ) de acordo com o Teste T. A chance dos positivos e dos negativos terem os resultados hematológicos e bioquímicos parecidos é muito próxima, para ser descartado estatisticamente. Estudos a longo prazo poderiam ser feitos para confirmar essa hipótese.

Na urinálise observa-se baixa densidade urinária e proteinúria discreta a moderada (GRECO, 2001). A densidade urinária determina a concentração de solutos na urina, verificando a capacidade dos túbulos renais de concentrar ou diluir o filtrado glomerular. A capacidade de concentrar a urina depende do sistema de produção e liberação de ADH, número de néfrons funcionais suficientes para gerar e manter uma alta concentração de solutos na medula renal e suficiente população de túbulos funcionais para responder ao ADH. A densidade urinaria reflete também a ingestão de água, disfunções hormonais, intoxicações, uso de medicamentos e processos infecciosos. (ROCCO, 2009)

A densidade urinária aumentada reflete uma diminuição na filtração glomerular, aumento na reabsorção de água, diminuição de consumo hídrico, aumento da perda de água por causas não renais (ROCCO, 2009). Dois animais apresentavam a densidade urinária possivelmente maior que a referência, pois a referência em gatos é de 1060 (STOCKHAM et al., 2008), e os animais apresentaram densidade maior que 1040, como não foi feita a diluição, para saber a real densidade desses animais, não podemos afirmar que eles estavam mesmo acima do valor, bem como a presença de sangue oculto na amostra, que aumenta a quantidade de proteína na mesma podendo causar um aumento de densidade. E nenhum dos animais com resultado de urinálise apresentou baixa densidade, como Greco (2001) citou.

A urina normalmente não contém proteína, mas quando presente pode ser um achado secundário à hemorragia, inflamação ou degeneração tubular renal. Caso não haja indicadores dessas anormalidades no sedimento, provavelmente a proteinúria resulte de lesão glomerular e extravasamento (THRALL et al., 2006). Como os animais que observamos tinham a presença de sangue na urina, isso poderia justificar a presença dessa proteinúria, mas também uma proteinúria acentuada, como foi encontrada em 3 animais, poderia ser um indicativo de degeneração tubular.

A presença de sangue oculto na urina, pode ser justificado por sangramentos intra-renais, ou também pelo uso da cistocentese como método de colheita de eleição para gatos.

A relação de proteína/creatinina (RPC) na urina é um teste indicado para avaliação de lesão aos glomérulos quando ainda não há evidências clínicas ou até mesmo laboratoriais de patologias em geral do sistema urinário. A RPC se correlaciona bem à excreção de proteína urinária, o aumento desse valor, além da faixa de variação (<1 normal; 1-2 observar e repetir exame mais a frente), tem sido associado a glomerulonefropatia acompanhada de perda de proteína. Recomenda-se a avaliação cautelosa da RPC quando houver piúria significativa de modo que a proteinúria renal não seja erroneamente diagnosticada. A contaminação da amostra de urina com sangue devido a hemorragias não influencia significativamente a RPC (THRALL et al., 2006). Como o animal citado não apresentou piúria, nem uma grande quantidade de sangue na urina, essa relação alterada, pode indicar que o rim já está comprometido pela DRP ou por alguma glomerulonefropatia, o que poderia ser

confirmado por uma urografia excretora, ultrassonografia ou tomografia contrastada.

Os testes de PCR em tempo real para a detecção da DRP felina se mostraram muito confiáveis e mais rápidos do que a ultrassonografia (HELPS et al., 2007). Em geral, a PCR é um método altamente acessível e confiável para o detecção da mutação do gene PKD1, que pode ser aplicada no diagnóstico de rotina da DRP felina em laboratórios com um termociclador padrão. (YA-JANE et al. 2010)

De acordo com os dados analisados podemos confirmar que a precocidade diagnóstica é de grande importância (BILLER et al., 1994; WHITE, 2010). Dos animais positivos 14,8% possui menos de 2 anos, o que reforça a utilização da PCR como método diagnóstico precoce para DRP, pois com o resultado positivo, esses animais poderão ter o manejo correto, tendo uma melhor condição de vida, além de serem castrados para que não passem o gene mutado para a próxima geração.

O controle da doença deve-se basear em precocidade diagnóstica por meio principalmente da realização da PCR e de exames ultrassonográficos em animais antes de iniciarem suas vidas reprodutivas. Sendo importante a esterilização dos animais positivos, já que o mesmo terá chance de transmitir a doença para pelo menos 50% de sua prole, mesmo na ausência de sinais clínicos, sendo também relevante a realização da PCR e do exame ultrassonográfico dos familiares quando for identificada positividade. (FERREIRA, 2010)

Com todos os dados obtidos nesta pesquisa, foi observado que nem todos os animais positivos, confirmados pela PCR, possuíam alterações hematológicas e bioquímicas dignas de nota, o que nos leva a pensar que a utilização da PCR como método diagnóstico para a DRP é muito importante gerando um diagnóstico precoce, pois os animais não apresentavam sinais clínicos nem alterações nos exames laboratoriais que levassem a crer que eles poderiam ter a DRP. Logo a PCR serve como uma importante ferramenta de diagnóstico e deve ser utilizada por criadores comerciais de gatos, para que a precocidade do diagnóstico seja efetiva, e o animal possa ser retirado da cadeia reprodutiva desse criatório comercial.

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos durante a pesquisa permitiram concluir nos animais avaliados que:

- A PCR é uma importante ferramenta diagnóstica precoce para a DRP. E com o diagnóstico precoce, os animais portadores de DRP poderão ser acompanhados por veterinários, ter o melhor manejo, e mesmo a DRP não tendo cura, o animal terá uma condição de vida melhor.
- 11,8% do total de animais testados, foram positivos para a mutação na PCR;
- A mutação genética para DRP não foi observada somente na raça persa, mas também em raças que podem ter sido inter cruzados com a linhagem persa.
- Os animais positivos nem sempre apresentavam sinais clínicos e alterações nos exames laboratoriais, o que caracteriza o estado de portador da doença.
- Com o diagnóstico precoce, os animais portadores de DRP poderão ser acompanhados por veterinários, ter o tratamento correto, e mesmo a DRP não tendo cura, o animal terá uma condição de vida melhor.

## 12.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTHEZ, P.Y.; RIVIER, P.; BEGON, D. **Prevalence of polycystic kidney disease in Persian and Persian related cats in France.** Journal of Feline Medicine and Surgery. 5, 2003. 345-347.

BECK, C.; LAVELLE, R.B. **Feline polycystic kidney disease in Persian and other cats: a prospective study using ultrasonography.** Aust. Vet. J. v.79 n.3, 2001. 181-184.

BILLER, D.S. **Polycystic Kidney Disease.** In: August, J.R. Consultations in Feline Internal Medicine. 2<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994. 325-330.

BILLER, D.S.; DIBARTOLA, S.P.; EATON, K.A.; PFIUEGER, S.; WELLMAN, M.L.; RADIN, M.J. **Inheritance of Polycystic Kidney Disease in Persian Cats.** Journal of Heredity. 87,1996. 1-5.

BONAZZI, M.; VOLTA, A.; GNUDI, G.; BOTTARELLI, E.; GAZZOLA, M.; BERTONI, G. **Prevalence of the polycystic kidney disease and renal and urinary bladder ultrasonographic abnormalities in Persian and Exotic Shorthair cats in Italy.** Journal of Feline Medicine and Surgery. 9, 2007. 387-391.

CANNON, M.J., MACKAY, A.D., BARR, F. J., RUDORF, H.,BRADLEY, T. J. **Prevalence of polycystic kidney disease in Persian cats in the United Kingdom.** Veterinary Record, v. 149, p. 409–411, 2001.

CRAWFORD, M. A. 1993. **O sistema urinário.** In: Hoskins, J. D. Pediatría Veterinária. 1. ed. São Paulo: Manole. 10: 300-310.

CROWELL, W. A.; HUBBELL, J. J. & RILLY, J. C. **Polycystic renal disease in related cats.** Am. J. Vet. Med. 175. 1979. 286-288.

DIBARTOLA, S.P. 2000. **Autosomal dominar polycystic kidney disease**. In 18<sup>th</sup> Annual Veterinary Medical Forum, 18. Seattle. Seattle: The American College of Veterinary Internal Medicine. 438-440.

EATON, K.A.; BILLER, D.S.; DIBARTOLA, S.P.; RADIN, M.J.; WELLMAN, M.L. **Autossomal Dominant Polycystic Kidney Disease in Persian and Persian-cross Cats**. Vet Pathol. 34, 1997. 117-126.

EVAN, A.P.; GARDENER, K.D. & BERNSTEIN, J. **Polypoid and papillary epithelial hyperplasia: a potential cause of ductal obstruction in adult polycystic disease**. Kidney Int. 16. 1979. 743-750.

FELDHAHN, J. **Polycystic kidney disease in a Persian cat**. Aust. Vet. Pract. 25. 1995. 176-178

FERRANTE, T. **Doença renal policística em felinos**. Nosso Clínico 7: 2004. 6-10.

FERREIRA, G.S.; GALVÃO, A.L.B.; SOCHA, J.J.M. **Atualização em doença renal policística felina**. Acta Veterinaria Brasilica. V.4, n.4, (2010), 227-232.

FISCHER, J.R. Doença Policística dos Rins. In: LAPPIN, M. R. **Segredos em Medicina Interna de Felinos: Respostas ao dia-a-dia em rounds, na clínica, em exames orais e escritos**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

GALLGHER, A.R., HIDAHA, S., GRETZ, N., WITZGALL, R. **Molecular basis of Autosomal dominant polycystic kidney disease**. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 59, p. 682– 693, 2002.

GONZALEZ, M.A.G., MENEZES L.F., PIONTEK K.B., KAIMORI J., HUSO D.L., WATNICK T., ONUCHIC L.F., GUAY WOODFORD L.M., GERMINO G.G. **Genetic interaction studies link autosomal dominant and recessive polycystic kidney disease in a common pathway**. Human Molecular Genetics. V.16, n.16, 2007. 1940-

1950.

GONZALEZ, J. R. M. & FRÓES, T. R. **Doença renal policística autossômica dominante**. In: Souza, H. J. M. Medicina e Cirurgia Felina. Rio de Janeiro: L. F. 2003. 165-172.

HELPS, C.R., TASKER, S., HARLEY, R. **Correlation of the feline PKD diagnosed by pathological examination**. Experimental and Molecular Pathology, v. 83, p. 264-268, 2007.

IGARASHI, P., SOMLO, S. **Genetics and pathogenesis of polycystic kidney disease**. Journal of the American Society of Nephrology, v. 13, p. 2384–2398, 2002.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Lea & Febiger: Philadelphia, 1993.

KANEKO, J.J., HARVEY, D.W., BRUSS, W.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1997. 932 p.

LEE, Y.J.; CHEN, H.Y.; WONG, M.L.; HSU, W.L. **Molecular detection of autosomal dominant feline polycystic kidney disease by multiplex amplification refractory mutation system polymerase chain reaction**. J Vet Diag Invest. 22, 2010. 424-428.

LULICH, J. P.; OSBORNE, C. A. & POLZIN, D. J. **Cystic diseases of the kidney**. In: Osborne, C. A.; Finco, D. R. Canine and Feline Nephrology and Urology. Williams & Wilkins. 1995. 460-470.

LYONS, L.A.; BILLER, D.S.; ERDMAN, C. A.; LIPINSKI, M.J.; YOUNG, A.E.; ROE, B.A.; QIN, B.; GRAHN, R.A. **Feline Polycystic Kidney Disease Mutation Identified in PKD1**. J Am Soc Nephrol. 15 (2004), 2548-2555.

NORSWORTHY, G. D. **Polycystic Kidney Disease**. In: The Feline Pacience. 4<sup>th</sup> ed.

Blackwell Publishing Ltd. Iowa, USA – 2004. p418-419.

NYLAND, G. T.; MATTOON, S. J. **Ultrassom diagnóstico em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2 ed. 2005. 357p.

PEDERSEN, K.M.; PEDERSEN, H.D.; HÄGGSTRÖM, J.; KOCH, J.; ERSBOLL, A.K. **Increased Mean Pressure and Aldosterone-to-Renin Ratio in Persian Cats with Polycystic Kidney Disease**. J Vet Intern Med. 17, 2003. 21-27.

ROCCO, L.C.M. **Guia Prático para Coleta e Interpretação de Exames Laboratoriais em Cães e Gatos**. Interbook, São Caetano do Sul, SP; Primeira Edição; 2009. 77-80.

ROUX, F. & DESCHAMPS, J. Y. **Ecografia em felinos: diagnóstico de policistose Renal em gato persa**. Hora Veterinária 25(145): 2005. 51-54.

SCHERDING, R. G. 1994. **The Cats: Diseases and Clinical Management**, 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, pp.1719-1721.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology**. 2<sup>nd</sup> Edition, Blackwell Publishing. 2008, 157.

THRALL M.A.; WEISER G.; ALLISON R.; CAMPBELL T.W.; **Veterinary Hematology And Clinical Chemistry**. 2<sup>nd</sup> Edition , Blackwell Publishing. 2006, 15.

YA-JANE LEE, HSIN-YU CHEN, MIN-LIANG WONG AND WEI-LI HSU **Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction Molecular Detection of Autosomal-Dominant Feline Polycystic Kidney Disease by Multiplex Amplification** J VET Diagn Invest 2010 22: 424

YOUNG, A.E.; BILLER, D.S.; HERRGESELL, E.J.; ROBERTS, H.R.; LYONS, L.A. **Feline polycystic kidney disease is linked to the PKD1 region**. Mamm. Genome. 16, 2005. 59-65.