



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**A UTILIZAÇÃO DOS microRNAs NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM GATOS**

CHRISTINE SOUZA MARTINS

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA - DF
NOVEMBRO de 2021



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**A UTILIZAÇÃO DOS microRNAs NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM GATOS**

CHRISTINE SOUZA MARTINS

ORIENTADORA: Profa. Dra. GIANE REGINA PALUDO

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 248D/21

BRASÍLIA – DF
NOVEMBRO de 2021

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

**A UTILIZAÇÃO DOS microRNAs NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL
CRÔNICA EM GATOS**

CHRISTINE SOUZA MARTINS

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**GIANE REGINA PALUDO, Profa. Dra. (Universidade de Brasília – UnB)
(ORIENTADORA)**

ÂNGELA PATRÍCIA SANT’ANA, Profa. Dra. (Universidade de Brasília – UnB)

**MARIA CLORINDA SOARES FIORAVANTI, Profa. Dra. (Universidade Federal de
Goiás – UFG)**

ALINE MOREIRA DE SOUZA, Profa. Dra. (Universidade Federal Fluminense – UFF)

BRASÍLIA, 18 DE NOVEMBRO DE 2021

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

MARTINS, C. S. **A utilização dos microRNAs no diagnóstico de doença renal crônica em gatos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 62p. Tese de doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado 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 e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta tese pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SS729u	Souza Martins, Christine A utilização dos microRNAs no diagnóstico de doença renal crônica em gatos / Christine Souza Martins; orientador Giane Regina Paludo. -- Brasília, 2021. 69 p.
	Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Animais) -- Universidade de Brasília, 2021.
	1. gatos. 2. miRNAs. 3. doença renal. 4. biomarcador. I. Regina Paludo, Giane, orient. II. Título.

Dedico esse trabalho à minha mãe Constância (in memoriam)
eternamente presente em minha vida como maior incentivo

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar saúde e oportunidade de trabalhar com que eu gosto e de me cercar de pessoas que apoiaram minhas escolhas profissionais.

À minha mãe (in memoriam) que sempre me considerou “doutora”, que acreditava em mim mais que eu mesma.

Aos membros da minha família, que das mais variadas maneiras, contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Especialmente minha irmã Bernadete e meu sobrinho Paulo Victor, por estarem próximos e me apoiarem em todos os momentos.

Aos mestres que encontrei ao longo da vida acadêmica e pessoal e que continuaram a ser exemplos de dedicação à educação e formação pessoal e profissional. Especialmente a Profa. Heloísa Justen, hoje uma amiga muito querida, mas sempre um exemplo de generosidade, competência e dedicação incontestável à fascinante área da medicina felina.

À minha orientadora, Profa. Giane Paludo, por ser essa profissional competente, repleta de serenidade e sensatez, além de uma pessoa incrível e generosa. Sua orientação, amizade e apoio estão sendo muito importantes para meu amadurecimento.

Aos meus alunos de graduação em Medicina Veterinária que, com o convívio e troca de ideias, sempre me ensinaram muito.

À Universidade de Brasília (UnB), por me proporcionar a oportunidade de complementar minha formação profissional e, em especial a todos envolvidos no Programa de Pós-graduação em Ciências Animais.

À toda a equipe do laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica, especialmente a Fran e ao Gabriel e Prof. Ricardo Titze-de-Almeida, pela inestimável parceria na realização desse trabalho.

À querida amiga e parceira de projeto Marcela Scalon, sem a qual eu provavelmente estaria até agora brigando com as pipetas. Sem palavras para agradecer a sua boa vontade, disposição e enorme capacidade científica.

Aos tutores dos gatos que permitiram que fossem incluídos nesse projeto com a esperança de que outros gatos sejam beneficiados.

Finalmente um agradecimento especial a todos os gatos, por existirem. Minha vida é melhor por causa deles. Aos que dividem a vida comigo nesse momento, Sophie e Feijão e que me ajudaram a manter o equilíbrio emocional durante esse período tão triste que a humanidade está atravessando.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Objetivos	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
CAPÍTULO 2: A utilização dos microRNAs no diagnóstico de doença renal crônica em gatos	
	17
1. RESUMO	18
2. ABSTRACT	19
3. INTRODUÇÃO	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6. CONCLUSÕES	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	52
CAPÍTULO 3: Conclusões / Considerações Finais	55

RESUMO

A UTILIZAÇÃO DOS **microRNAs** NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM GATOS

Christine Souza Martins, Giane Regina Paludo
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB)

Com a crescente popularização dos gatos como animais de companhia, cresce também a necessidade de implementação de medicina preventiva, em especial aos animais idosos. A doença renal crônica é uma das afecções mais comuns afetando gatos de meia idade a idosos. Os biomarcadores hoje utilizados na rotina clínica não satisfazem totalmente as condições de precocidade e especificidade adequados para permitir a intervenção terapêutica nos mecanismos iniciais que ao perpetuarem os danos ao tecido renal causam declínio gradual de funções e eventual falência renal. Os microRNAs (miRNA) são RNAs regulatórios curtos e não codificantes produzidos de maneira endógena que podem reprimir a expressão de genes por mecanismos pós-transcricionais. Sabe-se que eles podem influenciar condições fisiológicas e patológicas em diversos sistemas biológicos e tecidos específicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade da utilização dos miRNAs miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p e miR-16-5p no diagnóstico da doença renal crônica em gatos, através do desenvolvimento e padronização de protocolos de RT-qPCR para amostras de soro e plasma de gatos. Foram avaliadas as médias das expressões relativas dos cinco miRNAs alvos e feita a comparação entre dois grupos de gatos adultos domiciliados, um grupo Controle (10 gatos hígidos) e outro com diagnóstico de DRC (15 gatos). O miR-39-3p foi usado como controle exógeno. Os resultados obtidos mostraram que o miR-15b-5p apresentou menor expressão no soro e no plasma do grupo DRC, o miR-192-5p se mostrou menos expresso no soro do grupo DRC e o miR-365-3p se mostrou menos abundante no plasma do grupo DRC. Especialmente o miR-15b-5p e o miR-192-5p podem estar envolvidos em processos patológicos ocorrendo no rim, como homeostase de fósforo, hipertensão, danos imunomediados e particularmente indução de fibrose. O presente estudo demonstrou que diferenças de expressão de determinados miRNAs podem sim diferenciar gatos saudáveis de gatos com DRC e representa novas perspectivas de pesquisa de biomarcadores em gatos domésticos.

Palavras-chave: miRNA, doença renal crônica, gatos, diagnóstico molecular, biomarcador

ABSTRACT

microRNAs AS BIOMARKERS FOR FELINE CHRONIC KIDNEY DISEASE

Christine Souza Martins, Giane Regina Paludo
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB)

As the cat becomes more popular as pets, the need for better practices of preventive veterinary medicine also grows rapidly, especially for elderly animals. Chronic kidney disease (CKD) is one of the most common conditions affecting middle-aged to elderly cats. The biomarkers currently available in clinical practice do not fully satisfy the conditions of adequate precocity and specificity to allow prompt therapeutic intervention on first mechanisms that, by perpetuating damage to the renal tissue, cause a gradual decline in function and eventual renal failure. MicroRNAs (miRNA) are short, non-coding, endogenously produced regulatory RNAs that can repress gene expression through post-transcription mechanisms. It is well known that they can influence physiological and pathological conditions in various biological systems and specific tissues. The aim of the present work was to evaluate the possibility of using selected microRNAs: miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p and miR-16-5p in the diagnosis of chronic kidney disease in cats, through the development and standardization of RT-qPCR protocols for serum and plasma samples. The values of relative expressions of the five target microRNAs were evaluated and a comparison between two groups of adult pet cats was made, one Control group (10 healthy cats) and another group diagnosed with CKD (15 cats). miR-39-3p was used as an exogenous control. The results showed that miR-15b-5p was downregulated in serum and plasma of the CKD group, miR-192-5p was downregulated in the serum of the CKD group and miR-365-3p was less abundant in the plasma of the CKD group. Two of these targets, miR-15b-5p and miR-192-5p may be specially involved in pathological processes in the kidney, such as phosphorus homeostasis, hypertension, immune-mediated damage and, particularly induction of fibrosis. The present study has shown that differences in the expression of certain microRNAs can indeed differentiate healthy cats from cats with CKD and stands for new research frontiers on biomarkers in domestic cats.

KEY WORDS: miRNA, chronic kidney disease, cats, molecular diagnosis, biomarker

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	Página
Capítulo 2	
2.1- Gráfico representando a distribuição comparativa das expressões relativas ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos miRNAs no plasma dos dois grupos	30
2.2 – Gráfico representando a distribuição comparativa das expressões relativas ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos miRNAs no soro dos dois grupos	31
2.3 - Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-15b-5p no plasma	36
2.4 - Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-15b-5p no soro	36
2.5 - Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p no plasma	37
2.6 - Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-192-5p no soro.....	37
2.7 - Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p	38
2.8 - Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-365-3p no plasma	39
2.9 - Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p	39

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA

	Página
Capítulo 2	
2.1- Descrição dos miRNAs selecionados, com nome, gene de origem e sequência de nucleotídeos	26
2.2 - Resumo dos resultados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos miRNAs estudados no grupo Controle e o grupo DRC	30

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

- ADMA: Dimetilarginina Assimétrica
- ASC: Área sob a curva
- cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar
- Cq: Ciclo de quantificação
- Ct: Ciclo limiar (*threshold cycle*)
- DNA: Ácido desoxirribonucleico
- DRC: Doença Renal Crônica
- EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
- LTI: lesões tubulointersticiais
- miRNA: microRNA
- mRNA: RNA mensageiro
- NTC: no-template control
- P-bodies: corpos de processamento
- PCR: Reação em cadeia da polimerase
- ROC: *Receiver Operating Characteristic*
- RPC: razão proteína-creatinina urinária
- RT-qPCR: Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase Quantitativa
- SDMA: Dimetilarginina Simétrica
- TFG: taxa de filtração glomerular
- TGF- β 1: *Transforming Growth Factor Beta* (Fator do Crescimento Transformante Beta 1)

1. INTRODUÇÃO

A população de gatos mantidos como animais de estimação vem aumentando bastante nos últimos anos no Brasil, acompanhando a mesma tendência já percebida dos países desenvolvidos. De acordo com dados da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2019 divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística os gatos eram parte de 19,3% dos lares brasileiros. Segundo esses dados 14,1 milhões de residências contam com pelo menos um gato (IBGE, 2020). Observa-se não somente aumento no número absoluto de animais, mas também uma alteração na relação dos tutores com esses animais. No passado os gatos eram animais que viviam no fundo do quintal e que pouco frequentavam as clínicas veterinárias, pois largados a sua própria sorte sobreviviam por poucos anos vítimas de traumas ou doenças infecciosas.

Com o crescimento da população urbana e com o processo de verticalização das cidades, os gatos passaram a ser a melhor opção para quem não abre mão de ter um animal de companhia, mas não tem o tempo ou espaço suficiente para abrigar um cão. Exigindo menos tempo dos tutores e o fato de serem limpos e silenciosos fez com que se tornassem a melhor opção (STRAEDE; GATES, 1993; FERDMAN; INGRAHAM, 2014) .

A relação dos tutores com seus gatos foi se tornando cada vez mais próxima intensificando os cuidados com o manejo, nutrição e saúde. Essa nítida melhoria nos cuidados com a saúde tem como reflexo o aumento da longevidade e conseqüentemente o aumento da incidência das doenças crônicas que acompanham o processo de envelhecimento (RAY et al., 2021).

Dentre as inúmeras doenças crônicas e degenerativas que acompanham o processo de envelhecimento dos gatos, observa-se com mais frequência o câncer, as endocrinopatias (como o diabetes melito e o hipertireoidismo), as doenças gastrintestinais inflamatórias (incluindo hepáticas e pancreáticas) e a doença renal crônica (DRC). Com o avanço dos conhecimentos médicos veterinários e dos meios de diagnóstico, até condições antes obscuras, agora são reconhecidas como entidades comuns em gatos idosos, como a osteoartrite e a disfunção cognitiva (PAEPE et al., 2013).

O gato, como paciente, pode passar muito tempo (até anos) com disfunções orgânicas não detectadas e somente apresentados para tratamento quando essas disfunções já estão muito avançadas, restando poucas opções ao médico veterinário para controle ou manejo dessas condições (FORTNEY, 2012). Esse atraso no diagnóstico pode ser causa de frustração e descontentamento tanto para o profissional médico veterinário quanto para o tutor do animal.

A adoção da medicina geriátrica preventiva é essencial na detecção precoce de disfunções orgânicas, propiciando a intervenção imediata e direcionada, garantindo além de maior longevidade, um bem ainda mais precioso, que é a melhor qualidade de vida possível para o paciente e, por conseguinte também para o tutor. Essa abordagem também é considerada menos dispendiosa e mais bem sucedida do que o manejo da crise (RAY et al., 2021).

A medicina geriátrica preventiva muito se beneficia da introdução de novas avaliações laboratoriais que detectem e possam prever com meses, e até anos, de antecedência o aparecimento de disfunções orgânicas específicas ou neoplasias. A DRC afeta entre 30% a 40% dos gatos com mais de 10 anos de idade, sendo considerada inclusive a maior causa de morte em vários estudos retrospectivos de algumas populações de gatos em vários países (SPARKES et al., 2016). Um único biomarcador capaz de avaliar com precisão a função renal ainda não foi determinado. Na prática clínica então essa avaliação é baseada na combinação de alguns achados laboratoriais como presença de azotemia e alterações na densidade urinária (SPARKES *et al.*, 2016).

Considerando que o rim é um órgão que não se regenera e o diagnóstico preciso da patologia renal necessita de um procedimento invasivo para obtenção de uma biópsia, a identificação de biomarcadores em fluidos corporais em muito auxiliaria na identificação precisa dos processos patológicos presentes, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas não invasivas (ICHII; HORINO, 2017).

Os miRNAs são RNAs pequenos não codificantes, com aproximadamente 20 a 25 nucleotídeos, que agem como reguladores da expressão gênica pós-transcricional. Eles desempenham papéis fundamentais em muitos processos e vias biológicas, tais como a apoptose, proliferação e ciclo celular. Sua desregulação está associada com uma grande variedade de doenças, incluindo doenças cardíacas, neurológicas, câncer e doenças renais (LAGANÀ et al., 2017). O atual desenvolvimento de técnicas moleculares abre perspectivas de utilização dos miRNAs como opção de novos biomarcadores, visto que estes já tem se

mostrado excelente ferramenta de detecção e acompanhamento de várias doenças em seres humanos e animais (ICHII; HORINO, 2017).

1.1. Objetivos

1.1.1. Geral

Avaliar a possibilidade da utilização de miRNAs no diagnóstico da doença renal crônica em gatos.

1.1.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um protocolo de extração para plasma e soro de amostras de sangue de gatos domésticos, a fim de permitir a purificação, recuperação e preservação adequadas das moléculas de miRNAs. Desta forma, produzir amostras ideais que permitam uma quantificação mínima para a realização dos ensaios;
- Desenvolver e padronizar os protocolos de RT-qPCR, nas amostras selecionadas, para detecção e quantificação dos miRNAs alvos: miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p e miR-16-5p.
- Quantificar a expressão dos miRNAs: miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p e miR-16-5p no soro e plasma de gatos saudáveis (controle) e comparar essa expressão em gatos com doença renal crônica.
- Sugerir um perfil de miRNAs específicos capaz de diagnosticar gatos com doença renal crônica de maneira mais precoce e sensível.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O processo de envelhecimento

O processo de envelhecimento é um somatório dos efeitos deletérios do tempo na função celular, microanatomia e fisiologia de cada sistema corporal (Fortney, 2012). Envelhecer não representa uma doença específica, mas sim um processo complexo com envolvimento de fatores genéticos, biológicos, nutricionais e ambientais contribuindo para essa regressão progressiva chamada envelhecer (FORTNEY, 2012).

Muitos gatos domésticos estão vivenciando um nítido aumento na expectativa de vida devido à disponibilidade de melhores cuidados veterinários, melhor nutrição e tutores mais bem informados e engajados (RAY *et al.*, 2021). Não há uma idade específica na qual o gato se torna idoso, o processo de envelhecimento pode variar entre indivíduos ou até entre os sistemas orgânicos de um mesmo indivíduo (PITTARI *et al.*, 2009). Porém, com o objetivo de facilitar os cuidados preventivos nas diferentes faixas etárias dos gatos, foram estabelecidos quatro estágios de vida: filhotes (com menos de um ano), adultos jovens (que estão entre um e seis anos), adultos maduros (entre sete a dez anos) e idosos ou geriátricos (acima de 10 anos de idade)(QUIMBY *et al.*, 2021).

Usar a idade do paciente como ponto de referência para estimar seu estado de declínio orgânico pode ser apropriado. Entretanto, considerando que cada órgão apresenta uma taxa diferente de envelhecimento biológico, qualquer avaliação criteriosa do estado de saúde do paciente deveria ser baseada numa triagem funcional de cada sistema orgânico, se possível (FORTNEY, 2012).

Há um determinado ponto crítico nesse declínio progressivo, onde um determinado órgão atinge seu “ponto de inflexão” fisiológico. A partir desse ponto todas as reservas fisiológicas foram exauridas, resultando em alterações evidentes nos testes diagnósticos, nos parâmetros bioquímicos e/ou aparecimento de sinais clínicos (FORTNEY, 2012).

Esses pontos mensuráveis são referidos como “valores de referência” do envelhecimento daquele órgão. Em geral, esses valores de referência lentamente progressivos

são sutis, não detectados ou mal interpretados pelo tutor até que o paciente seja submetido a estresse por outras doenças não relacionadas, hospedagem, internação, medicações ou anestesia geral. Cada vez mais, essas alterações sutis nesses valores de referência podem ser detectadas nas avaliações dos perfis geriátricos, enfatizando ainda mais a importância do estabelecimento de exames de rotina, mesmo em pacientes saudáveis (FORTNEY, 2012).

2.2. Doença renal crônica nos gatos

As alterações biológicas inevitáveis associadas com o envelhecimento resultam na redução progressiva da capacidade de manejar fatores de estresse fisiológicos, imunológicos e ambientais. Portanto, concomitante com o processo normal de envelhecimento, a incidência de determinadas doenças aumenta gradativamente (PITTARI *et al.*, 2009).

A doença renal crônica (DRC) é uma doença comum na rotina da medicina dos gatos domésticos. Estudos de prevalência apresentam resultados diferentes entre populações de diversos países, podendo representar 4% dos atendimentos primários em clínicas não especializadas (O'NEILL *et al.*, 2014) até 50% dos atendimentos em clínicas especializadas (MARINO *et al.*, 2014). Já foi demonstrada como a causa mais comum de morte natural em gatos de várias idades em alguns estudos (EGENVALL *et al.*, 2009; O'NEILL *et al.*, 2015) ou mais frequente causa de eutanásia em outros (HUANG *et al.*, 2017). A DRC é sem dúvida mais comum nos gatos idosos, podendo afetar de 30% a 40% dos gatos com mais de 10 anos (SPARKES *et al.*, 2016).

A DRC não é reversível e, uma vez detectada, raramente se resolve. Embora desordens congênitas causem ligeiro aumento da incidência em gatos com menos de três anos de idade, a prevalência da DRC aumenta com a idade, a partir de cinco a seis anos em diante (BROWN *et al.*, 2016). Visto ser a DRC tão frequente em gatos idosos, o seu monitoramento precoce é considerado prática recomendada no acompanhamento periódico de gatos acima de 10 anos de idade (RAY *et al.*, 2021).

O termo doença renal crônica refere-se a qualquer condição mórbida na qual houve perda de tecido renal funcional devido a um processo prolongado (geralmente maior que dois meses de duração) e geralmente progressivo. A DRC frequentemente também causa alterações dramáticas na estrutura renal, embora a correlação entre alterações estruturais e funcionais seja bastante imprecisa. Isso ocorre parcialmente por causa da extraordinária reserva funcional renal possibilitando que os gatos possam sobreviver por longos períodos

(meses a anos) com somente uma pequena fração do tecido renal original, talvez menos de 10%. Sabe-se que a DRC pode já estar presente por meses ou anos até se tornar clinicamente aparente (BROWN, 2016).

DRC é um termo não específico e não indica a causa da lesão renal ou do seu comprometimento funcional. As causas são heterogêneas e, na maioria das vezes, permanecem indeterminadas. Elas podem ser divididas em congênicas e adquiridas (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013).

A doença mais comum de origem genética nos gatos é a doença renal policística autossômica dominante, que já chegou a afetar mais de 38% dos gatos da raça Persa e seus cruzamentos, sendo esperado que atualmente tenha havido diminuição dessa prevalência associada a práticas de cruzamentos controlados. Outras doenças renais congênicas são a amiloidose renal nos Abissínios, Siameses e Orientais, doença glomerular nos Abissínios e displasia renal juvenil (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013).

Inúmeras desordens adquiridas são associadas com a DRC em gatos, entre elas: presença de urólitos no trato urinário superior, linfoma renal, hipertireoidismo, infecções virais, fármacos e toxinas nefrotóxicas. Entretanto, na grande maioria dos casos, os fatores que iniciaram a lesão renal não podem ser determinados, mas os processos associados às lesões progressivas podem ser semelhantes a outras espécies (REYNOLDS; LEFEBVRE, 2013).

Nos seres humanos e nos cães, diversas glomerulopatias primárias ou secundárias são responsáveis pela maioria dos casos de DRC (BROWN et al., 2016). Grande parte dessas alterações são sinalizadas pela presença de proteinúria. Embora doenças glomerulares primárias, como glomerulonefrite por imunocomplexos e amiloidose, são relatadas no gato e podem resultar em lesões tubulointersticiais crônicas, a maioria dos gatos idosos com DRC não apresenta evidências histológicas de doença glomerular primária (CHAKRABARTI et al., 2013; MCLELAND et al., 2015). Na maior parte desses gatos com DRC as lesões primárias estão localizadas no compartimento tubulointersticial com somente lesões escleróticas brandas, provavelmente secundárias, na região glomerular (CHAKRABARTI et al., 2013). Nesses gatos, embora a proteinúria seja um importante marcador de progressão e mortalidade, sua presença e relação com doenças glomerulares é considerada incomum (SYME, 2009; CHAKRABARTI et al., 2013).

Os danos renais crônicos e persistentes induzem inflamação irreversível com infiltração de células inflamatórias, que por sua vez servem de estímulo para a fibrogênese, pela produção de citocinas pró fibróticas como, por exemplo, o TFG- β 1 (REYNOLDS;

LEFEBVRE, 2013). Lesões tubulointersticiais (LTI) desempenham um papel crítico na progressão final da DRC até seus estágios terminais. A prevalência de lesões tubulointersticiais é independente das injúrias primárias (YABUKI et al., 2010). Alterações patológicas envolvidas na LTI incluem infiltração mononuclear, lesão tubular e fibrose intersticial. Os complexos mecanismos associados à LTI envolvem a indução e proliferação de miofibroblastos, responsáveis pela produção da matriz extracelular que, quando em excesso, leva à esclerose renal (YABUKI et al., 2010). A gravidade da DRC em cães é mediada tanto por glomerulosclerose quanto por LTI, enquanto no gato há o predomínio da LTI, particularmente por fibrose intersticial. Estudos imunohistoquímicos demonstraram também que os precursores dos miofibroblastos são diferentes entre as duas espécies. (YABUKI et al., 2010).

Considera-se, no entanto, improvável que as alterações tubulointersticiais observadas em gatos com DRC, representem simplesmente a fase final comum do processo de lesão renal, visto que as mesmas lesões também são observadas em gatos em estádios iniciais da doença, porém em menor extensão (CHAKRABARTI et al., 2013; BROWN et al., 2016). A presença dessas lesões similares tanto em estádios iniciais quanto nos avançados é compatível com a suposição de que mais de um fator ou injúria seja responsável pelo início da DRC em gatos (BROWN et al., 2016).

Independente do fator inicial, a perda progressiva dos néfrons, tanto em número quanto em função, frequentemente culmina em falência renal. As manifestações clínicas associadas à falência renal resultam da perda irreversível das funções renais, levando ao desenvolvimento de uremia potencialmente fatal. Portanto, torna-se imperativo o diagnóstico da doença renal e, se possível, sua etiologia num estágio precoce de modo que intervenções terapêuticas possam ocorrer bem antes do estágio terminal irreversível (KHAN; KHAN, 2015).

2.3. Diagnóstico Precoce de DRC

Avaliação periódica da saúde dos gatos idosos é importante para a detecção precoce de condições crônicas, entre elas a DRC. As taxas de sobrevivência para gatos com DRC estão bastante associadas com o grau de azotemia e proteinúria e gatos diagnosticados mais precocemente no curso da doença vivem mais do que aqueles já diagnosticados com azotemia grave e com sinais clínicos (PAEPE; DAMINET, 2013).

Um biomarcador único e preciso para avaliar a função renal não existe nem na medicina tampouco na medicina veterinária (SARGENT; ELLIOTT; JEPSON, 2021). A mensuração da taxa de filtração glomerular (TFG) ainda é considerada o padrão ouro para avaliação da massa renal funcional (BRAFF et al., 2014).

A taxa de filtração glomerular (TFG) é definida como a quantidade de ultrafiltrado glomerular formado nos néfrons de ambos os rins numa dada unidade de tempo. O ultrafiltrado que entra no espaço de Bowman não pode ser mensurado diretamente, portanto o que é mensurada é a taxa de remoção (*clearance*) de um marcador de filtração (FINCH, 2014).

Quando ocorre redução da massa renal funcional, há um aumento da TFG em cada néfron individualmente como resposta adaptativa para a manutenção da TFG global. Essa resposta compensatória é benéfica em curto prazo. Entretanto, em longo prazo, a hiperfiltração glomerular e a hipertensão glomerular vai acarretar uma glomeruloesclerose e perda progressiva de néfrons (FINCH, 2014).

Isso significa que perdas significativas de massa renal funcional ocorre sem que haja declínio inicial da TFG global. As alterações compensatórias iniciais só são detectáveis como hipertrofia em exames histopatológicos de tecidos renais (BROWN; BROWN, 1995). Portanto, a detecção precoce da diminuição da TFG com implementação de manejo adequado da DRC poderia auxiliar na desaceleração da progressão da doença e preservação da massa renal funcional. Entretanto, encontrar evidências de hipertrofia renal, sugerindo a ocorrência de hiperfiltração, é inviável no contexto clínico, pois necessitaria de uma biópsia (FINCH, 2014). Sabe-se também que pode haver variações individuais e diárias da TFG de acordo com fatores ambientais, como estresse, ingestão de água e alimento; e os rins, com sua formidável capacidade homeostática de manutenção da volemia, são capazes de adaptar a TFG de acordo com variações de ingestão ou perda hídrica (KAMPA et al., 2003).

As principais técnicas para avaliação direta da TFG são: injeção de iohexol, ou utilização da taxa de excreção da creatinina (exógena ou endógena) ou inulina (CRIVELLENTI; GIOVANINNI, 2021). A necessidade de injeção intravenosa de bolus de contraste e a obrigação de colheitas de sangue seriadas em tempos pré-determinados tornam esse tipo de avaliação dispendiosa e inconveniente (BRAFF et al., 2014).

Devido à complexidade inerente a realização dos testes de avaliação direta da TFG, testes de avaliação indireta são os mais usados na prática da clínica veterinária, como a mensuração da creatinina e SDMA (CRIVELLENTI; GIOVANINNI, 2021).

A creatinina é uma molécula pequena (113 daltons), não tóxica, filtrada livremente e passivamente pelos glomérulos. Ela é formada a uma taxa constante (diretamente relacionada à massa muscular) a partir do fosfato de creatina na musculatura esquelética (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1992). Como a creatinina é constantemente produzida, e sua excreção ocorre apenas por via renal, a mensuração da sua concentração no soro reflete a capacidade renal de depuração renal, representada pela TFG. A creatinina pode ser mensurada em amostras de soro, plasma e urina (CRIVELLENTI; GIOVANINNI, 2021).

A concentração plasmática da creatinina correlaciona-se inversamente com a TFG, mas vários fatores afetam sua sensibilidade como marcador de função renal (FINCH, 2014). Suas concentrações variam com a massa muscular do indivíduo. Outra fonte de variação pode ser a amostra coletada (soro ou plasma) e o método de análise (FINCH, 2014). Estudos experimentais em cães demonstraram que os valores de creatinina se alteram somente após a perda de 75% da massa de néfrons, o que corresponde a cerca de 50% de perda de função renal global (HOKAMP; NABITY, 2016).

A sensibilidade da creatinina na detecção precoce de doença renal em animais pode ser aumentada pela avaliação seriada de mensurações realizadas em jejum num animal individualmente e a detecção de “tendências” de alta nos valores obtidos, mesmo que ainda dentro dos limites de referência (HOKAMP; NABITY, 2016). Mas mesmo esse monitoramento individual deve levar em consideração o processo de envelhecimento, onde o gato vai apresentar sarcopenia, além logicamente de possíveis alterações de volemia ou outras desordens do trato urinário (como obstruções e rupturas) (HOKAMP; NABITY, 2016).

A densidade urinária também é usada na rotina clínica na avaliação indireta da TFG, mas ela é considerada um marcador pouco sensível, especialmente em gatos (FINCH, 2014). É interessante o fato de que o rim felino contém aproximadamente de 40% a 50% do número de néfrons (200.000) que um rim canino (400.000 a 500.000). Mas todos os néfrons no rim do gato apresentam longas alças de Henle que adentram a medula mais interna. Essa característica anatômica pode ser responsável pela excelente capacidade de concentração renal do gato (NISSSEN, 1966). Gatos submetidos a ablação renal mantiveram considerável capacidade de concentrar a urina, sendo essa capacidade considerada bem maior do que em humanos e cães (ROSS; FINCO, 1981).

De maneira geral, um bom biomarcador deve ser acessível por métodos não invasivos, pouco dispendioso para quantificar, específico para a doença de interesse, extrapolável a partir de modelos experimentais para a espécie do paciente em estudo e um indicador precoce confiável de doença antes do aparecimento de sinais clínicos (WEBER et

al., 2010). Do ponto de vista médico, um biomarcador ideal para a DRC deveria se correlacionar fortemente com a TFG, ser mais sensível e específico que a creatinina e não ser afetado por comorbidades, idade, sexo ou raça. Se esse biomarcador fosse correlacionado com um processo patológico específico (fibrose ou lesão tubular renal ou metabolismo de fósforo, por exemplo), isto acrescentaria ainda informações a respeito da fisiopatogenia da doença e sua progressão. Além disso, um biomarcador ideal deveria ser claramente afetado pelo tratamento (QUIMBY, 2015).

A identificação de novos biomarcadores para a doença renal em gatos seria bastante interessante, pois poderia fornecer novas e melhores ferramentas para o diagnóstico e monitoramento dos gatos afetados. Embora não exista ainda uma recomendação específica no que diz respeito ao tratamento a fim de evitar a progressão da doença, sabe-se que o diagnóstico precoce está associado a maior sobrevida (QUIMBY, 2015). Além disso, a disponibilidade de novos biomarcadores permitiria avaliações mais precisas de potenciais tratamentos ainda sob investigação, assim como a avaliação mais objetiva das respostas aos tratamentos já implementados na rotina clínica (QUIMBY, 2015).

Alguns biomarcadores precoces de DRC foram investigados em gatos, baseados em estudos prévios em seres humanos. A concentração de cistatina C é considerada um marcador útil da TFG em seres humanos, mas não se mostrou útil para gatos (GHYS et al., 2015). A detecção de microalbuminúria, que é importante para o diagnóstico de DRC em seres humanos, não se mostrou ser clinicamente relevante em gatos (JEPSON et al., 2009). A detecção de aumentos das concentrações do fator-23 de crescimento de fibroblastos (FGF-23) pode preceder a azotemia em gatos com DRC, mas sua utilidade clínica ainda não foi determinada (FINCH et al., 2013).

Os derivados metilados da arginina, a dimetilarginina simétrica (SDMA) e a dimetilarginina assimétrica (ADMA) se originam da metilação intranuclear dos resíduos de L-arginina pela proteína-arginina metiltransferase e são liberadas na circulação após a proteólise. Enquanto a ADMA é metabolizada enzimaticamente pela dimetilarginina dimetilaminohidrolase, a SDMA é, na sua maioria, eliminada por excreção renal sugerindo ser a SDMA uma candidata ideal para ser usada como marcador da TFG (BRAFF et al., 2014).

O aumento das concentrações de SDMA foi relacionado com DRC em seres humanos a partir de 1992, porém se tornou relevante como marcador endógeno da TFG em pessoas somente no início dos anos 2000 (HOKAMP; NABITY, 2016). Mas ainda não é utilizado na rotina médica devido a dificuldades metodológicas de sua mensuração laboratorial (OBERT et al., 2021). Graças ao desenvolvimento de técnicas mais acessíveis por

laboratórios de referência veterinários, a mensuração da SDMA se tornou então disponível para a medicina veterinária como um marcador substituto e indireto para a TFG e, assim como a creatinina, reflete uma relação inversa com a TFG e não parece ser afetada pelas variações na massa muscular (HALL et al., 2014).

Estudos independentes, porém, demonstram que as concentrações de SDMA não oferecem vantagens adicionais em relação às concentrações de creatinina em diferenciar gatos saudáveis de gatos já azotêmicos em fases iniciais de DRC. O valor diagnóstico da mensuração de ambos se torna equivalente nas fases mais avançadas de disfunção renal (BRANS et al., 2021). Não existem muitos estudos também sobre fatores não renais que alteram os valores do SDMA e sua utilidade no monitoramento da DRC (SARGENT; ELLIOTT; JEPSON, 2021).

Outro achado em gatos com DRC é a proteinúria, embora seja considerada pouco frequente nessa espécie e sua presença já estaria associada com graves lesões histopatológicas como severa degeneração tubular, inflamação, necrose tubular e anormalidades de parênquima renal (MCLELAND et al., 2015). Fato esse que não a capacita como marcador precoce de disfunção. Mesmo em gatos que apresentam proteinúria, esta seria de origem tubular e não glomerular, como consequência da exposição das células tubulares a proteínas filtradas e consequente ativação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas (MCLELAND et al., 2015).

A DRC não é uma doença isolada, mas sim o resultado comum de diversos processos patológicos que podem ocorrer simultaneamente, sendo improvável que um único biomarcador seja capaz de pontuar todos esses processos. O ideal seria um painel de biomarcadores com características complementares (OBERT et al., 2021).

2.4. Os MicroRNAs

MicroRNAs (miRNAs) são RNAs regulatórios curtos e não codificantes produzidos de maneira endógena que podem reprimir a expressão de genes por mecanismos pós-transcricionais. Eles podem então influenciar condições normais e patológicas em diversos sistemas biológicos (BHATT; KATO; NATARAJAN, 2016).

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 no nematódeo *Caenorhabditis elegans*, onde estudos descreveram e detectaram um gene denominado lin-4 que não estava associado a codificação de nenhuma proteína (HAMMOND, 2006). Entretanto, naquele momento a existência desses RNAs foi considerada uma exceção e evento raro e que estariam

presentes apenas nos nematódeos. Somente em 2001, três estudos independentes relataram a existência de várias centenas desses RNAs pequenos e não codificantes, não somente em nematódeos, mas também em células de ratos e humanos (OCHS; STEINHILBER; SUESS, 2011). Desde a descoberta desses membros fundadores dessa classe, centenas de miRNAs foram descritos em plantas e animais, sendo criado até um registro para catalogar os miRNAs e facilitar a designação de nomes para os genes recém-descobertos (GRIFFITHS-JONES, 2004).

Podemos considerar bastante intrigante o fato dos miRNAs passarem tanto tempo despercebidos, e não foi porque eles são raros. Os miRNAs e suas proteínas associadas parecem ser os complexos ribonucleoproteicos mais abundantes na célula. Não obstante, os miRNAs cuja expressão esteja restrita a tipos celulares não abundantes ou a condições ambientais específicas poderiam ainda não ter sido detectados nos procedimentos de clonagem. Portanto, foram desenvolvidas abordagens utilizando ferramentas computacionais para complementar as abordagens experimentais na identificação dos genes dos miRNAs (BARTEL, 2007).

Avanços nos estudos da expressão diferencial dos miRNAs demonstraram que são expressos de maneira bastante específica dos tecidos durante o desenvolvimento. Isso indica que os miRNAs provavelmente estejam envolvidos na especificação e manutenção da identidade tecidual (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006).

Nos animais, os miRNAs se ligam com complementariedade imperfeita à região 3' não traduzida de seus alvos, para inibir a expressão de determinados genes por vários possíveis mecanismos, que incluem degradação do mRNA, inibição dos passos de inicialização ou alongamento da tradução, e localização nos "P-bodies" citoplasmáticos. Por causa dessa imperfeita complementariedade na ligação dos miRNAs, eles são capazes de afetar muitos mRNAs, portanto a alteração na expressão de um miRNA pode influenciar na expressão de centenas de proteínas (CHIN; SLACK, 2008).

Ao serem observados o grau de conservação e os padrões de expressão, fica bastante claro que os miRNAs desempenham importantes papéis no desenvolvimento do organismo, e, na verdade animais carecendo de miRNAs não são capazes de se manterem vivos ou se reproduzir (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006).

Os miRNAs também desempenham funções cruciais em muitos processos fisiológicos tais como hematopoese, proliferação celular, diferenciação tecidual, manutenção do tipo celular, apoptose, transdução de sinais e desenvolvimento dos órgãos (KLOOSTERMAN; PLASTERK, 2006; OCHS; STEINHILBER; SUESS, 2011).

Os miRNAs possuem papel chave também como reguladores na comunicação celular. Eles são secretados ativamente para o microambiente extracelular ou em fluidos corporais e capturados por outras células, sendo capazes de alterar a programação de transcrição dessas células. Além disso, os miRNAs podem ser derivados de células em apoptose, com o provável objetivo de levar sinais de alerta dessas células apoptóticas para as outras células (LORENZEN; THUM, 2012).

Suas características de baixa complexidade, ausência de sabidas modificações pós-processamento, métodos de detecção e amplificação simples, perfis de expressão restritos a tecidos específicos, além de terem suas sequências conservadas entre diversas espécies animais faz dos miRNAs extracelulares candidatos ideais como biomarcadores não invasivos para refletir e estudar várias condições fisiopatológicas do organismo (WEBER et al., 2010; TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

Os miRNAs foram detectados no soro e plasma pela primeira vez em 2008 e subsequentemente em outros fluidos corporais, como urina, saliva, lágrimas e leite materno em anos seguintes. Sua concentração pode variar bastante dependendo do tipo de fluido (ETHERIDGE et al., 2013). Circulam nos diversos fluidos corporais empacotados em microvesículas e/ou exossomas ou transportados por proteínas ligantes de RNA (complexos Argonata 2) e lipoproteínas, o que os protege da degradação pelas ribonucleases (LORENZEN; THUM, 2012).

A evolução na utilização dos miRNAs no diagnóstico e prognóstico de doenças começou com o primeiro relato de que alterações na expressão de alguns miRNAs estavam associadas ao câncer de pulmão no ser humano (TAKAMIZAWA et al., 2004). Desde então vários miRNAs extracelulares foram detectados no soro, plasma, saliva e urina associados com diversas condições patológicas, inclusive câncer (WEBER et al., 2010).

Com a publicação da descrição do genoma do gato (*Felis catus*), foram relatados vários miRNAs nessa espécie, usando diferentes técnicas, inclusive ferramentas computacionais (SATHYAMURTHY; SWAMY, 2010).

Estudos demonstraram que é possível estabelecer o perfil de expressão de miRNAs em gatos usando um pequeno volume de sangue que pode ser obtido facilmente no contexto clínico (FLEISCHHACKER et al., 2013; SCALON et al., 2021). Considerando que as sequências da maioria dos miRNAs estão altamente conservadas entre espécies, os métodos usados na detecção de miRNAs humanos e de roedores também podem ser empregados nos animais domésticos (FLEISCHHACKER et al., 2013).

Um dos métodos mais comumente utilizados para determinar a expressão de miRNAs é a tecnologia do microarranjo (*microarray*). É uma ferramenta de alto rendimento que pode ser utilizada para detectar a expressão de milhares de miRNAs num mesmo experimento (CHODKOWSKA; SADKOWSKI; OSTASZEWSKI, 2017). Outro método disponível comercialmente usado para análise de expressão de miRNAs é a RT-qPCR, que chega a ser considerado como padrão ouro por causa de sensibilidade e especificidade (CHODKOWSKA; SADKOWSKI; OSTASZEWSKI, 2017).

A aplicação clínica dos miRNAs como biomarcadores porém, provavelmente seja afetada por uma gama de variáveis como fatores pré-analíticos, incluindo a coleta e processamento das amostras, assim como fatores que influenciam a eficiência da extração do RNA, além de questões técnicas inerentes a RT-PCR e na análise dos dados (KROH et al., 2010).

Diferentes padrões de expressão dos miRNAs, ou de um miRNA específico, já foram relatados como sendo úteis como biomarcadores para detecção precoce de doenças, classificação e até estabelecimento mais preciso de evolução e prognóstico (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2011).

Em seres humanos vários miRNAs são encontrados nos rins, onde foram considerados cruciais para o desenvolvimento renal e funções fisiológicas assim como serem também considerados fatores que contribuem para a patogenia de doenças renais como a nefropatia diabética, lesão renal aguda, doença renal policística, entre outras, devido a seus efeitos em genes chave envolvidos nesses processos. Portanto, os miRNAs surgiram como novos biomarcadores nessas desordens renais (BHATT; KATO; NATARAJAN, 2016).

Os miRNAs quando envolvidos na fisiologia renal, atuam em muitos processos, desde controle da pressão sanguínea até a manutenção do fluido corpóreo e a homeostase eletrolítica (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

Estudos feitos *in vitro* com amostras de tecido da medula e do córtex renal de cães e gatos levaram a determinação do perfil de miRNAs nessas espécies usando o genoma do camundongo como referência. Dentre os miRNAs mais expressos no córtex renal do gato está o miR-192, relacionado com progressão de fibrose renal. Na medula renal do gato, foi observada alta expressão dos miR-15-5p e miR-16-5p relacionados com proliferação celular e apoptose, além do miR-20a, que foi relacionado com lesão de reperfusão em camundongos (ICHII et al., 2014).

Esses mesmos estudos revelaram diferenças entre os perfis dos miRNAs entre cães e gatos, que podem refletir as diferenças na patogenia das lesões túbulo-intersticiais e

glomerulares entre essas duas espécies, anteriormente já estudadas (YABUKI et al., 2010; ICHII et al., 2011). Especula-se também que essas diferenças na expressão dos miRNAs podem estar correlacionadas com diferenças na progressão da DRC nessas duas espécies (ICHII et al., 2014).

Independente da etiologia original da doença, a progressão da DRC resulta em fibrose túbulo-intersticial e glomerular devido a excessiva deposição de matriz extracelular (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

Outras características da DRC em seres humanos são infiltração de células inflamatórias, atrofia das células tubulares, hipertrofia das células mesangiais e apoptose dos podócitos. Sabe-se que todos esses eventos são instigados principalmente pela citocina TGF- β 1 (Fator de transformação do crescimento β 1) (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015). A sinalização do TGF- β 1 sofre finos ajustes pelos miRNAs. O papel do TGF- β 1 na progressão da doença renal no gato já foi demonstrada, com concentrações aumentadas na urina de gatos com DRC em comparação a gatos saudáveis (ARATA et al., 2005; TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

Sendo os miRNAs altamente pleotrópicos e apresentando diferentes ações dependendo do tipo celular, dificilmente um único miRNA será capaz de diagnosticar e prever a evolução da DRC. O ideal seria considerar um conjunto de miRNAs correlacionados aos processos patológicos de interesse (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

Os miRNAs maduros apresentam características únicas que os tornam também potenciais agentes terapêuticos, incluindo sua curta sequência e sua homologia entre várias espécies de vertebrados. A manipulação da atividade de miRNAs específicos nos rins pode ser alcançada pela introdução *in vivo* de *mimics* para restaurar os níveis de miRNA ou inibidores para bloquear sua função. Muitos estudos em modelos animais experimentais tiveram como foco o potencial terapêutico dos miRNAs na DRC e vários resultados promissores foram obtidos nas tentativas de cessar a fibrose renal (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015). Entretanto, muitos obstáculos devem ser superados antes que terapias para DRC utilizando os miRNAs possam ser traduzidas em utilização clínica, incluindo métodos de administração e preocupações de segurança. De fato, os alvos dos miRNAs devem ser específicos do rim a fim de evitar potenciais efeitos adversos em outros tecidos e órgãos e deveria afetar apenas um alvo (ou alvos na mesma via) para evitar efeitos não intencionais em vias interconectadas (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

A importância do estudo dos miRNAs no campo da nefrologia tem ganhado reconhecimento e importância, à medida que proporcionam um conhecimento mais profundo

das vias fisiológicas e patológicas dos rins, abrindo caminho para novos biomarcadores ou oportunidades de interferência terapêutica (TRIONFINI; BENIGNI; REMUZZI, 2015).

CAPÍTULO 2

A UTILIZAÇÃO DOS MICRORNAS NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM GATOS

1. RESUMO

A UTILIZAÇÃO DOS **microRNAs** NO DIAGNÓSTICO DE DOENÇA RENAL CRÔNICA EM GATOS

Christine Souza Martins, Giane Regina Paludo
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB)

Com a crescente popularização dos gatos como animais de companhia, cresce também a necessidade de implementação de medicina preventiva, em especial aos animais idosos. A doença renal crônica é uma das afecções mais comuns afetando gatos de meia idade a idosos. Os biomarcadores hoje utilizados na rotina clínica não satisfazem totalmente as condições de precocidade e especificidade adequados para permitir a intervenção terapêutica nos mecanismos iniciais que ao perpetuarem os danos ao tecido renal causam declínio gradual de funções e eventual falência renal. Os microRNAs (miRNA) são RNAs regulatórios curtos e não codificantes produzidos de maneira endógena que podem reprimir a expressão de genes por mecanismos pós-transcricionais. Sabe-se que eles podem influenciar condições fisiológicas e patológicas em diversos sistemas biológicos e tecidos específicos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade da utilização dos miRNAs miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p e miR-16-5p no diagnóstico da doença renal crônica em gatos, através do desenvolvimento e padronização de protocolos de RT-qPCR para amostras de soro e plasma de gatos. Foram avaliadas as médias das expressões relativas dos cinco miRNAs alvos e feita a comparação entre dois grupos de gatos adultos domiciliados, um grupo Controle (10 gatos hígidos) e outro com diagnóstico de DRC (15 gatos). O miR-39-3p foi usado como controle exógeno. Os resultados obtidos mostraram que o miR-15b-5p apresentou menor expressão no soro e no plasma do grupo DRC, o miR-192-5p se mostrou menos expresso no soro do grupo DRC e o miR-365-3p se mostrou menos abundante no plasma do grupo DRC. Especialmente o miR-15b-5p e o miR-192-5p podem estar envolvidos em processos patológicos ocorrendo no rim, como homeostase de fósforo, hipertensão, danos imunomediados e particularmente indução de fibrose. O presente estudo demonstrou que diferenças de expressão de determinados miRNAs podem sim diferenciar gatos saudáveis de gatos com DRC e representa novas perspectivas de pesquisa de biomarcadores em gatos domésticos.

Palavras-chave: miRNA, doença renal crônica, gatos, diagnóstico molecular, biomarcador

2. ABSTRACT

microRNAs AS BIOMARKERS FOR FELINE CHRONIC KIDNEY DISEASE

Christine Souza Martins, Giane Regina Paludo
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB)

As the cat becomes more popular as pets, the need for better practices of preventive veterinary medicine also grows rapidly, especially for elderly animals. Chronic kidney disease (CKD) is one of the most common conditions affecting middle-aged to elderly cats. The biomarkers currently available in clinical practice do not fully satisfy the conditions of adequate precocity and specificity to allow prompt therapeutic intervention on first mechanisms that, by perpetuating damage to the renal tissue, cause a gradual decline in function and eventual renal failure. MicroRNAs (miRNA) are short, non-coding, endogenously produced regulatory RNAs that can repress gene expression through post-transcription mechanisms. It is well known that they can influence physiological and pathological conditions in various biological systems and specific tissues. The aim of the present work was to evaluate the possibility of using selected microRNAs: miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p and miR-16-5p in the diagnosis of chronic kidney disease in cats, through the development and standardization of RT-qPCR protocols for serum and plasma samples. The values of relative expressions of the five target microRNAs were evaluated and a comparison between two groups of adult pet cats was made, one Control group (10 healthy cats) and another group diagnosed with CKD (15 cats). miR-39-3p was used as an exogenous control. The results showed that miR-15b-5p was downregulated in serum and plasma of the CKD group, miR-192-5p was downregulated in the serum of the CKD group and miR-365-3p was less abundant in the plasma of the CKD group. Two of these targets, miR-15b-5p and miR-192-5p may be specially involved in pathological processes in the kidney, such as phosphorus homeostasis, hypertension, immune-mediated damage and, particularly induction of fibrosis. The present study has shown that differences in the expression of certain microRNAs can indeed differentiate healthy cats from cats with CKD and stands for new research frontiers on biomarkers in domestic cats.

KEY WORDS: miRNA, chronic kidney disease, cats, molecular diagnosis, biomarker

3. INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) afeta entre 30% a 40% dos gatos com mais de 10 anos de idade, sendo considerada a maior causa de morte em vários estudos retrospectivos de algumas populações de gatos em diferentes países (SPARKES et al., 2016).

Um único biomarcador capaz de avaliar com precisão a função renal ainda não estabelecido. Na prática clínica então essa avaliação é baseada na combinação de alguns achados laboratoriais como presença de azotemia e alterações na densidade urinária (SPARKES et al., 2016).

Considerando que o rim é um órgão que não se regenera e o diagnóstico preciso da patologia renal necessita de um procedimento invasivo para obtenção de uma biópsia, a identificação de biomarcadores em fluidos corporais em muito auxiliaria na identificação precisa dos processos patológicos presentes, contribuindo para o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas não invasivas (ICHII; HORINO, 2017).

O atual desenvolvimento de técnicas moleculares abre perspectivas de utilização de novos biomarcadores, os miRNAs, que já tem se mostrado excelente ferramenta de detecção e acompanhamento de várias doenças em seres humanos e animais (ICHII; HORINO, 2017).

Os miRNAs poderiam corresponder às expectativas de sensibilidade, especificidade e reprodutividade necessárias a um biomarcador não invasivo, desde que sejam estabelecidas estratégias de normalização que garanta a quantificação acurada e que controles apropriados sejam utilizados (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2011).

Diferentes padrões de expressão dos miRNAs, ou de um miRNA específico, já foram relatados com sendo úteis biomarcadores na detecção precoce de doenças, classificação e até estabelecimento mais preciso de evolução e prognóstico (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2011).

Como já foi demonstrado, a técnica de RT-qPCR, utilizando pequenos volumes de sangue, de 100µl de soro ou plasma, é capaz de detectar e quantificar os miRNAs circulantes na espécie felina (SCALON et al., 2021).

Como base em estudos relatando a presença e abundância de vários miRNAs nos rins dos gato (ICHII et al., 2014), foram escolhidos cinco miRNAs para serem pesquisados no sangue de gatos com DRC, objetivando o estabelecimento de um perfil limitado que pudesse diferenciar esses pacientes de animais sem a doença.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Grupos amostrais

Os gatos selecionados para participar do estudo foram divididos em dois grupos: um grupo de 10 animais categorizados como saudáveis (grupo Controle) e um grupo de 15 animais diagnosticados com doença renal crônica DRC (grupo DRC).

Foram incluídos no grupo Controle apenas gatos que não apresentassem nenhuma alteração clínica ao exame físico e os valores de creatinina sérica e SDMA estivessem dentro dos intervalos de referência de acordo com o estabelecido pela IRIS (“International Renal Interest Society”) (IRIS KIDNEY, 2019) além de nenhuma alteração na urinálise e que fossem negativos para o gene da doença renal policística, mediante teste de PCR específico.

Os gatos incluídos no grupo DRC foram classificados como doentes renais (15 animais) segundo os critérios da IRIS, isto é, que normohidratados apresentaram valores de creatinina estável acima de 1,6 mg/dl e valores de SDMA maiores que 14 µg/dl. Foram considerados apenas os gatos classificados a partir do estágio 2 de DRC (segundo os critérios da IRIS). Quatro dos 15 animais desse grupo apresentaram valores dentro do intervalo de referência SDMA, mas foram incluídos mesmo assim, pois além de apresentarem valores de creatinina acima dos valores de referência, histórico de azotemia persistente, também tinham densidades urinárias abaixo do normal, sem outras causas. Os animais nesse grupo também eram negativos para o gene da doença renal policística, mediante teste de PCR específico.

Os gatos do grupo Controle apresentavam uma idade média de 4,72 anos (variando de 1 a 16) enquanto os gatos incluídos no grupo DRC tinham uma idade média de 13,6 anos (variando de 8 a 19). O grupo Controle continha seis gatos machos e quatro fêmeas. O grupo DRC era composto por sete gatos machos e oito fêmeas.

Todos os gatos incluídos no estudo eram domiciliados. Suas amostras de sangue foram colhidas após assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido pelos seus tutores.

Os protocolos realizados com os animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília sob protocolo número 82/2018.

4.2. Amostras biológicas:

As amostras de sangue (média de 2 ml) foram colhidas mediante punção da veia cefálica, jugular ou safena medial com agulha 25x7 acoplada a seringa de 3 ml. Durante a colheita, as amostras de sangue eram separadas em duas frações: 0,5 ml era acondicionado em frasco com K₂ EDTA para separação do plasma e o restante num tubo seco para separação do soro.

As amostras de sangue colhidas sem anticoagulante foram deixadas em espera por cerca de cinco minutos, para formação do coágulo e então levadas para centrifugação para a separação do soro. O soro era cuidadosamente aspirado a fim de evitar contaminação de restos celulares. Uma alíquota desse soro foi reservada para realização das avaliações bioquímicas e outra para dosagem do SDMA.

Dentro de um tempo máximo de uma hora após a colheita, o sangue colhido em frasco com K₂ EDTA foi submetido a uma primeira centrifugação 1.300 x g por 10 minutos em uma centrífuga refrigerada a 4°C, para a remoção da maioria das plaquetas, tomando-se o cuidado para evitar o rompimento das células presentes na capa de leucócitos e das plaquetas. Em seguida, uma segunda centrifugação foi feita a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, para remover as plaquetas residuais, segundo protocolo sugerido por Van Vliet e colaboradores (VAN VLIET et al., 2017).

Segundo etapas prévias experimentais realizadas, foi determinado que as alíquotas de soro e plasma suficientes para passos posteriores de extração e quantificações moleculares, deveriam ser de 100 µl (SCALON et al., 2021). Então após a separação de soro e plasma, esses foram fracionados em alíquotas de 100 µl e congelados a -80°C.

Foram também colhidas amostras de urina por cistocentese com agulha, que eram mantidas na seringa de colheita e protegidas da luz por papel alumínio e refrigeradas, se necessário, até serem analisadas. As urinálises foram realizadas no mesmo dia da colheita.

4.3. Avaliações laboratoriais:

As amostras de sangue e urina foram analisadas pelo laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília (UnB).

Foram realizados hemogramas em todas as amostras e avaliações bioquímicas séricas selecionadas, a saber: ureia, creatinina, proteína plasmática total, albumina, fósforo e potássio. Os hemogramas foram realizados em um contador automático de células para uso veterinário (ABX Horiba Instruments Ltda, São Paulo). Os valores de volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. O volume globular (VG) foi determinado por microhematócrito com a utilização de capilares sem anticoagulante em microcentrífuga (CELM® mod.MH, Barueri, São Paulo). As proteínas plasmáticas totais (PPT) foram determinadas com refratômetro portátil (Modelo: SZJ-D). Os esfregaços de sangue total em lâmina foram corados com corante comercial tipo Romanowsky (Instant-Prov NewProv, Pinhais, PR) para a realização da contagem leucocitária diferencial e observações da morfologia celular sanguínea.

Na avaliação bioquímica do soro foram mensuradas as concentrações de ureia, creatinina, proteína total (PT), albumina, fósforo, potássio. Foram utilizados reagentes comerciais específicos para cada analito, seguindo as recomendações do fabricante, com leituras realizadas no analisador bioquímico automático (COBAS C111 Analyser, Roche® Instrument Center, Suíça) e semiautomático (Bio 2000, Bioplus, Barueri, São Paulo).

Amostras de soro de todos os gatos dos dois grupos também foram enviadas para o laboratório de referência IDEXX® em São Paulo para a mensuração da SDMA.

As amostras de urina colhidas foram submetidas a urinálises e utilizadas para a mensuração de creatinina urinária, proteína urinária e o cálculo da razão Proteína:Creatinina urinária (RPC). As mensurações da creatinina e proteína urinárias foram realizadas em analisador bioquímico automático (COBAS C111 Analyser, Roche® Instrument Center, Suíça). A avaliação química da urina foi realizada por meio de fita colorimétrica (Combur-test, Roche®, Indianápolis, IN). A sedimentoscopia foi realizada após centrifugação da amostra.

4.4. Análises moleculares:

4.4.1. Extração

As amostras de soro e plasma em alíquotas de 100 µl foram submetidas primeiramente aos protocolos de extração com o kit de purificação de miRNA miRNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com protocolo suplementar fornecido pelo fabricante e adaptado segundo estudos feitos em gatos (WEBER et al., 2015).

Com o objetivo de avaliar a eficiência da extração, um miRNA exógeno, nesse caso o cel-miR-39-3p (miRNeasy serum/plasma spiked-in control, Qiagen®), é adicionado às amostras numa concentração de $1,6 \times 10^8$ cópias/ µl antes da transcrição reversa e usado para normalização dos dados (SCHWARZENBACH et al., 2014).

Os volumes finais após as eluições em água *RNase-free* foram de 30-50 µl. Após esses procedimentos as amostras eram novamente congeladas a -80°C .

4.4.2. Quantificação das amostras

As próximas etapas foram realizadas no Laboratório de Tecnologias para Terapia Gênica da Universidade de Brasília.

Um volume de 2 µl dessas amostras purificadas foram submetidos ao protocolo de quantificação dos miRNAs pelo método fluorimétrico utilizando o aparelho Qubit® 2.0 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, EUA), com o uso dos kits Qubit® microRNA Assay, seguindo as recomendações do fabricante. Após obtidos os valores da quantificação, todas as amostras foram diluídas para a concentração final de 0,25 ng/µL antes dos passos seguintes.

4.4.3. RT-qPCR

A expressão dos miRNAs foi analisada utilizando-se a técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia de polimerase quantitativa (RT-qPCR).

Para a realização da técnica da RT-qPCR é necessário que os RNAs extraídos das amostras sejam convertidos em DNA complementar (cDNA) por meio da reação de transcrição reversa.

Essa etapa de síntese do cDNA foi realizada utilizando o kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher) juntamente com iniciadores específicos (primers) dos miRNAs alvos escolhidos e o nesse estudo (Tabela 2.1).

As escolhas dos alvos de estudo foram baseadas nos perfis de miRNAs já descritos em tecidos renais de gatos e suas correspondentes correlações com processos patológicos (como fibrose, apoptose, proliferação celular, doença renal policística) em várias espécies animais, sendo que o miR-192-5p mais abundante no córtex renal e os demais mais abundantes na medula renal (ICHII et al., 2014).

Tabela 2.1. Descrição dos miRNAs selecionados, com nome, gene de origem e sequência de nucleotídeos

miRNA	Sequência do miRNA maduro	Gene
miR-192-5p	5'-CUGACCUAUGAAUUGACAGCC-3'	MIPF0000063
miR-20a-5p	5'-UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG-3'	MIPF0000001
miR-365-3p	5'-UAAUGCCCCUAAAAUCCUUAU-3'	MIPF0000061
miR-16-5p	5'-UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG-3'	MIPF0000006
miR-15b-5p	5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA-3'	MIPF0000006
cel-miR-39-3p	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	MIPF0000304

Todos os oligonucleotídeos do miRNA maduro já vem em ensaios preparados com a sonda Taqman (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific TaqMan® MicroRNA Assays, Life Technologies Corporation, Pleasanton, CA, USA), os reagentes usados para as reações do RT são do mesmo conjunto TaqMan® reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, LT), com concentrações e volumes padrão para todas as reações, segundo as recomendações do fabricante.

A solução de mistura para essa etapa era composta por água livre de nucleases (4.16µL), 100mM de desoxinucleotídeos (0.15µL), enzima de transcriptase a 50U/µL (Multiscribe™ Reverse Transcriptase) (1.0µL), tampão RT 10X (1.5µL), inibidor de RNase a 20U/µL (0.19µL), 5µL da amostra de miRNA diluída na proporção de 0.25ng/µL e 3µL do oligonucleotídeo RT a 5X, compondo um volume final de 15µL de reação para cada amostra. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de 30 minutos a 16°C, seguido de 30 minutos a 42°C e uma etapa final de 5 minutos a 85°C. Todas as amplificações foram realizadas em um mesmo termociclador (MyCycler™ Thermal Cycler, Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Após a realização da reação da transcriptase reversa, as amostras foram submetidas à reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR). Para isso as soluções foram preparadas contendo os seguintes reagentes: 10 µL do Master Mix (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, TaqMan® Fast Advanced Master Mix, Life Technologies Corporation, Austin, TX, USA), 1 µL do oligonucleotídeo (TaqMan®) a 20X (*primer* de interesse), 7 µL de água livre de nucleases e 2 µL do cDNA da amostra produzido da etapa anterior de RT, totalizando um volume final de 20µL de reação para cada amostra.

O plaqueamento das amostras foi feito em triplicatas em uma placa de reação (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate 0,1mL, Applied Biosystems by Life Technologies), coberta por um filme de proteção (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). As placas seladas pelo filme de proteção foram centrifugadas (Mini Plate Spinner, Labnet) e posteriormente levadas para o equipamento termociclador qPCR QuantStudio 12K Flex (Applied Biosystems by Life Technologies) onde ocorrem os ciclos de amplificação e quantificação com o seguinte protocolo: etapa inicial de 2 minutos a 50°C, segunda etapa de 20 segundos a 95°C, terceira etapa de 40 ciclos com 3 segundos a 95°C, seguidos de 30 segundos a 60°C.

Cada ensaio também incluiu, além do miRNA de interesse, um RNA de referência para normalização dos resultados e um controle negativo NTC (no-template control) contendo os demais reagentes, mas com a água livre de nucleases em substituição ao cDNA.

O equipamento termociclador fornece a representação da curva de amplificação e os valores correspondentes dos ciclos de quantificação (Cq ou Ct) que indicam o ciclo em que a amplificação se torna exponencial, com consequente informação suficiente para se calcular a quantidade inicial de partículas de miRNA na amostra testada, bem como a comparação dessa quantidade em relação ao controle normalizador das reações.

A comparação entre os valores de Ct do grupo experimental com os valores de Ct do grupo Controle começa pela normalização de todos os grupos pelo gene de referência com obtenção do ΔCt , isto é, o $\Delta Ct = Ct (\text{miRNA alvo}) - Ct (\text{miRNA referência})$. A partir daí calcula-se o $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{experimental}) - \Delta Ct (\text{controle})$. A expressão gênica foi expressa com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, representando a expressão relativa do grupo experimental em relação ao grupo controle (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Essa fórmula adotada para a expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) contempla a expressão logarítmica por duplicação do cDNA a cada ciclo de amplificação, e o sinal negativo que ajusta a relação inversa entre o valor de Ct e o conteúdo de miRNA na amostra em teste.

4.5. Análise estatística:

Os dados da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) de todos os miRNAs foram inseridos no programa “GraphPad Prism Versão 6.01 for Windows”. Após a eliminação de “outliers”, foram realizados teste de Shapiro-Wilk para checar se os dados tinham distribuição normal. Após essa análise, os que não passaram no teste de normalidade, a comparação entre os grupos foi feita com o teste Mann Whitney, considerados diferentes aqueles cujo $p < 0,05$. Os dados que passaram no teste de normalidade foram comparados com teste t não pareado.

Com o objetivo de analisar o poder discriminatório da expressão relativa entre o grupo Controle e o grupo DRC foram utilizadas curvas “*Receiver Operating Characteristic*” (ROC) para cada miRNA avaliado, por meio do cálculo da área sob a curva (ASC).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após as análises dos hemogramas, avaliação bioquímica sanguínea e urinálise, foi possível estadiar os 15 gatos que fizeram parte do grupo DRC, de acordo com seus valores de creatinina e seguindo os critérios estabelecidos pela IRIS, 10 foram classificados como estágio 2 de DRC e cinco em estágio 3. No momento da avaliação apenas um gato apresentava proteinúria ($RPC > 0,4$), oito gatos não apresentavam proteinúria ($RPC < 0,2$) e seis foram classificados como tendo proteinúria limítrofe ou “borderline” (RPC entre 0,2-0,4). Não foi aferida a pressão arterial dos gatos desse grupo no momento da avaliação, não sendo possível portanto, fazer o sub-estadiamento completo da DRC. No grupo DRC, seis gatos apresentaram hipocalemia e apenas dois estavam com hiperfosfatemia, duas alterações bioquímicas comuns em gatos com alterações renais crônicas (PAEPE; DAMINET, 2013). Os dados completos das avaliações laboratoriais dos dois grupos estudados podem ser vistos no Anexo 1.

A Tabela 2.2 resume os resultados obtidos na RT-qPCR das expressões relativas ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos cinco miRNAs estudados e as diferenças entre o grupo Controle e o grupo DRC.

Tabela 2.2. Resumo dos resultados comparativos entre as médias (\pm desvio padrão) da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos miRNAs estudados no grupo Controle e o grupo Doença Renal Crônica (DRC). *representa diferença significativa entre os grupos Controle e DRC pelo teste Mann Whitney, considerando $p < 0,05$

miRNA	Amostra	Controle	DRC	p
miR-15b-5p	Plasma	1,11 ($\pm 0,54$)	0,54 ($\pm 0,32$)	0,0046*
	Soro	1,056 ($\pm 0,72$)	0,43 ($\pm 0,25$)	0,0124*
miR-192-5p	Plasma	1,24 ($\pm 0,91$)	0,71 ($\pm 0,48$)	0,088
	Soro	1,25 ($\pm 0,94$)	0,45 ($\pm 0,22$)	0,003*
miR-365-3p	Plasma	1,26 ($\pm 0,75$)	0,59 ($\pm 0,39$)	0,021*
	Soro	1,47 ($\pm 1,26$)	1,04 ($\pm 0,84$)	0,304
miR-16-5p	Plasma	1,16 ($\pm 0,61$)	0,95 ($\pm 0,54$)	0,24
	Soro	1,30 ($\pm 0,73$)	1,94 ($\pm 1,13$)	0,28
miR-20a-5p	Plasma	1,13 ($\pm 0,5$)	0,78 ($\pm 0,38$)	0,77
	Soro	1,02 ($\pm 0,41$)	1,16 ($\pm 0,76$)	0,95

A Figura 2.1 é a representação gráfica desses resultados somente no plasma e a Figura 2.2 somente no soro.

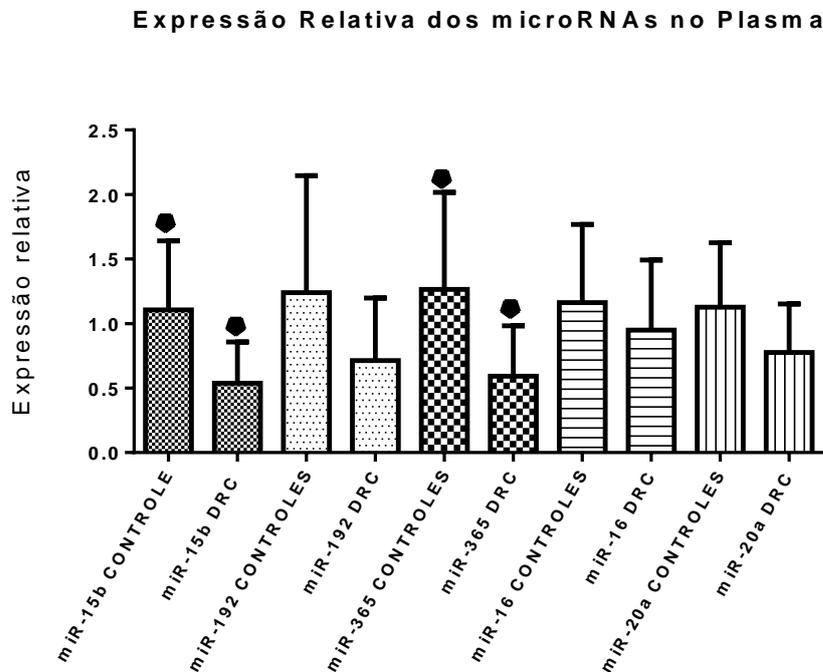


Figura 2.1 – Distribuição comparativa das expressões relativas ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) dos miRNAs no plasma dos dois grupos. (*) representa diferença significativa pelo teste Mann Whitney, considerando $p < 0,05$.

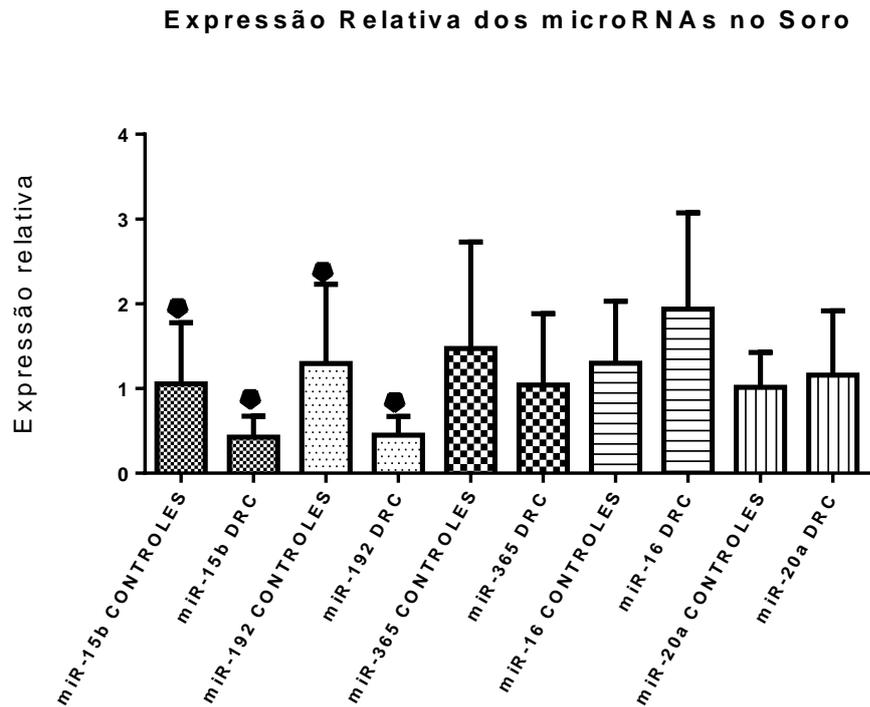


Figura 2.2 - Distribuição comparativa das expressões relativas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos miRNAs no soro dos dois grupos. (*) representa diferença significativa pelo teste Mann Whitney, considerando $p < 0,05$.

Está claro pelos resultados obtidos que o único miRNA cuja expressão estava diferente entre os grupos amostrais, tanto no soro quanto no plasma foi o miR-15b-5p, apresentando-se menos expresso nos animais do grupo DRC, em comparação com os animais do grupo Controle. Os outros miRNAs avaliados apresentaram um padrão diferente entre soro e plasma, sendo o miR-192 menos expresso apenas no soro e miR-365 menos expresso apenas no plasma dos gatos com DRC quando comparados com o grupo Controle.

A escolha dos cinco miRNAs utilizados no presente estudo foi baseada na sua comprovada abundância no tecido renal de gatos (ICHII et al., 2014), mas o fato de estarem presentes no tecido renal não quer dizer necessariamente que apresentam a mesma abundância no sangue ou que estão envolvidos direta ou indiretamente em processos fisiológicos ou patológicos nos rins. Todos os miRNAs estudados foram detectados no plasma e soro dos gatos dos dois grupos experimentais. Conforme foi demonstrado em etapas prévias desse trabalho, a abundância desses miRNAs foi maior no soro que no plasma (SCALON et al., 2021).

A incapacidade de detectar miRNAs específicos no plasma ou soro, em alguns casos, reflete a sua pouca abundância livre na circulação. Sabe-se que a liberação de alguns miRNAs das células/tecidos para o sangue é limitada ou seletiva. Além disso alguns miRNAs

podem ser mais estáveis que outros à degradação pelas ribonucleases plasmáticas ou serem mais receptivos à amplificação pelas polimerases (KIM et al., 2012).

Os miRNAs circulantes, como os que foram avaliados no presente estudo, não funcionam apenas como biomarcadores de doença, que são liberados do compartimento celular como resultado de morte celular, mas eles são também ativamente secretados e carregam informações genéticas de uma célula para outra, funcionando como reguladores dessa comunicação intercelular. Para melhor exercerem essas funções devem ser protegidos da degradação e, por causa de sua baixa concentração no sangue circulante, são ativamente captados pelas células receptoras (LORENZEN; THUM, 2012).

É importante considerar que qualquer tentativa de traduzir a expressão de miRNAs no sangue em informações diagnósticas ou prognósticas na rotina clínica deve passar pela padronização das metodologias utilizadas, isto é, padronizar os procedimentos de colheita de amostras, condições de estocagem e processamento, os miRNAs escolhidos para a normalização e os métodos estatísticos para análise dos dados (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011). Toda metodologia utilizada no presente estudo foi padronizada desde a colheita das amostras de sangue, condições de armazenamento e processamentos finais. Essa padronização fez parte das etapas iniciais cujo objetivo foi exatamente a determinação dos melhores métodos de processamento, volume ideal das amostras e escolha do gene de referência e normalização (SCALON et al., 2021).

A completa compreensão do papel exercido pelos miRNAs aqui estudados na fisiopatogenia renal é bastante problemática considerando os diferentes tipos celulares nos quais as concentrações e influências dos miRNAs podem ser diversas em várias patologias (LI et al., 2010).

A evolução das lesões histopatológicas nos rins é proporcional à evolução dos estádios da doença, isto é, a gravidade da degeneração tubular, inflamação intersticial, fibrose e glomeruloesclerose é maior nos estádios mais avançados em comparação aos estádios iniciais (MCLELAND et al., 2015). No presente estudo não houve avaliação histopatológica dos rins, o que inviabiliza a relação direta da expressão desses miRNAs a processos patológicos específicos, sejam em fases iniciais ou avançadas.

Já foram descobertos literalmente dezenas de miRNAs cuja expressão no tecido renal e urina foram relacionados a diversos processo patológicos renais (FRANCZYK et al., 2021). Por outro lado, pesquisas com perfis de miRNAs no sangue circulante como foi feito no presente estudo são bem menos numerosas.

Dos cinco miRNAs estudados, o miR-192 é o que apresenta mais menções de ser relacionado à fisiologia e patologia renal em animais e no ser humano. Sabe-se que o miR-192 está bastante expresso nos rins saudáveis de várias espécies, incluindo seres humanos, cães e gatos (ICHII et al., 2014) e, comparativamente o miR-192 está mais expresso nos rins do que em outros órgãos (FRANCZYK et al., 2021). Foi demonstrado que ele está envolvido em mecanismos fisiológicos renais como o equilíbrio fluido pela sua ação supressora na ATPase Na⁺/K⁺ (MLADINOV et al., 2013). Mas o fato mais marcante de suas ações no tecido renal é sua relação com a fibrose renal, por mecanismos mediados pela citocina TGF- β (KATO et al., 2007; KRUPA et al., 2010; PUTTA et al., 2012). Especula-se se a menor expressão do miR-192 aqui observada no soro dos gatos com DRC, poderia estar relacionada com maiores concentrações no rim, durante os processos de fibrose que acompanham a progressão da DRC.

A fibrose renal é uma consequência praticamente inevitável do acúmulo excessivo de matriz extracelular que ocorre em virtualmente qualquer tipo de DRC. Independente da causa inicial, a progressão da DRC geralmente resulta progressão de cicatrização tecidual que leva à completa destruição do parênquima renal e DRC terminal. Entre os muitos fatores fibrogênicos que regulam o processo fibrótico renal, o TGF- β 1 desempenha papel fundamental (LIU, 2006).

Inúmeras evidências experimentais em modelos animais e no ser humano apontam para uma relação causal entre o aumento da expressão do TGF- β 1 e o início da fibrose glomerular e tubulointersticial (ZEISBERG et al., 2002; ARATA et al., 2005) Os níveis elevados de TGF- β 1 nos rins correlaciona-se diretamente com o grau de fibrose intersticial ou esclerose glomerular (ARATA et al., 2005).

A DRC nos gatos é uma doença que muito se assemelha à DRC nos seres humanos, no que diz respeito às várias causas e à fibrose renal resultante, ao acúmulo de matriz extracelular e a proliferação de miofibroblastos nos rins. Isso indica então que o TGF- β 1 é um fator importante envolvido também na doença nos gatos, assim como nos seres humanos e outros animais (ARATA et al., 2005). Esses fatos reforçam a importância do estudo do papel do miR-192 em pacientes com DRC, como feito no presente estudo.

As menores expressões do miR-15b tanto nas amostras de soro quanto de plasma no grupo DRC poderiam estar relacionadas com a presença de lesão renal, uma vez que já foi demonstrado que perfis de expressão urinários do miR-15b podem servir de biomarcadores de lesões renais agudas em cães (SUN et al., 2021). A menor expressão do miR-15b no sangue já foi relacionada com alterações do metabolismo do fósforo em pacientes

humanos com DRC avançada (WANG et al., 2012) e também com hipertensão sistêmica em pacientes renais (NANDAKUMAR et al., 2017). Em ambos os estudos, porém, o miR-15b não era o único alterado. Como no presente estudo não houve a aferição da pressão arterial dos gatos incluídos, não podemos fazer nenhuma correlação da menor expressão do miR-15b com esse parâmetro e apenas dois gatos do grupo DRC apresentaram hiperfosfatemia, impossibilitando também qualquer correlação de seus valores com os níveis de expressão do miR-15b.

Sabe-se também que o miR-15b participa da indução de linfócitos T CD4(+) reguladores, que protegem de danos celulares causados por reações autoimunes (SINGH et al., 2015). Acredita-se com isso que a menor expressão dele e de outros miRNAs em pacientes humanos com DRC, possa sugerir uma menor ativação imunológica, mas o que isso implica na progressão da DRC ainda necessita maior investigação (NANDAKUMAR et al., 2017).

Uma menor expressão do miR-15 e do miR-192 já foi demonstrada na urina de pacientes humanos com diferentes formas de DRC, o que, segundo os pesquisadores, corrobora a hipótese do envolvimento desses miRNAs na progressão da DRC (SZETO et al., 2012), porém não há relato dessa correlação com os níveis desses miRNAs no soro ou plasma desses pacientes.

O miR-15b-5p e o miR-16-5p já foram observados apresentando menor expressão em neoplasias mamárias em cães (BOGGS et al., 2008). Nenhum animal dos grupos experimentais tinha diagnóstico de neoplasia.

Muitos miRNAs estão envolvidos de diversas maneiras nas vias moleculares dos processos inflamatórios, como o miR-16 e o miR-20a (OCHS; STEINHILBER; SUESS, 2011). Considerando que parte dos processos patológicos nos rins são inflamatórios, podemos especular alguma participação desses miRNAs, mas é mais provável que as concentrações na urina sejam mais informativas. Foi demonstrado mais recentemente que o miR-16 está presente na urina de gatos, mas não apresentou diferenças significativas de expressão entre animais doentes (pielonefrite e outras doenças renais) e gatos saudáveis (JESSEN et al., 2020), sendo então inútil como biomarcador de patologia renal. O miR-20a, que está altamente expresso na medula renal dos gatos (ICHII et al., 2014), já foi relacionado com lesões renais isquêmicas em camundongos (GODWIN et al., 2010). No presente estudo não foram observadas diferenças de expressão do miR-16 ou do miR-20a nem no soro nem no plasma. Se eles estão envolvidos de alguma maneira na progressão da DRC, pode ser que suas

concentrações fiquem restritas ao tecido renal ou urina ou talvez estariam envolvidos apenas nas fases iniciais da DRC onde os processos inflamatórios estão no começo.

Dos miRNAs estudados, o que tem menos relação com patologias renais é o miR-365a-3p, sendo a maioria das citações de sua expressão relacionadas a diversos tipos de neoplasias, inclusive carcinoma renal (OTO et al., 2021). Sua menor expressão no plasma de gatos do grupo DRC no presente estudo pode não ter nenhum significado ou ser um bom presságio de sua localização “protegendo” o tecido renal de transformações neoplásicas.

Com o objetivo de investigar o valor diagnóstico da expressão relativa do miR-15b no plasma e no soro, o miR-192 no soro e do miR-365 no plasma e sua utilidade como biomarcadores para a DRC em gatos, foram geradas as curvas ROC e calculadas as áreas sob a curva (ASC).

A curva ROC é obtida pelo cálculo da sensibilidade e especificidade de cada valor observado e fazendo o traçado da sensibilidade pelo valor 1-sensibilidade. Um teste diagnóstico que discrimina perfeitamente dois grupos deve resultar numa curva que coincida com as margens esquerda e superior do traçado. Uma avaliação global do poder discriminatório de um teste é dada pela área sob a curva (ASC). Essa área é igual a probabilidade que um valor qualquer obtido num teste diagnóstico seja diferente entre os indivíduos saudáveis e os doentes (ALTMAN; BLAND, 1994). Valores de ASC variam de 0 a 1,0 (100%); valores > 0,8 (80%) indicam que a precisão do teste diagnóstico é muito boa (FERREIRA; PATINO, 2018).

A análise da curva ROC para o miR-15b do grupo Controle versus o grupo DRC no plasma resultou numa área sob a curva de 83 %, com $p = 0,006$ e intervalo de confiança (IC) de 95 % (67% - 98%). Sendo calculado o índice de Youden (J), isto é, o ponto de maior sensibilidade e especificidade, onde $J = \text{Sensibilidade (\%)} + \text{Especificidade (\%)} - 100$. Esse ponto ótimo = 0,456 fornecendo uma sensibilidade de 60 % e uma especificidade de 100% (Figura 2.3).

Quando colocamos juntos os dados referentes às curvas ROC da expressão do miR-15b-5p no soro e plasma nos permite comparar o poder discriminatório que a menor expressão desse miRNA tem nesses dois tipos de amostras biológicas (Figura 2.5). Considerando que seus valores de ASC são bem semelhantes, podemos concluir que a menor expressão do miR-15b-5p no plasma e no soro tem o mesmo poder de diferenciar entre gatos saudáveis e com DRC, de acordo com os respectivos pontos de corte calculados.

ROC curve: miR-15-5p Soro + miR-15 Plasma

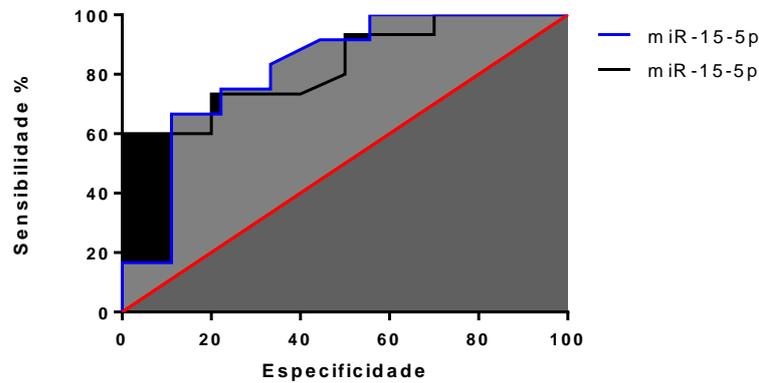


Figura 2.5 – Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p no plasma (ASC = 0,83) e no soro (ASC = 0,82).

A análise da curva ROC para o miR-192 para grupo Controle versus o grupo DRC no soro resultou numa área sob a curva de 85 %, com $p = 0,004$ e intervalo de confiança (IC) de 95 % (66% - 100%) (Figura 2.6). Foi calculado o índice de Youden (J), isto é, o ponto de maior sensibilidade e especificidade, onde $J = \text{Sensibilidade (\%)} + \text{Especificidade (\%)} - 100$. Esse ponto ótimo = 0,98 fornecendo uma sensibilidade de 100 % e uma especificidade de 70%.

ROC curve: miR-192-5p Soro

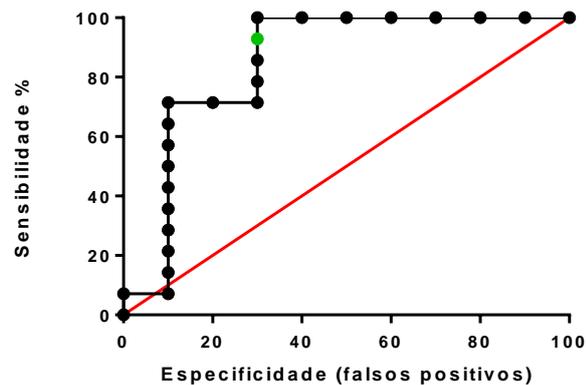


Figura 2.6 – Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-192-5p no soro (ASC = 0,85; $p = 0,004$). (● ponto de corte = 0,98).

Ao comparar o poder discriminatório da menor expressão do miR-192-5p no soro com o miR-15b-5p também no soro (Figura 2.7), observamos uma ligeira diferença entre os dois, onde a ASC para o miR-192-5p foi de 0,85 conferindo a este uma maior precisão para diferenciar animais saudáveis daqueles com DRC. Como ambos os parâmetros demonstraram $ASC > 0,8$ indicando que a precisão é muito boa (ALTMAN; BLAND, 1994), o uso dos dois juntos pode representar um poder discriminatório ainda maior para diferenciar entre saudáveis e com DRC.

ROC curve miR-15-5p soro + miR-192-5p soro

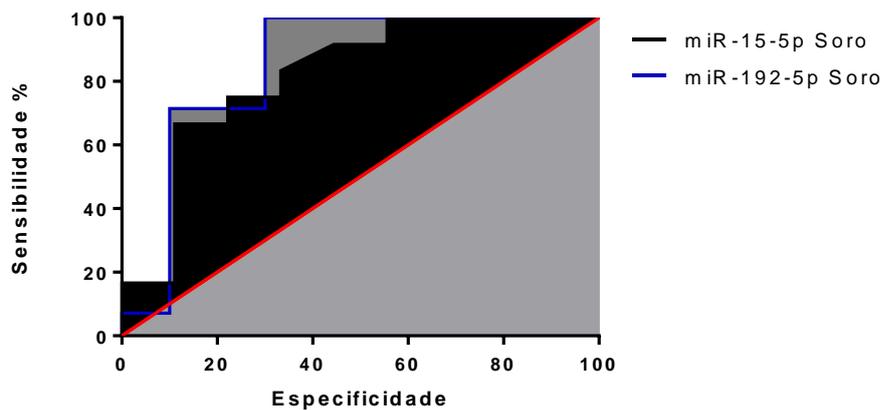


Figura 2.7 – Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p (ASC = 0,82) e do miR-192-5p (ASC = 0,85) no soro.

A análise da curva ROC para o miR-365 grupo Controle versus o grupo DRC no plasma resultou numa área sob a curva de 78 %, com $p = 0,022$ e intervalo de confiança (IC) de 95 % (57% - 99%). Sendo calculado o índice de Youden (J), isto é, o ponto de maior sensibilidade e especificidade, onde $J = \text{Sensibilidade (\%)} + \text{Especificidade (\%)} - 100$. Esse ponto ótimo = 0,795 fornecendo uma sensibilidade de 86 % e uma especificidade de 70% (Figura 2.8).

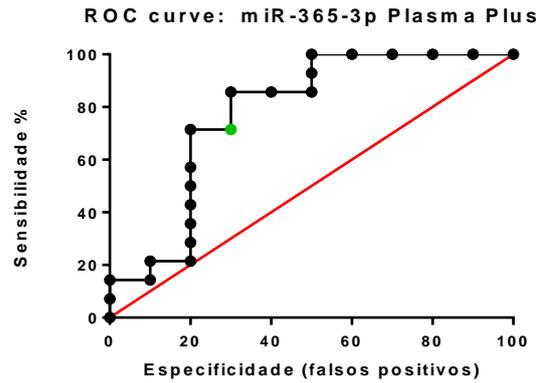


Figura 2.8 – Curva ROC da análise comparativa entre os grupos Controle e DRC quanto a expressão relativa do miR-365-3p no plasma (ASC = 0,78; $p = 0,022$). (● ponto de corte = 0,795).

Ao comparar o poder discriminatório da menor expressão do miR-365-3p no plasma com o miR-15b-5p também no plasma (Figura 2.9), observamos uma nítida diferença entre os dois, onde a ASC para o miR-365-3p foi de 0,78, considerado abaixo do valor para ser considerado um teste com boa precisão, e para o miR-15b-5p de 0,83. Mesmo com a observada menor expressão do miR-365-3p no plasma de animais com DRC no presente estudo, não seria recomendada a sua utilização isoladamente para diferenciar entre estes e os saudáveis.

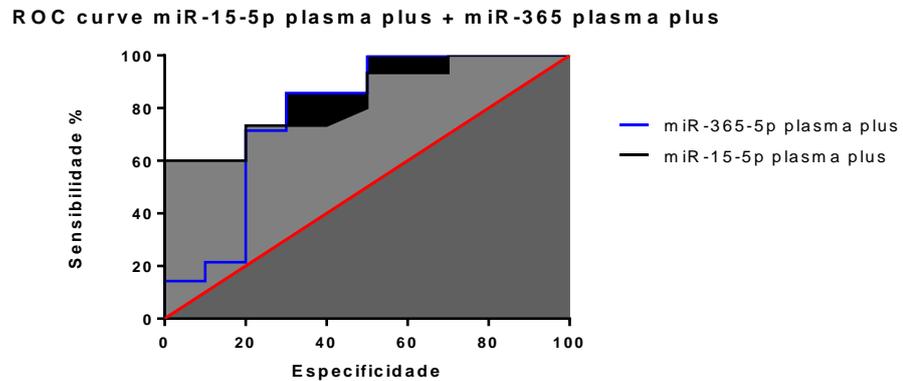


Figura 2.9 – Curva ROC comparativa da sensibilidade/especificidade da expressão do miR-15b-5p (ASC = 0,83) e do miR-365-3p (ASC = 0,78) no plasma.

Já sabemos, de prévios experimentos que as amostras de soro apresentam um rendimento de miRNAs maior em comparação ao plasma e que o uso de amostras de soro é mais conveniente, pois não necessita de uma centrífuga refrigerada (VAN VLIET et al., 2017). Felizmente também a melhor combinação de miRNAs de acordo com as curvas ROC foi o uso de valores de expressão do miR-15b e do miR-192 no soro. Estes foram os parâmetros com ótimos valores da ASC, de 82% e 85%, respectivamente e se forem

combinados podem aumentar ainda mais o poder de distinguir gatos saudáveis de gatos com DRC. Essa combinação pode ser proposta como parte de um perfil de avaliação de gatos na busca do diagnóstico de DRC.

Antes de considerarmos esses resultados como tendo relação direta com o diagnóstico de doença renal há de se considerar alguns fatores que poderiam interferir nos resultados.

Plasma e soro, mesmo de um único indivíduo, apresentam características biológicas diferentes. A diferença essencial entre plasma e soro é a presença e ausência, respectivamente, de fibrinogênio e fatores de coagulação. Mais importante ainda é a presença das plaquetas, que contém uma grande variedade de miRNAs e que poderiam ser liberados no soro durante a coagulação junto com os miRNAs dos leucócitos e eritrócitos (MOLDOVAN et al., 2014). Na obtenção de amostras de plasma há o risco de contaminação por células presentes no “pellet” durante a aspiração, como as células possuem maiores concentrações de miRNAs do que o plasma ou soro, essa “contaminação” pode ser um fator de confusão se não houver atenção para isso durante o processamento do sangue (KROH et al., 2010). Muitos estudos comparando esses dois fluidos biológicos encontraram pouca ou nenhuma diferença na eficiência da quantificação dos miRNAs extracelulares, porém com tendência a obter maiores concentrações no soro, tanto em estudos com humanos (MOLDOVAN et al., 2014) e com gatos (SCALON et al., 2021).

Outros fatores pré-analíticos também podem afetar a eficiência da extração, como o tempo decorrido desde a colheita do sangue até seu processamento e o jejum pré colheita, visto que já se sabe que a lipemia pode afetar essa eficiência (KROH et al., 2010). Quanto ao tempo decorrido pós-colheita da amostra, esse foi padronizado para não ultrapassar uma hora. Infelizmente, não foi possível padronizar o jejum para os animais selecionados para participar, pois sendo animais domiciliados, havia a dependência da disposição dos tutores para levá-los ao hospital veterinário em horários de sua conveniência.

A manutenção da estabilidade do RNA durante e após a colheita do sangue é um fator importante para a quantificação mais precisa dos miRNAs e pode ser influenciada pelo anticoagulante utilizado (KIM et al., 2012). No presente estudo todas as amostras foram colhidas utilizando o mesmo tipo de tubo com o mesmo anticoagulante.

Outro fator de variação, independente da doença, poderia ser a idade dos pacientes, uma vez que estudos em humanos e ratos já demonstraram que a idade do indivíduo pode afetar a expressão de alguns miRNAs (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2011). No presente estudo há uma nítida e significativa diferença ($p = 0,0004$) de faixa etária

entre os animais incluídos nos grupos. O grupo Controle tinha uma média de idade 4,7 anos ($\pm 4,9$) e o grupo DRC com média de 13,6 anos ($\pm 3,1$).

Considerando que as vias metabólicas celulares influenciam o processo de envelhecimento e que estas são alvos da regulação pelos miRNAs, é praticamente inevitável que os miRNAs estejam envolvidos na longevidade celular e nos fenômenos que evoluem com a idade (SUN; LAI, 2013). A expressão de diversos miRNAs se alteram com a idade, alguns mais expressos, outros menos expressos em diferentes tecidos e células, afetando a longevidade. Alterações nas expressões dos miRNAs podem representar tanto uma resposta adaptativa em animais idosos ou estarem ativamente envolvidas em processos relacionados ao envelhecimento (SUN; LAI, 2013). O processo de senescência celular pode ser induzido como resposta a diversos fatores, tais como encurtamento dos telômeros após muitos ciclos de divisão celular (senescência replicativa) ou estressores, como danos ao DNA ou à cromatina, oncogenes e mitógenos (senescência prematura induzida por estresse)(SMITH-VIKOS; SLACK, 2012).

Muitos dos estudos que relacionam as diferentes expressões de miRNAs com processos de envelhecimento e longevidade foram realizados com o nematódeo *C. elegans*, mas há também outros que sugerem o envolvimento dos miRNAs na regulação de fenótipos de envelhecimento em células ou tecidos específicos nos mamíferos (SMITH-VIKOS; SLACK, 2012). Os miRNAs controlam a transformação de uma célula em replicação em uma célula senescente ao interferirem com fatores que respondem ao estresse celular, vias de supressão tumoral e vias de sinalização celular relacionadas com controle da longevidade (SMITH-VIKOS; SLACK, 2012).

É fato que parte dos processos degenerativos que ocorrem nos rins podem ser atribuídos ao envelhecimento renal. O estudo do envelhecimento renal torna-se interessante como modelo de envelhecimento de órgãos, pois a função renal pode ser acompanhada de maneira quantitativa mais prontamente do que em outros órgãos (BAI et al., 2011). Estudos realizados em ratos demonstram claramente que vários miRNAs apresentam expressões significativamente diferentes nos tecidos renais jovens em comparação com tecido renal de animais idosos. Foi sugerido que esses miRNAs poderiam estar regulando o processo de envelhecimento do tecido renal através da modulação dos genes envolvidos nos mecanismos antioxidantes mitocondriais (BAI et al., 2011).

Considerando que as características das lesões renais diferem nas diversas doenças renais, deve-se examinar com cautela os perfis de expressão de miRNAs para cada doença renal com relação ao tipo de célula expressando o miRNA em questão, em especial se

considerarmos a aplicação dos miRNAs como marcadores de doença (ICHII; HORINO, 2017).

Até o presente não há um único biomarcador nem mesmo na nefrologia médica que seja considerado ideal, isto é, não invasivo, totalmente confiável e com altas sensibilidade e especificidade. Os miRNAs podem atender os critérios de sensibilidade, especificidade e reprodutividade necessários para serem considerados biomarcadores não invasivos e confiáveis, desde que estratégias de normalização para quantificação precisas e escolha adequada dos controles sejam implementadas, como foram feitas no presente estudo (FRANCZYK et al., 2021). Entretanto, o fato de que os miRNAs poderem estar envolvidos em múltiplos processos de doenças simultaneamente continua um obstáculo a ser superado (FRANCZYK et al., 2021).

Além de servirem como biomarcadores, os miRNAs também possuem emergente papel como agentes terapêuticos ou de prevenção de doenças. Essas terapias geralmente estão baseadas no estímulo ou repressão de suas expressões. Mas essa abordagem apresenta desafios a serem superados, como um melhor conhecimento da biologia dos miRNAs e seus alvos, desenvolvimento de estratégias de administração dos miRNAs ou seus antagonistas ao paciente e a determinação precisa do risco de toxicidade ou respostas imunológicas, além, é claro dos potenciais efeitos indesejados em diferentes alvos (DE PLANELL-SAGUER; RODICIO, 2011). Visto que o miR-192 apresentou diferença em sua expressão nos pacientes com DRC, especula-se a sua utilidade no tratamento das lesões crônicas, onde a fibrose já se apresenta como principal processo associado com perda progressiva de função.

Muito ainda é necessário ser investigado no que diz respeito ao papel ativo dos miRNAs na doença renal nas diversas espécies animais, incluindo os gatos, antes que um perfil totalmente reprodutível e prático seja disponibilizado.

Mesmo com diferenças de expressão observadas em três alvos estudados, informações mais completas e precisas seriam obtidas se pudessemos comparar simultaneamente a abundância desses mesmos miRNAs no tecido renal e na urina de cada indivíduo. Essa avaliação seria ainda mais precisa se pudessemos relacionar os perfis de miRNAs obtidos com alterações histopatológicas específicas e a fase de progressão, abrindo caminho para intervenções terapêuticas precoces e eficazes. Os procedimentos de obtenção de amostras para biópsia renal não são isentos de risco para o paciente, o que torna bastante desafiadora essa abordagem ao trabalhar com animais de estimação domiciliados.

A descoberta e a rápida evolução das pesquisas com miRNAs abriu um campo totalmente novo e empolgante de pesquisa. As tecnologias de detecção e manipulação dos miRNAs evoluem a passos largos. Os miRNAs circulantes já demonstraram o seu potencial como biomarcadores em diversos cenários de doenças. Algumas terapias baseadas em miRNAs já estão em diversas fases de testes clínicos para diferentes doenças humanas. Mas ainda há muito a se descobrir e talvez ainda leve um bom tempo para que as respostas obtidas nos laboratórios de pesquisa se traduzam em terapias aplicáveis na clínica, em especial na clínica de animais de companhia.

6. CONCLUSÕES

Considera-se bem-sucedida a tentativa de estabelecimento de protocolos de extração de miRNAs do sangue de gatos domésticos, com a utilização de pequenas quantidades de sangue para obtenção de plasma e soro a serem utilizados nos ensaios. Isso pode abrir novas perspectivas de pesquisas de biomarcadores de doenças nessa espécie.

Foi possível detectar e quantificar os alvos miR-365-3p, miR-192-5p, miR-20a-5p, miR-15b-5p e miR-16-5p no plasma e no soro dos gatos dos dois grupos experimentais.

Os protocolos desenvolvidos e padronizados foram capazes de demonstrar que diferenças de expressão dos miRNAs miR-365-3p, miR-192-5p e miR-15b-5p podem sim diferenciar gatos saudáveis de gatos com DRC, em especial a combinação da expressão dos miR-192-5p e miR-15b-5p no soro, que apresentou o melhor poder discriminatório.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, n. 1–2, p. 1–8, 2011.
- ALTMAN, D. G.; BLAND, J. M. Statistics Notes: Diagnostic tests 3: Receiver operating characteristic plots. **BMJ**, v. 309, n. 6948, p. 188, 16 jul. 1994.
- ARATA, S. et al. Urinary Transforming Growth Factor- β 1 in Feline Chronic Renal Failure. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 12, p. 1253–1255, 2005.
- BAI, X.-Y. Y. et al. miR-335 and miR-34a promote renal senescence by suppressing mitochondrial antioxidative enzymes. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 22, n. 7, p. 1252–1261, 2011.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function (Reprinted from **Cell**, vol 116, pg 281-297, 2004). **Cell**, v. 116, p. 281–297, 2007.
- BHATT, K.; KATO, M.; NATARAJAN, R. Mini-review: emerging roles of microRNAs in the pathophysiology of renal diseases. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 310, n. 2, p. F109–F118, 2016.
- BOGGS, R. M. et al. MicroRNA expression in canine mammary cancer. **Mammalian Genome** 2008 19:7, v. 19, n. 7, p. 561–569, 30 jul. 2008.
- BRAFF, J. et al. Relationship between Serum Symmetric Dimethylarginine Concentration and Glomerular Filtration Rate in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, p. 1699–1701, 2014.
- BRANS, M. et al. Plasma symmetric dimethylarginine and creatinine concentrations and glomerular filtration rate in cats with normal and decreased renal function. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 35, n. 1, p. 303–311, 2021.
- BROWN, C. A. et al. Chronic Kidney Disease in Aged Cats: Clinical Features, Morphology, and Proposed Pathogeneses. **Veterinary Pathology**, v. 53, n. 2, p. 309–326, 11 fev. 2016.
- BROWN, S. A.; BROWN, C. A. Single-nephron adaptations to partial renal ablation in cats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative**

- Physiology**, v. 269, n. 5 38-5, p. R1002–R1008, 1995.
- CHAKRABARTI, S. et al. Histomorphometry of Feline Chronic Kidney Disease and Correlation With Markers of Renal Dysfunction. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 1, p. 147–155, 2013.
- CHIN, L. J.; SLACK, F. J. A truth serum for cancer microRNAs have major potential as cancer biomarkers. **Cell Research**, v. 18, n. 10, p. 983–984, 2008.
- CHODKOWSKA, K. A.; SADKOWSKI, T.; OSTASZEWSKI, P. MicroRNA function in domestic animal physiology and diseases: a promising diagnostic tool for veterinary use. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 73, n. 3, p. 156–165, 2017.
- CRIVELLENTI, L. Z.; GIOVANINNI, L. H. Função Renal e Biomarcadores. In: CRIVELLENTI, L. Z.; GIOVANINNI, L. H. (Ed.). **TRATADO DE NEFROLOGIA E UROLOGIA EM CÃES E GATOS**. São Paulo: Medvet, 2021. p. 180–194.
- DE PLANELL-SAGUER, M.; RODICIO, M. C. Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 699, n. 2, p. 134–152, 2011.
- EGENVALL, A. et al. Mortality of life-insured Swedish cats during 1999-2006: Age, breed, sex, and diagnosis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 6, p. 1175–1183, nov. 2009.
- ETHERIDGE, A. et al. The complexity, function and applications of RNA in circulation. **Frontiers in Genetics**, v. 4, n. JUN, p. 1–8, 2013.
- FERDMAN, R. A.; INGRAHAM, C. Where cats are more popular than dogs in the U.S.—and all over the world - **The Washington Post**. Disponível em: <<https://www.washingtonpost.com/news/wonk/wp/2014/07/28/where-cats-are-more-popular-than-dogs-in-the-u-s-and-all-over-the-world/>>.
- FERREIRA, J. C.; PATINO, C. M. Understanding diagnostic tests. Part 3. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, n. 1, p. 4–4, fev. 2018.
- FINCH, N. Measurement of glomerular filtration rate in cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 9, p. 736–748, 21 set. 2014.
- FINCH, N. C. et al. Fibroblast growth factor 23 (fgf-23) concentrations in cats with early nonazotemic chronic kidney disease (ckd) and in healthy geriatric cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 27, p. 227–233, 2013.
- FLEISCHHACKER, S. N. et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 688–693, 1 set. 2013.
- FORTNEY, W. D. Implementing a Successful Senior/Geriatric Health Care Program for Veterinarians, Veterinary Technicians, and Office Managers. **Veterinary Clinics of**

- North America - Small Animal Practice**, v. 42, n. 4, p. 823–834, 2012.
- FRANCZYK, B. et al. miRNA biomarkers in renal disease **International Urology and Nephrology**, 6 jul. 2021.
- GHYS, L. F. E. et al. Biological validation of feline serum cystatin C: The effect of breed, age and sex and establishment of a reference interval. **Veterinary Journal**, v. 204, n. 2, p. 168–173, 2015.
- GODWIN, J. G. et al. Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 32, p. 14339–14344, 2010.
- GRIFFITHS-JONES, S. The microRNA Registry. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 90001, p. 109D – 111, 2004..
- HALL, J. A. et al. Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1676–1683, 1 nov. 2014.
- HAMMOND, S. M. microRNA detection comes of age. **Nature Methods**, v. 3, n. 1, p. 12–13, 2006.
- HOKAMP, J. A.; NABITY, M. B. Renal biomarkers in domestic species. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45, n. 1, p. 28–56, 1 mar. 2016.
- HUANG, W. H. et al. A real-time reporting system of causes of death or reasons for euthanasia: A model for monitoring mortality in domesticated cats in Taiwan. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 137, p. 59–68, 1 fev. 2017.
- ICHII, O. et al. Pathological correlations between podocyte injuries and renal functions in canine and feline chronic kidney diseases. **Histology and Histopathology**, v. 26, n. 10, p. 1243–55, out. 2011.
- ICHII, O. et al. MicroRNA expression profiling of cat and dog kidneys. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 2, p. 299–303, 2014.
- ICHII, O.; HORINO, T. MicroRNAs associated with the development of kidney diseases in humans and animals. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 31, n. 1, p. 23–34, 2017.
- IRIS Kidney - Education - IRIS Staging System. <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>
- JEPSON, R. E. et al. Evaluation of Predictors of the Development of Azotemia in Cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 806–813, jul. 2009.
- JESSEN, L. R. et al. Stability and profiling of urinary microRNAs in healthy cats and cats with pyelonephritis or other urological conditions. **Journal of Veterinary Internal**

- Medicine**, v. 34, n. 1, p. 166–175, 1 jan. 2020. 2020.
- KAMPA, N. et al. Day-to-day variability in glomerular filtration rate in normal dogs by scintigraphic technique. **Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 50, n. 1, p. 37–41, 2003.
- KATO, M. et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 9, p. 3432–3437, 27 fev. 2007.
- KHAN, T. M.; KHAN, K. N. M. Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. **Veterinary Pathology**, 3 maio 2015.
- KIM, D.-J. J. et al. Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 1, p. 71–80, jan. 2012.
- KLOOSTERMAN, W. P.; PLASTERK, R. H. A. The Diverse Functions of MicroRNAs in **Animal Development and Disease Developmental Cell**, 2006.
- KROH, E. M. et al. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). **Methods**, v. 50, n. 4, p. 298–301, 1 abr. 2010.
- KRUPA, A. et al. Loss of microRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 21, n. 3, p. 438–447, 2010.
- LAGANÀ, A. et al. Discovery and characterization of the feline miRNAome. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.
- LI, J. Y. Z. et al. Review: The role of microRNAs in kidney disease. **Nephrology**, v. 15, n. 6, p. 599–608, 1 set. 2010.
- LIU, Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics. **Kidney International**, 2006. .
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.
- LORENZEN, J. M.; THUM, T. Circulating and Urinary microRNAs in Kidney Disease. **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, v. 7, n. 9, p. 1528–1533, set. 2012.
- MARINO, C. L. et al. Prevalence and classification of chronic kidney disease in cats randomly selected from four age groups and in cats recruited for degenerative joint disease studies. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 16, n. 6, p. 465–472, 11 nov. 2014.

- MCLELAND, S. M. et al. A Comparison of Biochemical and Histopathologic Staging in Cats With Chronic Kidney Disease. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 3, p. 524–534, 16 dez. 2015.
- MLADINOV, D. et al. MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: MiR-192 targets Na⁺/K⁺-ATPase β 1. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 2, p. 1273–1283, 2013.
- MOLDOVAN, L. et al. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 3, p. 371–390, mar. 2014.
- NANDAKUMAR, P. et al. MicroRNAs in the miR-17 and miR-15 families are downregulated in chronic kidney disease with hypertension. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–13, 2017.
- NISSEN, O. I. The Relation between Reabsorption Rate and Filtration Rate in the Superficial and Deep Venous Drainage Area of the Cat Kidney. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 68, n. 3–4, p. 286–294, nov. 1966.
- O'NEILL, D. G. et al. Prevalence of disorders recorded in cats attending primary-care veterinary practices in England. **Veterinary Journal**, v. 202, n. 2, p. 286–291, 1 nov. 2014.
- O'NEILL, D. G. et al. Longevity and mortality of cats attending primary care veterinary practices in England. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 17, n. 2, p. 125–133, 22 fev. 2015.
- OBERT, L. A. et al. A Review of Specific Biomarkers of Chronic Renal Injury and Their Potential Application in Nonclinical Safety Assessment Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 49, n. 5, p. 996–1023, 12 jul. 2021.
- OCHS, M. J.; STEINHILBER, D.; SUESS, B. MicroRNA involved in inflammation: Control of eicosanoid pathway. **Frontiers in Pharmacology**, July, p. 1–7, 2011.
- OTO, J. et al. Identification of miR-20a-5p as Robust Normalizer for Urine microRNA Studies in Renal Cell Carcinoma and a Profile of Dysregulated microRNAs. **International Journal of Molecular Sciences** 2021, Vol. 22, Page 7913, v. 22, n. 15, p. 7913, 24 jul. 2021.
- PAEPE, D. et al. Routine Health Screening: Findings in apparently healthy middle-aged and old cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 1, p. 8–19, 2013.
- PAEPE, D.; DAMINET, S. Feline CKD. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 1_suppl, p. 15–27, 2013.

- PERRONE, R.; MADIAS, N.; LEVEY, A. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. **Clinical chemistry**, v. 38, n. 10, p. 1933–1953, 1992.
- PITTARI, J. et al. Senior care guidelines. **Journal of Feline Medicine And Surgery**, v. 11, p. 763–778, 2009.
- PUTTA, S. et al. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 23, n. 3, p. 458–469, 2012.
- QUIMBY, J. et al. 2021 AAHA/AAFP Feline Life Stage Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 3, p. 211–233, 2021.
- QUIMBY, J. M. Searching for biomarkers in feline chronic kidney disease: A new frontier. **Veterinary Journal**, v. 206, p. 3–4, 2015.
- RAY, M. et al. 2021 AAFP Feline Senior Care Guidelines. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 23, n. 7, p. 613–638, 2021.
- REYNOLDS, B. S.; LEFEBVRE, H. P. Feline CKD: Pathophysiology and risk factors - what do we know? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 15, n. 1 SUPPL., p. 3–14, 2013.
- ROSS, L. A.; FINCO, D. R. Relationship of selected clinical renal function tests to glomerular filtration rate and renal blood flow in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, n. 10, p. 1704–10, out. 1981.
- SARGENT, H. J.; ELLIOTT, J.; JEPSON, R. E. The new age of renal biomarkers: does SDMA solve all of our problems? **Journal of Small Animal Practice**, v. 62, n. 2, p. 71–81, 13 fev. 2021.
- SATHYAMURTHY, G.; SWAMY, N. R. Computational Identification of Putative miRNAs from Felis Catus . **Biomedical Engineering and Computational Biology**, v. 2, p. 37–46, 2010.
- SCALON, M. C. et al. RT-rtPCR quantification of circulating microRNAs in plasma and serum samples from healthy domestic cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 33, n. 6, p. 1151–1155, 23 nov. 2021.
- SCHWARZENBACH, H. et al. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 11, n. 3, p. 145–156, 29 mar. 2014.
- SINGH, Y. et al. MicroRNA-15b/16 Enhances the Induction of Regulatory T Cells by Regulating the Expression of Rictor and mTOR. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 12, p. 5667–5677, 15 dez. 2015.
- SMITH-VIKOS, T.; SLACK, F. J. MicroRNAs and their roles in aging. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 1, p. 7–17, 1 jan. 2012.

- SPARKES, A. H. et al. ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 18, n. 3, p. 219–239, 2016.
- STRAEDE, C. M.; GATES, R. G. Psychological Health in a Population of Australian Cat Owners. **Anthrozoös**, v. 6, n. 1, p. 30–42, mar. 1993.
- SUN, B. et al. Urinary microRNAs miR-15b and miR-30a as novel noninvasive biomarkers for gentamicin-induced acute kidney injury. **Toxicology Letters**, v. 338, p. 105–113, 1 mar. 2021..
- SUN, K.; LAI, E. C. Adult-specific functions of animal microRNAs. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 8, p. 535–548, ago. 2013.
- SYME, H. M. Proteinuria in cats. Prognostic marker or mediator? **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 3, p. 211–8, 1 mar. 2009.
- SZETO, C. C. et al. Micro-RNA expression in the urinary sediment of patients with chronic kidney diseases. **Disease Markers**, v. 33, n. 3, p. 137–144, 2012.
- TAKAMIZAWA, J. et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Research**, v. 64, n. 11, p. 3753–3756, 2004.
- TRIONFINI, P.; BENIGNI, A.; REMUZZI, G. MicroRNAs in kidney physiology and disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 11, n. 1, p. 23–33, 2015.
- VAN VLIET, E. A. et al. Standardization procedure for plasma biomarker analysis in rat models of epileptogenesis: Focus on circulating microRNAs. **Epilepsia**, v. 58, n. 12, p. 2013–2024, 2017.
- WANG, H. et al. Reduced Circulating miR-15b Is Correlated with Phosphate Metabolism in Patients with End-Stage Renal Disease on Maintenance Hemodialysis. **Renal Failure**, v. 34, n. 6, p. 685–690, 2012..
- WEBER, J. A. et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. **Clinical Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 1733–1741, 2010.
- WEBER, K. et al. Serum microRNA profiles in cats with hypertrophic cardiomyopathy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 402, n. 1–2, p. 171–180, 2015.
- YABUKI, A. et al. Comparative study of chronic kidney disease in dogs and cats: Induction of myofibroblasts. **Research in Veterinary Science**, v. 88, n. 2, p. 294–299, 2010.
- ZEISBERG, M. et al. Renal fibrosis: Extracellular matrix microenvironment regulates migratory behavior of activated tubular epithelial cells. **American Journal of Pathology**, v. 160, n. 6, p. 2001–2008, 2002.

ANEXO A – RESULTADOS DE EXAMES LABORATORIAIS MAIS RELEVANTES DO GRUPO CONTROLE

Identificação	Idade (anos)	VG (%)	PPT (g/dl)	Creatinina (mg/dl)	SDMA (µg/dl)	Potássio Sérico (mEq/l)	Fósforo Sérico (mg/dl)	Densidade urinária	RPC (Razão Proteína:Creatina urinária)
Gato 1	1,2	38	7.4	1.1	14	5.16	6.0	1,039	0.08
Gato 2	3	50	7.2	1.6	12	4.7	4.5	1,057	0.08
Gato 3	11	44	8.2	1.2	10	4.43	6.0	1,044	0.09
Gato 4	1	47	8.4	1.1	10	3.91	5.2	1,054	0.15
Gato 5	2	46	7.6	1.2	9	5.03	5.9	1,060	0.12
Gato 6	1	46	7.4	1.4	11	4.16	5.5	1,038	0.08
Gato 7	4	49	7.8	1.5	10	3.87	4.3	1,057	0.10
Gato 8	16	48	8.0	1.2	10	4.8	5.4	1,049	0.14
Gato 9	5	44	7.4	1.0	9	3.5	4.8	1,045	0.16
Gato 10	3	40	7.6	1.0	10	4.66	6.0	1,047	0.13
Valores de Referência	-	24-45	6,0-8,0	0,8-1,6	0-14	3,6-5,4	3,0-6,3	>1,035	< 0,4

ANEXO B – RESULTADOS DE EXAMES LABORATORIAIS MAIS RELEVANTES DO GRUPO DRC

Identificação	Idade (anos)	VG (%)	PPT (g/dl)	Creatinina (mg/dl)	SDMA (µg/dl)	Potássio Sérico (mEq/l)	Fósforo Sérico (mg/dl)	Estádio de DRC	Densidade urinária	RPC (Razão Proteína:Creatina urinária)
Gato 1	15	36	8,4	2,8	18	3,99	5,2	2	1,017	0,17
Gato 2	15	39	9,0	2,3	21	4,55	5,4	2	-	-
Gato 3	9	36	8,4	2,8	16	4,25	5,2	2	1,016	0,36
Gato 4	17	40	9,6	2,5	21	4,3	3,5	2	1,027	0,12
Gato 5	13	35	8,6	1,7	15	3,25	4,0	2	1,040	0,13
Gato 6	13	48	9,2	2,2	17	2,84	3,6	2	1,019	0,27
Gato 7	8	42	9,0	3,1	21	5,85	4,1	3	1,025	0,24
Gato 8	14	45	9,0	2,8	23	3,25	4,9	2	1,017	0,25
Gato 9	17	29	9,4	2,8	27	4,82	7,9	3	1,013	0,32
Gato 10	15	31	9,4	3,3	33	3,10	5,1	3	1,027	0,12
Gato 11	15	39	9,6	3,8	36	2,92	18,8	3	1,013	2,66
Gato 12	19	52	7,8	2,3	6	3,35	3,7	2	1,022	0,04
Gato 13	9	28	8,2	1,9	10	4,62	2,3	2	1,012	0,17
Gato 14	13	30	9,0	2,6	8	-	4,2	2	1,021	0,16
Gato 15	12	42	8,2	3,0	9	4,43	3,6	3	1,010	0,22
Valores de Referência	-	24-45	6,0-8,0	0,8-1,6	0-14	3,6-5,4	3,0-6,3	-	> 1,035	< 0,4

ANEXO D – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA DE USO ANIMAL (CEUA-UnB)



Brasília, 26 de fevereiro de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “USO DO MICRORNA PARA DIAGNÓSTICO DE DOENÇAS DE CÃES E GATOS DOMÉSTICOS.” Protocolo n.º 82/2018, sob responsabilidade da Professora Giane Regina Paludo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Felis catus* (100) e *Canis lupus familiaris* (100). A presente aprovação é válida pelo período de: 10/11/2018 a 30/12/2021.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

CAPÍTULO 3

1. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que diferenças de expressão de determinados miRNAs podem sim diferenciar gatos saudáveis de gatos com DRC, mas respostas mais completas e precisas seriam obtidas se pudéssemos comparar simultaneamente a abundância desses mesmos miRNAs no tecido renal e na urina de cada indivíduo. Foi demonstrado também que pequenos volumes de sangue, em particular de soro, são suficientes para as técnicas de detecção e quantificação dos miRNAs, o que muito facilita a colheita, processamento e armazenamento de amostras para estudos futuros.

Seria muito útil também, antes desenvolver estudos comparativos, dedicar estudos com uso da técnica de microarranjo de miRNAs circulantes nos gatos saudáveis, para obter uma visão geral e buscar alvos mais específicos e, a partir daí, compararmos com animais afetados por diferentes doenças. Novos estudos também podem acompanhar o processo de envelhecimento dos indivíduos e se esse processo, mesmo saudável afetaria a abundância de determinados miRNAs.

É possível vislumbrar um caminho bastante inovador no diagnóstico de várias doenças que afetam os gatos domésticos, em especial os idosos. Uma das afecções crônicas mais comuns é a doença inflamatória intestinal que, em determinado ponto, não se diferencia do linfoma, desordem igualmente comum. O caminho dos biomarcadores sanguíneos em muito facilitaria o processo de diagnóstico, tradicionalmente dependente de biópsias intestinais.

Outro horizonte inovador seria também a incorporação de miRNAs como alvos de terapias individualizadas e precoces. Técnicas que já vem sendo utilizadas na Medicina, através de silenciamento da ação de determinados miRNAs ou a administração de outros com foco na interferência específica em processos patológicos em curso. No caso da doença renal crônica, isso poderia representar uma nova modalidade de intervenção na progressão da doença, que até hoje, só é manejada quando indícios de disfunção já estão presentes e, muitas vezes, já irreversível.