

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GENE DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO  
GÊNICA NO SANGUE TOTAL E EFEITO DA IDADE SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES  
SANGUÍNEOS EM CÃES

Autora: Beatriz Ribeiro Souza Gomes  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Angélica de Souza Khatlab

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro - 2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GENE DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO  
GÊNICA NO SANGUE TOTAL E EFEITO DA IDADE SOBRE  
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E MOLECULARES  
SANGUÍNEOS EM CÃES

Autora: Beatriz Ribeiro Souza Gomes  
Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Angélica de Souza Khatlab

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro - 2024

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

G633g      Gomes, Beatriz Ribeiro Souza  
Gene de referência para análise de expressão gênica no sangue total e efeito da idade sobre parâmetros bioquímicos e moleculares sanguíneos em cães / Beatriz Ribeiro Souza Gomes. -- Maringá, PR, 2024.  
89 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Gasparino.  
Coorientadora: Profa. Dra. Angélica de Souza Khatlab.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2024.

1. Expressão gênica - Sangue total. 2. Animais de companhia. 3. Modelo animal. 4. Estabilização do RNA. 5. Senescência. I. Gasparino, Eliane, orient. II. Khatlab, Angélica de Souza, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.7



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

GENE DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO  
GÊNICA NO SANGUE TOTAL E EFEITO DA IDADE SOBRE  
PARÂMETROS SANGUÍNEOS BIOQUÍMICOS E  
MOLECULARES EM CÃES

Autora: Beatriz Ribeiro Souza Gomes  
Orientadora: Profª Drª Eliane Gasparino

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 29 de fevereiro de 2024.

Profª Drª Maria Amélia Menck  
Soares

Profª Drª Marisa Bastos Silva

Profª Drª Eliane Gasparino  
Orientadora

Em tudo daí graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco.

*1 Tessalonicenses 5:18*

Ao meu esposo, João Antônio, meu grande incentivador e parceiro de vida.

A querida Angélica, um anjo que Deus colocou em meu caminho.

Sem vocês este trabalho não existiria.

**DEDICO ESTE TRABALHO**

## AGRADECIMENTOS

Para desenvolver essa dissertação, muitos foram os apoios recebidos.

Começo agradecendo a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino, que desde o início acreditou em mim. Obrigada pela sua disponibilidade, competência, dedicação e carinho.

Agradeço minha coorientadora Dr.<sup>a</sup> Angélica de Souza Khatlab, que fez tudo acontecer. Obrigada pela sua doçura, amizade, inteligência, incentivo e paciência.

Agradeço aos amigos e futuros médicos veterinários que nos apoiaram nas coletas dos animais, Luiz Fernando Paiva e Mariana Amorin, obrigada por ajudarem com dedicação e alegria.

Agradeço a minha família: meu esposo João Antônio que me apoia em tudo e cuida diariamente de todas as minhas necessidades, minha filha Maria Clara, por dar sentido a minha caminhada, minha mãe Valéria que sempre incentivou minha jornada acadêmica e inspira minha jornada de vida, minha sogra Beatriz, que sempre me ajuda em tudo, sem medir esforços.

A todos os tutores que confiaram e aceitaram participar desse estudo.

Aos membros da banca de defesa que aceitaram estar comigo nesse momento e pelas sugestões que certamente contribuiram para esta dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelos ensinamentos e em especial ao Prof. Dr. Ricardo S. Vasconcellos.

À Universidade Estadual de Maringá, pelo suporte acadêmico.

Por fim, agradeço a Deus, Senhor e salvador da minha vida.

## BIOGRAFIA

BEATRIZ RIBEIRO SOUZA GOMES, filha de Mário Miranda Souza e Valéria Borges Ribeiro, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no 13 de maio de 1991.

Cursou graduação em Medicina Veterinária na Unicesumar – Centro Universitário de Maringá, no período de 2009 a 2013.

Em 2013, ainda antes da colação de grau, ingressou no mercado de trabalho atuando como médica veterinária de equinos, na área de clínica médica voltada ao cavalo de esporte, a qual se dedica até hoje.

Em 2018 tornou-se empresária no ramo veterinário. É sócia-proprietária da farmácia de manipulação exclusiva veterinária Drogavet, em Maringá –PR e Presidente Prudente – SP.

Inspirada por sua mãe que seguiu carreira acadêmica e incentivada por seu esposo, em março de 2021, iniciou no mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, área de concentração Produção Animal – Linha de Pesquisa em Melhoramento Genético Animal, sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eliane Gasparino e coorientação da Dr.<sup>a</sup> Angélica de Souza Khatlab.

No dia 29 de fevereiro de 2024, submeteu-se à banca examinadora para a defesa da dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Zootecnia.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUÇÃO.....	1
I. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
<b>1. Cães jovens e idosos.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Processo de envelhecimento.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Teoria programada.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2 Teoria de dano ou erro.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Estresse oxidativo.....</b>	<b>8</b>
<b>4. Estresse oxidativo e sua relação com o processo de envelhecimento.....</b>	<b>12</b>
<b>5. Defesa antioxidante durante o processo de envelhecimento.....</b>	<b>15</b>
<b>6. Parâmetros sanguíneos (hemograma e perfil bioquímico).....</b>	<b>16</b>
<b>7. Expressão gênica no sangue total: coleta, armazenamento do RNA e     escolha do gene de referência.....</b>	<b>19</b>
REFERÊNCIAS.....	23
II. OBJETIVOS GERAIS.....	33
III. Teste de um procedimento pré-analítico para a análise de expressão gênica no sangue total e, análise de parâmetros sanguíneos e de expressão de genes antioxidantes no sangue total de cães jovens e idosos.....	34
Resumo.....	34
Abstract.....	35
<b>Introdução.....</b>	<b>36</b>
<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>43</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>Informações de Apoio.....</b>	<b>58</b>

<b>Agradecimentos</b> .....	67
<b>Referências</b> .....	67

## LISTA DE TABELAS

	Página
III. Teste de um procedimento pré-analítico para a análise de expressão gênica no sangue total e, análise de parâmetros sanguíneos e de expressão de genes antioxidantes no sangue total de cães jovens e idosos.....	34
<b>Tabela 1. Sequência dos genes utilizados nas reações de RT-qPCR.....</b>	<b>42</b>
<b>Tabela 2. Efeito da idade sobre a expressão dos genes envolvidos na resposta antioxidante.....</b>	<b>47</b>
<b>Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão dos genes superóxido dismutase 1 (<i>SOD1</i>), catalase (<i>CAT</i>) e glutathione peroxidase 1 (<i>GPXI</i>) no sangue total de cães jovens e idosos.....</b>	<b>48</b>
<b>Tabela 4. Efeito da idade de cães sobre as análises de hemograma completo e perfil bioquímico sérico.....</b>	<b>50</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Página
I. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
<p><b>Figura 1.</b> Imagem ilustrativa de como o comportamento do cão muda à medida que ele envelhece. A linha azul mostra que a característica comportamental do cão que tem relação linear com a idade é a atividade/excitabilidade, atinge o pico na infância e reduz continuamente ao longo da vida. A linha verde mostra que a atenção do animal, atinge o pico no início da idade adulta e declina de maneira contínua a partir de então. A linha laranja mostra como o declínio cognitivo canino, aumenta de forma constante a partir dos 10 anos de idade e, em seguida, rapidamente após os 15 anos de idade. Fonte: [29].....</p>	5
<p><b>Figura 2.</b> Esquema ilustrativo proposto por Varesi et al. (2022) [90] para exemplificar a interação entre o estresse oxidativo e, a senescência. Os autores resumiram este processo da seguinte maneira: as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) quando em excesso desencadeiam a senescência por meio de diferentes mecanismos: (i) via estimulação do fator de transcrição kappa <math>\beta</math> (NF<math>\kappa</math><math>\beta</math>), que induz a transcrição dos principais fatores que compõem o fenótipo secretor associado à senescência (SASP); (ii) por meio de quebras da fita dupla do DNA, que desencadeiam uma resposta de dano ao DNA (DDR) sustentada; (iii) via encurtamento dos telômeros, que está diretamente relacionado à senescência celular; (iv) por meio da disfunção mitocondrial e da produção de ROS/RNS e (v) por meio da inibição do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), um importante fator de transcrição de genes antioxidantes. Moléculas antioxidantes não enzimáticas (exemplo: glutathione reduzida, vitamina E, ácido úrico etc.) e, enzimas antioxidantes (exemplo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX)) podem neutralizar a senescência por inibir o estresse oxidativo. ARE: elemento de resposta antioxidantes; GCL: glutamato cisteína ligase; GST: glutathione transferase; HO-1: heme oxigenase-1; IL-1<math>\beta</math>: interleucina 1<math>\beta</math>; NQO1: NAD(P)H quinona desidrogenase 1; PST: enzima fenol sulfotransferase; TNF-<math>\alpha</math>: fator de necrose tumoral <math>\alpha</math>. Fonte: Adaptado de [90].....</p>	14

III. Teste de um procedimento pré-analítico para a análise de expressão gênica no sangue total e, análise de parâmetros sanguíneos e de expressão de genes antioxidantes no sangue total de cães jovens e idosos.....	34
<b>Fig 1.</b> Esquema experimental ilustrativo.....	43
<b>Fig 2.</b> Imagem gráfica (exibição espectral) gerada durante a mensuração da concentração de RNA total pelo equipamento Nanodrop-2000c. (a) Exibição espectral do RNA de menor concentração (245,3 ng/μL) e (b) RNA de maior concentração (938,6 ng/μL).....	44
<b>Fig 3.</b> Gel de agarose 1% das amostras de RNA total obtidas do sangue total de cães jovens e idosos.....	44
<b>Fig 4.</b> Curva de melting demonstrando a especificidade dos genes endógenos β-actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e, dos genes alvos superóxido dismutase 1 ( <i>SOD1</i> ), catalase ( <i>CAT</i> ) e glutaciona peroxidase 1 ( <i>GPXI</i> ) no sangue total de cães.....	45
<b>Fig 5.</b> Valores de Ct da β-actina e do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> ) nas amostras de sangue total de cães jovens e idosos.....	46
<b>Fig 6.</b> Estabilidade de expressão dos genes endógenos β-actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase ( <i>GAPDH</i> ) classificadas pelo RefFinder.....	47
<b>Fig 7.</b> Padrão de expressão dos genes superóxido dismutase 1 ( <i>SOD1</i> ), catalase ( <i>CAT</i> ) e glutaciona peroxidase 1 ( <i>GPXI</i> ). UA - o valor de expressão dos genes é expresso como unidade arbitrária.....	48

## RESUMO

Assim como nos seres humanos, os cães também envelhecem e a compreensão do processo de envelhecimento é um objetivo comum da medicina humana e veterinária, uma vez que isso pode levar a intervenções direcionadas para as diversas doenças causadas pela idade. A melhoria das fisiopatologias e, das comorbidades associadas ao envelhecimento de certa forma, pode melhorar a qualidade de vida e, o bem-estar da população canina idosa. O envelhecimento está relacionado a diversas alterações no perfil bioquímico sérico, no hemograma completo e, na expressão de genes que afetam diferentes funções do organismo. A análise de expressão gênica é uma poderosa ferramenta, sensível e rápida que pode ser utilizada na identificação de genes expressos como potenciais biomarcadores do envelhecimento, podendo ser um preditor do envelhecimento biológico e, possivelmente, de patologias relacionadas à idade no cão. Dessa forma, é importante padronizar a análise de expressão gênica, em tecidos biológicos menos invasivo ao animal, como por exemplo, o sangue total. Em cães, não foi encontrado até o momento, nenhum estudo investigando o impacto de procedimentos pré-analíticos focados na coleta e no armazenamento do sangue e, de determinação do gene endógeno (também conhecido como gene referência) sobre a análise de expressão gênica no sangue total. Nesse sentido, nossos objetivos foram testar um método de coleta e armazenamento do sangue total, bem como determinar o gene endógeno para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos e, avaliar se cães jovens e idosos apresentam diferenças na temperatura corporal, nos batimentos cardíacos, no hemograma completo, nos perfis bioquímicos séricos e, na expressão dos genes

superóxido dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) e glutathiona peroxidase 1 (*GPXI*) avaliada no sangue total. Doze cães foram divididos em dois tratamentos: animais jovens ( $n = 6$ ; idade média = 3,9 anos), e animais idosos ( $n = 6$ , idade média = 12 anos). Para a análise de hemograma completo e perfil bioquímico sérico, 2 mL de sangue foi coletado da veia jugular com seringa e transferido imediatamente para tubos com anticoagulante (1 mL) e com ativador de coágulo (1 mL). Para a análise de expressão gênica, 1 mL de sangue da veia jugular foi coletado com seringa e, transferido imediatamente para o tubo criogênico que foi congelado em nitrogênio líquido e, em seguida foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para determinar o gene endógeno foi avaliada a especificidade e eficiência de amplificação dos genes, a variação na expressão dos genes endógenos e, a estabilidade dos genes foi avaliada por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk e pelo software RefFinder. Os dados de hemograma completo, do perfil bioquímico sérico e da expressão dos genes *SOD*, *CAT* e *GPXI*, foram avaliados por meio da ANOVA one-way e, as médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). A análise de correlação de Pearson foi realizada para avaliar a relação entre a expressão dos genes alvos ( $p < 0,05$ ). O rendimento de RNA total do sangue de cães variou de 245,3 a 938,6 ng/ $\mu\text{L}$ , e apresentou alta qualidade e integridade. As curvas de melting dos genes endógenos ( $\beta$ -actina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*)), e dos genes alvos *SOD*, *CAT* e *GPXI* demonstraram especificidade de amplificação. A eficiência de amplificação do gene  $\beta$ -actina foi de 96% e do *GAPDH* 94%. A eficiência de amplificação dos genes alvos *SOD*, *CAT* e *GPXI* foi de 108%, 99% e 102%, respectivamente. Não houve variação significativa, na expressão dos genes endógenos no sangue total de cães jovens e idosos. A expressão do gene  $\beta$ -actina seguiu distribuição normal e teve maior estabilidade na expressão no sangue de cães de diferentes idades. Não houve efeito significativo da faixa etária sobre o peso corporal, a temperatura retal e, a frequência cardíaca. Cães idosos apresentaram menor valor de expressão dos genes *SOD*, *CAT* e *GPXI*. Houve correlação positiva entre a expressão do gene *SOD* e *CAT* (0,89), *SOD* e *GPXI* (0,91), e entre a *CAT* e a *GPXI* (0,74) no sangue total dos cães. Os cães idosos apresentaram menor concentração de hemoglobina, maior porcentagem de eosinófilo, maior quantidade de plaquetas, maior quantidade de neutrófilos segmentados e, maior atividade da enzima fosfatase alcalina. Os resultados sugerem, que o método pré-analítico e o gene endógeno escolhido, podem ser aplicados com eficiência na condução da análise de expressão gênica no sangue total de cães em diferentes idades. Além disso, os resultados demonstram existir alterações bioquímicas e moleculares relevantes em cães idosos,

possivelmente como consequência do envelhecimento, uma vez que a qualidade de vida dos cães avaliados era boa e semelhante.

Palavras-chave: animais de companhia, coleta de sangue, danos oxidativos, estabilização do RNA, expressão gênica, modelo animal, nitrogênio líquido, senescência

## ABSTRACT

Just like humans, dogs also age, and understanding the aging process is a common goal of human and veterinary medicine, as this can lead to targeted interventions for various diseases caused by aging. Improving pathophysiology and comorbidities associated with aging can, in a certain way, improve the quality of life and well-being of the elderly canine population. Aging is related to several changes in the serum biochemical profile, in the complete blood count and in the expression of numerous genes that affect different functions of the organism. Gene expression analysis is a powerful, sensitive and rapid analysis that can be used to identify genes expressed as potential biomarkers of aging, and can be a predictor of biological aging and, possibly, age-related pathologies in dogs. It is therefore important to standardize gene expression analysis in biological tissues that are less invasive to the animal, such as whole blood. In dogs, to date, no study has been found investigating the impact of pre-analytical procedures (focused on blood collection and storage) and endogenous gene determination on gene expression analysis in whole blood. In this sense, this study our objectives were to test a method of collecting and storing whole blood, as well as determining the endogenous gene (also known as reference gene) for the analysis of gene expression in the whole blood of young and old dogs and, to evaluate whether young and old dogs present differences in temperature body, heart rate, complete blood count, serum biochemical profiles and expression of genes superoxide dismutase (*SOD*), catalase (*CAT*) and glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) evaluated in whole blood. Twelve dogs were divided into two treatments: young animals (n = 6; average age = 3.9 years), and elderly animals (n = 6, average age = 12 years). To analyze the complete blood count and serum biochemical profile, 2 mL of blood was

collected from the jugular vein with a syringe and immediately transferred to tubes with anticoagulant (1 mL) and clot activator (1 mL). For gene expression analysis, 1 mL of blood from the jugular vein was collected with a syringe and immediately transferred to cryogenic tube, frozen in liquid nitrogen and then stored in a freezer at -80°C. To determine the endogenous genes, the specificity and amplification efficiency of the genes and variation in the expression of the endogenous genes was evaluated. Stability of the genes was evaluated using the Shapiro-Wilk normality test and by RefFinder software. The complete blood count data, biochemical profile and expression of the *SOD*, *CAT* and *GPXI* genes were evaluated using one-way ANOVA and the means were compared using the Student's t-test ( $p < 0.05$ ). Pearson correlation analysis was performed to evaluate the relationship between the expression of target genes ( $p < 0.05$ ). The yield of total RNA from dog blood ranged from 245.3 to 938.6 ng/ $\mu$ L, and was of high quality and integrity. The melt curves of endogenous genes ( $\beta$ -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)), and target genes *SOD*, *CAT* and *GPXI* demonstrated amplification specificity. The amplification efficiency of the  $\beta$ -actin gene was 96% and that of *GAPDH* 94%. The amplification efficiency of the target genes *SOD*, *CAT* and *GPXI* was 108%, 99% and 102%, respectively. There was no significant variation in the expression of endogenous genes in whole blood from young and old dogs. The expression of the  $\beta$ -actin gene followed a normal distribution and had greater stability in expression in the blood of dogs of different ages. There was no significant effect of age group on body weight, rectal temperature and heart rate. Elderly dogs had lower expression values for the *SOD*, *CAT* and *GPXI* genes. There was a positive correlation between the expression of the *SOD* and *CAT* gene (0.89), *SOD* and *GPXI* (0.91), and between *CAT* and *GPXI* (0.74) in the dogs' whole blood. Elderly dogs had a lower hemoglobin concentration, a higher percentage of eosinophils, a higher number of platelets, greater number of segmented neutrophils and a higher activity of the alkaline phosphatase enzyme. The results suggest that the pre-analytical method and the chosen endogenous gene can be efficiently applied to conduct gene expression analysis in whole blood from dogs under different ages. Furthermore, results demonstrate that there are relevant biochemical and molecular changes in elderly dogs, possibly because of aging, since the quality of life of the evaluated dogs was good and similar.

Keywords: animal model, blood collection, companion animals, gene expression, liquid nitrogen, oxidative damage, RNA stabilization, senescence

## INTRODUÇÃO

Animais domésticos como os cães (*Canis lupus familiaris*) e os gatos (*Felis catus*), ocupam lugar importante na sociedade como animais de companhia, trabalho e lazer. Além disso, os cães são considerados importantes modelos animais para pesquisas científicas que avançaram tanto na saúde humana quanto animal [1]. Assim, como nos humanos, os cães também envelhecem e, a compreensão do processo de envelhecimento, passou a ser um objetivo comum da medicina humana e veterinária, uma vez que pode levar a intervenções direcionadas para as diversas doenças causadas pelo avanço da idade [2, 3]. A melhoria das fisiopatologias e das comorbidades associadas ao envelhecimento, de certa forma limitaria a fragilidade e melhoraria a qualidade de vida e, o bem-estar da população canina idosa [4, 5].

O envelhecimento biológico é definido como a manifestação progressiva do dano celular acumulado com a idade e, é determinado por fatores ambientais ou genéticos, e quase todos os aspectos do fenótipo do indivíduo sofrem modificações [6]. As alterações que ocorrem no organismo animal durante o envelhecimento são caracterizadas pelo declínio na capacidade do organismo em responder ao estresse, ao aumento do desequilíbrio homeostático e, ao aumento do risco do desenvolvimento de doenças que levam à morte [7]. Em cães idosos e clinicamente saudáveis, diferenças em seus perfis bioquímicos séricos e, de hemograma completo, em comparação com cães adultos mais jovens são observadas [8]. Sendo que algumas dessas diferenças são atribuídas a alterações imunosenescentes normais, enquanto outras indicam patologia precoce ou fisiologia alterada [8]. Estas alterações em conjunto são referidas como envelhecimento ou senescência e, um aspecto importante da senescência é a regulação positiva da resposta inflamatória e, o aumento do dano oxidativo que se manifesta como um estado pró-inflamatório crônico de baixo nível [9].

O fenótipo do envelhecimento é determinado por pelo menos dez características celulares e, moleculares candidatas do envelhecimento [10, 11], entre estas características, está a disfunção mitocondrial, que tem sido considerada como um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e, o declínio funcional do organismo [12, 13]. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria, aumenta durante o envelhecimento, enquanto a capacidade de defesa antioxidante torna-se reduzida com a idade, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo [13, 14], que prejudica significativamente a função dos órgãos e, está envolvido na etiologia e patogênese de diversas doenças [15]. Geralmente em condições fisiológicas normais, um sistema integrado de defesa antioxidante existente no organismo do animal, é capaz de controlar a produção das ROS e, neutralizar ou reparar os danos oxidativos, nas biomoléculas, mantendo dessa forma o equilíbrio redox celular [16].

Conforme sugerido por Surai et al. (2019) [16], o organismo animal dispõe de três níveis de defesa antioxidante, sendo o primeiro constituído pelas três principais enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase. Essas enzimas são responsáveis pela desintoxicação do radical logo no início do processo de sua formação. O segundo nível da defesa antioxidante, inclui principalmente antioxidantes eliminadores de radicais livres, como a vitamina E, o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GSH), o ácido úrico etc. O terceiro nível de defesa antioxidante é aquele que promove o reparo de moléculas danificadas (exemplo: metionina sulfóxido redutase, proteínas de choque térmico, enzimas reparadoras de DNA etc.), ou faz a remoção destas (por exemplo, fosfolipases e proteossomos) [16].

Estudos conduzido com cães idosos têm demonstrado redução dependente da idade na função mitocondrial, aumento na produção de ROS [17], alteração na produção de imunoglobulinas, na capacidade de responder ao estresse oxidativo intracelular, aumento no dano oxidativo aos ácidos nucléicos e na inflamação [7]. Além disso, cães idosos também apresentam redução no número de neurônios positivos para a enzima SOD [18], aumento progressivo no nível de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, menor atividade da enzima glutamina sintetase e, menor nível da glutathiona reduzida no cérebro [19].

A teoria do envelhecimento do estresse oxidativo, sugere que as perdas funcionais associadas à idade são devidas ao acúmulo de danos oxidativos causados pelas espécies reativas oxidantes em macromoléculas (lipídios, DNA nuclear, DNA mitocondrial e proteínas) que não podem ser reparados [20]. As lesões oxidativas no DNA nuclear, assim

como no DNA mitocondrial, pode modificar o padrão de expressão gênica e promover falhas na síntese de proteínas, causando o mau funcionamento de uma série de vias metabólicas, incluindo a via de defesa antioxidante [21], alterando desta forma a função ideal do organismo [22]. Além disso, o dano oxidativo tem sido associado ao encurtamento dos telômeros, contribuindo para o processo de envelhecimento e para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade [23].

Estudos anteriores investigaram os efeitos da idade sobre enzimas antioxidantes, marcadores de oxidação e alterações na expressão gênica em tecidos biológicos como o cérebro de cães [18, 19, 24]. Contudo, a preocupação da sociedade com o bem-estar dos cães, usados em pesquisas, tem resultado no desenvolvimento de inúmeras leis e diretrizes restritivas para o uso desses animais. Visto que o cão é um modelo animal de envelhecimento para humanos [25, 26], e que a detecção precoce de alterações no organismo destes animais pode ser útil para melhorar a qualidade de vida durante o envelhecimento [2, 24], é importante padronizar análises incluindo as moleculares, mais especificamente de expressão gênica, em tecidos biológicos mais acessíveis e menos invasivo ao animal, como por exemplo, o sangue total que é uma fonte de RNA. De acordo com Vartanian et al. (2009) [27] a expressão gênica no sangue é um método utilizado para identificar biomarcadores, determinar doenças e investigar respostas imunológicas. Shahid et al. (2020) [28] demonstraram que a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo no sangue pode refletir o comportamento desses genes no fígado, sugerindo que a expressão gênica no sangue explora novos biomarcadores não invasivos e que representam danos ao fígado.

Nesse contexto, nossos objetivos foram: (1) testar um método de coleta e estabilização do material genético, bem como determinar o gene endógeno para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos e, (2) avaliar se cães jovens e idosos apresentam diferenças na temperatura corporal, nos batimentos cardíacos, nos perfis bioquímicos séricos, no hemograma completo, e na expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante avaliado no sangue total.

## I. REVISÃO DE LITERATURA

### 1. Cães jovens e idosos

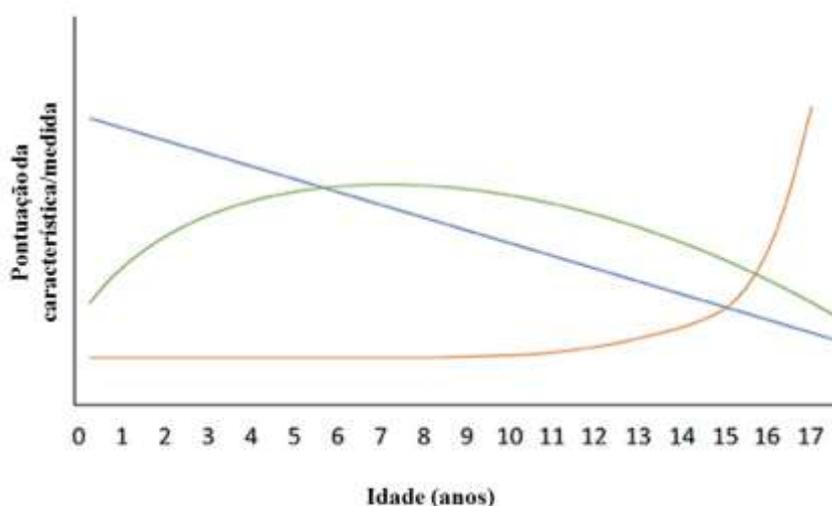
O desenvolvimento inicial do cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é dividido em cinco fases, sendo elas (1) pré-natal, (2) neonatal (do nascimento aos 12 a 13 dias), (3) transicional (14 a 20 dias após o nascimento), (4) socialização (21 a 84 dias) e (5) juvenil (12 a 52–104 semanas após o nascimento) [29]. A fase de desenvolvimento juvenil é a mais longa e, é nesta fase que os animais entram na adolescência, período no qual o filhote faz a transição para a fase adulta e, atinge a puberdade [29].

Considera-se que a puberdade seja efetivamente alcançada em cães com idades entre 6 e 9 meses nos machos e, entre 6 e os 16 meses nas fêmeas [30]. A maturidade comportamental e, social dos cães pode ser alcançada entre os 12 e os 24 meses de idade e, existe a suposição de que esta maturidade seja diferente dependendo da raça e do tamanho do animal [31].

Cães com idade entre 12 e 24 meses, podem ser classificados como adultos jovens, e com 2 anos de idade o cão passa a ser considerado adulto maduro. De forma geral, sugere-se que 7 anos seja a idade limiar para definir os cães como sêniores ou idosos, contudo, esta idade pode variar para mais ou menos em função da raça, do porte, da genética e da saúde geral dos animais [29]. Ainda, para fins de pesquisas que necessitam de informações mais precisas, o período sênior que compreende a faixa etária de 7 a 11 anos de idade pode ser dividido em sênior inicial (7 a 9 anos) e sênior final (10 a 11 anos), e esta divisão deve-se em função de diferenças observadas em cães nessas faixas etárias [29, 32].

Os cães jovens são animais mais sociáveis e companheiros, apresentam mais energia, excitabilidade, ludicidade, envolvimento ativo, extroversão, atenção e maior capacidade de resposta ao treino [33]. Por outro lado, os cães sêniores são animais menos ativos, tem menor capacidade de interação com outros cães ou pessoas, apresentam comportamento menos ansioso/destrutivo, disfunção cognitiva e podem passar a ter maior sensação de medo de ser manuseado, de ruídos e de humanos [33] (Figura 1). Segundo Wallis et al. (2020) [33] essas mudanças comportamentais em função da idade dos animais, podem estar relacionadas a diversos fatores, incluindo o ambiente e as alterações fisiológicas intrínsecas dos animais, que ocorrem durante cada ano vivido. Por exemplo, Starling et al. (2013) [34] sugeriram que a redução da ousadia (exemplo: treinabilidade,

disposição para brincar com humanos etc.) em cães com mais de 13 anos pode ser explicada por condições degenerativas, como por exemplo, a artrite relacionada à idade. Isso porque, os cães idosos podem sentir dores e desconfortos físicos e, podendo fazer com que esses animais corram menos riscos e deixem de interagir com outros cães ou pessoas.



**Figura 1.** Imagem ilustrativa de como o comportamento do cão muda à medida que ele envelhece. A linha azul mostra que a característica comportamental do cão que tem relação linear com a idade é a atividade/excitabilidade, atinge o pico na infância e reduz continuamente ao longo da vida. A linha verde mostra que a atenção do animal, atinge o pico no início da idade adulta e declina de maneira contínua a partir de então. A linha laranja mostra como o declínio cognitivo canino, aumenta de forma constante a partir dos 10 anos de idade e, em seguida, rapidamente após os 15 anos de idade. Fonte: [29].

## 2. Processo de envelhecimento

O envelhecimento é um processo biológico multifatorial e complexo, em que quase todos os aspectos do fenótipo do indivíduo sofrem modificações [6]. O processo de envelhecimento é definido de maneira geral, como a redução progressiva da função fisiológica, metabólica e da aptidão com o passar dos anos, cujo processo é derivado endogenamente e de forma irreversível para o organismo [6]. O que aumenta a vulnerabilidade dos animais, aos desafios fisiológicos internos e ambientais externos, bem como tornam os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças e a morte [35].

O acúmulo de erros estocásticos, lesões diversas e danos celulares derivados do metabolismo celular normal é inevitável [36]. Segundo Ricklefs (2008) [37], os

organismos assim como as máquinas sofrem desgastes ao longo dos anos, e as macromoléculas (proteínas, os lipídios, DNA nuclear e DNA mitocondrial), que compõe o corpo do animal, sofrem inúmeros danos causados por processos oxidativos e outras alterações bioquímicas. Além disso, as células morrem e não são substituídas, e os tecidos acumulam depósitos de metabólitos prejudiciais a função do organismo e, geralmente essas alterações podem causar colapso do sistema vital [37]. Por causa do acúmulo dessas características deletérias, todos os aspectos do fenótipo de um organismo são modificados durante o avançar da idade [13].

O envelhecimento é influenciado tanto por fatores endógenos, como por exemplo, o relógio biológico ou a programação genética (fatores necessários para que esse processo ocorra ao longo da vida), quanto por fatores exógenos que influenciam o ritmo e a velocidade que o envelhecimento ocorre, acelerando os processos degenerativos e reduzindo o índice de sobrevivência, quando estes são desfavoráveis [38].

Não se conhece com exatidão quais são os fatores que estão envolvidos no processo de envelhecimento, contudo, existem inúmeras teorias do envelhecimento. Inicialmente Medvedev (1990) [39] listou mais de 300 teorias sobre este processo biológico, entretanto, os fundamentos teóricos de investigação do envelhecimento foram simplificados ao longo dos anos. As teorias biológicas modernas sobre o envelhecimento dividem-se em duas categorias principais: teorias programadas e teorias de danos ou erros [39, 40].

Segundo Jin (2010) [41] as teorias programadas sugerem que o envelhecimento segue uma espécie de calendário biológico, podendo ser a continuação daquele que regula o crescimento e, o desenvolvimento infantil. Sendo que, o mecanismo regulatório dependeria de alterações na expressão de genes, que afetam as mais diferentes vias metabólicas, incluindo aquelas responsáveis pela manutenção, reparo e respostas de defesa. As teorias de dano ou erro, de acordo com Jin (2010) [41] sugerem que as agressões ambientais aos organismos vivos, induzem danos que se acumulam com o tempo e sejam a causa do envelhecimento.

## **2.1. Teoria programada**

Essa teoria é dividida em três subcategorias: longevidade programada, teoria endócrina e teoria imunológica [41]. Na longevidade programada, sugere-se que o envelhecimento, seja o resultado da ativação e desativação sequencial de determinados genes, sendo o envelhecimento o momento em que se manifesta o mau funcionamento na

ativação e, desativação gênica em razão da idade [40, 41]. Na teoria endócrina, sugere-se que o relógio biológico do animal, atue por meio de hormônios para controlar o ritmo do envelhecimento [41]. Estudos têm demonstrado que o envelhecimento é um processo regulado por meio de hormônios e, que a via de sinalização da insulina/fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1) esteja envolvida na regulação hormonal do envelhecimento [41-44]. Por fim, a teoria imunológica, considera que o sistema imune, esteja programado para reduzir sua função ao longo dos anos, o que causaria nos animais maior susceptibilidade a doenças infecciosas e, portanto, ao envelhecimento e à morte [41, 45]. Por exemplo, à medida que o animal envelhece, os anticorpos perdem a eficiência e menor número de novas doenças pode ser combatido eficazmente pelo organismo, que por sua vez causaria o estresse celular e eventual morte [46].

## **2.2. Teoria de dano ou erro**

Essa teoria está dividida em teoria do desgaste, teoria da taxa de vida, teoria das ligações cruzadas, teoria dos radicais livres e teoria do dano somático ao DNA [41]. A teoria do desgaste, considera que as células e os tecidos possuem partes vitais que se desgastam ao longo do tempo, resultando em envelhecimento [38]. Na teoria de taxa de vida, postula-se que quanto maior for a taxa de metabolismo basal de oxigênio do indivíduo, menor será sua expectativa de vida [47]. Segundo Hulbert et al. (2007) [48] embora a teoria da taxa de vida do envelhecimento seja útil, ela não é totalmente adequada para explicar a expectativa de vida máxima do indivíduo. Bjorksten em 1942 [49] propôs a teoria de ligações cruzadas e, esta teoria considera que o acúmulo de proteínas reticuladas danifica as células e os tecidos, prejudicando os processos corporais, resultando em envelhecimento.

A teoria dos radicais livres foi desenvolvida por Harman em 1956 [50], sendo que esta teoria sugere que o radical superóxido, e outros radicais livres, causem danos aos componentes celulares, promovam o acúmulo de danos oxidativos fazendo com que as células e, eventualmente os órgãos parem de funcionar [41, 51]. Os ácidos nucleicos, o DNA mitocondrial, os lipídios, os açúcares e as proteínas são moléculas vulneráveis ao ataque dos radicais livres [41]. Afanas'ev (2010) [52] mostrou que a sinalização de espécies reativas de oxigênio, é provavelmente a via enzimática/gênica mais importante e, a responsável pelo desenvolvimento da senescência celular e do envelhecimento do organismo. Além disso, o autor sugere que a sinalização das ROS possa ser considerada como um desenvolvimento adicional da teoria dos radicais livres de envelhecimento.

A teoria do dano somático ao DNA, sugere que o DNA sofre danos continuamente e que apesar da maioria destes danos serem reparados, alguns podem acumular ao longo do tempo, uma vez que as DNA polimerases e outros mecanismos de reparação não conseguem corrigir os defeitos tão rápido, como os mesmos parecem ser produzidos [40]. Nessa situação mutações no material genético ocorrem e, acumulam-se com o aumento da idade, causando a deterioração e o mau funcionamento das células [41, 53]. Mais especificamente, danos no DNA mitocondrial podem causar disfunção na mitocôndria e, portanto, verifica-se que o envelhecimento surge como resultado de danos à integridade genética das células do corpo [41].

López-Otín et al. (2013) [10] identificaram e categorizaram as características celulares e moleculares do envelhecimento e, propuseram nove características candidatas, sendo elas, (1) a instabilidade genômica, (2) o encurtamento dos telômeros, (3) a alteração epigenética (exemplo: modificação de histonas, remodelação da cromatina e metilação do DNA), (4) a perda de proteostase, (5) a desregulação da detecção de nutrientes, (6) a disfunção mitocondrial, (7) a senescência celular, (8) a exaustão de células-tronco e, (9) a alteração da comunicação intercelular. Existe ainda a proposta que o comprometimento do processo de autofagia seja a décima marca registrada do envelhecimento [11]. De acordo com López-Otín et al. (2013) [10], estas características geralmente são consideradas como contribuintes para o processo de envelhecimento, e juntas determinam o fenótipo do envelhecimento animal.

### **3. Estresse oxidativo**

O organismo animal ao cumprir suas funções metabólicas normais, produzem diversas espécies reativas que incluem os radicais livres e, outros derivados reativos não radicais [54]. Radical livre pode ser definido de maneira geral, como um átomo ou molécula instável, de vida curta e altamente reativo, que contém um ou mais elétrons desemparelhados na camada de valência ou órbita externa e, é capaz de ter existência independente [55]. Por causa da alta reatividade, eles podem emparelharem com elétrons de outros compostos (radicais ou não) para atingir estabilidade [54]. Enquanto a molécula atacada perderá seu elétron e, tornar-se-á um radical livre, iniciando a cascata de reações em cadeia que podem culminar em danos a célula viva [56].

Os compostos considerados reativos não radicais, por sua vez, não possuem elétrons livres, são menos instáveis que os radicais livres, entretanto, estes compostos podem reagir com moléculas e outros radicais livres formando substâncias potencialmente

tóxicas [57, 58]. Portanto, são definidos como potentes agentes oxidantes, ou como componentes que podem facilmente ser convertidos em radicais oxidantes [59].

As espécies reativas de oxigênio (ROS, moléculas que contêm oxigênio em sua composição) e de nitrogênio (RNS, moléculas que contêm nitrogênio em sua composição), descrevem coletivamente os radicais livres mais comuns e, outros derivados reativos não radicais, também chamados de pró-oxidantes/oxidantes [54, 55]. Essas espécies de caráter oxidante, são classificadas como radicais livres e, espécies não radicais, em função da existência ou não de elétrons desemparelhados em suas estruturas [57]. Exemplos de radicais livres incluem o ânion superóxido, o radical hidroxila, os radicais peróxidos, o óxido nítrico, o dióxido de nitrogênio e o óxido nitroso [60]. O ozônio, o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso, o ânion peroxinitrito e os aldeídos estão entre as espécies oxidantes consideradas como não radicais [60].

No organismo animal as ROS e RNS são formadas a partir de fontes endógenas ou exógenas [55]. As espécies oxidantes endógenas são geradas comumente no organismo animal por diversos motivos, por exemplo, pela ativação de células imunes, a inflamação, a situação de estresse, a prática de exercício excessivo, a isquemia, a infecção, ao câncer e ao envelhecimento [54]. Por outro lado, a formação de espécies oxidantes no corpo por causa das fontes exógenas, é resultante do contato do indivíduo com a poluição do ar e da água, da fumaça de cigarro, a certos medicamentos e a radiação, por exemplo [61]. A formação das ROS/RNS ocorre a partir da penetração desses compostos exógenos no corpo, por meio de diferentes vias e pela decomposição ou metabolização em radicais livres [15].

Mais especificamente a formação de ROS/RNS no organismo ocorre por meio de reações enzimáticas, que geram como subprodutos os radicais livres, incluindo reações envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas e no sistema do citocromo P450 [54]. Por exemplo, o ânion superóxido é produzido por meio de diferentes sistemas de oxidase celular, como a NADPH oxidase, a xantina oxidase e as peroxidases [15, 62]. Após ser formado, o superóxido participa de outras reações produzindo diferentes ROS e RNS, como peróxido de hidrogênio, o radical hidroxila, o peroxinitrito, dentre outros [15]. O peróxido de hidrogênio (espécie não radical) é formado pela ação de várias enzimas oxidases, como a aminoácido oxidase e a xantina oxidase [15]. O radical hidroxila (radical livre mais reativo), é formado pela reação do superóxido com o peróxido de hidrogênio na presença de catalisadores como o ferro

(Fe<sup>2+</sup>) ou o cobre (Cu<sup>+</sup>) [63]. O radical óxido nítrico é formado nos tecidos biológicos a partir da oxidação da L-arginina em citrulina pelo óxido nítrico sintase [64].

Os radicais livres também podem ser formados a partir de reações não enzimáticas, a partir da reação do oxigênio com compostos orgânicos, ou por meio de reações celulares iniciadas por radiações ionizantes [15]. Além disso, a produção de radicais livres por meios não enzimáticos também pode ocorrer durante a respiração mitocondrial [65].

A produção endógena de ROS está principalmente relacionada ao metabolismo celular, mais especificamente, durante a respiração celular, isso porque, parte do oxigênio utilizado pelas mitocôndrias para produzir energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP), está envolvida na produção de ROS, especialmente dentro da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, em que ocorre a fosforilação oxidativa [66]. Sendo que aproximadamente 90% de todas as ROS são produzidas pelas mitocôndrias [67].

De forma resumida, a formação de ROS durante o processo de produção de energia pelas mitocôndrias, pode ser descrita como modelo de cascata que ocorre da seguinte forma: à medida que ocorre a oxidação do dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADH) e do dinucleotídeo de flavina adenina (FADH<sub>2</sub>), os elétrons fluem em sequência para outros complexos da cadeia respiratória. Na última etapa, no complexo IV (citocromo c) os elétrons são transferidos para o oxigênio e formando água [55]. No entanto, antes que os elétrons alcancem o complexo IV, pode ocorrer um vazamento de oxigênio nos complexos anteriores e, a combinação do oxigênio com esses elétrons formam o ânion superóxido ao invés da água [55]. Como a produção do superóxido não é enzimática, quanto maior for a taxa metabólica do animal, maior será a produção de ROS [68]. Em condições adversas como durante a infecção e o estresse oxidativo, o superóxido e o óxido nítrico podem ser secretados simultaneamente e interagirem para gerar peroxinitrito, uma espécie altamente reativa capaz de nitrosar resíduos de tirosina, intensificando o dano oxidativo iniciado pelas ROS [69].

Na tentativa de combater danos oxidativos, logo em seguida a produção do superóxido, este será rapidamente convertido em uma reação de dismutação catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD) em oxigênio e peróxido de hidrogênio [70]. Em termos químicos, o peróxido de hidrogênio é pouco reativo e, não oxida diretamente as macromoléculas e, o DNA que não tenham grupos tiol hiper-reativos ou resíduos de cisteína e metionina na estrutura [71]. Contudo, o peróxido de hidrogênio pode interagir com o íon ferro, que é utilizado por todos os tipos de células na catálise de muitas reações e transições metabólicas essenciais [72, 73], e a interação entre o peróxido

de hidrogênios e o ferro, forma o radical hidroxila que é altamente reativo nos sistemas biológicos [72]. Portanto, o modo de oxidação celular do peróxido de hidrogênio, ocorre indiretamente por meio da sua reação com o íon ferro [72, 74].

Segundo Halliwell (1989) [75] o íon hidroxila é o radical que apresenta a mais alta reatividade química conhecida, podendo atacar e danificar quase todas as moléculas encontradas nas células vivas. Ainda, Di Meo e Venditti (2020) [76], citam que o íon hidroxila tornou-se amplamente aceito, como a principal toxina produzida *in vivo*. A fim de evitar maiores danos celulares, o peróxido de hidrogênio recém-formado na reação iniciada pela SOD, é convertido em moléculas de água e oxigênio, pela ação das enzimas catalase, glutatona peroxidase e peroxiredoxinas [72, 77, 78].

Outro processo de produção de ROS específico das mitocôndrias, é o transporte reverso de elétrons, que promove a superprodução de superóxido quando a coenzima Q é excessivamente reduzida pelo complexo II ou o succinato é usado em excesso devido à hipóxia [79].

Como a produção de ROS/RNS e outras espécies reativas oxidantes no organismo animal, é um processo constante durante os processos metabólicos, os animais dispõem de uma rede de defesa antioxidante para equilibrar eficazmente o processo de formação e inativação/desintoxicação de ROS/RNS [16]. Essa rede de defesa antioxidante é responsável por manter níveis baixos das substâncias oxidantes nocivas ao organismo, mas, ainda acima de zero [16], ao eliminar e/ou convertê-las em produtos não tóxicos, a fim de prevenir e reduzir os danos oxidativos. Surai et al. (2019) [16] sugeriram três níveis principais de defesa antioxidante na célula, sendo o primeiro nível constituído por três principais enzimas antioxidantes, a SOD, a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase. Essa primeira linha de defesa antioxidante é responsável pela desintoxicação do radical logo no início do processo de sua formação [16]. O segundo nível da defesa antioxidante, inclui principalmente antioxidantes eliminadores de radicais livres, como a vitamina E, o ácido ascórbico, a glutatona reduzida (GSH), o ácido úrico etc. O terceiro nível de defesa antioxidante é aquele que promove o reparo de moléculas danificadas (exemplo: metionina sulfóxido redutase, proteínas de choque térmico, enzimas reparadoras de DNA etc.) ou faz a remoção destas (por exemplo, fosfolipases e proteossomos) [16].

As ROS/RNS quando estão em concentrações baixas ou moderadas são necessárias e exercem inúmeras funções benéficas no organismo, como por exemplo, a maturação de estruturas celulares, a participação em mecanismos de defesa imune durante o processo de infecção, sinalização celular, indução de resposta mitogênica, atuação como

mediadores para a transferência de elétrons em diversas reações bioquímicas, geração de energia por meio da cadeia transportadora de elétrons, sinalização celular, ativação de genes etc. [53, 80]. De acordo com Surai et al. (2019) [16], as ROS atuam estreitamente com diversos fatores de transcrição e vitagenes (processos de manutenção e reparo na célula), sendo responsáveis pela adaptação ao estresse, homeostase e manutenção da saúde.

Por outro lado, alta concentração de ROS/RNS devido ao comprometimento da rede de defesa antioxidante, ou à produção excessiva de ROS como resultado de condições de alto estresse, causa o fenômeno conhecido como estresse oxidativo por promover danos oxidativos reversíveis e irreversíveis as principais biomoléculas, incluindo, proteínas, lipídeos e DNA, alterando-as ou inativando-as [16, 54].

#### **4. Estresse oxidativo e sua relação com o processo de envelhecimento**

Apesar de existir inúmeras teorias do envelhecimento, nenhuma é universalmente aceita. Entretanto, a teoria dos radicais livres mitocondriais e, a disfunção mitocondrial tem sido considerada como um dos principais mecanismos, que contribuem para o envelhecimento e, o declínio funcional do organismo [12, 13]. Isso porque durante o envelhecimento, as mitocôndrias tornam-se maiores e menos numerosas, a atividade respiratória mitocondrial reduz, enquanto os danos nas moléculas mitocondriais (DNA mitocondrial, proteínas e lipídios) aumentam [81].

A disfunção mitocondrial ocorre por meio de múltiplos mecanismos interligados, que incluem o acúmulo de mutações no DNA mitocondrial e, a proteostase alterada (deficiente), levando a desestabilização dos complexos da cadeia respiratória, a redução da renovação da organela e a alterações na dinâmica mitocondrial [36]. A produção de ROS pela mitocôndria aumenta durante o envelhecimento, enquanto a capacidade de defesa antioxidante torna-se reduzida com a idade, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo [13, 14]. Sendo que muitas vezes causa aumento paralelo na quantidade de dano oxidativo, resultando em ciclo vicioso que causa esgotamento de energia celular, dano oxidativo e a morte celular [13, 14].

Assim, a teoria do envelhecimento do estresse oxidativo, sugere que as perdas funcionais associadas à idade são pelo acúmulo de danos oxidativos causados pelas espécies reativas oxidantes em macromoléculas (lipídios, DNA nuclear, DNA mitocondrial e proteínas) que não podem ser reparados [20]. Além disso, o dano oxidativo tem sido associado também ao encurtamento dos telômeros, que contribui para o processo

de envelhecimento e para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade [23]. Em cães idosos, Jimenez et al. (2018) [82], observaram maior respiração basal e vazamento de prótons, e Head et al. (2009) [17] demonstraram que houve redução dependente da idade na função mitocondrial e, no aumento na produção de ROS. Alexander et al. (2018) [7] demonstraram que cães idosos sofrem alteração na produção de imunoglobulinas e, na capacidade de responder ao estresse oxidativo intracelular. Além disso, os autores demonstram que houve aumento no dano oxidativo aos ácidos nucleicos e na inflamação em cães idosos.

O mecanismo exato do envelhecimento induzido pelo estresse oxidativo, ainda não está claro, mas existe a suposição de que níveis elevados de ROS podem ativar a proteína adaptadora p66Shc (proteína pró-apoptótica), induzindo produção adicional de ROS, causando à apoptose e mantendo um processo de envelhecimento constante [83]. Outra suposição existente, é que o aumento dos níveis de ROS (estresse oxidativo) provoca lesões no DNA, acelera o encurtamento dos telômeros e, ativa vias moleculares que levam à parada do crescimento e, causa senescência celular que consiste em mecanismo fisiológico, que interrompe a proliferação celular em resposta a danos que ocorrem durante a replicação [20]. A senescência celular é um contribuidor chave para o envelhecimento do organismo, uma vez que as células senescentes são acumuladas de forma robusta nos tecidos envelhecidos [84, 85].

As células senescentes adquirem um fenótipo secretor associado a senescência irreversível (SASP), envolvendo a secreção de fatores solúveis (interleucinas, quimiocinas e fatores de crescimento), de enzimas degradativas como as metaloproteases de matriz e componentes de proteínas insolúveis/matriz extracelular [4, 20, 86]. O estresse oxidativo é também um dos mediadores diretos da SASP, por exemplo, por meio da resposta de dano ao DNA (DDR) persistente [86, 87].

Conforme revisado por Liguori et al. (2018) [20] e Iakovou e Kourti (2022) [88] as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, induzem a senescência celular, agindo em vários componentes do SASP (Figura 2), descritos a seguir:

- (1) regulação das funções relacionadas a proteína alvo mecanicista da rapamicina (mTOR);
- (2) produção de interleucina-1 $\alpha$ , causando um estado pró-inflamatório, que aumenta a atividade do fator nuclear kappa- $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ), a transição epitelial-mesenquimal e a progressão metastática do tumor;

(3) indução da expressão de metaloproteases de matriz, que está associada a doenças crônicas e relacionadas à idade;

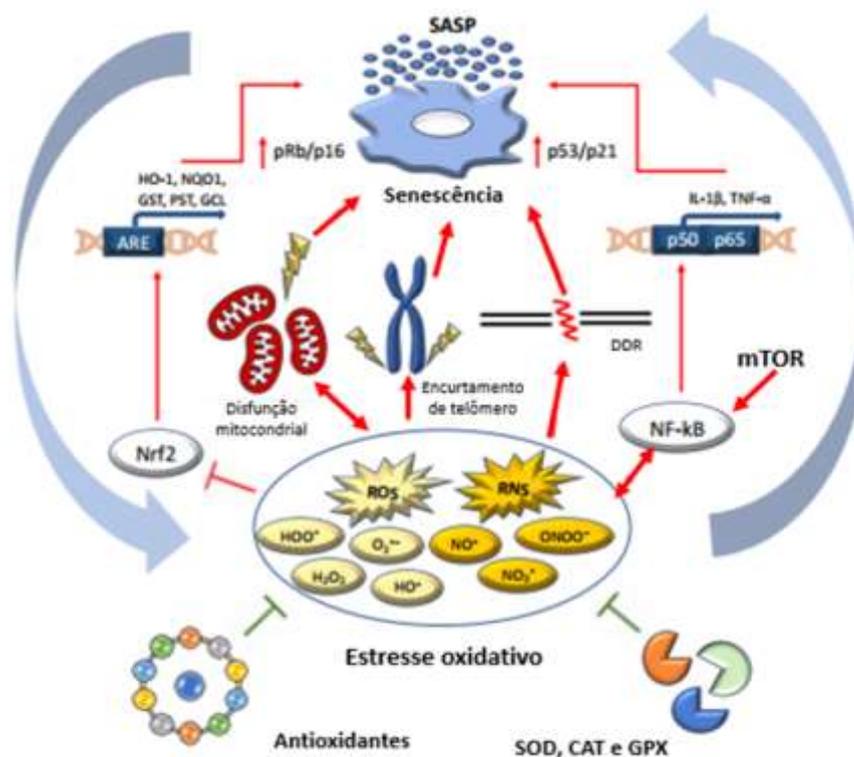
(4) inibição da atividade das proteínas Forkhead box (FOXO), que está envolvida na proteção mediada pela via de sinalizada da insulina/do fator de crescimento semelhante à insulina 1 contra o estresse oxidativo;

(5) redução da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático e endoplasmático causando à senescência cardíaca;

(6) inibição da atividade das sirtuínas, que causa aumento na produção de RON/RNS pela inibição da enzima SOD, estado pró-inflamatório ao prevenir a inibição do fator de necrose tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ) e  $\text{NF}\kappa\beta$ , e causa efeito tumorigênico ao prevenir seu efeito inibitório em c-Jun e c-Myc;

(7) regulação das vias  $\text{p16}^{\text{INK4a}}/\text{pRB}$  e  $\text{p53}/\text{p21}$  levando à senescência e

(8) falha na resposta antioxidante por defeitos no fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) [89].



**Figura 2.** Esquema ilustrativo proposto por Varesi et al. (2022) [90] para exemplificar a interação entre o estresse oxidativo e, a senescência. Os autores resumiram este processo da seguinte maneira: as espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) quando em excesso desencadeiam a senescência por meio de diferentes mecanismos: (i) via

estimulação do fator de transcrição kappa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ), que induz a transcrição dos principais fatores que compõem o fenótipo secretor associado à senescência (SASP); (ii) por meio de quebras da fita dupla do DNA, que desencadeiam resposta de dano ao DNA (DDR) sustentada; (iii) via encurtamento dos telômeros, que está diretamente relacionado à senescência celular; (iv) por meio da disfunção mitocondrial e da produção de ROS/RNS e (v) por meio da inibição do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide 2 (Nrf2), um importante fator de transcrição de genes antioxidantes. Moléculas antioxidantes não enzimáticas (exemplo: glutathiona reduzida, vitamina E, ácido úrico etc.) e, enzimas antioxidantes (exemplo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX)) podem neutralizar a senescência por inibir o estresse oxidativo. ARE: elemento de resposta antioxidantes; GCL: glutamato cisteína ligase; GST: glutathiona transferase; HO-1: heme oxigenase-1; IL-1 $\beta$ : interleucina 1 $\beta$ ; NQO1: NAD(P)H quinona desidrogenase 1; PST: enzima fenol sulfotransferase; TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$ .  
Fonte: Adaptado de [90].

## **5. Defesa antioxidante durante o processo de envelhecimento**

O declínio da eficiência dos sistemas de defesa antioxidantes, juntamente com níveis elevados de ROS, está relacionado ao processo de envelhecimento [13]. Em condições normais, a manutenção dos níveis das ROS em quantidades não nocivas ao organismo, é mantido por uma rede de defesa antioxidante celular. Contudo, durante o envelhecimento, ocorrem alterações na homeostase das ROS em direção a um estado de estresse oxidativo [13].

As lesões oxidativas no DNA nuclear, e no DNA mitocondrial podem modificar o padrão de expressão gênica e, promover falhas na síntese de proteínas e, conseqüentemente alterar a função ideal do organismo [22]. Possivelmente causa mecanismo de feedback positivo na geração de níveis extensivos de ROS [91]. Existe a sugestão de que a alteração do padrão de expressão gênica ocorra pelo acúmulo de danos no DNA, que por sua vez atrapalham a RNA polimerase II, enquanto ela tenta transcrever a fita molde em RNA [21]. Quando a RNA polimerase II atinge um ponto danificado, ela para e fica presa, interferindo na transcrição e, causando o mau funcionamento de uma série de vias celulares importantes, incluindo a via de defesa antioxidante [21].

O mecanismo pelo qual a eficiência da resposta antioxidante dos animais idosos reduz, não está totalmente elucidada. Entretanto, sugere-se que o declínio dependente da idade na resposta das enzimas antioxidantes, seja causado pela redução da eficiência da

via de sinalização do fator nuclear eritroide 2/elemento de resposta eletrofilica (Nrf2/EpRE) [92]. Os níveis de expressão basal e indutível das enzimas antioxidantes, que estão envolvidas na desintoxicação e, na eliminação de oxidantes reativos, são regulados pelo menos em parte, por meio da ativação da via de sinalização Nrf2/EpRE [92]. O Nrf2 é o fator mestre de transcrição que controla a expressão basal e indutível de centenas de enzimas antioxidantes e desintoxicantes [92, 93]. Embora, exista ampla diversidade no efeito da idade sobre a expressão basal de enzimas antioxidantes, existe um consenso de que a capacidade de induzir estas enzimas pelos eletrófilos diminui com a idade [92]. Estudos mostraram que a indutibilidade das enzimas antioxidantes dependentes do Nrf2, estava significativamente reduzida nos pulmões, no fígado e no cerebelo de camundongos de meia-idade [92, 94], e que a perda de indutibilidade estava correlacionada com o aumento da expressão de inibidores do Nrf2 (exemplo: proteína reguladora de transcrição - Bach1 e família de genes reguladores e proto-oncogenes - c-Myc) [95]. Zhang et al. (2012) [94] sugerem que o aumento observado em Bach1 em camundongos idosos pode explicar, em parte, a perda de indutibilidade de alguns genes regulados pelo Nrf2. Zhou et al. (2018) [95] demonstraram que a expressão basal dos genes regulados por Nrf2, aumentou com o envelhecimento enquanto a indutibilidade foi reduzindo durante o envelhecimento. Os autores sugeriram então, que o aumento da expressão de supressores de Nrf2 como o Bach1 e o c-Myc, possa ter contribuído para a redução da indutibilidade dos genes antioxidantes que são regulados pelo Nrf2 com o envelhecimento.

Kiatipattanasakul et al (1997) [18], por meio de ensaio imuno-histoquímico observaram em cães a redução relacionada à idade no número de neurônios positivos para a enzima SOD, sugerindo que pode aumentar a toxicidade dos radicais livres e resultar em morte celular neuronal. Head et al. (2002) [19], observaram aumentos progressivos dependentes da idade no nível de peroxidação lipídica e, oxidação de proteínas, menor atividade da enzima glutamina sintetase (enzima que prediz a vulnerabilidade do tecido ao dano oxidativo) e, menor nível da glutathiona reduzida (antioxidante não enzimático) no cérebro.

## **6. Parâmetros sanguíneos (hemograma e perfil bioquímico)**

Cães idosos clinicamente saudáveis demonstram inúmeras diferenças em seus perfis bioquímicos séricos e de hemograma completo, em comparação com cães adultos mais jovens [8]. Sendo que algumas dessas diferenças são atribuídas a alterações

imunosenescentes normais, enquanto outras indicam possível patologia precoce ou fisiologia alterada, que justifica investigação mais aprofundada [8]. Assim, os exames hematológicos são indicados como ideais para investigar alterações nas propriedades fisiológicas dos cães, por serem exames mais objetivos e, com maior especificidade do que os exames físicos de rotina isolados [96]. Lee et al. (2020) [3] citam que é comum em cães idosos a utilização de exames de sangue, para compreender os efeitos biológicos do envelhecimento e, para identificar doenças específicas relacionadas ao envelhecimento.

Em cães idosos, alterações hematológicas como a anemia, a redução do volume corpuscular médio (VCM) e, alterações bioquímicas, como a redução da proteína sérica, o aumento do colesterol e do nível de ureia são evidentes e, são correlacionadas com a disfunção do fígado, dos rins, do coração, do baço, do sistema nervoso e do músculo esquelético. Essas alterações em nível sistêmico ou de órgãos, juntamente com outras doenças, podem causar à perda de funcionalidade, eficiência e agilidade do animal durante a fase final da vida [97].

O perfil de hemoglobina, a contagem total de eritrócitos, o VCM reduzido e o aumento de plaquetas em cães idosos, pode ser explicado pela redução da atividade da medula óssea, de esplenomegalia e da redução da produção de eritrócitos [97]. Além disso, o menor valor de hemácias também pode ser por causa da doença renal crônica, que resulta na redução da produção de eritropoietina e, da capacidade da medula óssea em produzi-la, o que, em última circunstância, resulta na menor produção de células vermelhas [97]. Idosos clinicamente saudáveis geralmente apresentam inflamação crônica de baixo grau mesmo na ausência de patógenos [98], sendo esta inflamação caracterizada pelo estado pró-trombótico causado pela ativação mútua de neutrófilos e plaquetas [99].

Em cães idosos, também é comum o aumento dos níveis de proteínas totais séricas e, este aumento é composto por concentrações mais elevadas de globulina (devido ao aumento das concentrações de imunoglobulina A sérica), que juntamente com a redução da albumina indica um padrão inflamatório clássico para estas proteínas [8]. O aumento da globulina está intimamente relacionado com casos de câncer, doença hepática crônica e diabetes mellitus, por outro lado menores níveis de albumina estão associados à desnutrição, infecção crônica e doença nefrótica, sendo um dos principais sintomas fisiológicos da senescência [3]. Lee et al. (2020) [3] verificaram que os cães mais velhos, apresentaram níveis significativamente mais elevados de proteína total do que cães mais

jovens e, sugeriram que o parâmetro de proteína total poderia ser utilizado para a identificação do processo de envelhecimento.

A contagem de leucócitos totais quando aumentada, com maior contagem média de neutrófilos e concentrações de linfócitos e, hematócritos com valores baixos, em cães idosos, pode ser por causa da infecção sistêmica secundária [96], por perda de sangue por sangramento gastrointestinal e imunossenescência [8, 100]. Com relação as enzimas hepáticas, o aumento na atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA), em relação ao valor de referência em cães idosos tem sido atribuído a diversas condições fisiológicas incluindo a colestase, o hiperadrenocorticismismo subjacente, o estresse crônico, a pancreatite crônica, a doença infiltrativa e a inflamação intestinal/enterite [8].

Os níveis de glicose geralmente em cães idosos são menores do que em cães jovens e, a explicação mais provável é que os estoques de glicogênio hepático reduzem com a idade e, outra possibilidade é a redução da massa hepática funcional [8]. Além disso, alterações multiendócrinas, incluindo aquelas associadas a alterações na estrutura e função da glândula adrenal podem ocorrer durante o envelhecimento [101]. Essas alterações estão associadas a mudanças na produção hormonal, como por exemplo, o aumento gradual e sustentado da secreção de glicocorticóides [101]. Sendo que, a alteração mais notável tanto em humanos como nos cães, é o aumento geral dos níveis médios diários de cortisol sérico nos idosos [101, 102]. O cortisol é um hormônio catabólico e, o maior nível deste hormônio em idosos é de particular interesse, já que maior nível de cortisol tem sido associado a características clínicas de fragilidade, como a perda de peso, a redução de massa muscular e a anorexia [103].

Radakovich et al. (2017) [8], avaliaram diferenças no hemograma e nos valores bioquímicos sanguíneos entre cães adultos (jovens) e idosos de diferentes raças. Os autores verificaram que cães idosos clinicamente saudáveis, apresentaram alterações nas variáveis laboratoriais avaliadas (hematócrito, leucócitos, plaquetas, proteínas totais e suas frações, glicose, colesterol, fósforo, creatinina, ureia, ferro, potássio e enzimas hepáticas). Sugerindo que os resultados encontrados indicam possíveis alterações fisiológicas, incluindo evidências de eritropoiese com restrição de ferro, aumento de colesterol e enzimas hepáticas como a ALT e sangramento gastrointestinal.

Lee et al. (2020) [3], conduziram um estudo com cães idosos a fim de definir um conjunto de biomarcadores hematológicos/bioquímicos, que influenciam o processo de envelhecimento. A análise hematológica/bioquímica foi realizada para avaliar parâmetros

significativamente associados à idade. Sendo, portanto, realizadas as seguintes análises: (1) hemograma completo que avaliou glóbulos vermelhos, glóbulos brancos, hematócrito, hemoglobina e contagens de plaquetas, neutrófilos, basófilos, leucócitos, monócitos, linfócitos e eosinófilos. O volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina celular média, a concentração média de hemoglobina corpuscular, a largura de distribuição dos glóbulos vermelhos e o volume plaquetário médio (VPM). (2) Teste de painel químico sérico que incluiu a mensuração de sódio, potássio, cloro, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, nitrogênio ureico no sangue, creatinina, glicose, bilirrubina total, albumina, proteína total, gama glutamiltransferase, fósforo inorgânico e níveis de cálcio. (3) Mensuração das concentrações do hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1 (IGF-1). Os autores observaram diferenças marcantes no nível de glicose e de proteínas totais, bem como na concentração do GH e do IGF-1 entre cães jovens e idosos, sugerindo que estes são potenciais biomarcadores envolvidos na regulação do processo de envelhecimento em cães de grande/médio porte.

## **7. Expressão gênica no sangue total: coleta, armazenamento do RNA e escolha do gene de referência**

O processo de envelhecimento animal, está relacionado a uma gama de fatores, incluindo as alterações no padrão de expressão gênica, que afeta as mais diferentes funções celulares e, predispõem o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade [104]. Dessa forma, a identificação de genes expressos como potenciais biomarcadores do envelhecimento, pode ser um preditor promissor do envelhecimento biológico e, possivelmente, de patologias relacionadas à idade no cão [24]. Isso de forma benéfica pode em um futuro próximo, fornecer potenciais alvos terapêuticos que possam retardar o aparecimento de doenças associadas à idade, melhorando as respostas protetoras e suprimindo alterações prejudiciais [105].

Nesse sentido, a identificação do perfil de expressão gênica associada à idade dos animais, tornou-se prioridade nas pesquisas sobre envelhecimento e, diferentes técnicas moleculares têm sido empregadas para tal finalidade, como por exemplo, a expressão diferencial de genes [106], o microarray [107], o RNA-seq [108] e a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) [24].

O sangue total é uma fonte de RNA que pode ser utilizada na análise de expressão gênica e, tem como principal vantagem a facilidade de coleta e a menor invasividade

[109]. De acordo com Vartanian et al. (2009) [27] a expressão gênica no sangue é um método informativo utilizado para identificar biomarcadores, determinar doenças e investigar respostas imunológicas. Joehanes et al. (2012) [110] citam que células linfoblastoides, células do sangue total e células mononucleares do sangue periférico têm sido utilizadas em estudos de expressão gênica para identificação de biomarcadores. Esses autores explicam que a análise no sangue total detecta os perfis de RNA de todas as células que compõem o sangue total, incluindo eritrócitos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), linfócitos, monócitos e plaquetas. Enquanto nas células mononucleares do sangue periférico, os perfis de RNA são detectados apenas nas células derivadas de um subconjunto de linfócitos e monócitos.

Segundo Vartanian et al. (2009) [27], embora exista vantagens significativas na análise de RNA isolado de sangue total, ao ser considerada a preparação de amostras para análise de microarranjos é necessário minimizar artefatos associados a transcritos de RNA de globina que são abundantes no sangue total. Sendo comum nos laboratórios o fracionamento de componentes do sangue total antes da extração de RNA, para remover os glóbulos vermelhos e facilitar o estudo de populações de células mais homogêneas. Entretanto, de acordo com esses autores embora a contaminação do RNA da globina possa ser um obstáculo em determinadas análises moleculares, existem razões convincentes para avaliar a expressão gênica no sangue total e não em subpopulações celulares sanguíneas. Por exemplo, para obter perfis de expressão que reflitam o transcriptoma no ato da coleta de sangue e para minimizar artefatos de manipulação de amostras, é preferível evitar o processamento, já que algum grau de ativação celular pode ocorrer durante o fracionamento celular. Além disso, Vartanian et al. (2009) [27] explicaram que mesmo quando o fracionamento celular é realizado, os transcritos de mRNA da globina  $\alpha$  e  $\beta$  são frequentemente os transcritos mais abundantes do RNA total extraído de populações enriquecidas com leucócitos [111] e, o próprio fracionamento pode aumentar a variabilidade da amostra utilizada na análise de microarray [112]. Por fim, os autores citam que existem inúmeras populações de células no sangue total e se todas elas puderem ser analisadas de forma conjunta, a economia financeira é substancial. Além disso, o menor tempo de análise é outra vantagem e, se as amostras estiverem sendo coletadas em locais diferentes, a metodologia facilita a uniformidade que por outro lado pode ser cada vez menor quando ocorre o processamento do sangue.

A RT-qPCR é uma ferramenta molecular de alta precisão, sensibilidade, reprodutibilidade e alto rendimento, sendo uma das técnicas mais prevalentemente

utilizadas para avaliar e, quantificar a expressão de genes em tempo real, de forma rápida e específica [108]. Geralmente, os padrões de expressão gênica entre cães jovens e idosos têm sido avaliados no tecido cerebral [24] e muscular [24, 107], entretanto, esse mesmo parâmetro pode ser avaliado em tecidos biológicos mais acessíveis e, menos invasivos aos animais, como por exemplo, no sangue total [24, 106, 113]. Sendo que a principal vantagem de utilizar o sangue como amostra, é que pode ser facilmente coletado dos animais, em um procedimento que causa pouco ou nenhum desconforto ou estresse no animal [106]. Estudos avaliando a expressão gênica em cães geralmente são feitos com amostras de banco de cérebros caninos [114], amostras obtidas de animais que morreram por outras razões que não a participação em estudo [115], amostras de biópsias [116] ou de animais que são eutanasiados intencionalmente ao final do experimento [107].

Os procedimentos que antecedem as análises de RT-qPCR, como a coleta e o armazenamento dos tecidos, podem comprometer os resultados desta análise [117]. A qualidade e a quantidade dos ácidos nucleicos (DNA/RNA) podem ser fortemente afetadas pelo meio de conservação das amostras (estabilização do material genético) [118]. Sendo então, este um aspecto importante a ser considerado, uma vez que RNA com alto grau de pureza e integridade são necessárias para a análise de expressão gênica [117].

Como pode ocorrer degradação do material genético nos tecidos biológicos e, pelo fato dos transcritos de RNA apresentarem instabilidade *ex vivo*, métodos de manuseio e, de armazenamento das amostras, mais eficientes são imprescindíveis [119, 120]. Dentre os métodos de armazenamento, podem citar o uso de protetores de RNA, que são soluções aquosas não tóxicas, que permeia rapidamente a amostra para estabilizar e proteger o RNA da degradação por RNases além de minimiza as mudanças *ex vivo* na expressão gênica (exemplo: tubo de RNA sanguíneo PAXgene™, tubo de RNA sanguíneo Tempus™, reagente de estabilização RNAlater®) e, outro método bastante utilizado é o congelamento das amostras em nitrogênio líquido [121-123].

Uma das formas de avaliar os resultados da quantificação da RT-qPCR é pela quantificação relativa, que é baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene referência (endógeno), cuja função principal é minimizar os erros da PCR em tempo real [117]. A normalização destes genes referências, controla variações no rendimento de extração, rendimento de transcrição reversa e, na eficiência de amplificação, já que estes são genes constitutivos e não variam sob condições experimentais [117]. Portanto, a precisão da RT-qPCR também depende da disponibilidade de genes de referência, que mantenham níveis de expressão estáveis nas condições testadas, para serem utilizados

como controles endógenos para normalização da reação [117, 124]. Portanto, a identificação de genes de referência adequados é de fato crucial para o correto desenvolvimento da RT-qPCR [104]. Os genes referências/endógenos mais comumente utilizados incluem a  $\beta$ -actina, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), a proteína ribossomal 19 e, o RNA ribossomal 18S [125, 126].

A expressão dos genes de referência/endógenos varia sob diferentes condições e, segundo Touchberry et al. (2007) [127], genes de referência frequentemente utilizados nas pesquisas com foco no envelhecimento, mostram variação na expressão dependente da idade. Refletindo a importância de validação da estabilidade da expressão dos genes de referência, selecionados para quantificar corretamente os níveis de expressão gênica durante o envelhecimento [104].

## REFERÊNCIAS

1. National Research Council (US) Committee on Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research. Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research. 2. Use of Dogs and Cats in Research: Public Perception and Evolution of Laws and Guidelines. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009.
2. Stowe HD, Lawler DF, Kealy RD. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J Nutr.* 2006;136: 1844-1848.
3. Lee SH, Kim JW, Lee BC, Oh HJ. Age-specific variations in hematological and biochemical parameters in middle- and large-sized of dogs. *J Vet Sci.* 2020;21: 1-13.
4. Chandrasekaran A, Idelchik MDPS, Melendez JA. Redox control of senescence and age-related disease. *Redox Biol.* 2017;11: 91-102.
5. McKenzie BA, Chen F, LaCroix-Fralish ML. The phenotype of aging in the dog: how aging impacts the health and well-being of dogs and their caregivers. *J Am Vet Med Assoc.* 2022;260: 963-970.
6. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Sig Transduct Target Ther.* 2022;7, 1-40.
7. Alexander JE, Colyer A, Haydock RM, Hayek MG, Park J. Understanding How Dogs Age: Longitudinal Analysis of Markers of Inflammation, Immune Function, and Oxidative Stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73: 720-728.
8. Radakovich LB, Pannone SC, Truelove MP, Olver CS, Santangelo KS. Hematology and biochemistry of aging-evidence of "anemia of the elderly" in old dogs. *Vet Clin Pathol.* 2017;46: 34-45.
9. Sendama W. The effect of ageing on the resolution of inflammation. *Ageing Res Rev.* 2020;57: 1-6.
10. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013;153: 1194-1217.
11. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging.* 2021;1: 634-650.
12. Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med.* 2008;263: 167-178.
13. Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging hallmarks and the role of oxidative stress. *Antioxidants (Basel).* 2023;12: 1-37.

14. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, Patalas-Krawczyk P, et al. Mitochondria and reactive oxygen species in aging and age-related diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340: 209-344.
15. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, et al. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017: 1-13.
16. Surai PF, Kochish II, Fisinin VI, Kidd MT. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: an update. *Antioxidants (Basel).* 2019;8: 1-36.
17. Head E, Nukala VN, Fenoglio KA, Muggenburg BA, Cotman CW, Sullivan PG. Effects of age, dietary, and behavioral enrichment on brain mitochondria in a canine model of human aging. *Exp Neurol.* 2009;220: 171-176.
18. Kiatipattanasakul W, Nakamura S-i, Kuroki K, Nakayama H, Doi K. Immunohistochemical detection of anti-oxidative stress enzymes in the dog brain. *Neuropathol.* 1997;17: 307-312.
19. Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J Neurochem.* 2002;82: 375-381.
20. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Gargiulo G, Testa G, Cacciatore F, Bonaduce D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging.* 2018;13: 757-772.
21. Agapov A, Olina A, Kulbachinskiy A. RNA polymerase pausing, stalling and bypass during transcription of damaged DNA: from molecular basis to functional consequences. *Nucleic Acids Res.* 2022;50: 3018-3041.
22. Ghosh A, Shcherbik N. Effects of Oxidative Stress on Protein Translation: Implications for Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21: 1-25.
23. Gavia-García G, Rosado-Pérez J, Arista-Ugalde TL, Aguiñiga-Sánchez I, Santiago-Osorio E, Mendoza-Núñez VM. Telomere Length and Oxidative Stress and Its Relation with Metabolic Syndrome Components in the Aging. *Biology (Basel).* 2021;10: 1-29.
24. Sándor S, Tátrai K, Czeibert K, Egyed B, Kubinyi E. *CDKN2A* gene expression as a potential aging biomarker in dogs. *Front Vet Sci.* 2021;8: 1-8.
25. Sándor S, Kubinyi E. Genetic pathways of aging and their relevance in the dog as a natural model of human aging. *Front Genet.* 2019;10: 1-34.
26. Ruple A, MacLean E, Snyder-Mackler N, Creevy KE, Promislow D. Dog Models of Aging. *Annu Rev Anim Biosci.* 2022;10: 419-439.

27. Vartanian K, Slotke R, Johnstone T, Casale A, Planck SR, Choi D, Smith JR, Rosenbaum JT, Harrington CA. Gene expression profiling of whole blood: comparison of target preparation methods for accurate and reproducible microarray analysis. *BMC Genomics*. 2009;10: 2.
28. Shahid M, Idrees M, Butt AM, Raza SM, Amin I, Rasul A, Afzal S. Blood-based gene expression profile of oxidative stress and antioxidant genes for identifying surrogate markers of liver tissue injury in chronic hepatitis C patients. *Arch Virol*. 2020;165:809-822.
29. Harvey ND. How old is my dog? Identification of rational age groupings in pet dogs based upon normative age-linked processes. *Front Vet Sci*. 2021;8: 1-6.
30. Concannon PW. Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Sci*. 2011;124: 200-210.
31. Beaver BV. Canine Social Behavior. In: Bonnie V. Beaver, editor. *Canine Behavior. Insights Insights and answers*. Saunders; 2009. pp. 133-192.
32. Studzinski CM, Christie LA, Araujo JA, Burnham WM, Head E, Cotman CW, Milgram NW. Visuospatial function in the beagle dog: an early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. *Neurobiol Learn Mem*. 2006;86: 197-204.
33. Wallis LJ, Szabó D, Kubinyi E. Cross-Sectional Age Differences in Canine Personality Traits; Influence of Breed, Sex, Previous Trauma, and Dog Obedience Tasks. *Front Vet Sci*. 2020;6: 1-17.
34. Starling MJ, Branson N, Thomson PC, McGreevy PD. "Boldness" in the domestic dog differs among breeds and breed groups. *Behav Processes*. 2013;97: 53-62.
35. Schneider JL, Rowe JH, Garcia-de-Alba C, Kim CF, Sharpe AH, Haigis MC. The aging lung: Physiology, disease, and immunity. *Cell*. 2021;184: 1990-2019.
36. Silva PFL, Schumacher B. Principles of the molecular and cellular mechanisms of aging. *J Invest Dermatol*. 2021;141: 951-960.
37. Ricklefs RE. The evolution of senescence from a comparative perspective. *Funct. Ecol*. 2008;22: 379-392.
38. Park DC, Yeo SG. Aging. *Korean J Audiol*. 2013;17: 39-44.
39. Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1990;65: 375-398.
40. Davidovic M, Sevo G, Svorcan P, Milosevic DP, Despotovic N, Erceg P. Old age as a privilege of the "selfish ones" *Aging and Disease*. 2010;1: 139–146.
41. Jin K. Modern biological theories of aging. *Aging Dis*. 2010;1: 72-74.

42. van Heemst D. Insulin, IGF-1 and longevity. *Aging Dis.* 2010;1: 147-157.
43. Li WJ, Wang CW, Tao L, Yan YH, Zhang MJ, Liu ZX, Li YX, et al. Insulin signaling regulates longevity through protein phosphorylation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun.* 2021;12: 1-16.
44. Yang NC, Chin CY, Zheng YX, Lee I. The attenuation of insulin/IGF-1 signaling pathway plays a crucial role in the myo-inositol-alleviated aging in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci.* 2023;24: 1-17.
45. Weyand CM, Goronzy JJ. Aging of the immune system: Mechanisms and therapeutic targets. *Ann Am Thorac Soc.* 2016;13: S422-S428.
46. Aiello A, Farzaneh F, Candore G, Caruso C, Davinelli S, Gambino CM, Ligotti ME, et al. Immunosenescence and its hallmarks: how to oppose aging strategically? a review of potential options for therapeutic intervention. *Front. Immunol.* 2019;10: 1-19.
47. Brys K, Vanfleteren JR, Braeckman BP. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol.* 2007;42: 845-851.
48. Hulbert AJ, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer WA. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiol Rev.* 2007;87: 1175-1213.
49. Bjorksten J. The crosslinkage theory of aging. *J Am Geriatr Soc.* 1968;16: 408-427.
50. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol.* 1956;11: 298-300.
51. Harman D. Free radical theory of aging: an update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006;167: 10-21.
52. Afanas'ev I. Signaling and damaging functions of free radicals in aging-free radical theory, hormesis, and TOR. *Aging Dis.* 2010;1: 75-88.
53. Kennedy SR, Loeb LA, Herr AJ. Somatic mutations in aging, cancer and neurodegeneration. *Mech Ageing Dev.* 2012;133: 118-126.
54. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci.* 2008;4: 89-96.
55. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015;30: 11-26.
56. Eiz I. Significant Role of free radicals in inflammation. *Oxid Antioxid Med Sci.* 2022;11: 1-2.
57. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994;34: 721-724.

58. Magder, S. Reactive oxygen species toxic molecules or spark of life. *Critical Care*. 2006;10: 208-216.
59. Genestra M. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell Signal*. 2007;19: 1807-1819.
60. Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001;18: 685-716.
61. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE. Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiol Rev*. 2014;94: 329-354.
62. Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, D'andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health. *Oxygen*. 2022;2: 48-78.
63. Schneider CD, Oliveira AR. Oxygen free radicals and exercise: mechanisms of synthesis and adaptation to the physical training. *Rev Bras Med Esporte*. 2004;10: 314-318.
64. Habib S, Ali A. Biochemistry of nitric oxide. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26: 3-17.
65. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39: 44-84.
66. Checa J, Aran JM. Reactive oxygen species: drivers of physiological and pathological processes. *J Inflamm Res*. 2020;13: 1057-1073.
67. Srivastava S. The Mitochondrial Basis of Aging and Age-Related Disorders. *Genes (Basel)*. 2017;8: 1-23.
68. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000;408: 239-247.
69. Kaludercic N, Giorgio V. The Dual function of reactive oxygen/nitrogen species in bioenergetics and cell death: the role of atp synthase. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016: 1-18.
70. Azadmanesh J, Borgstahl GEO. A Review of the catalytic mechanism of human manganese superoxide dismutase. *Antioxidants*. 2018;7: 1-16.
71. Halliwell B. The antioxidant paradox. *Lancet*. 2000;355: 1179-1180.
72. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141: 312-322.
73. Mahaseth T, Kuzminov A. Potentiation of hydrogen peroxide toxicity: From catalase inhibition to stable DNA-iron complexes. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017;773: 274-281.

74. Collin F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. *Int J Mol Sci.* 2019;20: 1-17.
75. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989; 82: 747-52.
76. Di Meo S, Venditti P. Evolution of the Knowledge of free radicals and other oxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020: 1-32.
77. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med.* 2005;38: 1543-1552.
78. Aoyama K, Nakaki T. Glutathione in cellular redox homeostasis: association with the excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1). *Molecules.* 2015;20: 8742-8758.
79. Scialò F, Fernández-Ayala DJ, Sanz A. Role of mitochondrial reverse electron transport in ROS signaling: potential roles in health and disease. *Front Physiol.* 2017;8: 1-7.
80. Shields HJ, Traa A, Van Raamsdonk JM. Beneficial and detrimental effects of reactive oxygen species on lifespan: a comprehensive review of comparative and experimental studies. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9: 1-27.
81. Bratic I, Trifunovic A. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797: 961-967.
82. Jimenez AG, Winward J, Beattie U, Cipolli W. Cellular metabolism and oxidative stress as a possible determinant for longevity in small breed and large breed dogs. *PLoS One.* 2018;13: 1-20.
83. Galimov ER. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae.* 2010;2 :44-51.
84. Ressler S, Bartkova J, Niederegger H, Bartek J, Scharffetter-Kochanek K, Jansen-Dürr P, Wlaschek M. p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging Cell.* 2006;5: 379-389.
85. Velarde MC, Flynn JM, Day NU, Melov S, Campisi J. Mitochondrial oxidative stress caused by Sod2 deficiency promotes cellular senescence and aging phenotypes in the skin. *Aging (Albany NY).* 2012;4: 3-12.
86. Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 2010;5: 99-118.
87. McCarthy DA, Clark RR, Bartling TR, Trebak M, Melendez JA. Redox-control of the senescence regulator Interleukin-1  $\alpha$  and the secretory phenotype. *J. Biol. Chem.* 2013;288: 32149–32159.

88. Iakovou E, Kourti M. A Comprehensive overview of the complex role of oxidative stress in aging, the contributing environmental stressors and emerging antioxidant therapeutic interventions. *Front Aging Neurosci.* 2022;14: 1-29.
89. Yu C, Xiao J-H. The Keap1-Nrf2 System: A mediator between oxidative stress and aging. *oxidative med. Cell. Longev.* 2021;2021: 1-16.
90. Varesi A, Chirumbolo S, Campagnoli LIM, Pierella E, Piccini GB, Carrara A, Ricevuti G, The role of antioxidants in the interplay between oxidative stress and senescence. *Antioxidants (Basel).* 2022;11: 1-42.
91. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012: 1-13.
92. Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B): 314-336.
93. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci.* 2022;291: 1-13.
94. Zhang H, Liu H, Davies KJ, Sioutas C, Finch CE, Morgan TE, Forman HJ. Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;52: 2038–2046.
95. Zhou L, Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells. *Redox Biol.* 2018: 35-40.
96. Metzger FL, Rebar AH. Clinical pathology interpretation in geriatric veterinary patients. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012;42: 615-629.
97. Pati S, Panda SK, Acharya AP, Senapati S, Behera M, Behera SS. Evaluation of geriatric changes in dogs. *Vet World.* 2015;8: 273-278.
98. Van Avondt K, Strecker JK, Tulotta C, Minnerup J, Schulz C, Soehnlein O. Neutrophils in aging and aging-related pathologies. *Immunol Rev.* 2023;314: 357-375.
99. Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol.* 2022;19: 177-191.
100. Blount DG, Pritchard DI, Heaton PR. Age-related alterations to immune parameters in Labrador retriever dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;108: 399–407.
101. Yiallouris A, Tsioutis C, Agapidaki E, Zafeiri M, Agouridis AP, Ntourakis D, Johnson EO. Adrenal aging and its implications on stress responsiveness in humans. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10: 1-12.

- 102.** Reul JM, Rothuizen J, de Kloet ER. Age-related changes in the dog hypothalamic-pituitary-adrenocortical system: neuroendocrine activity and corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40: 63-69.
- 103.** Clegg A, Young J, Iliffe S, Rikkert MO, Rockwood K. Frailty in elderly people. *Lancet.* 2013;381: 752–762.
- 104.** González-Bermúdez L, Anglada T, Genescà A, Martín M, Terradas M. Identification of reference genes for RT-qPCR data normalisation in aging studies. *Sci Rep.* 2019;9: 1-11.
- 105.** Viñuela A, Brown AA, Buil A, Tsai PC, Davies MN, Bell JT, Dermitzakis ET, Spector TD, Small KS. Age-dependent changes in mean and variance of gene expression across tissues in a twin cohort. *Hum Mol Genet.* 2018;27: 732-741.
- 106.** Jónás D, Tátrai K, Egyed B, Kubinyi E. Differential gene expression analysis of the whole blood transcriptome between young and old companion border collie dogs. *Res Square.* 2022;1: 1-12.
- 107.** Middelbos IS, Vester BM, Karr-Lilienthal LK, Schook LB, Swanson KS. Age and Diet Affect Gene Expression Profile in Canine Skeletal Muscle. *PLoS ONE.* 2019;4: 1-**106.**
- 108.** Kim HS, Jang S, Kim J. Genome-wide integrative transcriptional profiling identifies age-associated signatures in dogs. *Genes.* 2023;14: 1-13.
- 109.** Artika IM, Dewi YP, Nainggolan IM, Siregar JE, Antonjaya U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. *Genes (Basel).* 2022;13: 1-21.
- 110.** Schwochow D, Serieys LE, Wayne, RK, Thalmann O. Efficient recovery of whole blood RNA - a comparison of commercial RNA extraction protocols for high-throughput applications in wildlife species. *BMC Biotechnol.* 2012;12: 1-12.
- 111.** Joehanes R, Johnson AD, Barb JJ, Raghavachari N, Liu P, Woodhouse KA, O'Donnell CJ, Munson PJ, Levy D. Gene expression analysis of whole blood, peripheral blood mononuclear cells, and lymphoblastoid cell lines from the Framingham Heart Study. *Physiol Genomics.* 2012;44: 59-75.
- 112.** Feezor RJ, Baker HV, Mindrinos M, Hayden D, Tannahill CL, Brownstein BH, Fay A, MacMillan S, Laramie J, Xiao W, Moldawer LL, Cobb JP, Laudanski K, Miller-Graziano CL, Maier RV, Schoenfeld D, Davis RW, Tompkins RG. Whole blood and leukocyte RNA isolation for gene expression analyses. *Physiol Genomics.* 2004;19: 247-254.
- 112.** Fan H, Hegde PS. The transcriptome in blood: challenges and solutions for robust expression profiling. *Curr Mol Med.* 2005;5: 3-10.

113. Tesfamichael DH, Wood MW, Pritchard JC. Comparison of commercial manual extraction kits for RNA isolation from canine whole blood. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2020;32: 737-741.
114. Sándor S, Czeibert K, Salamon A, Kubinyi E. Man's best friend in life and death: scientific perspectives and challenges of dog brain banking. *Geroscience.* 2021; 43: 1653-1668.
115. Saetre P, Lindberg J, Leonard JA, Olsson K, Pettersson U, Ellegren H, Bergström TF, Vilà C, Jazin E. From wild wolf to domestic dog: gene expression changes in the brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004;126: 198-206.
116. Wood SH, Clements DN, Ollier WE, Nuttall T, McEwan NA, Carter SD. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *J Dermatol Sci.* 2009;55: 27-33.
117. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009;55: 611-622.
118. Simister RL, Schmitt S, Taylor W. Evaluating methods for the preservation and extraction of DNA and RNA for analysis of microbial communities in marine sponges. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 2011;397: 38-43.
119. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. *Biotechnol Lett.* 2006;28: 1601-1613.
120. Franken C, Remy S, Lambrechts N, Hollanders K, Den Hond E, Schoeters G. Peripheral blood collection: the first step towards gene expression profiling. *Biomarkers.* 2016;21: 458-654.
121. Liu L, Han R, Yu N, Zhang W, Xing L, Xie D, Peng D. A method for extracting high-quality total RNA from plant rich in polysaccharides and polyphenols using *Dendrobium huoshanense*. *PLoS One.* 2018;13: 1-9.
122. Duale N, Brunborg G, Rønningen KS, Briese T, Aarem J, Aas KK, Magnus P, Stoltenberg C, Susser E, Lipkin WI. Human blood RNA stabilization in samples collected and transported for a large biobank. *BMC Res Notes.* 2012;5: 1-9.
123. Weber DG, Casjens S, Rozynek P, Lehnert M, Zilch-Schöneweis S, Bryk O, Taeger D, et al. Assessment of mRNA and microRNA Stabilization in Peripheral Human Blood for Multicenter Studies and Biobanks. *Biomark Insights.* 2010;5: 95-102.

124. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 2005;6: 279-284.
125. Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol.* 2009;10: 1-13.
126. RÁCZ GA, Nagy N, Tóvári J, Apáti Á, Vértessy BG. Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep.* 2021;11: 1-14.
127. Touchberry C.D., Wacker M.J., Richmond S.R., Whitman S.A., Goddard M.P. Age-related changes in relative expression of real-time PCR housekeeping gene in human skeletal muscle. *J. Biomol. Tech.* 2006;17: 157–162.

## II. OBJETIVOS GERAIS

Nossos objetivos com este estudo foram: (1) testar fatores pré-analíticos, como o método de coleta e armazenamento do sangue total para manter a estabilidade do material genético, bem como determinar o gene endógeno (também conhecido como gene referência) mais eficiente para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos e, (2) avaliar se cães jovens e idosos apresentam diferenças na temperatura corporal, nos batimentos cardíacos, no hemograma completo, nos perfis bioquímicos séricos e, na expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante (superóxido dismutase 1, catalase e glutathione peroxidase 1) avaliada no sangue total.

III. Teste de um procedimento pré-analítico para a análise de expressão gênica no sangue total e, análise de parâmetros sanguíneos e de expressão de genes antioxidantes no sangue total de cães jovens e idosos

Short title: Expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos

(PLos One)

### Resumo

Nossos objetivos foram testar um método de coleta e armazenamento do sangue total, bem como determinar o gene endógeno mais eficiente para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos e, avaliar se cães de diferentes idades apresentam diferenças na temperatura corporal, nos batimentos cardíacos, no hemograma completo, no perfil bioquímico sérico e, na expressão dos genes superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutathione peroxidase 1 (*GPXI*) avaliada no sangue total. Doze cães foram divididos em dois tratamentos: animais jovens (n = 6; idade média = 3,9 anos), e animais idosos (n = 6, idade média = 12 anos). Para a análise de hemograma completo e perfil bioquímico sérico, 2 mL de sangue foi coletado da veia jugular com seringa e, então 1 mL de sangue foi transferido para um tubo com anticoagulante (avaliação de parâmetros plasmáticos) e 1 mL do sangue foi transferido para outro tubo com ativador de coágulo (parâmetros sorológicos). Para a análise de expressão gênica, 1 mL de sangue da veia jugular, foi coletado com seringa e, em seguida foi transferido para um tubo criogênico, congelado em nitrogênio líquido e posteriormente essas amostras foram armazenadas em freezer a -80°C. Para determinar o gene endógeno foi avaliada a especificidade e eficiência de amplificação dos genes, a variação na expressão e, a estabilidade do gene endógeno por meio do teste de normalidade Shapiro-Wilk e pelo software RefFinder. Os dados de hemograma completo, do perfil bioquímico e da expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*, foram avaliados por meio da ANOVA one-way e as médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). A análise de correlação de Pearson foi realizada para avaliar a relação entre a expressão dos genes alvos ( $p < 0,05$ ). O rendimento de RNA total do sangue de cães variou de 245,3 a 938,6 ng/ $\mu$ L, e apresentou alta qualidade e integridade. As curvas de melting dos genes endógenos ( $\beta$ -actina e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*)), e dos genes alvos *SOD1*, *CAT* e *GPXI* demonstraram especificidade de amplificação. A eficiência do gene  $\beta$ -actina foi de 96% e do *GAPDH* 94%. A eficiência dos genes alvos *SOD1*, *CAT* e *GPXI* foi de 108%, 99%

e 102%, respectivamente. A expressão do gene  $\beta$ -actina seguiu distribuição normal e teve melhor estabilidade. Cães idosos apresentaram menor valor de expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*. Houve correlação positiva entre a expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI* no sangue total. Os cães idosos apresentaram menor concentração de hemoglobina, maior porcentagem de eosinófilo, maior quantidade de neutrófilos segmentados, plaquetas e atividade da enzima fosfatase alcalina. Os resultados sugerem que o método pré-analítico e o gene endógeno escolhido, podem ser aplicados com eficiência na condução da análise de expressão gênica no sangue total de cães em diferentes idades. Além disso, os resultados demonstram existir alterações bioquímicas e moleculares relevantes em cães idosos, possivelmente como consequência do envelhecimento.

### **Abstract**

Our objectives were to test a method of collecting and storing whole blood, as well as the endogenous gene for gene expression analysis in the whole blood of young and old dogs and, to evaluate whether young and old dogs present differences in body temperature, heart rate, in the complete blood count, in serum biochemical profiles and in the expression of genes superoxide dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) and glutathione peroxidase 1 (*GPXI*) evaluated in whole blood. Twelve dogs were divided into two treatments: young animals (n = 6; average age = 3.9 years), and elderly animals (n = 6, average age = 12 years). For the analysis of complete blood count and serum biochemical profile, 2 mL of blood was collected from the jugular vein with a syringe and then 1 mL of blood was transferred to a tube with anticoagulant (evaluation of plasma parameters) and 1 mL of blood was transferred to another tube with clot activator (serological parameters). For gene expression analysis, 1 mL of blood from the jugular vein was collected with a syringe and then transferred to a cryogenic tube, frozen in liquid nitrogen and later these samples were stored in a freezer at -80°C. To determine the endogenous gene, the specificity and efficiency of gene amplification, variation in expression, and the stability of the endogenous gene the Shapiro-Wilk normality test and the RefFinder software were used. The complete blood count data, biochemical profile and expression of the *SOD1*, *CAT* and *GPXI* genes were evaluated using one-way ANOVA and the means were compared using the Student's t-test ( $p < 0.05$ ). Pearson correlation analysis was performed to evaluate the relationship between the expression of target genes ( $p < 0.05$ ). The yield of total RNA from dog blood ranged from 245.3 to 938.6 ng/ $\mu$ L, and was

of high quality and integrity. The melt curves of endogenous genes ( $\beta$ -actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)), and target genes *SOD1*, *CAT* and *GPXI* demonstrated amplification specificity. The efficiency of the  $\beta$ -actin gene was 96% and that of *GAPDH* 94%. The efficiency of the target genes *SOD1*, *CAT* and *GPXI* was 108%, 99% and 102%, respectively. The expression of the  $\beta$ -actin gene followed a normal distribution and had better stability. Elderly dogs had lower expression values for the *SOD1*, *CAT* and *GPXI* genes. There was a positive correlation between the expression of *SOD1*, *CAT* and *GPXI* genes in whole blood. Elderly dogs had a lower hemoglobin concentration, a higher percentage of eosinophils, a greater quantity of segmented neutrophils, platelets, and a greater activity of the alkaline phosphatase enzyme. The observed results suggest that the pre-analytical method and the chosen endogenous gene can be efficiently applied to conduct gene expression analysis in whole blood from dogs under different ages. Furthermore, they demonstrate that there are relevant biochemical and molecular changes in elderly dogs, possibly because of aging.

### **Introdução**

Os cães (*Canis lupus familiaris*) ocupam um lugar importante na sociedade como animais de companhia, trabalho e lazer. Além disso, os cães são considerados como importantes modelo animal para pesquisas científicas, que avançaram tanto na saúde humana quanto animal [1]. Segundo Ruple et al. (2022) [2], os cães são potenciais modelos para a identificação de fatores genéticos e ambientais, que influenciam o envelhecimento, bem como os mecanismos subjacentes que moldam a comorbidade e a mortalidade específicas da idade. Essa potencialidade do cão doméstico ser utilizado como modelo animal, está relacionada a algumas características que incluem, o fato desta espécie ter a maior diversidade fenotípica, por compartilhar o mesmo ambiente do ser humano, ou seja, o cão é exposto aos mesmos fatores de estresse ambiental e do estilo de vida do ser humano. Também por ter acesso a cuidados sofisticados relacionados a saúde e, por serem propensos a desenvolverem diversas alterações no organismo relacionadas a idade de forma semelhante a alterações observadas nos seres humanos, porém em cães essas alterações relacionadas a idade ocorrem em um período de vida muito mais curto [2-4]. O melhor entendimento de como ocorre o processo de envelhecimento, ao utilizar os cães como modelo animal, traz, portanto, benefícios ao próprio animal bem como aos seres humanos, por meio do avanço de diagnósticos humanos e veterinários [5].

O envelhecimento biológico é definido de forma geral, como a manifestação progressiva do dano celular acumulado com a idade e, é determinado por fatores ambientais e genéticos, e quase todos os aspectos do fenótipo do indivíduo sofrem modificações [6]. As alterações que ocorrem no organismo animal durante o envelhecimento são caracterizadas por declínio na capacidade do organismo em responder ao estresse, ao aumento do desequilíbrio homeostático e ao aumento do risco do desenvolvimento de doenças que levam à morte [7]. Radakovich et al. (2017) [8] demonstraram que existem diferenças no perfil bioquímico sérico e do hemograma completo, entre cães idosos e adultos mais jovens, ambos clinicamente saudáveis. Algumas dessas diferenças foram atribuídas a alterações imunosenescentes normais, enquanto outras podem ser indicativos de potencial patologia precoce ou fisiologia alterada [8]. Estas alterações são referidas como envelhecimento ou senescência e, um aspecto importante da senescência é a regulação positiva da resposta inflamatória e, o aumento do dano oxidativo, que se manifesta como estado pró-inflamatório crônico de baixo nível [9].

A disfunção mitocondrial tem sido considerada como um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e, o declínio funcional do organismo [10,11]. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria, aumenta durante o envelhecimento, enquanto a capacidade de defesa antioxidante, principalmente aquela mediada por enzimas (exemplo: superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) torna-se reduzida com a idade, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo [11-13], que prejudica significativamente a função dos órgãos e, está envolvido na etiologia e patogênese de diversas doenças [14].

Estudos anteriores investigaram os efeitos da idade sobre a atividade de enzimas antioxidantes, de marcadores de oxidação e, de alterações na expressão gênica em tecidos biológicos como o cérebro de cães [5, 15, 16]. Contudo, a preocupação da sociedade com o bem-estar dos cães usados em pesquisas, tem resultado no desenvolvimento de inúmeras leis e diretrizes restritivas para o uso desses animais. Visto que o cão é um modelo animal de envelhecimento para humanos [2, 17] e, que a detecção precoce de alterações no organismo destes animais podem ser úteis para melhorar a qualidade de vida dos mesmos durante o envelhecimento [5, 18], é importante padronizar análises incluindo as moleculares, mais especificamente de expressão gênica, em tecidos biológicos mais acessíveis e minimamente invasivo ao animal, como por exemplo, o sangue total, que é uma fonte de RNA que pode ser utilizada para tal finalidade [19].

Além disso, a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo no sangue por exemplo, pode refletir o comportamento desses genes no fígado, sugerindo que a expressão gênica no sangue explora novos biomarcadores não invasivos e que representam danos ao fígado [20]. Em cães, não foi encontrado até o momento, nenhum estudo investigando o impacto de procedimentos pré-analíticos (focados no método coleta e armazenamento do sangue) e, de determinação do gene endógeno sobre a análise de expressão gênica no sangue total.

Nesse contexto, neste estudo nós objetivamos (1) testar um método de coleta e armazenamento do sangue total para manter a estabilidade do material genético, bem como determinar o gene endógeno para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos e, (2) avaliar se cães jovens e idosos apresentam diferenças na temperatura corporal, nos batimentos cardíacos, no hemograma completo, no perfil bioquímico sérico e, na expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase 1) avaliada no sangue total.

## **Materiais e métodos**

### **Declaração de ética**

Este experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) (processo nº 2719031023) e, foi realizado conforme os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

### **Animais**

Doze cães domésticos (*Canis lupus familiaris*), com estilos de vida semelhantes, machos e fêmeas, de pequeno porte e raças diferentes (sem raça definida, Maltês, Spitz alemão, Poodle, Lhasa apso, Shitzu, Shnauzer miniatura e Chihuahua) com peso médio de  $5,53 \pm 0,53$  kg, não aparentados, foram divididos em dois tratamentos referentes a faixa etária: animais jovens que incluiu cães de 2 a 4 anos de idade ( $n = 6$ ; idade média = 3,9 anos), e animais idosos que incluiu cães de 10 a 14 anos de idade ( $n = 6$ , idade média = 12 anos). A idade dos cães foi confirmada por meio de documento veterinário.

Apenas os cães considerados saudáveis com base no seu histórico fornecido por seus tutores e, por meio do exame físico realizado no ato da coleta pela médica veterinária foram incluídos no estudo. Os cães utilizados no experimento não apresentaram sinais de

doença, não receberam terapia medicamentosa, vacinação ou suplementação com vitaminas e, antioxidantes durante um período de duas semanas antes da coleta do sangue total.

Antes das avaliações dos animais e da coleta de sangue total, a participação consentida pelo responsável do animal, mediante leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ver Informações de Apoio) disponibilizado previamente ao início do estudo foi assinado pelos tutores dos animais.

### **Peso corporal, temperatura corporal, frequência cardíaca**

A mensuração do peso corporal, da temperatura corporal e da frequência cardíaca foram realizadas pela médica veterinária na presença do tutor. Os animais foram pesados em balança veterinária digital, os resultados estão expressos como kg. Para medir a temperatura corporal, o termômetro digital para cães (Generic, BR) higienizado foi introduzido cuidadosamente no ânus dos cães e, os resultados estão expressos em graus Celsius (°C).

A frequência cardíaca foi mensurada utilizando estetoscópio (Littmann classic III) posicionado na região torácica esquerda do animal, atrás do cotovelo. Após o posicionamento do estetoscópio no animal, foi feita a auscultação e, a contagem das batidas do coração por um período de 60 segundos. Os resultados estão expressos como batimentos por minuto (bpm).

### **Coleta de amostras de sangue**

A coleta de sangue foi realizada pela médica veterinária na presença do tutor. Logo após, os animais terem sido pesados, a temperatura corporal e a frequência cardíaca mensuradas, o animal foi contido pelo tutor e então foi feita a assepsia no pescoço do animal com álcool 70%. Em seguida foi realizada a coleta de sangue na veia jugular.

Para a análise de hemograma completo e de perfil bioquímico sérico, aproximadamente 2 mL de sangue foi coletado com seringa e em seguida 1 mL de sangue foi transferido para um tubo de coleta de sangue a vácuo com anticoagulante EDTA (Labor Import) (análises plasmáticas) e 1 mL foi transferido para outro tubo de coleta de sangue com ativador de coágulo (Labor Import) (análises sorológicas). Logo após a coleta do sangue, os mesmos foram transportados sob refrigeração para o Centro de Diagnóstico Veterinário (CDVET, Maringá-Paraná), onde foram realizadas as análises de glicose,

cortisol, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, proteínas totais, albumina, globulina e hemograma completo.

Para a análise de expressão gênica, 1 mL de sangue venoso total de cada animal, foi coletado com seringa e imediatamente transferido para um tubo criogênico, que foi congelado em nitrogênio líquido e em seguida foi armazenado em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise.

### **Expressão gênica no sangue total**

Para extração do RNA total, aproximadamente 1 mL de sangue total (ainda congelado para evitar coagulação e hemólise) foi adicionado em microtubo contendo 1000  $\mu\text{L}$  de TRIzol<sup>TM</sup> (Invitrogen, Carlsbad CA, USA). Em seguida, a extração do RNA foi realizada seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total, foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop<sup>TM</sup> 2000-c (Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>), no comprimento de onda de 260 nm. A pureza e integridade do RNA total de cada amostra foi determinada por meio da razão 260/280 nm obtida no espectrofotômetro NanoDrop<sup>TM</sup> 2000-c. A integridade do RNA foi analisada em gel de agarose 1% corado com SYBR<sup>TM</sup> Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), e visualizada no fotodocumentador para gel de eletroforese (L-PIX TOUCH - Loccus Biotecnologia) sob luz ultravioleta.

Para evitar possível contaminação das amostras com DNA genômico, 1  $\mu\text{g}$  de RNA total foi tratado com o kit DNase I amplification grade (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Após esse procedimento, a síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada, utilizando o kit SuperScript<sup>TM</sup> III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen Corporation, Brazil), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das reações de amplificação.

Um teste de eficiência de primers e amostras foi realizado para determinar a melhor concentração de primer e cDNA para cada gene a ser amplificado. Para isso, um pool de amostras de cDNA foi diluído em série (10, 20, 40 e 80  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e usado para avaliar a eficiência dos primers (concentrações finais testadas 100, 200 e 400 nM). As concentrações de primers e cDNA utilizadas, foram definidas a partir de cálculos da eficiência de amplificação ( $E = ((10^{-1/\text{slope}}) - 1) \times 100$ ) que ficou entre 90 e 110%.

As concentrações utilizadas dos genes alvos e endógeno e de cDNA foram de 400 nM e 40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , respectivamente. As reações em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (RT-qPCR), foram realizadas conforme as recomendações do composto fluorescente

PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). As reações de RT-qPCR foram realizadas no termociclador StepOne™ Real Time PCR System versão 2.3 (Applied Biosystems™), e os parâmetros do ciclo térmico para todos os genes foram os recomendados pelo PowerUP™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Vilnius, Lithuania). Os genes alvos específicos para a espécie *Canis lupus familiaris*: superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutathione peroxidase 1 (*GPX1*) foram desenhados com base nas sequências dos genes depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI) [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 1), usando o site [www.idtdna.com](http://www.idtdna.com). Os genes endógenos  $\beta$ -actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) específicos para a espécie *Canis lupus familiaris* foram testados como controle endógeno. Para definir qual o melhor gene endógeno a ser utilizado, nós avaliamos a estabilidade desses genes usando o teste de normalidade de Shairo-Wilk e o software RefFinder [21]. O gene  $\beta$ -actina foi eleito como gene endógeno neste estudo por apresentar melhor eficiência de amplificação (96%) e por apresentar melhor estabilidade (Tabela 1).

A análise de RT-qPCR foi realizada em duplicata num volume final de 20  $\mu$ L, e os resultados estão expressos como unidade arbitrária (UA). O método  $2^{-\Delta CT}$  [22], em que  $\Delta CT = (Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene endógeno})$  foi utilizado para a análise de quantificação relativa de expressão dos genes.

**Tabela 1. Sequência dos genes utilizados nas reações de RT-qPCR.**

Genes <sup>1</sup>	Sequência do gene (5'→3')	Amplicon (pb) <sup>2</sup>	Número de acesso
<i>SOD1</i>	F: GTCCTCACTTTAATCCTCTGTCC R: GTCTCCTGAGAGTGCAATCAG	146	NM_001003035.1
<i>CAT</i>	F: GACGCACAACCTTTTCATCCAG R: TCGCGTTCTTAGGTTTCTCAG	121	NM_001002984.1
<i>GPXI</i>	F: GACTACACCCAGATGAACGAG R: CAGGATCTCTTCGTTCTTAGCG	117	NM_001115119.1
$\beta$ -actina	F: TGAATCCCAAAGCCAACCG R: CCAGAGTCCATGACAATACCAG	139	AF021873.2
<i>GAPDH</i>	F: GAGAAAGCTGCCAAATATGACG R: GAAGGTGGAAGAGTGGGTG	138	AB038240.1

<sup>1</sup>*SOD1* - superóxido dismutase 1; *CAT* - catalase; *GPXI* - glutationa peroxidase 1; *GAPDH* - gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase.

<sup>2</sup>Tamanho do amplicon em pares de bases (pb).

F - forward; R - reverse.

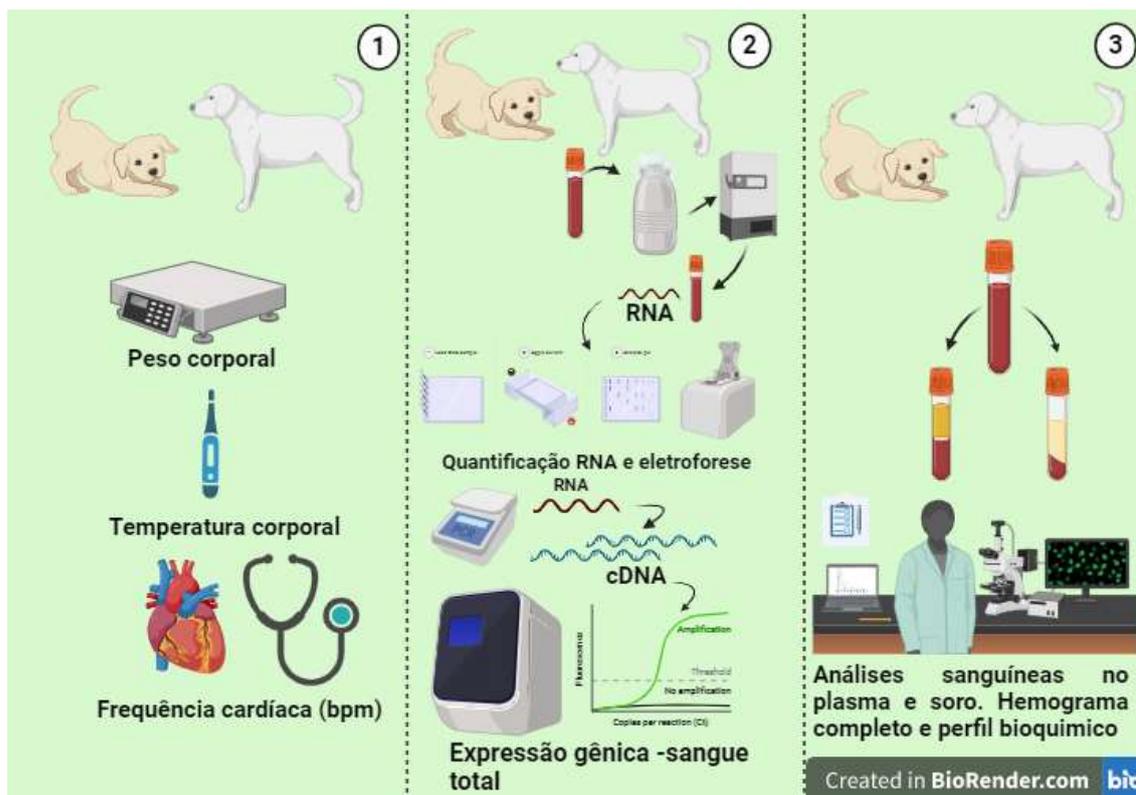
### Análise estatística

O procedimento UNIVARIATE foi aplicado para verificar a normalidade dos dados (hemograma completo, perfil bioquímico e expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*).

Todos os dados (hemograma completo, perfil bioquímico e expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*) foram avaliados utilizando o procedimento PROC GLM (SAS, 2002 versão 9.00, SAS Inst. Inc., Cary, NC).

Os efeitos da faixa etária sobre o hemograma completo, o perfil bioquímico e a expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*, foram avaliados por meio da ANOVA one-way. O modelo estatístico utilizado foi  $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$ , em que  $Y_{ij}$  é a variável dependente,  $\mu$  é a média geral,  $\alpha_i$  é efeito da faixa etária ( $i = \text{jovem e idoso}$ ), e  $e_{ij}$  é o termo de erro residual. As médias foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). A análise de correlação de Pearson foi realizada para avaliar a relação entre a expressão dos genes alvos ( $p < 0,05$ ).

A Figura 1 ilustra o esquema experimental deste estudo.



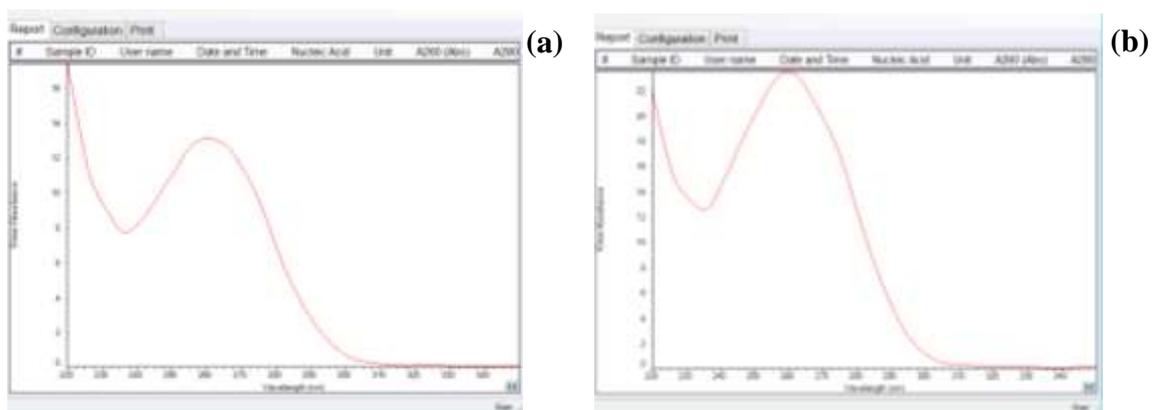
**Fig 1.** Esquema experimental ilustrativo.

## Resultados

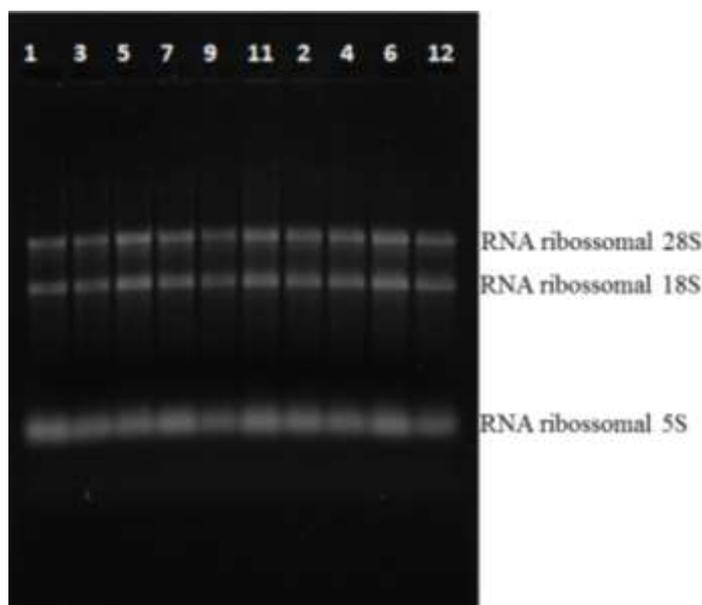
### Método de coleta e armazenamento do sangue total

O rendimento de RNA total variou de 245,3 a 938,6 ng/ $\mu$ L, sendo que esta variação é normal e, está relacionada a quantidade inicial de amostra utilizada na extração. A qualidade e a integridade do RNA, foi avaliada por meio da imagem gráfica (exibição espectral) e, da razão 260/280 fornecida pelo equipamento Nanodrop<sup>TM</sup> 2000c, e pela detecção das bandas de RNA em gel de agarose 1% (Fig 2).

Estes resultados demonstram que o RNA total extraído do sangue total apresentou alta qualidade, uma vez que obtiveram valores da razão 260/280 variando de 1,82 a 1,88 (média = 1,85), a exibição espectral mostrou o mesmo padrão indicado pelo Nanodrop<sup>TM</sup> 2000c como ideal (Fig 2) e, no gel de agarose observamos a presença de três bandas distintas e integras (Fig 3).



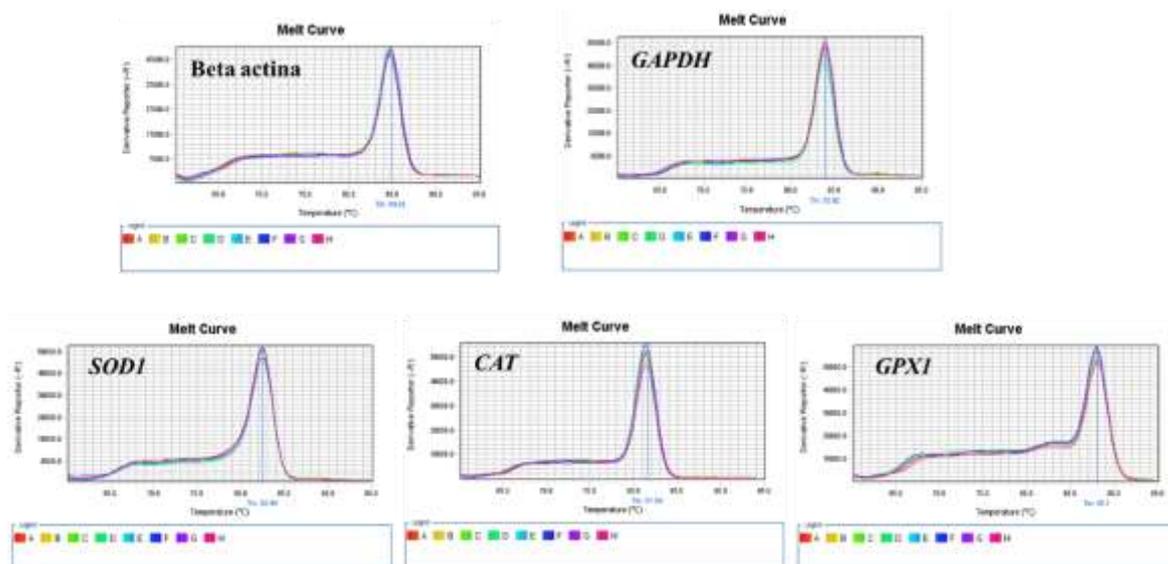
**Fig 2.** Imagem gráfica (exibição espectral) gerada durante a mensuração da concentração de RNA total pelo equipamento Nanodrop-2000c. (a) Exibição espectral do RNA de menor concentração (245,3 ng/μL) e (b) RNA de maior concentração (938,6 ng/μL).



**Fig 3.** Gel de agarose 1% das amostras de RNA total obtidas do sangue total de cães jovens e idosos.

### **Especificidade dos genes endógenos e alvos**

As curvas de melting dos genes endógenos e alvos, demonstraram pico único, sugerindo que a reação é específica e não houve a formação de dímeros de primers ou produtos de PCR inespecíficos (Fig 4).



**Fig 4.** Curva de melting demonstrando a especificidade dos genes endógenos  $\beta$ -actina, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e, dos genes alvos superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutaciona peroxidase 1 (*GPXI*) no sangue total de cães.

#### **Eficiência de amplificação dos genes endógenos e alvos**

Para avaliar o desempenho da análise de RT-qPCR, nós calculamos a eficiência de amplificação para os genes endógenos  $\beta$ -actina e *GAPDH*. A eficiência do gene  $\beta$ -actina foi de 96% (slope -3.4216) e do *GAPDH* 94% (slope = -3,4747) e, as curvas padrão apresentaram alta linearidade com coeficientes de correlação  $R^2$  de 0,9997 para a  $\beta$ -actina e de 0,9999 para o *GAPDH*.

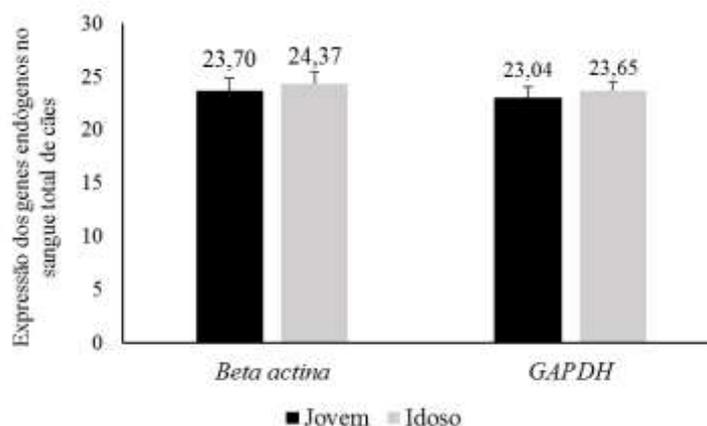
A eficiência dos genes alvos *SOD1*, *CAT* e *GPXI* foi de 108% (slope -3,1392), 99% (slope -3,3518) e 102% (slope -3.2730), respectivamente. As curvas padrão apresentaram alta linearidade com coeficientes de correlação  $R^2$  de 0,9922; 0,9948 e 0,9913 para os genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*, respectivamente.

Os valores de eficiência dos genes endógenos e alvos estão dentro da faixa de eficiência que vai de 90 a 110% considerada como aceitável para a análise de RT-qPCR [23].

#### **Perfil de expressão e estabilidade dos genes endógenos**

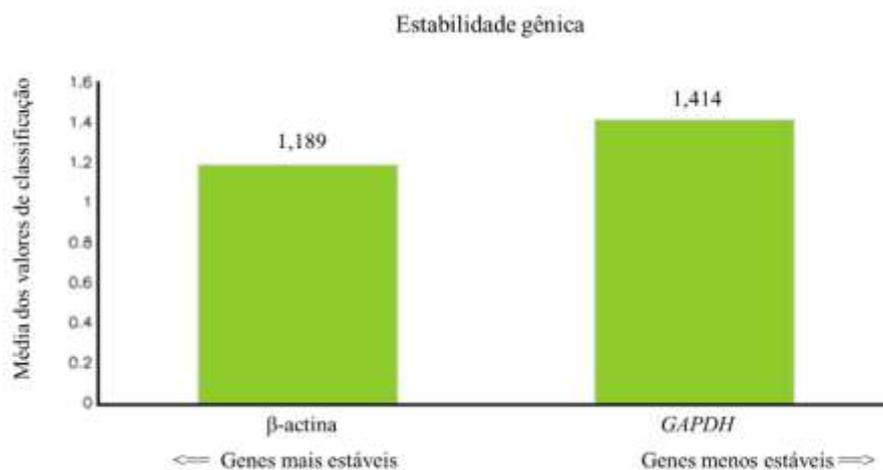
Não houve variação significativa na expressão dos genes endógenos no sangue total de cães jovens e idosos ( $p = 0,7150$   $\beta$ -actina e  $p = 0,6928$  *GAPDH*). O coeficiente de variação para a  $\beta$ -actina foi de 15,05% e para o gene *GAPDH* foi de 12,99%. O valor médio de Ct

da  $\beta$ -actina nas amostras de sangue total de cães jovens e idosos foi  $23,70 \pm 3,36$  UA e  $24,37 \pm 3,87$  UA, respectivamente, e o valor médio de Ct do gene *GAPDH* no sangue total de cães jovens e idosos foi de  $23,04 \pm 2,86$  UA e  $23,65 \pm 3,20$  UA, respectivamente (Fig 5).



**Fig 5.** Valores de Ct da  $\beta$ -actina e do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) nas amostras de sangue total de cães jovens e idosos.

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk da expressão do gene endógeno  $\beta$ -actina foi  $W = 0,917654$  ( $p = 0,1546$ ) e, do gene *GAPDH* foi  $W = 0,781439$  ( $p = 0,0016$ ), o que indica que a expressão do gene  $\beta$ -actina segue uma distribuição normal, enquanto o gene *GAPDH* não possui distribuição normal. Indicando que a expressão do gene  $\beta$ -actina tem maior estabilidade no sangue total do que o gene *GAPDH*. Nós também verificamos no RefFinder que a  $\beta$ -actina foi classificada como o gene mais estável (Fig 6).



**Fig 6.** Estabilidade de expressão dos genes endógenos  $\beta$ -actina e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) classificadas pelo RefFinder.

### Peso corporal, temperatura retal e frequência cardíaca

Não houve efeito significativo da faixa etária sobre o peso corporal ( $p = 0,7017$ ), a temperatura retal ( $p = 0,1127$ ) e, a frequência cardíaca ( $p = 0,4561$ ). O peso corporal médio dos cães jovens foi de  $5,39 \pm 1,38$  kg e dos idosos  $5,68 \pm 1,42$  kg. A temperatura corporal dos animais jovens e idosos foi de  $38,49 \pm 0,46^\circ\text{C}$  e  $38,10 \pm 0,35^\circ\text{C}$ , respectivamente. A frequência cardíaca média dos animais jovens foi de  $88,25 \pm 9,35$  bpm e dos cães idosos foi de  $75,66 \pm 14,24$  bpm.

### Expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI* no sangue total de cães jovens e idosos

A idade influenciou a expressão dos genes *SOD1* ( $p < 0,0001$ ), *CAT* ( $p = 0,0129$ ) e *GPXI* ( $p = 0,0002$ ) no sangue total dos cães, sendo observada menor valor de expressão desses genes nos cães idosos (Tabela 2).

**Tabela 2. Efeito da idade sobre a expressão dos genes envolvidos na resposta antioxidante.**

	EXPRESSÃO GÊNICA		
	<i>SOD1</i> (UA)	<i>CAT</i> (UA)	<i>GPXI</i> (UA)
JOVEM	0,098 <sup>a</sup>	0,060 <sup>a</sup>	0,653 <sup>a</sup>
IDOSO	0,037 <sup>b</sup>	0,022 <sup>b</sup>	0,155 <sup>b</sup>
Erro padrão médio	0,015177	0,022080	0,146134
p-valor	<0,0001	0,0129	0,0002

<sup>a,b</sup>Médias com letras diferentes sobrescritas na mesma coluna, são significativamente diferentes pelo teste t de Student. Os resultados são apresentados como média e erro padrão médio. O cão foi considerado como uma unidade experimental ( $n = 6$  cães jovens e  $n = 6$  cães idosos). *SOD1* - superóxido dismutase 1; *CAT* - catalase; *GPXI* - glutathione peroxidase 1. UA - o valor de expressão dos genes é expresso como unidade arbitrária.

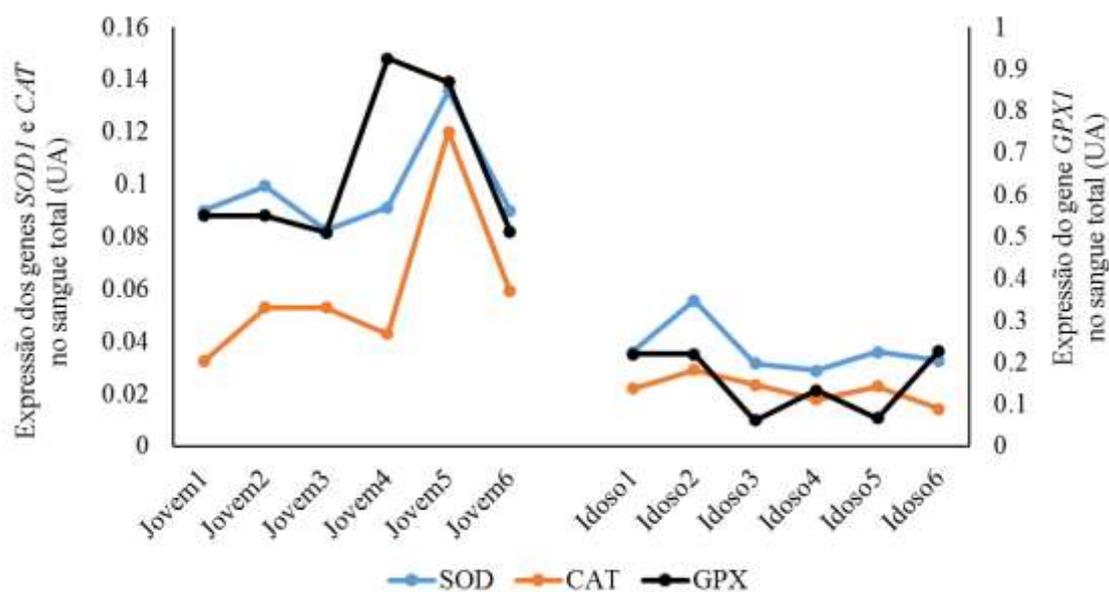
Nós observamos correlação positiva entre a expressão do gene *SOD1* e *CAT* (0,89;  $p = 0,0001$ ), *SOD1* e *GPXI* (0,91;  $p < 0,0001$ ), e entre a *CAT* e a *GPXI* (0,74;  $p = 0,0005$ ) (Tabela 3) no sangue total dos cães, indicando que estes genes agem em conjunto.

Embora, estes resultados demonstrem existir variação nas respostas entre os animais, o padrão de expressão desses três genes se mantém, ou seja, se a expressão do gene *SOD1* aumentar no caso dos animais jovens, por exemplo, também aumentará a expressão da *CAT* e da *GPXI*, e assim para os demais genes que se correlacionaram entre si (Fig 7).

**Tabela 3. Coeficientes de correlação de Pearson entre a expressão dos genes superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutatona peroxidase 1 (*GPXI*) no sangue total de cães jovens e idosos.**

	<i>SOD1</i> (UA)	<i>CAT</i> (UA)	<i>GPXI</i> (UA)
<i>SOD1</i> (UA)	1	0,89 (p = 0,0001)	0,91 (p < 0,0001)
<i>CAT</i> (UA)		1	0,74 (p = 0,0055)
<i>GPXI</i> (UA)			1

*SOD1* - superóxido dismutase 1; *CAT* - catalase; *GPXI* - glutatona peroxidase 1. UA - o valor de expressão dos genes é expresso como unidade arbitrária.



**Fig 7.** Padrão de expressão dos genes superóxido dismutase 1 (*SOD1*), catalase (*CAT*) e glutatona peroxidase 1 (*GPXI*). UA - o valor de expressão dos genes é expresso como unidade arbitrária.

### Hemograma completo e perfil bioquímico sérico

A idade influenciou a concentração de hemoglobina, a porcentagem de eosinófilos, a quantidade de neutrófilos segmentados, a concentração de plaquetas e a atividade da enzima fosfatase alcalina (Tabela 4). Os cães idosos apresentaram menor concentração de hemoglobina, maior porcentagem de eosinófilo, maior quantidade de neutrófilos

segmentados, plaquetas e maior atividade da enzima fosfatase alcalina, quando comparados com os animais jovens.

Não houve efeito significativo da idade sobre os demais parâmetros sanguíneos avaliados (Tabela 4).

**Tabela 4. Efeito da idade dos cães sobre as análises de hemograma completo e perfil bioquímico sérico.**

PARÂMETROS SANGUÍNEOS	JOVEM	IDOSO	Erro padrão médio	p-valor	Valores de referências (CDVET)
Hemoglobina (g/dL)	17,875 <sup>s</sup>	15,250 <sup>b</sup>	1,840063	0,0215	12-18 g/dL
Hematócrito (%)	52,438	46,483	5,660146	0,0752	37-55%
Volume corpuscular médio (fL)	66,250	66,500	3,905125	0,9076	60-77 fL
Hemoglobina corpuscular média (pg)	22,525	21,817	1,084871	0,2500	19,5-24,5 pg
Concentração da hemoglobina corpuscular média (%)	34,113	32,900	1,776437	0,2303	30-36 %
Leucócitos (cels/μL)	7.700	10.633	3,961832	0,1955	6.000-17.000 cels/μL
Neutrófilos segmentados (cels/μL)	4.633 <sup>b</sup>	8.884 <sup>a</sup>	2848,758	0,0290	3.000-11.500 cels/μL
Eosinófilos (%)	1,375 <sup>b</sup>	3,667 <sup>a</sup>	1,807584	0,0369	2-10%
Linfócitos (%)	26,750	20,667	6,824181	0,1247	12-30%
Plaquetas (cels/μL)	322,875 <sup>b</sup>	601,667 <sup>a</sup>	135,2061	0,0024	175.000-500.000 cels/μL
Proteínas totais (g/dL)	6,600	6.733	0,863777	0,7799	5,4-7,0 g/dL
Albumina (g/dL)	3,438	3,133	0,806850	0,4985	2,3-3,8 g/dL
Globulina (g/dL)	3,163	3,600	0,994935	0,4314	2,4-4,8 g/dL
Relação Albumina/Globulina (g/dL)	1,223	0,961	0,494270	0,3478	≥1
Aspartato aminotransferase (U/L)	49,088	54,217	15,02780	0,5392	10-88 U/L
Alanina aminotransferase (U/L)	44.425	60,317	21,07918	0,1880	7-92 U/L
Fosfatase alcalina (U/L)	60.462 <sup>b</sup>	78,183 <sup>a</sup>	14,96765	0,0488	20-150 U/L
Glicose (mg/dL)	78.187	81,133	9,769519	0,5869	60-118 mg/dL
Cortisol (μg/dL)	1,053	1,287	0,348196	0,2368	0,50-5,50 μg/dL

<sup>a,b</sup>Médias com letras diferentes sobscritas na mesma linha, são significativamente diferentes pelo teste t de Student. Os resultados são

apresentados como média e erro padrão da média. O cão foi considerado como uma unidade experimental (n = 6 cães jovens e n = 6 cães idosos).

Os valores de referência foram fornecidos pelo Centro de Diagnóstico Veterinário (CDVET).

## Discussão

### **Padronização de fatores pré-analíticos e do gene endógeno para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos**

A análise de expressão gênica no sangue total tem sido cada vez mais aplicada na investigação, no diagnóstico e no monitoramento de muitas doenças e, para identificação de potenciais biomarcadores genéticos do envelhecimento [5, 19]. Um dos objetivos foi testar um método de coleta e de armazenamento do sangue total para manter a estabilidade do material genético, bem como determinar o gene endógeno para a análise de expressão gênica no sangue total de cães jovens e idosos. Isso porque, o sangue é vulnerável a variáveis pré-analíticas [24, 25] e, os genes endógenos frequentemente utilizados nas pesquisas com foco no envelhecimento, mostram variação na expressão dependente da idade [26].

Em nosso estudo nós podemos verificar que o método de coleta e armazenamento do sangue total de cães aqui testado, é um procedimento que se mostrou adequado, uma vez que nós obtivemos alto rendimento de RNA total (média 591,95 ng/μL), íntegro e com boa qualidade (razão 260/280 média 1,85). Uma razão 260/280 superior a 1,8 é geralmente considerada um indicador aceitável de boa qualidade de RNA [27, 28]. Duale et al. (2012) [29] ao comparar dois sistemas diferentes de tubos de coleta com solução estabilizadora e protetora de RNA sanguíneo humano, também encontraram razões 260/280 médias (RNA) de aproximadamente 1,8. Tesfamichael et al. (2020) [30] extraiu RNA total de 500 μL de sangue de apenas um cão com Trizol e obtiveram 38,1 ng/μL de RNA com razão 260/280 medida no Nanodrop 2000 de 1,96. O que difere dos nossos resultados, contudo, essas diferenças podem estar relacionadas ao tipo de procedimento analítico. Esses autores coletaram o sangue de apenas um cão, o que pode fornecer uma medida não representativa e não confiável, a coleta foi realizada em tubos com anticoagulante EDTA e, o volume de amostra utilizado pelos autores foi inferior ao nosso. Conforme Leidinger et al. (2015) [31] em análises moleculares o ideal para a purificação do RNA do sangue total é, realizara a coleta do sangue fresco em tubos sem anticoagulantes e, processar a amostra o mais rápido possível. Uma vez que o proteoma sanguíneo ou o transcriptoma sofrem alterações *ex vivo* pela exposição ao EDTA, podendo por sua vez gerar resultados tendenciosos de expressão gênica.

Após termos verificado a qualidade e integridade do RNA total, nós também avaliamos outro ponto importante da análise de expressão gênica, que é a determinação da especificidade e, da eficiência de amplificação dos genes endógenos e alvos. Nós

confirmamos, que tanto os genes endógenos  $\beta$ -actina e *GAPDH*, como os genes alvos (*SOD1*, *CAT* e *GPXI*) específicos para a espécie *Canis lupus familiaris* utilizadas neste estudo apresentaram amplificação específica. Os valores de eficiência dos genes endógenos e alvos foram semelhantes e estavam dentro da faixa de eficiência considerada como aceitável para a análise de RT-qPCR [23].

Com relação a expressão dos genes endógenos no sangue total de cães jovens e idosos nós verificamos valores médios de Ct semelhantes para a  $\beta$ -actina e o *GAPDH*. Uma das formas de avaliar os resultados da quantificação da RT-qPCR é pela quantificação relativa, que é baseada na expressão de um gene alvo em relação a um gene endógeno, cuja função principal é minimizar os erros da PCR em tempo real [32]. A normalização destes genes endógenos controla variações no rendimento de extração, no rendimento de transcrição reversa e na eficiência de amplificação, já que estes são genes constitutivos e não variam sob condições experimentais [32]. Portanto, a precisão da RT-qPCR também depende da disponibilidade de genes endógenos, que mantenham níveis de expressão estáveis nas condições testadas, para serem utilizados como controles endógenos para normalização da reação [32, 33]. Os genes endógenos mais comumente utilizados incluem a  $\beta$ -actina, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), a proteína ribossomal 19 e o RNA ribossomal 18S [34, 35]. A expressão dos genes endógenos pode variar sob diferentes condições e, frequentemente esses genes que são utilizados nas pesquisas com foco no envelhecimento, mostram variação na expressão dependente da idade [26]. Isso reflete a importância de determinar previamente a estabilidade da expressão dos genes endógenos selecionados, para quantificar corretamente os níveis de expressão gênica em estudos avaliando o envelhecimento [36].

Neste estudo, os dois genes endógenos eleitos apresentaram as principais características necessárias para serem utilizados como gene endógeno, ou seja, esses genes apresentaram expressão constante em animais de diferentes idades e eficiência comparáveis a expressão dos genes alvos, contudo, no teste de normalidade dos resultados de expressão desses dois genes, nós verificamos que o gene *GAPDH* não apresentou distribuição normal. Para escolher o melhor gene endógeno neste estudo, nós optamos por utilizar dois critérios de avaliação sugerido por Yim et al. (2015) [37]. Sendo eles: (1) a expressão dos genes endógenos deve ser estável em todas as amostras, independentemente da condição, e, portanto, a expressão do gene endógeno nas amostras deve seguir distribuição normal e (2) a variação na expressão entre as diferentes amostras, avaliada pelo coeficiente de variação, deve ser a menor possível para um determinado

gene endógeno. Além disso, nós classificamos a estabilidade do gene utilizando o software RefFinder. Conforme sugerido por Yim et al. (2015) [37], um gene endógeno estável e confiável deve ter valor de p superior a 0,6 no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e coeficiente de variação menor que 20%. No software RefFinder a  $\beta$ -actina foi classificada como o gene endógeno mais estável. Assim, neste estudo nós elegemos a  $\beta$ -actina como gene endógeno por ela cumprir com todas as características necessárias de um gene endógeno.

Os nossos resultados em conjunto, mostram que o método de coleta e de armazenamento do sangue total (estabilização e proteção do RNA) testado, assim como o gene endógeno escolhido, podem ser aplicados com segurança e eficiência na condução da análise de expressão gênica no sangue total de cães em diferentes idades. Considerando a importância das análises moleculares e, que os cães ocupam lugar de destaque na sociedade como melhor amigo do homem e modelo animal para pesquisas científicas, estes resultados mostram em uma nova perspectiva, que é possível realizar a análise de RT-qPCR no sangue total de forma econômica, precisa e, relativamente fácil de executar, com o benefício desta análise no sangue poder refletir o comportamento da expressão gênica em diversos órgãos não acessíveis facilmente, não sendo necessário eutanasiar os animais de companhia.

### **Avaliação da temperatura corporal, da frequência cardíaca, do hemograma completo, do perfil bioquímico sérico e, da expressão de genes relacionados com a resposta antioxidante no sangue total de cães jovens e idosos**

O envelhecimento é um processo biológico multifatorial e complexo, e quase todos os aspectos do fenótipo do indivíduo sofrem modificações [6]. O processo de envelhecimento é definido de maneira geral, como a redução progressiva da função fisiológica, metabólica e da aptidão com o passar dos anos, cujo processo é derivado endogenamente e de forma irreversível para o organismo [6]. O processo de envelhecimento aumenta a vulnerabilidade dos animais, aos desafios fisiológicos internos e ambientais externos, bem como tornam os animais mais susceptíveis ao desenvolvimento de doenças e a morte [38]. Algumas das alterações fisiológicas frequentemente observadas durante o envelhecimento, é a redução da temperatura corporal e a senescência cardiovascular [39, 40]. Neste estudo, nós não verificamos diferenças na temperatura corporal e, na frequência cardíaca entre cães jovens e idosos, sendo que esses resultados corroboram com o estudo de Strasser et al. (1997) [39] que

também não encontraram mudanças significativas nesses parâmetros com o aumento da idade dos cães.

O fenótipo do envelhecimento é determinado por pelo menos dez características celulares e moleculares candidatas do envelhecimento [41, 42], entre estas características, está a disfunção mitocondrial que tem sido considerada, como um dos principais fatores que contribuem para o envelhecimento e, o declínio funcional do organismo [10, 11]. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela mitocôndria, aumenta durante o envelhecimento, enquanto a capacidade de defesa antioxidante torna-se reduzida com a idade, contribuindo para a manifestação do estresse oxidativo [11, 12], que prejudica significativamente a função dos órgãos, promove inflamação e, está envolvido na etiologia e patogênese de diversas doenças [14]. Geralmente em condições fisiológicas normais, um sistema de defesa antioxidante existente no organismo animal, é capaz de controlar a produção das ROS e, neutralizar ou reparar os danos oxidativos nas biomoléculas causados pelas ROS, mantendo dessa forma o equilíbrio redox (antioxidante/oxidante) celular [43].

Conforme Surai et al. (2019) [43] o organismo animal dispõe de três níveis principais de defesa antioxidante na célula, sendo o primeiro nível constituído pelas três principais enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase. Essas enzimas são responsáveis pela desintoxicação do radical logo no início do processo de sua formação. O segundo nível de defesa antioxidante, inclui principalmente antioxidantes eliminadores de radicais livres, como a vitamina E, o ácido ascórbico, a glutathiona reduzida (GSH), o ácido úrico etc. O terceiro nível de defesa antioxidante é aquele que promove o reparo de moléculas danificadas (exemplo: metionina sulfóxido redutase, proteínas de choque térmico, enzimas reparadoras de DNA etc.) ou, faz a remoção destas (por exemplo, fosfolipases e proteossomos).

No presente estudo, nós verificamos que cães idosos apresentaram menor expressão dos genes *SOD1*, *CAT* e *GPXI*, que codificam as três principais enzimas envolvidas na linha primária de defesa antioxidante. Nós também verificamos que existe correlação positiva entre a expressão do gene *SOD1* e *CAT*, *SOD1* e *GPXI*, e entre a *CAT* e a *GPXI* indicando que estes genes agem de forma conjunta na defesa antioxidante.

Pouco se sabe sobre o efeito do tempo biológico sobre o estado redox de cães. Entretanto, Kiatipattanasakul et al. (1997) [15], por meio de ensaio imuno-histoquímico observaram redução relacionada à idade, no número de neurônios positivos para a enzima SOD, sugerindo que isso pode aumentar a toxicidade dos radicais livres e resultar em

morte celular neuronal. Head et al. (2002) [16] observaram aumento progressivo dependente da idade no nível de peroxidação lipídica e, oxidação de proteínas, menor atividade da enzima glutamina sintetase (enzima que prediz a vulnerabilidade do tecido ao dano oxidativo) e, menor nível da glutathione reduzida no cérebro dos cães.

O mecanismo pelo qual a eficiência da resposta antioxidante dos animais idosos reduz não está totalmente elucidada. As lesões oxidativas no DNA nuclear e no DNA mitocondrial podem modificar o padrão de expressão gênica e promover falhas na síntese de proteínas e, conseqüentemente alterar a função ideal do organismo [44]. Isso possivelmente causa um mecanismo de feedback positivo na geração de níveis extensivos de ROS [45]. Existe a sugestão de que a alteração do padrão de expressão gênica ocorre pelo acúmulo de danos no DNA, que por sua vez atrapalham a RNA polimerase II, enquanto tenta transcrever a fita molde em RNA [46]. Quando a RNA polimerase II atinge um ponto danificado, ela para e fica presa, interferindo na transcrição, causando o mau funcionamento de uma série de vias celulares importantes, incluindo a via de defesa antioxidante [46]. Zhang et al. (2015) [47] sugerem que o declínio dependente da idade na resposta das enzimas antioxidantes, seja causado pelo declínio da eficiência da via de sinalização do fator nuclear eritroide 2/elemento de resposta eletrofílica (Nrf2/EpRE). O Nrf2 é o fator de transcrição que controla a expressão basal e indutível de centenas de enzimas antioxidantes e desintoxicantes [47, 48] e, existem evidências de que além do Nrf2 ter papel fundamental no controle da expressão de genes antioxidantes, e também exerce funções anti-inflamatórias [49]. Embora, exista ampla diversidade no efeito da idade sobre a expressão basal de enzimas antioxidantes, existe um consenso que a capacidade de induzir estas enzimas pelos eletrófilos diminui com a idade [47].

Zhang et al. (2012) [50] sugerem que o aumento observado na proteína reguladora de transcrição (Bach1) em camundongos idosos pode explicar, em parte, a perda de indutibilidade de alguns genes regulados pelo Nrf2. Zhou et al. (2018) [51] demonstraram que a indutibilidade dos genes regulados por Nrf2 reduz durante o envelhecimento, sugerindo, que o aumento da expressão de supressores de Nrf2 como a Bach1 e a família de genes reguladores e proto-oncogenes (c-Myc), possa ter contribuído para a redução da indutibilidade dos genes antioxidantes que são regulados pelo Nrf2 com o envelhecimento.

Em cães idosos clinicamente saudáveis inúmeras alterações em seu perfil bioquímico sérico e, de hemograma completo em comparação com cães adultos mais jovens são observadas [8]. Sendo comum em cães idosos a utilização de exames de sangue

para compreender os efeitos biológicos do envelhecimento e para identificar doenças específicas relacionadas ao envelhecimento [52].

Neste estudo nós avaliamos se existe diferenças nos parâmetros sanguíneos clínicos de cães jovens e idosos. Os nossos resultados demonstraram que os cães idosos apresentaram menor concentração de hemoglobina, maior porcentagem de eosinófilo, maior quantidade de neutrófilos segmentados, de plaquetas e maior atividade da enzima fosfatase alcalina. Os resultados obtidos estão dentro do valor de referência, com exceção a porcentagem de eosinófilos (1,375%) em cães jovens que estava abaixo do recomendado (2 a 10%).

O menor nível de hemoglobina observada nos cães idosos, pode indicar a anemia dos idosos e, é uma condição atribuída a diversos fatores incluindo a deficiência de ferro [8, 53]. Esta anemia, geralmente não é grave, mas está associada a diversas comorbidades e ao maior risco de mortalidade [54]. A eosinofilia (aumento de eosinófilo) no sangue está relacionada a diversas causas, que vão desde hipersensibilidade, infestações parasitárias até neoplasias [55]. Segundo Guija-de-Arespacochaga et al. (2022) [55] a infestação parasitária deve ser considerada em filhotes e adultos jovens, como causa de eosinofilia desconhecida, enquanto a neoplasia deve passar a fazer parte do diagnóstico diferencial em pacientes mais velhos.

Assim como em nosso estudo, Radakovich et al. (2014) [8] também verificaram aumento na quantidade de plaquetas e na atividade da enzima fosfatase alcalina em cães idosos. Sugerindo que o aumento na quantidade de plaqueta possa ser atribuído à deficiência de ferro e, também a trombocitose reativa secundária à inflamação. Idosos clinicamente saudáveis geralmente apresentam inflamação crônica de baixo grau mesmo na ausência de patógenos [56], sendo esta inflamação caracterizada por um estado pró-trombótico causado pela ativação mútua de neutrófilos e plaquetas [57]. A ação dos neutrófilos ocorre pela combinação de fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio e, liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) [57]. Complexos formados entre neutrófilos e plaquetas são encontrados comumente em humanos com doenças inflamatórias crônicas [58]. A interação entre plaquetas e neutrófilos é fundamental para as respostas inflamatórias, uma vez que isso auxilia na localização de plaquetas nos locais inflamatórios, potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio e, é fundamental na ativação dos neutrófilos para liberar NETs [58, 59]. Com relação a atividade da enzima fosfatase alcalina, Radakovich et al. (2014) [8] sugerem

que maior atividade desta enzima possivelmente ocorre pela condição de hiperadrenocorticismo subjacente ou estresse crônico.

Estes resultados bioquímicos séricos e de hemograma completo demonstraram que os cães idosos e clinicamente saudáveis quando comparados aos cães mais jovens, apresentaram alterações evidentes nos parâmetros sanguíneos que são potenciais indícios de alterações fisiológicas devido a idade. Nós também acreditamos que esses resultados podem estar de alguma forma relacionados a menor expressão dos genes antioxidantes observada neste estudo, uma vez que a menor capacidade de defesa antioxidante pode causar aumento na produção de ROS causando acúmulo de biomoléculas danificadas, e essa perda de homeostase devido ao aumento crônico da produção de ROS afeta o correto funcionamento dos órgãos e de sistemas reguladores, incluindo o endócrino e imunológico. Como consequência dessa ativação do sistema imune por exemplo, existe a indução do estado inflamatório no organismo criando um círculo vicioso, onde o estresse oxidativo crônico e a inflamação se alimentam [60].

Em conclusão, os nossos resultados de parâmetros sanguíneos e de expressão gênica em conjunto demonstram existir alterações bioquímicas e moleculares relevantes em cães idosos, e essas alterações são referidas como envelhecimento ou senescência, e um aspecto importante desse processo biológico é a regulação positiva da resposta inflamatória e o aumento do dano oxidativo, que pode se manifestar como um estado pró-inflamatório crônico de baixo grau [9].

## Informações de Apoio

### Arquivo S1. Termo de consentimento livre esclarecido

#### Declaração de Consentimento

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: *Maringá / PR - 02/02/2024*

Assinatura do Responsável: *Kellyn Prado*

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome: *Kellyn Prado*

Documento de Identidade (quando aplicável): *77475028*

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: *Mickey*

Número de identificação: *1*

Espécie: *Canina*

Raça: *SRD*

*13 meses*

Nome: *Buck*

Número de identificação: *2 (nº de identificação)*

Espécie: *Canine*

Raça: *Maltês*

*14 meses*

Nome: *Mini*

Número de identificação: *3 (nº de identificação)*

Espécie: *Canine*

Raça: *SRD*

*13 meses*

**Declaração de Consentimento**

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá/PR - 02/02/2024

Assinatura do Responsável: \*Andressa Vital

Assinatura do Pesquisador Responsável: Souza

Nome: Andressa Vital

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Theo

Número de identificação: nº 4

Espécie: Spitz / Caminhô

Raça: Spitz

#### Declaração de Consentimento

*(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)*

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa:

Maringá, PR - 03/02/2024

Assinatura do Responsável:

Yuri S.O. Barbosa Sotti

Assinatura do Pesquisador Responsável:

*[Assinatura]*

Nome: Yuri Sotti

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Fifi

Número de identificação: 5

Espécie: Canina

Raça: SRD

Nome: Rombo

Nº de identificação: 6

Espécie: Canina

Raça: Poodle

CEUA/UEM - Termo de Consentimento - TCLE, fls. 14/2

#### Declaração de Consentimento

*(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)*

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa:

Maringá, PR / 03/02/2024

Assinatura do Responsável:

Renato Zanco

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome: Luna Pet / Renato Zanco Tutor.

Documento de Identidade (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Luna

Número de identificação: 7

Espécie: Canina

Raça: Husky Arco

CEUA/UEM - Termo de Consentimento - TCLE, fls. 14/2

### Declaração de Consentimento

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá/PR - 03/02/2024

Assinatura do Responsável: *Celi F. Mendes*

Assinatura do Pesquisador Responsável: *[Assinatura]*

Nome: Celi de Mendes

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Boris

Número de identificação: 8

Espécie: Canina

Raça: Lhasa - Apso

**Declaração de Consentimento**

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá, PR - 02 - 2024

Assinatura do Responsável: x Gabriella Lariss Santos

Assinatura do Pesquisador Responsável: [assinatura]

Nome: Gabriella Lariss Santos

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Spitz

Número de identificação: 9

Espécie: Canim

Raça: Shit-zu

**Declaração de Consentimento**

*(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)*

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá / PR - 03/02/2024

Assinatura do Responsável: x Ingrid Vidmantar

Assinatura do Pesquisador Responsável: 

Nome: Ingrid Vidmantar

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Belinha

Número de identificação: 10

Espécie: Canina

Raça: Poodle

**Declaração de Consentimento**

(esta parte **NÃO** precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maximópolis/PR - 06/02/2024

Assinatura do Responsável: X Helena Kikuchi

Assinatura do Pesquisador Responsável: [Assinatura]

Nome: Alina e Helena Kikuchi

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Champ

Número de identificação: 44

Espécie: Canina

Raça: Shitzu

### Declaração de Consentimento

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Marimã - PR / 06/02/2024

Assinatura do Responsável:  Karine Jimão Evaristo

Assinatura do Pesquisador Responsável: [Assinatura]

Nome: Karine Evaristo

Documento de Identidade (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Bob  
 Número de identificação: 12  
 Espécie: Canina  
 Raça: Shepherd

Nome: Tehias  
 nº: 13  
 Espécie: Canina  
 Raça: Poodle

### Declaração de Consentimento

(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá/PR - 06/02/2024

Assinatura do Responsável: [Assinatura]

Assinatura do Pesquisador Responsável: [Assinatura]

Nome: Raquel Marques

Documento de Identidade (quando aplicável): -

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Franisca

Número de identificação: 14

Espécie: Canina

Raça: Chuvaca

Nome: Eunice

n.º: 15

Espécie: Canina

Raça: Chuvaca

#### Declaração de Consentimento

*(esta parte NÃO precisa vir preenchida previamente, para análise ética, pois será preenchida após a aprovação ética do protocolo, no momento de contato entre o pesquisador/proprietário)*

Fui devidamente esclarecido(a) sobre todos os procedimentos deste estudo, seus riscos e benefícios ao(s) animal(is) pelo(s) qual(is) sou responsável. Fui também informado que posso retirar meu(s) animal(is) do estudo a qualquer momento. Ao assinar este Termo de Consentimento, declaro que autorizo a participação do(s) meu(s) animal(is) identificado(s), a seguir, neste projeto.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará arquivada com o(a) proprietário(a) e outra com o pesquisador.

(Cidade/UF), dd/mm/aaaa: Maringá PR / 03/02/2024

Assinatura do Responsável: Renato Zencaro

Assinatura do Pesquisador Responsável:

Nome: Luna Pet / Renato Zencaro Tutor.

Documento de Identidade (quando aplicável):

Identificação do(s) animal(is) (repetir tantas vezes quantas forem os animais)

Nome: Luna

Número de identificação: ♀

Espécie: Canina

Raça: Husky Apró

CEUA/UEM - Termo de Consentimento - TCLE, fls. 14/2

## Agradecimentos

Os autores agradecem aos tutores pela colaboração na realização deste estudo, ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia e a Universidade Estadual de Maringá

## Referências

1. National Research Council (US) Committee on Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research. Scientific and Humane Issues in the Use of Random Source Dogs and Cats in Research. 2. Use of Dogs and Cats in Research: Public Perception and Evolution of Laws and Guidelines. Washington (DC): National Academies Press (US); 2009.
2. Ruple A, MacLean E, Snyder-Mackler N, Creevy KE, Promislow D. Dog Models of Aging. *Annu Rev Anim Biosci*. 2022;10: 419-439.
3. Gilmore KM, Greer KA. Why is the dog an ideal model for aging research? *Exp Gerontol*. 2015;71: 14-20.
4. Hoffman JM, Creevy KE, Franks A, O'Neill DG, Promislow DEL. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell*. 2018;17: 1-13.
5. Sándor S, Tátrai K, Czeibert K, Egyed B, Kubinyi E. *CDKN2A* gene expression as a potential aging biomarker in dogs. *Front Vet Sci*. 2021;8: 1-8.

6. Guo J, Huang X, Dou L, Yan M, Shen T, Tang W, Li J. Aging and aging-related diseases: from molecular mechanisms to interventions and treatments. *Sig Transduct Target Ther.* 2022;7: 1-40.
7. Alexander JE, Colyer A, Haydock RM, Hayek MG, Park J. Understanding How Dogs Age: Longitudinal Analysis of Markers of Inflammation, Immune Function, and Oxidative Stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2018;73: 720-728.
8. Radakovich LB, Pannone SC, Truelove MP, Olver CS, Santangelo KS. Hematology and biochemistry of aging-evidence of "anemia of the elderly" in old dogs. *Vet Clin Pathol.* 2017;46: 34-45.
9. Sendama W. The effect of ageing on the resolution of inflammation. *Ageing Res Rev.* 2020;57: 1-6.
10. Trifunovic A, Larsson NG. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med.* 2008;263: 167-178.
11. Maldonado E, Morales-Pison S, Urbina F, Solari A. Aging hallmarks and the role of oxidative stress. *Antioxidants (Basel).* 2023;12: 1-37.
12. Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, Ren Z, Morciano G, Perrone M, Patalas-Krawczyk P, et al. Mitochondria and reactive oxygen species in aging and age-related diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2018;340: 209-344.
13. Kozakiewicz M, Kornatowski M, Krzywińska O, Kędziora-Kornatowska K. Changes in the blood antioxidant defense of advanced age people. *Clin Interv Aging.* 2019; 14:763-771.
14. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, et al. Oxidative Stress: harms and benefits for human health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017: 1-13.
15. Kiatipattanasakul W, Nakamura S-i, Kuroki K, Nakayama H, Doi K. Immunohistochemical detection of anti-oxidative stress enzymes in the dog brain. *Neuropathol.* 1997;17: 307-312.
16. Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. *J Neurochem.* 2002;82: 375-381.
17. Sándor S, Kubinyi E. Genetic pathways of aging and their relevance in the dog as a natural model of human aging. *Front Genet.* 2019;10: 1-34.
18. Stowe HD, Lawler DF, Kealy RD. Antioxidant status of pair-fed labrador retrievers is affected by diet restriction and aging. *J Nutr.* 2006;136: 1844-1848.

19. Martire S, Valentino P, Marnetto F, Mirabile L, Capobianco M, Bertolotto A. The impact of pre-freezing storage time and temperature on gene expression of blood collected in EDTA tubes. *Mol Biol Rep.* 2022;49: 4709-4718.
20. Shahid M, Idrees M, Butt AM, Raza SM, Amin I, Rasul A, Afzal S. Blood-based gene expression profile of oxidative stress and antioxidant genes for identifying surrogate markers of liver tissue injury in chronic hepatitis C patients. *Arch Virol.* 2020;165: 809-822.
21. Xie F, Xiao P, Chen D, Xu L, Zhang B. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant Mol Biol.* 2012;80: 75-84.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Method. *Methods.* 2001;25: 402-408.
23. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Exp Ther Med.* 2015;10: 1261-1264.
24. Langelaan, MLP, Dylus, J, Bock E, Jongen B, Mertens AAM, Raijmakers MTM. Improved pre-analytical process for RNA isolation from whole blood samples. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2014;39: 164-165.
25. Donohue DE, Gautam A, Miller SA, Srinivasan S, Abu-Amara D, Campbell R, Marmar CR, Hammamieh R, Jett M. Gene expression profiling of whole blood: A comparative assessment of RNA-stabilizing collection methods. *PLoS One.* 2019;14: 1-12.
26. Touchberry C.D., Wacker M.J., Richmond S.R., Whitman S.A., Goddard M.P. Age-related changes in relative expression of real-time PCR housekeeping gene in human skeletal muscle. *J. Biomol. Tech.* 2006;17: 157–162.
27. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.
28. Manchester KL. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. *Biotechniques.* 1996;20: 968–970.
29. Duale N, Brunborg G, Rønningen KS, Briese T, Aarem J, Aas KK, Magnus P, Stoltenberg C, Susser E, Lipkin WI. Human blood RNA stabilization in samples collected and transported for a large biobank. *BMC Res Notes.* 2012;5: 1-9.
30. Tesfamichael DH, Wood MW, Pritchard JC. Comparison of commercial manual extraction kits for RNA isolation from canine whole blood. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32: 737-741.

31. Leidinger P, Backes C, Rheinheimer S, Keller A, Meese E. Towards Clinical Applications of Blood-Borne miRNA Signatures: The Influence of the Anticoagulant EDTA on miRNA Abundance. *PLoS One*. 2015;10: e0143321.
32. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009;55: 611-622.
33. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun*. 2005;6: 279-284.
34. Tong Z, Gao Z, Wang F, Zhou J, Zhang Z. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Mol Biol*. 2009;10: 1-13.
35. Rácz GA, Nagy N, Tóvári J, Apáti Á, Vértessy BG. Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep*. 2021;11: 1-14.
36. González-Bermúdez L, Anglada T, Genescà A, Martín M, Terradas M. Identification of reference genes for RT-qPCR data normalisation in aging studies. *Sci Rep*. 2019;9: 1-11.
37. Yim AK, Wong JW, Ku YS, Qin H, Chan TF, Lam HM. Using RNA-Seq data to evaluate reference genes suitable for gene expression studies in soybean. *PLoS One*. 2015;10: e0136343.
37. Schneider JL, Rowe JH, Garcia-de-Alba C, Kim CF, Sharpe AH, Haigis MC. The aging lung: Physiology, disease, and immunity. *Cell*. 2021;184: 1990-2019.
39. Strasser A, Simunek M, Seiser M, Hofecker G. Age-dependent changes in cardiovascular and metabolic responses to exercise in beagle dogs. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1997;44: 449-460.
40. Katsuumi G, Shimizu I, Yoshida Y, Minamino T. Vascular Senescence in cardiovascular and metabolic diseases. *Front Cardiovasc Med*. 2018;5: 1-13.
41. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153: 1194-1217.
42. Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, Morimoto RI, Simon AK, Bjedov I, Palikaras K, et al. Autophagy in healthy aging and disease. *Nat Aging*. 2021;1: 634-650.
43. Surai PF, Kochish II, Fisinin VI, Kidd MT. Antioxidant defence systems and oxidative stress in poultry biology: an update. *Antioxidants (Basel)*. 2019;8: 1-36.

44. Ghosh A, Shcherbik N. Effects of Oxidative Stress on Protein Translation: Implications for Cardiovascular Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21: 1-25.
45. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct.* 2012;2012: 1-13.
46. Agapov A, Olina A, Kulbachinskiy A. RNA polymerase pausing, stalling and bypass during transcription of damaged DNA: from molecular basis to functional consequences. *Nucleic Acids Res.* 2022;50: 3018-3041.
47. Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging. *Free Radic Biol Med.* 2015;88(Pt B): 314-336.
48. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci.* 2022;291: 1-13.
49. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. *Molecules.* 2020;25: 1-31.
50. Zhang H, Liu H, Davies KJ, Sioutas C, Finch CE, Morgan TE, Forman HJ. Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;52: 2038–2046.
51. Zhou L, Zhang H, Davies KJA, Forman HJ. Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells. *Redox Biol.* 2018: 35-40.
52. Lee SH, Kim JW, Lee BC, Oh HJ. Age-specific variations in hematological and biochemical parameters in middle- and large-sized of dogs. *J Vet Sci.* 2020;21: 1-13.
53. Stauder R, Thein SL. Anemia in the elderly: clinical implications and new therapeutic concepts. *Haematologica.* 2014;99: 1127-1130.
54. Goodnough LT, Schrier SL. Evaluation and management of anemia in the elderly. *Am J Hematol.* 2014;89: 88-96.
55. Guija-de-Arespachaga A, Kremer L, Künzel F, Schwendenwein I. Peripheral blood eosinophilia in dogs: Prevalence and associated diseases. *Vet Med Sci.* 2022;8: 1458-1465.
56. Van Avondt K, Strecker JK, Tulotta C, Minnerup J, Schulz C, Soehnlein O. Neutrophils in aging and aging-related pathologies. *Immunol Rev.* 2023;314: 357-375.
57. Herrero-Cervera A, Soehnlein O, Kenne E. Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cell Mol Immunol.* 2022;19: 177-191.

- 58.** Lisman T. Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease. *Cell Tissue Res.* 2018;371: 567-576.
- 59.** Page C, Pitchford S. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol.* 2013;17: 1176–1184
- 60.** De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Curr Pharm Des.* 2009;15: 3003-3026.