

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES COM LINFOMA
MULTICÊNTRICO DE IMUNOFENÓTIPO B OU T:
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS**

Manuela Cristina Vieira

Médica Veterinária

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PERFIL DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES COM LINFOMA
MULTICÊNTRICO DE IMUNOFENÓTIPO B OU T:
CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS**

Manuela Cristina Vieira

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Medicina Veterinária (Patologia Animal).

2013

V658p Vieira, Manuela Cristina
Perfil de proteínas séricas em cães com linfoma multicêntrico de imunofenótipo B ou T: correlação com fatores prognósticos. / Manuela Cristina Vieira. -- Jaboticabal, 2013
xi, 72 p.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Maria Angélica Dias, Alessandra Kataoka, Elzylene Lega Palazzo
Bibliografia

1. Canina. 2. Doença linfoproliferativa. 3. Eletroforese. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-006:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: PERFIL DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO DE IMUNOFENÓTIPO B OU T: CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

AUTORA: MANUELA CRISTINA VIEIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: PATOLOGIA ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. MARCIA FERREIRA DA ROSA SOBREIRA
Universidade Camilo Castelo Branco / Descalvado/SP



Profa. Dra. MARIA ANGÉLICA DIAS
Centro Universitário Moura Lacerda / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. ELZYLENE LÉGA
Fundação Educacional de Ituverava / Ituverava/SP



Profa. Dra. ALESSANDRA KATAOKA
Universidade Federal de Mato Grosso / Sinop/MT

Data da realização: 26 de junho de 2013.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MANUELA CRISTINA VIEIRA – nascida em 4 de novembro de 1977, na cidade de Ituverava-SP. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) – Alfenas-MG, em março de 1996, concluindo-o em dezembro de 2000. Trabalhou na área de Clínica e Patologia Clínica de Pequenos Animais, em Ribeirão Preto/SP, nos anos de 2001 à 2007. Realizou curso de especialização “Lato Sensu” em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, na Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), São João da Boa Vista/SP, no período de maio de 2001 à junho de 2002. Realizou curso de especialização “Lato Sensu” em Homeopatia Veterinária, no Instituto Homeopático Françoi Lamasson, Ribeirão Preto-SP, no período de março de 2003 à dezembro de 2005. Ingressou no curso de mestrado na área de Cirurgia Veterinária em agosto de 2007, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal, SP, cuja defesa da dissertação ocorreu em julho de 2009, tendo sido bolsista CAPES. Em agosto de 2009 iniciou o doutorado em Medicina Veterinária, na FCAV/Unesp, Câmpus Jaboticabal, SP, com bolsa do CNPq e auxílio financeiro da FAPESP. No período de março a julho de 2011 realizou Doutorado Sanduíche na Universidade Autônoma de Barcelona, UAB, Espanha, na área de Patologia Clínica, em cujo período foi contemplada com bolsa da CAPES-PDEE.

DEDICATÓRIA

Dedico com muito amor e carinho a conclusão desta etapa da minha vida, meu doutorado, à minha avó Maria, que nos deixou este ano (“*In memoriam*” 06.03.1922 – 25.02.2013)... Dedico a ela meu esforço, minha disciplina, minha perseverança, minha fé, minha ansiedade, meu cansaço, minhas noites em claro estudando..... ela que mesmo sem estudos, tinha doutorado em vivência, e sempre nos ensinou o caminho da sabedoria, da humildade, da virtude, da honestidade e da fé em Deus..... as lembranças boas são inúmeras e o amor é eterno!

Dona Cila (Maria Gadú)

*De todo amor que eu tenho
Metade foi tu que me deu
Salvando minh'alma da vida
Sorrindo e fazendo o meu eu*

*Se queres partir ir embora
Me olha da onde estiver
Que eu vou te mostrar que eu to pronta
Me colha madura do pé*

*Salve, salve essa nega
Que axé ela tem
Te carrego no colo e te dou minha mão
Minha vida depende só do teu encanto
Cila pode ir tranqüila
Teu rebanho ta pronto*

*Teu olho que brilha e não para
Tuas mãos de fazer tudo e até
A vida que chamo de minha
Neguinha, te encontro na fé*

*Me mostre um caminho agora
Um jeito de estar sem você
O apego não quer ir embora
Diaxo, ele tem que querer*

*Ó meu pai do céu, limpe tudo aí
Vai chegar a rainha
Precisando dormir
Quando ela chegar
Tu me faça um favor
Dê um manto a ela, que ela me benze aonde eu for*

*O fardo pesado que levas
Deságua na força que tens
Teu lar é no reino divino
Limpinho cheirando alecrim*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre estar presente nos meus pensamentos e no meu coração... por sempre me mostrar a melhor escolha... por sempre aumentar a minha fé diante das dificuldades...

À minha família, minha avó Maria (*"In memoriam"*), meu pai Erlon, minha mãe Darci, minha irmã Helena, meu irmão Samuel, meus cunhados e sobrinhos, pelo apoio em todas as horas e pelo amor incondicional... sem vocês seria impossível esta conquista!

Ao meu orientador Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade e orientação no Mestrado e Doutorado.

Aos pós-graduandos Thiago Demarchi Munhoz, Letícia Abrahão Anai e Lívia Maria Souza Semolin, por aceitarem minha participação no "Grupo de Pesquisa Linfoma", pelo convívio e trabalho durante um ano e meio.

À Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Profa. Dra. Maria Angélica Dias, Profa. Dra. Sabryna Gouveia Calazans e Prof. Dr. Gervásio Henrique Bechara, por participarem da minha banca de qualificação do Doutorado e por terem contribuído de forma valiosa para a melhoria do trabalho.

À Profa. Dra. Alessandra Kataoka, Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, Profa. Dra. Maria Angélica Dias e Profa. Dra. Elzylene Lega por aceitarem o convite em participar da minha banca de defesa de Doutorado, mesmo diante da distância e dos afazeres do dia a dia.

Ao Prof. Dr. Josep Pastor Milán pela orientação no Doutorado Sanduíche, na UAB, Barcelona, Espanha.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de estudos para realização do Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo, propiciando a realização do Doutorado Sanduíche na UAB, Barcelona, Espanha.

Ao auxílio financeiro FAPESP, pelo crédito concedido para realização da pesquisa científica.

À amiga Profa. Márcia F. R. Sobreira que sempre me acolheu com sua amizade e palavras carinhosas.

Aos amigos de coração da pós-graduação: Andréa Campos Belfort, Rosana Lino, Livia Maria Souza Semolin, Anelise Carvalho, Karina Ferreira de Castro, Vanessa Páfaro, Thais Melo, Gisele Batista, Giovanni Vargas Hernandez, Poliana Melo, Kelly Caselani, André L. B. Galvão, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntos...

Às queridas amigas de Ribeirão Preto: Mariana Barbosa, Carmem Lúcia Minto, Renata Pucci, Vanessa de Oliveira, Amanda Bonilha, Juliana Stefanello, Marina Casari, Talita Albanezi, "As Catarinas", que sempre valorizaram nossa amizade...

À Beatriz Junqueira e Rejane Guerra Ribeiro, amigas de longa data, amigas de verdade, amigas que fazem a amizade valer a pena....

Às amigas espanholas Eva Codina e Susana Augusti, à amiga Costa Riquense Natalia Carballo, à amiga mexicana Jhaqueline Euán e à amiga brasileira Adriene Ribeiro, com vocês a experiência de viver no exterior ficou mais valiosa...

Às amigas colombianas Cristina Herto, Natália Pedraza e Edna Ortiz, pela ajuda no idioma espanhol para realização da proficiência.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica, Eugênio de Campos Filho, Mateus Yamasaki, residente Nathan Cruz e técnico Douglas Luduvério, pela ajuda e disposição sempre que necessário.

Ao Dr. Paulo César da Silva, funcionário do Laboratório de Apoio à Pesquisa, da FCAV – Unesp, Jaboticabal/SP, pelo auxílio na realização da eletroforese.

Ao Prof. Dr. José Carlos Barbosa, pelas inúmeras análises estatísticas realizadas sempre com muita atenção.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier por permitir meu acesso as aulas de imunologia na graduação.

Aos animais e proprietários de animais que acreditaram no nosso trabalho e acima de tudo colocaram suas esperanças em nossas mãos...

Aos funcionários da pós-graduação e da biblioteca, da FCAV/Unesp, Jaboticabal, pelas orientações no decorrer do Mestrado e Doutorado.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

CEUA.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Linfoma Canino.....	2
2.1.1 Definição	2
2.1.2 Imunidade	2
2.1.3 Incidência	3
2.1.4 Etiologia	3
2.1.5 Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais	4
2.1.6 Classificação Anatômica	5
2.1.7 Estadiamento Clínico	5
2.1.8 Diagnóstico e Prognóstico	6
2.1.9 Imunofenotipagem	6
2.1.10 Classificação Morfológica	6
2.1.11 Quimioterapia Antineoplásica	8
2.2 Proteínas Totais e Frações Protéicas.....	9
2.2.1 Proteína Total	9
2.2.2 Globulinas	10
2.2.3 Relação Albumina:Globulina	11
2.2.4 Proteínas de Fase Aguda (PFA)	12
2.2.5 Frações Proteicas	14

a) Proteínas de Fase Aguda	14
b) Imunoglobulinas	20
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Instituições Envolvidas.....	25
4.2 Grupos Experimentais.....	25
4.3 Momentos Avaliados	26
4.4 Avaliação das Parcelas Experimentais.....	27
4.5 Quimioterapia Antineoplásica.....	27
4.6 Colheita de Material Biológico.....	29
4.7 Imunofenotipagem	29
4.7.1 Técnica de Imuno-histoquímica.....	29
4.8 Avaliação da Proteína Total e Frações Protéicas	30
4.8.1 Proteína Total.....	30
4.8.2 Albumina	31
4.8.3 Globulina	31
4.8.4 Relação Albumina Globulina	31
4.8.5 Fracionamento Eletroforético.....	31
4.9 Análise Estatística.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Imunofenotipagem, Estadiamento Clínico e Resposta ao Tratamento	33
5.2 Histopatológico	38
5.3 Proteína Total e Frações Protéicas.....	39
5.3.1 Proteína Total, Albumina, Globulina e Relação A:G.....	40
5.3.2 Frações Protéicas: Proteínas de Fase Aguda (PFA) e Imunoglobulinas ..	46
a) Proteínas de Fase Aguda: AAT, AGP, CP, HP e TN	46

b) Imunoglobulinas: IgG e IgA	53
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICE A	67
APÊNDICE B	69

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 021929/09 do trabalho de pesquisa intitulado "**Imunofenotipagem, imunoistoquímica e eletroforese de proteínas séricas no linfoma canino**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de outubro de 2009.

Jaboticabal, 13 de outubro de 2009.



Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui
Presidente - CEUA



Med. Vet. Maria Alice de Campos
Secretária - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

AAT: alfa-1-antitripsina

AGP: alfa-1-glicoproteína ácida

C3: complemento C3

C4: complemento C4

CAAF: citologia aspirativa por agulha fina

CD: *Cluster of Designation*

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

CR: ceruloplasmina

DAB: *Diaminobenzidine Tetrachloride*

DE: doença estável

DP: doença progressiva

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

GC: grupo controle

GLB: grupo linfoma B

GLT: grupo linfoma T

HP: Haptoglobina

HRP: *Horseradishperoxidase*

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

IgA: imunoglobulina A

IgD: imunoglobulina D

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IHQ: imuno-histoquímica

KDa: kilodáltons

M: molar

M₀: momento do diagnóstico da doença

M₅: momento da 5ª semana de quimioterapia

M_R: momento da recidiva da doença

mA: miliampere

NK: *natural killer*

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PFA: proteína de fase aguda

PT: proteína total

RC: remissão completa

RP: remissão parcial

RFA: resposta de fase aguda

Relação A/G: relação albumina globulina

SDS-PAGE: *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

SRD: sem raça definida

TEMED: Tetrametiletenodiamina

TN: transferrina

TNF- α : fator alfa de necrose tumoral

UK: *United Kingdom*

WHO: *World Health Organization*

α -globulina: alfa globulina

β -globulina: beta globulina

γ -globulina: gama globulina

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Estadiamento clínico do linfoma, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)	5
Tabela 2. Classificação histopatológica do linfoma canino, segundo a OMS (VEZZALI et al., 2009).....	7
Tabela 3. Características gerais de raça, sexo, idade e peso dos cães do grupo linfoma B (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	26
Tabela 4. Características gerais de raça, sexo, idade e peso dos cães do grupo linfoma T (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	26
Tabela 5. Número de animais dos três grupos experimentais nos momentos M_0 , M_5 e M_R (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	27
Tabela 6. Protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin modificado (NELSON & COUTO, 2006) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).....	28
Tabela 7. Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfonodos caninos (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).....	30
Tabela 8. Imunofenotipagem (M_0), estadiamento clínico (M_0) e resposta ao tratamento (M_5) dos cães com linfoma (FCAV / Unesp, Jaboticabal, 2013).....	34
Tabela 9. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações protéicas, em cães acometidos por linfoma, segundo a resposta ao tratamento (M_5) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	36
Tabela 10. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações protéicas, em cães acometidos por linfoma, de acordo com o estadiamento clínico (M_0) (FCAV / Unesp, Jaboticabal, 2013).....	37
Tabela 11. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações protéicas, em cães acometidos por linfoma, de acordo com o subestádio clínico (M_0) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	38
Tabela 12. Classificação morfológica (OMS) do linfoma nos cães dos grupos linfoma B (GLB) e linfoma T (GLT) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013)...	39
Tabela 13. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total, albumina, globulina e relação Albumina:Globulina, nos três grupos experimentais (GC, GLB e GLT), nos diferentes momentos (M_0 , M_5 e M_R) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).....	43

- Tabela 14. Valores médios e desvios-padrão obtidos para as proteínas de fase aguda AAT, AGP, CP, HP e TN (mg/dL), nos grupos experimentais (GC, GLB e GLT), nos momentos M_0 , M_5 e M_R (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013)..... 50
- Tabela 15. Valores médios e desvios-padrão obtidos para as imunoglobulinas IgG e IgA, nos três grupos experimentais (GC, GLB e GLT), nos diferentes momentos (M_0 , M_5 e M_R) (FCAV / Unesp – Jaboticabal, 2013)..... 55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Representação gráfica da proteína total (A) e albumina (B) (g/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV/Unesp-Jaboticabal, 2013).....	44
Figura 2. Representação gráfica da glogulina (A) e relação A:G (B) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).....	45
Figura 3. Representação gráfica da AAT (A) e AGP (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).....	51
Figura 4. Representação gráfica da CP (A) e HP (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV / Unesp–Jaboticabal, 2013).....	52
Figura 5. Representação gráfica da TN (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV/Unesp–Jaboticabal, 2013).....	53
Figura 6. Representação gráfica da IgG (A) (g/dL) e IgA (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M ₀ , M ₅ e M _R (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).....	56

PERFIL DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES COM LINFOMA MULTICÊNTRICO DE IMUNOFENÓTIPO B OU T: CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS

RESUMO - O linfoma é o tumor de tecido hemolinfopoiético mais comum nos cães e um dos tumores malignos de maior ocorrência na referida espécie. Um importante complemento ao seu diagnóstico é a investigação imunofenotípica da subpopulação de linfócitos envolvida e caracterização do subestádio do tumor, estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Adicionalmente a avaliação das proteínas séricas em cães com neoplasias, poderia auxiliar o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença. Inflamações, infecções, doenças imunológicas e neoplasias, podem estimular a resposta de fase aguda (RFA), que inclui alterações nas concentrações de determinadas proteínas, chamadas proteínas de fase aguda (PFA). A avaliação das PFA em cães com linfoma poderia auxiliar o diagnóstico, prognóstico e monitoramento da doença. Este ensaio foi concebido para avaliar as proteínas séricas totais e suas frações, através da técnica de SDS-PAGE, correlacionando-as aos fatores prognósticos do linfoma canino, tais como imunofenotipagem dos linfócitos, resposta ao tratamento e estadiamento clínico da doença. Para tanto, foram avaliados 30 cães, machos ou fêmeas, sendo 10 hígidos e 20 acometidos por linfoma multicêntrico, atendidos junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" da FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal/SP. Os animais foram distribuídos em três grupos, sendo um grupo controle (GC) constituído de cães hígidos (n=10), um grupo de cães acometidos por linfoma B (GLB) (n=12) e um grupo de cães acometidos por linfoma T (GLT) (n=8). Os animais foram avaliados em três diferentes momentos: M_0 (diagnóstico), M_5 (5ª semana de quimioterapia) e M_R (recidiva da doença). As proteínas séricas totais e suas frações não apresentaram correlação com a imunofenotipagem, nem com a resposta ao tratamento, nos cães com linfoma. A albumina apresentou correlação com o estadiamento e subestadiamento clínico do linfoma. Algumas PFA apresentaram-se mais elevadas no GLB e outras no GLT, portanto estas proteínas demonstraram alterações biológicas importantes na síntese proteica de acordo com o imunofenótipo.

Palavras-chave: canina, doença linfoproliferativa, eletroforese, proteínas de fase aguda, albumina, ceruloplasmina

PROFILE OF SERUM PROTEINS IN DOGS WITH MULTICENTRIC LYMPHOMA OF IMMUNOPHENOTYPE B OR T: CORRELATION WITH PROGNOSTIC FACTORS

ABSTRACT – Lymphoma is the tumor of hematolymphopoietic tissue most common in dogs and one of the most frequent malignant tumors in that specie. An important adjunct in diagnosis is to investigate the subpopulation involved and the immunophenotypic characterization of the tumor subtype stated by the World Health Organization (WHO). In addition, the valuation of serum proteins in dogs with cancer, could aid in the diagnosis, prognosis and monitoring of disease. Inflammations, infections, autoimmune diseases and cancers, can stimulate acute phase response, including abnormal levels of certain proteins called acute phase proteins (APP). This trial was designed to evaluate the serum total protein and its fractions by SDS-PAGE technique, and relate if to prognostic factors in canine lymphoma, such as immunophenotyping of lymphocyte, clinical stage of disease and response to treatment. Therefore, we evaluated 30 dogs, males or females, being 10 healthy and 20 affected by multicentric lymphoma, treated with the Veterinary Hospital "Governor Laudo Natel", FCAV / UNESP, Jaboticabal / SP. The animals were divided into three groups, one control group (GC) formed by healthy dogs ($n = 10$), a group of dogs with B lymphoma (GLB) ($n = 12$) and a group of dogs with T lymphoma (GLT) ($n = 8$). The animals were evaluated at three different moments: M_0 (at diagnosis), M_5 (5th week of chemotherapy) and M_R (disease recurrence). Serum total proteins and its fractions did not correlate with immunophenotype, or the response to treatment in dogs with lymphoma. Albumin correlated with staging and clinical substaging lymphoma. Some APP were more elevated in the GLB and others in the GLT, therefore these proteins showed significant biological alterations in protein synthesis according to the immunophenotype.

Keywords: canine, lymphoproliferative disease, electrophoresis, acute phase protein, albumin, ceruloplasmin

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão e corresponde a mais de 80% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie (DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003; FAN & LORIMIER, 2005). Trata-se de neoplasia caracterizada pela proliferação de células linfoides malignas, originárias do tecido linfoide tais como linfócitos, seus precursores e derivados, que afeta primariamente os linfonodos ou órgãos viscerais sólidos como fígado e baço (VAIL, 2000). No diagnóstico do linfoma bem como em outras doenças linfoproliferativas, a imunofenotipagem das células linfoides tem grande importância, uma vez que a classe celular envolvida, assim como o seu estágio de evolução, tem grande implicação no comportamento biológico do linfoma (KIUPEL; TESKE; BOSTOCK, 1999).

Os animais possuem o sistema imune interligado aos demais sistemas existentes e há um envolvimento de mediadores proteicos na modulação da resposta imune. Estes mediadores vêm sendo estudados de modo que a sua manipulação experimental tem viabilizado grandes descobertas que possibilitam diagnósticos mais precoces e precisos na rotina clínica.

A injúria tecidual conduz a uma resposta imune inata imediata, produzindo agentes de resposta de fase aguda (RFA), entre eles se destacam as proteínas de fase aguda (PFA), indispensáveis para o restabelecimento da homeostasia corporal (CERÓN et al., 2005). Após o estímulo gerado pelas citocinas, principalmente a interleucina-1, interleucina-6 e fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), liberadas por células de defesa, o fígado sintetiza e libera a maioria das PFA, o que resulta no seu aumento na corrente sanguínea (PETERSEN et al., 2004).

De outra parte, o estudo das PFA tem despertado grande interesse no diagnóstico dos linfomas. No entanto, não há relatos na literatura em cães com linfoma de imunofenótipo B ou T, correlacionando-os com as PFA. Portanto, o objetivo do presente ensaio foi avaliar o perfil eletroforético das proteínas séricas em cães com linfoma multicêntrico e correlacioná-lo com os fatores prognósticos, tais como imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias, estadiamento clínico e resposta ao tratamento.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma Canino

2.1.1 Definição

Também chamado de linfossarcoma e linfoma maligno, é um dos tumores malignos de maior ocorrência, que tem sido relatado em todas as espécies domésticas, principalmente em mamíferos. É o tumor do tecido hematopoiético mais comum nos cães, correspondendo a 83% das neoplasias hematopoiéticas (OGILVIE & MOORE, 1995; DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003), e chegando a representar 7 a 9% das neoplasias malignas nesta espécie (MORRISON, 1998; VAIL, 2000).

O linfoma é uma neoplasia caracterizada pela proliferação clonal de linfócitos malignos nos órgãos linfoides, tais como a medula óssea, linfonodos e baço (DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003). Devido à contínua migração destas células, os linfomas podem se originar em praticamente qualquer tecido (VAIL et al., 2003; FAN, 2005).

2.1.2 Imunidade

O fato das neoplasias serem consequentes a diversos fatores e relativamente comuns, deixa antever a inadequação dos mecanismos protetores imunológicos. Diversos estudos mundiais têm evidenciado que animais portadores de tumores desenvolvem mecanismos, por meio dos quais, as células tumorais conseguem driblar o sistema imune. Assim é que, geralmente animais com neoplasias apresentam-se imunodeprimidos e, que tal supressão, é mais claramente observada nos animais com tumores linfóides. Adicionalmente, os tumores de células B tendem a suprimir a formação de anticorpos, enquanto os tumores de origem T, geralmente suprimem as respostas celularmente mediadas e a atividade das células NK (ABBAS & LICHTMAN, 2005; TIZARD, 2008). Segundo Daleck et al. (2008), a imunossupressão é um estado que possivelmente predispõe cães e gatos ao desenvolvimento de linfoma.

O sistema imune é composto pela imunidade inata e adquirida. A imunidade inata representa a primeira linha de defesa do organismo frente a um agente agressor, e compreende a ação de lisozimas, complementos, interferons, quimiocinas e proteínas de fase aguda (PFAs), todos da família de componentes humorais; e células NK, fagócitos e células dendríticas, como componentes celulares. A imunidade adquirida representa a segunda linha de defesa do organismo contra um antígeno estranho e envolve, como componentes celulares, linfócitos B e T, e como humorais os anticorpos, perforinas, citocinas e quimiocinas (ABBAS & LICHTMAN, 2005; TIZARD, 2008).

2.1.3 Incidência

Corresponde a aproximadamente 90% das neoplasias do sistema hematopoiético nos cães (MORRISON, 1998; FAN & LORIMIER, 2005), com uma incidência de 30 casos a cada 100.000 cães/ano (SEQUEIRA et al., 1999).

Fráguas (2008) registrou entre 2003 e 2006, no Hospital Veterinário da FCAV UNESP/Jaboticabal, SP, Brasil, 108 cães acometidos, com predominância de cães sem raça definida (SRD), adultos jovens e sem predisposição sexual. Resultados semelhantes foram relatados após estudos retrospectivos da incidência de linfomas caninos, realizados na região de Botucatu, SP (CARDOSO et al., 2003).

2.1.4 Etiologia

A etiologia do linfoma canino é multifatorial, entretanto, a presença de agentes virais não foi ainda comprovada na espécie canina, ao contrário do que acontece nos seres humanos, felinos, bovinos, roedores, aves e alguns primatas (JONES et al., 1997; MORRISON, 2005). Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas, como o herbicida 2,4 ácido fenoxiacético, alterações genéticas herdadas ou adquiridas e imunossupressão são citados como predisponentes ao desenvolvimento de linfoma em cães (DALECK et al., 2008).

Em cães de raças puras, a predisposição genética para este tipo de neoplasia parece existir (MORRISON, 2005). Os animais portadores de linfoma pertencem

predominantemente as raças de grande ou médio porte, como Boxer, Basset Hound, Rottweiler, Cocker Spaniel, São Bernardo, Golden Retriever, entre outros (SEQUEIRA et al.,1999; COUTO, 2006). Alguns autores afirmam que os animais da raça Boxer representam a maior parcela de cães acometidos por linfoma, sugerindo uma predisposição genética desta raça (FORNEUL-FLEURY et al., 1994; SOZMEN et al., 2005). Porém, a predisposição racial neste tipo de neoplasia ainda é um assunto controverso (MOULTON & HARVEY, 1990).

Quanto ao sexo, alguns autores ingleses relatam a predominância de linfomas em machos, sendo que estes respondem por 68% dos casos (DOBSON & GORMAN, 1994). Quanto à idade, o linfoma canino é mais frequentemente observado em animais adultos e senis, podendo ocorrer também em animais muito jovens (SEQUEIRA et al., 1999).

2.1.5 Sinais Clínicos e Alterações Laboratoriais

Os sinais clínicos do linfoma variam de acordo com a sua apresentação anatômica e histológica. O linfoma multicêntrico é caracterizado por linfadenomegalia generalizada, envolvimento hepático, esplênico, da medula óssea, ou a combinação destes. Os linfonodos acometidos apresentam-se aumentados, indolores e com mobilidade livre, podendo em caso de obstrução mecânica da drenagem linfática levar à ocorrência de edema (NELSON & COUTO, 2006).

A hipercalcemia caracterizada por anorexia, perda de peso, letargia, fraqueza, poliúria, polidipsia e, raramente, depressão do sistema nervoso central e coma, é uma das síndromes paraneoplásicas que pode estar associada com o linfoma (VAIL & YOUNG, 2007). As síndromes paraneoplásicas são sinais e sintomas presentes em pacientes com câncer, distantes do tumor ou de suas metástases, e que não são causadas por obstrução ou efeito da neoplasia (DALECK et al.,2008).

Os pacientes com linfoma podem desenvolver anemia de leve à moderada, em decorrência da liberação de fatores neoplásicos que deprimem a eritropoese. Outras formas de anemia são também descritas, dentre elas a anemia hemolítica autoimune, a anemia hemorrágica e a anemia das doenças crônicas (FIGHERA, 2001).

O animal acometido por linfoma pode apresentar leucometria normal, diminuída

ou elevada, porém um quadro de linfocitose quase sempre é observado (RASKIN & KRENBIEL, 1989). Quando há anemia, linfocitose, neutropenia, trombocitopenia e presença de linfócitos atípicos ou linfoblastos circulantes, estas alterações sugerem o envolvimento da medula óssea. Assim, o mielograma pode auxiliar na confirmação de seu comprometimento, sendo muitas vezes difícil a diferenciação entre linfoma e leucemia (DALECK et al., 2008).

2.1.6 Classificação Anatômica

O linfoma canino apresenta características semelhantes ao linfoma não-Hodgkin humano, podendo assim ser classificado anatomicamente em multicêntrico, mediastinal, digestivo, cutâneo e extranodal. Em cães a forma multicêntrica é a mais prevalente, como asseverado por Moulton & Harvey (1990).

2.1.7 Estadiamento Clínico

Em cães o linfoma é classificado em diferentes estádios clínicos, que compreendem a extensão da doença em outros órgãos, a presença de síndromes paraneoplásicas e os sinais clínicos (DE MOURA; SEQUEIRA; BANDARRA, 1999). O estadiamento auxilia na determinação do prognóstico da doença, no diagnóstico mais precoce, permite tratamento adequado e aumento no tempo de sobrevivência dos pacientes com linfoma (MORENO & BRACARENSE, 2007). Geralmente, a classificação em estádios segue o protocolo proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e tem uma variação de grau de I a V (OWEN, 1980) (Tabela 1).

Tabela 1. Estadiamento clínico do linfoma, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Estádio	Órgão acometido
Estádio I	Envolvimento limitado a um linfonodo
Estádio II	Envolvimento de linfonodos regionais
Estádio III	Aumento generalizado dos linfonodos
Estádio IV	Envolvimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia
Estádio V	Envolvimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos

Além disso, o linfoma pode ser classificado em subestádios de acordo a presença de sinais clínicos, ou seja, subestádio “a” quando não há sinais clínicos, e subestádio “b” quando há sinais clínicos da doença (VAIL, 2000).

2.1.8 Diagnóstico e Prognóstico

O diagnóstico inicial do linfoma geralmente tem como base os resultados obtidos no exame físico, nas alterações hematológicas, bioquímico-séricas e exames de imagem. Porém, o diagnóstico definitivo só pode ser firmado pela avaliação citológica ou histológica do órgão afetado. Estudos revelam a importância da citologia aspirativa com agulha fina (CAAF) no diagnóstico do linfoma não-Hodking (SANTANA et al., 2008), principalmente quando aliada a imunofenotipagem do sangue periférico pela citometria de fluxo (SÖZMEN et al., 2005). O prognóstico nos casos de linfoma canino tem relação direta com o subestádio e, desta forma, tem sido observado que animais com sinais clínicos de linfoma (subestádio b) têm prognóstico reservado. Já, com relação à caracterização imunofenotípica dos linfócitos, tumores imunorreativos CD3 (derivados de células T) têm remissão mais curta (VAIL, 2000).

2.1.9 Imunofenotipagem

Em relação à imunofenotipagem, podem ser classificados em linfomas T, B, não T/não B e mistos (B e T), sendo mais comumente diagnosticados os linfomas B (SEQUEIRA et al., 1999). Contrariamente, Coleta (2009), trabalhando na região de Jaboticabal, SP, com imunofenotipagem de células linfomatosas em cães, relatou maior frequência do imunofenótipo T.

2.1.10 Classificação Morfológica

Quanto à classificação citomorfológica, os linfomas podem ser de alto, médio ou baixo grau de malignidade, sendo a maioria dos casos de cães com linfoma classificados como de alto grau, segundo a classificação de Kiel (SEQUEIRA et al., 1999). Segundo a classificação histopatológica da OMS, os linfomas não Hodgkin podem ser classificados em imunofenótipo B ou T (VEZZALI et al., 2009) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação histopatológica do linfoma canino, segundo a OMS (VEZZALI et al., 2009).

B	Precursor Maduro	Leucemia Linfoblástica Aguda-B (LLA-B), Linfoma Linfoblástico-B (LL-B), Leucemia Linfocítica Crônica-B (LLC-B), Linfoma Linfocítico Pequeno-B (LLP-B), Linfoma Linfocítico Tipo Intermediário e Linfoma Linfoplasmocítico
	Folicular	Linfoma de Células do Manto, Linfoma de Células do Centro Folicular-I (LCCF-I), LCCF-II, LCCF-III, Linfoma de Zona Marginal (LZM), LZM Esplênico e Linfoma de Tecido Linfóide Associado a Mucosa.
	Tumores Plasmocíticos (TP)	TP Indolente, TP Anaplásico e Mieloma
	Linfoma de Grandes Células B (LGCB)	LGCB Clivado ou não Clivado, Linfoma Imunoblástico de Grandes Células, LGCB rico em Células T e LGCB Tímico
	Linfoma Burkitt Like	
T	Precursor	LLA-T e LL-T
	Maduro	LLC-T, LLP-T, Leucemia ou Linfoma Linfocítico de Grandes Grânulos e LLC de Células NK
	Cutâneo	Linfoma Epiteliotrópico Cutâneo (LEC) e Linfoma não Epiteliotrópico Cutâneo
	Linfoma de Células T Periférico ou Extranodal	
	Linfoma Angiotrópico	Linfoma Angiocêntrico e Linfoma Angioinvasivo
	Linfoma de Células T Intestinal	
	Linfoma de Grandes Células Anaplásico	

2.1.11 Quimioterapia Antineoplásica

Os fármacos antineoplásicos podem causar vários efeitos tóxicos, especialmente nas células que estão em constante divisão, como as hematopoiéticas. O grau de toxicidade varia de acordo com o nível de destruição tumoral, a condição sistêmica da malignidade, as mudanças no metabolismo e na competência do sistema imune induzidas pela neoplasia (BARGER & GRINDEM, 2000).

A toxicidade hematológica é um fator limitante da quimioterapia. Trata-se do efeito colateral mais freqüente e mais grave, por dois motivos. Primeiramente, porque pode comprometer a quimioterapia de maneira transitória ou definitiva, uma vez que a diminuição da dose determinada pode prejudicar a eficácia do tratamento. Em segundo lugar, porque relaciona-se ao risco potencial de morte do animal em decorrência de neutropenia séptica. A ciclofosfamida possui mielotoxicidade elevada e a vincristina, na dose de 0,75 mg/m², possui mielotoxicidade moderada (LANORE & DELPRAT, 2004).

A neutropenia é a mais freqüente e mais grave das citopenias resultantes da quimioterapia. O nadir de neutrófilos, momento no qual o número de granulócitos é o mais baixo após uma sessão de quimioterapia, é geralmente constatado uma semana após o início do tratamento. A neutropenia, fase mais perigosa do ciclo, persiste por 3 a 5 dias. Em pouco menos de duas semanas, a medula óssea passa por uma fase de recuperação (LANORE & DELPRAT, 2004). O hemograma reflete a magnitude e o grau de comprometimento da medula óssea e pode ser utilizado para monitorar os efeitos da terapia antineoplásica (BARGER & GRINDEM, 2000).

A poliquimioterapia é a modalidade mais utilizada e eficaz no tratamento do linfoma canino (DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003) e é subdividida em três etapas: indução da remissão, manutenção da remissão e reindução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN & YOUNG, 1996). Desta forma, o protocolo quimioterápico de Madison-Wiscosin, introduzido mais recentemente, é capaz de promover remissão e tempo de sobrevivência mais prolongados no caso de cães com linfoma, sendo um dos protocolos mais empregados no tratamento de linfoma em cães (MORRISON, 2005).

Os fármacos antineoplásicos vincristina, L-asparaginase, ciclofosfamida, doxorrubicina e prednisona, fazem parte do protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (RODASKI & DE NARDI, 2008).

A L-asparaginase é um agente antineoplásico obtido de organismos como a *Escherichia coli* e a *Erwinia carotovora*. Ela é uma enzima capaz de destruir as reservas exógenas do aminoácido asparagina, uma vez que este aminoácido é vital ao processo de síntese protéica das células neoplásicas. A enzima L-asparaginase é um antilábico ciclo celular específico. A vincristina é um alcalóide vegetal extraído da planta “Vinca Rósea” (*Catharantus roseus*) que age inibindo a mitose, pois é um fármaco ciclo celular específico. A prednisona é um hormônio que atua em receptor celular específico, causando a cisão do DNA, prevenindo a divisão celular. A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada, classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese e divisão do DNA e é um fármaco antineoplásico ciclo celular não específico. A doxorrubicina é um antibiótico antitumoral derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, e é um inibidor da transcriptase reversa da RNA polimerase. Sendo assim, impede a síntese de DNA e RNA e é um agente ciclo celular não específico (RODASKI & DE NARDI, 2008).

2.2 Proteína Total e Frações Protéicas

2.2.1 Proteína Total

As proteínas são substâncias essenciais à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica sob a forma de anticorpos, entre outras funções (JAIN, 1993; ECKERSALL, 2008). As proteínas séricas totais compreendem a albumina e as globulinas sem o fibrinogênio, pois este é totalmente consumido na formação do coágulo sanguíneo. Já as proteínas plasmáticas totais compreendem a albumina e globulinas incluindo o fibrinogênio. A albumina e todas as outras proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas pelo fígado. As imunoglobulinas são sintetizadas pelos plasmócitos no tecido linfóide em resposta à estimulação antigênica, e estão incluídas nas frações beta e gamaglobulinas (BUSH, 2004).

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa globulinas, betaglobulinas, e gamaglobulinas), obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (ECKERSALL, 2008).

2.2.2 Globulinas

As globulinas são formadas pelas frações proteicas alfa, beta e gamaglobulinas (α , β e γ) e, em muitos casos, cada uma delas pode ser claramente subdividida em duas bandas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 e γ_2) (BUSH, 2004; ECKERSALL, 2008).

As alfa globulinas são as globulinas que migram mais rapidamente no gel de eletroforese, sendo as proteínas mais importantes na fração alfa-1 a alfa-1-lipoproteína, alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), e a fração alfa-2 compreende a pré-beta lipoproteína, haptoglobina (HP) e ceruloplasmina (CP) (ECKERSALL, 2008).

As betaglobulinas são compostas pelo complemento (C3 e C4), hemopexina, transferrina, ferritina, PCR e fibrinogênio. As imunoglobulinas IgM e IgA, prolongam-se da região beta-2 para gama-2 (ECKERSALL, 2008).

As gamaglobulinas contêm as imunoglobulinas IgM e IgE que são encontradas primariamente na região gama-1 e a IgG na região gama-2 (ECKERSALL, 2008). A concentração de gamaglobulinas aumenta com a estimulação antigênica, especialmente nas infecções crônicas e doenças autoimunes (BUSH, 2004). Uma população específica de plasmócitos de genótipo homogêneo e bem definido, um clone, produz uma imunoglobulina específica. O crescimento descontrolado de um ou de um grupo de clones de células B, resulta em uma super produção de espécies químicas de imunoglobulinas, que aparecem como um pico monoclonal pontiagudo (gamopatia monoclonal) ou difuso (gamopatia policlonal) no eletroforetograma (ECKERSALL, 2008).

2.2.3 Relação Albumina:Globulina (A:G)

É comum mensurar as concentrações de proteína total e de albumina e pressupor que a diferença entre estas representa a concentração de globulinas. A partir dessas concentrações, pode ser calculada a relação A:G, que pode ajudar no diagnóstico, acentuando as alterações relativas nos dois principais compartimentos de proteína. A comparação cuidadosa das frações de albumina e globulina derivadas da eletroforese, apresenta maior sensibilidade (ECKERSALL, 2008).

As alterações nas concentrações de proteína total se devem, primariamente, a aumentos e diminuições na concentração de albumina, e as alterações na concentração de globulinas geralmente tem menor efeito (ECKERSALL, 2008).

Disproteinemias são anormalidades quantitativas e qualitativas nas concentrações de proteínas plasmáticas, sendo neste caso a eletroforese o método indicado para avaliação global do quadro proteico. A eletroforese das proteínas séricas seguida pelo cálculo dos valores absolutos das frações proteicas fornecem bases excelentes para um diagnóstico. O estabelecimento do perfil eletroforético das frações proteicas séricas em conjunto com a relação A:G fornece subsídios para interpretação das discrasias proteicas (ECKERSALL, 2008).

O perfil eletroforético normal de proteínas séricas traduz uma relação A:G normal. Essa relação A:G normal também pode ser observada na presença de hiperproteinemia ou hipoproteinemia. A hiperproteinemia pode ocorrer por desidratação, e nesse caso todas as frações proteicas aumentam proporcionalmente, incluindo a albumina. O aumento da proteína total também pode ocorrer devido a hiperglobulinemia, pelo aumento das alfa, beta e/ou gamaglobulinas (LASSEN, 2007). A hipoproteinemia pode ocorrer por aumento da perda de proteína ou diminuição da síntese proteica. O aumento da perda de proteína pode ser observado na hemorragia, enteropatia, dermatite exsudativa grave, queimaduras graves e derrames. A diminuição da síntese proteica pode ser observada na insuficiência hepática, inanição, parasitismo gastrointestinal, má absorção intestinal, insuficiência pancreática exócrina e doença glomerular (LASSEN, 2007). A hipoproteinemia raramente pode ocorrer por uma super hidratação, podendo ocorrer por perda aguda de sangue ou de plasma, onde haverá um deslocamento do fluido

intersticial para o plasma. Essa diluição pode ser intensificada pelo mecanismo compensatório de ingestão de água para satisfazer a sede (ECKERSALL, 2008).

A eletroforese anormal de proteínas séricas pode traduzir diminuição ou aumento na relação A:G. A diminuição na relação A:G pode ser devido a uma diminuição da albumina ou um aumento das globulinas. Já o aumento na relação A:G pode ser devido a um aumento da albumina ou uma diminuição das globulinas (ECKERSALL, 2008).

2.2.4 Proteínas de Fase Aguda (PFA)

Em animais com distúrbios na homeostase devido à infecção, inflamação, injúria tecidual, neoplasia ou desordem imunológica, há uma resposta de fase aguda (RFA) inespecífica. Esta resposta compreende alterações na concentração de algumas proteínas séricas referidas como proteínas de fase aguda (PFA).

A mensuração das concentrações das PFA pode auxiliar no monitoramento de protocolos terapêuticos em cães com determinadas neoplasias (CÉRON et al., 2005). Segundo Eckersall (2004), estas proteínas, além de úteis no auxílio diagnóstico de linfomas em pacientes humanos, leucemia e mieloma múltiplo, são indicadores de prognóstico, permitindo detectar precocemente a sepse. Pesquisas recentes têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e trazer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000).

Classificação das PFA

As PFA podem ser classificadas de acordo com sua concentração plasmática, seu modo de ação e mecanismo de síntese (JAIN et al., 2011).

Classificação baseada na concentração plasmática

a) PFA negativas

Na inflamação o fígado responde produzindo um grande número de PFA. Por outro lado, a produção de uma série de outras proteínas é reduzida. Estas são conhecidas como PFA negativas. Neste grupo se encontram a albumina, a transferrina, a transtiretina, a transcortina e a proteína de ligação do retinol (JAIN et al., 2011).

b) PFA positivas

As PFA positivas são glicoproteínas produzidas e liberadas pelos hepatócitos a partir de estímulo específico de citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α) (KANEKO, 1997, ECKERSALL, 2008). São consideradas PFA positivas as que apresentam elevação da concentração sérica na inflamação, como a proteína C reativa (PCR), proteína ligadora de manose, alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-antiquimiotripsina (AAQ), alfa-2-macroglobulina, fibrinogênio, protrombina, fator VIII, fator de Von Willebrand, plasminogênio, fatores do complemento, ferritina, amilóide A sérica (SAA), ceruloplasmina (CP), haptoglobina (Hp) e alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) (CERÓN et al., 2005; ECKERSALL, 2008, JAIN et al., 2011).

As PFA positivas desempenham diversas funções fisiológicas para o sistema imunológico, como destruição ou inibição do crescimento de microrganismos, atuação nos estados de inflamação sistêmica associada à anorexia e alterações metabólicas. Outras são responsáveis pelo *feedback* negativo sobre a resposta inflamatória (JAIN et al., 2011).

Classificação baseada no modo de ação

Considerando o modo de ação das PFA, pode ser estabelecida a seguinte classificação (JAIN et al., 2011):

- inibidores das proteases: AAT e AAQ;
- proteínas da coagulação: fibrinogênio e protrombina.
- proteínas do sistema complemento: C2, C3, C4, C5;
- proteínas de transporte: Hp e CP;
- outras proteínas, como PCR, SAA e AGP.

Classificação baseada no mecanismo de síntese

As PFA são produzidas devido a RFA que estimula a produção hepática pelos hepatócitos e também ocorre a estimulação extra-hepática, com a produção pelas células epiteliais, células endoteliais e tecido conjuntivo (JAIN et al., 2011).

Classificação baseada na magnitude de aumento

A classificação da RFA é dividida em principal, moderada e menor. A PCR e SAA são classificadas como resposta principal. A AAT, AGP, CR, HP e proteína-C são classificadas como resposta moderada (CERÓN et al., 2005; ECKERSALL & BELL, 2010).

2.2.5 Frações Proteicas

a) Proteínas de Fase Aguda (PFA)

Albumina

Na eletroforese a albumina migra com maior rapidez e aparece como um pico alto e distinto em uma das pontas da curva, geralmente localizada à esquerda. A albumina corresponde a 60% da quantidade total de proteínas, portanto, é a proteína mais abundante no plasma (ECKERSALL, 2008), sendo que a sua concentração sérica é controlada pela pressão coloidosmótica (EVANS, 2002). A albumina é sintetizada pelos ribossomos no citoplasma de hepatócitos, transferida para o retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso e complexo de golgi, através da membrana dos sinusoides (PRINSEN & de SAIN-van der VELDEN, 2004). A albumina aparece no citoplasma dos hepatócitos como um precursor chamado pré-albumina (ECKERSALL, 2008). Somente cerca de 30 a 40% da albumina está no sangue, o restante está no espaço intersticial. Músculos, fígado e rins são os principais colaboradores para o catabolismo da albumina, com 40 a 60%

da albumina total metabolizada nesses tecidos (PRINSEN & de SAIN-van der VELDEN, 2004).

Diversos metabólitos no sangue se unem a albumina, e essa união auxilia o transporte de substâncias que são solúveis em meio aquoso e também evita perdas, através dos rins, de importantes moléculas pequenas. A albumina constitui importante reserva protéica, bem como um transportador de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios, bilirrubina, colesterol, óxido nítrico e íons, além de participar da regulação do pH sanguíneo, atuando como ânion (EVANS, 2002; LASSEN, 2007). O seu aumento ocorre em situações de desidratação (LASSEN, 2007). Segundo Cooper et al. (2009), cães com carcinoma hepático, sem evidência de desidratação, apresentaram aumento na concentração sérica de albumina. A hipoalbuminemia pode ocorrer em várias situações advindas de dano hepático crônico, deficiência alimentar de fontes protéicas, parasitismos, doença renal, síndrome da má absorção intestinal, hemorragias, enteropatia e queimaduras graves (LASSEN, 2007). A interpretação da diminuição da concentração sérica das proteínas de fase aguda negativa é complicada, porque elas também são afetadas pelo estado nutricional, perdas proteicas e diminuição da síntese (ECKERSALL, 2008).

A albumina é uma PFA negativa, que tende a diminuir sua concentração sérica diante de um processo inflamatório. Isto ocorre devido à inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA & BURINI, 1992) e ao aumento da permeabilidade vascular, com consequente saída para os espaços extravasculares (CORRÊA & BURINI, 2000).

A comparação do proteinograma sérico de cães hípidos e cães com linfoma demonstrou diferenças significativas entre ambos os grupos. Nos cães enfermos a concentração sérica apresentou valores diminuídos para albumina e elevados para a ceruloplasmina e haptoglobina, quando comparados aos cães hípidos (CALAZANS et al., 2009). Segundo Vieira et al. (2010), a concentração sérica da albumina apresentou-se menor nos cães com linfoma, comparados aos cães sadios, porém sem alteração significativa e dentro do valor de normalidade.

Transferrina (TN)

A TN é responsável pelo transporte do ferro plasmático, sendo o seu aumento o reflexo da carência de ferro (ECKERSALL, 2008).

Também conhecida por siderofilina é uma glicoproteína responsável pelo transporte sanguíneo de ferro, presente na fração beta-2-globulina. Atua no controle da absorção do ferro intestinal bem como na sua distribuição no organismo (BACILA, 2003; PIRES et al., 2011). Sua molécula é composta pela ligação de dois átomos de Fe^{3+} . A oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} é catalisada pela ferroxidase, que no sangue existe sob a forma de uma ou mais proteínas (ferroxidase I e ferroxidase II). A TN libera para o metabolismo somente um dos dois átomos de Fe^{3+} , que se reduz a Fe^{2+} para as reações de formação de hemoglobina, ferritina (nos órgãos hematopoiéticos), mioglobina (músculos), enzimas heme (todas as células) e para excreção no suor e na bile. O ferro é estocado sob forma de ferritina (ferro absorvível) e/ou hemossiderina (forma inabsorvível) (BACILA, 2003). Possui efeito bactericida, pois indisponibiliza o Fe^{3+} para bactérias quando ocorre um processo inflamatório (JAIN et al., 2011).

A quantificação sérica da TN é utilizada para avaliar o metabolismo do ferro no organismo dos animais. Níveis diminuídos de TN podem ser consequência da produção inadequada de transferrina por danos nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica. Os níveis elevados podem indicar deficiência grave de ferro, desnutrição ou gestação (JAIN, 1993).

A TN é uma PFA negativa e seus valores decrescem de acordo com a enfermidade apresentada. Possui vida média de aproximadamente oito a 10 dias, responde com rapidez a mudanças no estado nutricional, porém, seus níveis são afetados por várias doenças (FUHRMAN et al., 2004). Pires et al. (2011), avaliaram o metabolismo do ferro em cães, em relação idade e sexo. A TN não apresentou alteração significativa segundo o sexo, porém houve diferença significativa em relação às médias de faixa etária, apresentando valores aumentados em cães adultos, comparados aos cães jovens.

Estudos em humanos demonstraram que a expressão do receptor de TN apresentou-se maior em células malignas e em células normais em proliferação, do

que nas outras células (SUTHERLAND et al., 1981). Segundo Wu et al. (2006), em neoplasias hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, houve a expressão do receptor de transferrina. A alta expressão do receptor de TN foi associada a um prognóstico reservado em humanos (KVALOY et al., 1984). O receptor de transferrina foi expresso no linfoma canino e sua expressão foi associada ao grau e fenótipo do tumor (PRIEST et al., 2010).

Alfa-1-Antitripsina (AAT)

A AAT é o componente mais importante dentre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas com a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999; ECKERSALL, 2008). As enzimas proteolíticas possuem a capacidade de degradar a membrana basal e a matriz extracelular, permitindo o contato das células neoplásicas com o estroma e consequente penetração e infiltração celular, ocasionando metástases e crescimento tumoral (HIRATSUKA et al., 2002; GOMES et al., 2009).

O aumento da AAT é característico das hepatopatias crônicas e agudas, porém tende a diminuir na cirrose (NAOUM, CERON; DOMINGOS, 1999) e também aumenta na doença pulmonar crônica (ECKERSALL, 2008).

A AAT é uma antiprotease com significativa propriedade antiinflamatória e uso terapêutico em algumas doenças graves como: deficiência da AAT, enfizema pulmonar, asma, vasculite, lesão pulmonar aguda, diabetes, artrite reumatóide, paniculite e fibromialgia (BERGIN et al., 2012).

Atualmente sabe-se que a AAT é a proteína mais complexa e multipotente, que possui atividade antiinflamatória contra células do sistema imune (BERGIN et al., 2012).

Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP)

A AGP altera-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1989), podendo diminuir na insuficiência hepática e nefropatias (YUKI et al.,

2010).

A AGP apresenta propriedades imunomoduladoras, de reparo e cicatrização, liga-se a maioria das drogas e agentes inespecíficos, apresentando sua concentração elevada na babesiose, erliquiose, parvovirose, linfoma, sarcoma e carcinoma (CERÓN et al. 2005). Em cadelas com piometra, as quantidades de AGP variam de acordo com o aumento da severidade do problema e com o tempo de internação (HAGMAN, 2011). De acordo com Yuki et al. (2010), a AGP apresentou aumento gradual com a idade e auxiliou na avaliação do efeito terapêutico da cirurgia para piometra.

Ceruloplasmina (CP)

É uma glicoproteína (alfa-2-globulina), descrita como PFA transportadora do cobre, essencial para a eritropoiese, com efeito antioxidante nas células e tecidos, a fim de protegê-los de compostos gerados pela fagocitose de microrganismos e debris de tecidos e redução de neutrófilos anexados ao endotélio (CERÓN et al., 2005; LUCAS et al., 2010; CRAY et al., 2012). A CP pode aumentar nos processos inflamatórios, infecciosos e parasitários (JAIN, 1993).

Segundo Tecles et al. (2005), cães com linfoma ou leucemia não apresentaram diferença significativa na concentração sérica de CP, quando comparados aos cães hígidos. Em cães com linfoma a CP diminui com o início da quimioterapia, na remissão e surpreendentemente, na recidiva da doença. Portanto, a ausência de alteração da CP no linfoma e a influência da quimioterapia, faz dela uma PFA inapropriada para monitorar o linfoma canino (LUCAS et al., 2010).

No trauma os valores da CP se elevam duas a três vezes, alcançando o pico máximo dentro de 24 horas. A CP apresenta menor aumento na concentração sérica em cães com parvovirose, porém, em comparação entre valor de normalidade, sua alteração foi maior quando comparado a outras PFA, resultado que a apontou como indicador precoce do processo inflamatório em cães (KOGIKA et al., 2003).

A CP apresenta um papel importante no metabolismo do cobre, e desta forma, pesquisadores a investigaram em diversas fases do ciclo estral de cadelas descrevendo valores aumentados na sua concentração no terço inicial da gestação

(ULUTAS et al., 2009). Também foi descrita sua elevação na detecção e resposta ao tratamento de cães com leishmaniose, sendo indicada como uma das principais PFA para avaliar tal enfermidade (MARTINEZ SUBIELA & CÉRON, 2005).

Haptoglobina (HP)

É uma glicoproteína (alfa-2-globulina) formada por duas subunidades alfa e beta, que se estabilizam ao se ligarem especificamente à hemoglobina livre plasmática, formando um complexo proteico que será direcionado da circulação para o sistema mononuclear fagocitário, onde ocorrerá a reciclagem do íon ferro durante o processo da hemocaterese e na defesa contra patógenos (CORAZZA et al., 1997; LEVY et al., 2010).

É considerada uma das principais PFA em todas as espécies, principalmente em bovinos. A elevação de seus valores em cães é ocasionada por processos inflamatórios, corticoterapia (MARTINEZ et al., 2001; McGROTTY et al., 2005), tripanossomíases, leishmaniose, trauma e síndrome de Cushing (CERÓN et al., 2005). Segundo Cerón et al.(2005), a HP pode ser detectada na circulação 24 horas após o trauma e suas concentrações chegam ao pico máximo em quatro dias. Suas funções são descritas como ligante de hemoglobina, agente bacteriostático e fator estimulador de angiogênese, participa no metabolismo de lipídios e possui um importante efeito imunomodulador (CRAY et al., 2012). A HP liga-se a hemoglobina livre, portanto, pode ser utilizada como um biomarcador para anemia hemolítica (MITCHELL et al., 2009).

A HP também pode ser utilizada como marcador de infecção bacteriana secundária em cães com gastroenterite hemorrágica, sugerindo a gravidade do processo inflamatório ocasionado pelo parvovírus canino (KOGIKA et al., 2003).

Planellas et al. (2009), investigaram a HP e PCR em cadelas com neoplasias mamárias e encontraram aumentos moderados nas concentrações séricas de ambas as proteínas quando comparadas a cadelas hípidas.

A mensuração da PCR em conjunto com a HP em cães obesos “resistentes a insulina” submetidos à restrição dietética, demonstrou que as concentrações séricas de ambas as proteínas no início do regime dietético estavam aumentadas e

diminuíram após redução do tecido adiposo, sugerindo que estas PFA podem estar ligadas a uma resposta inflamatória subclínica em casos de obesidade. Também foi demonstrado que a diminuição de TNF- α pode ter envolvimento no desenvolvimento da resistência à insulina detectada nestes animais (GERMAN et al., 2009).

b) Imunoglobulinas

O reconhecimento de antígeno é o ponto alto da resposta imune adaptativa específica, e dois tipos de moléculas estão envolvidas nesse processo, as imunoglobulinas e os receptores de antígenos da célula T. As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presente no soro e fluidos teciduais de mamíferos. Algumas imunoglobulinas estão localizadas nas superfícies das células B onde funcionam como receptores, enquanto outras estão livres no sangue e na linfa (ROITT et al., 2003).

As imunoglobulinas agem como anticorpos e são produzidas em resposta a antígenos. Elas são altamente específicas e somente um antígeno determinante está envolvido. Naturalmente, entretanto, determinados antígenos múltiplos estão comumente envolvidos. A linha de células linfocíticas exerce uma função central no sistema imune. Há duas subpopulações, os linfócitos B e linfócitos T, que podem ser identificados por técnicas imunológicas especiais. Os linfócitos T são encontrados no sangue e nos linfonodos na área cortical profunda. Eles estão associados a imunidade mediada por células. Os linfócitos B foram originalmente identificados na bursa de fabricius de aves. No adulto, eles são encontrados no sangue e no centro germinativo dos linfonodos. As células B respondem a estímulo de antígenos com a proliferação de plasmócitos e produção de anticorpos específicos contra a estimulação antigênica. Há cinco classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que tem sido identificadas em humanos, mas na maioria das espécies domésticas somente a IgG, IgA, IgM, e IgE são evidentes, embora a IgD possa ser raramente expressada (GORMAN & HALLIWELL, 1989).

Uma população específica de plasmócitos de origem genética definida, um clone, produz uma imunoglobulina específica. O crescimento descontrolado de um clone de células B únicas (malignidade) resulta em uma super produção de espécies

químicas únicas de imunoglobulinas, que aparecem como um pico monoclonal pontiagudo ou gamopatia monoclonal no eletroforetograma. Ocasionalmente, uma gamopatia triclonal ou biclonal pode ser identificada. Um grupo de clones, cada um de origem genética diferente, pode também produzir uma mistura heterogênea de imunoglobulinas, que aparece como uma região hiperglobulinêmica ampla ou difusa no eletroforetograma. Essa região é descrita como uma gamopatia policlonal (ECKERSALL, 2008).

A hipergamaglobulinemia é uma síndrome paraneoplásica que provoca hiperviscosidade sanguínea e que pode ser observada no mieloma múltiplo, no linfoma, na leucemia linfocítica e na macroglobulinemia primária (DORFMAN & DIMSKI, 1992).

Imunoglobulina G (IgG)

A IgG é a principal imunoglobulina encontrada no sangue, é responsável pela imunidade humoral do organismo, e apresenta várias atividades biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação de complemento (JAIN, 1993). A IgG apresenta elevações e diminuições na sua concentração sérica semelhantes a IgA (KANEKO, 1997).

A IgG é a classe de anticorpos com maior concentração sérica, apresentando aproximadamente 1 a 2g/100mL, e demonstra algumas diferenças entre as espécies (TIZARD, 2008). As subclasses de IgG são conhecidas na maioria das espécies. A IgG tem uma estrutura de cadeia de quatro polipeptídeos com um peso molecular total de 180 KD. As cadeias pesadas de IgG são chamadas de cadeia gama e são únicas para IgG. A IgG auxilia na defesa do hospedeiro porque ela pode estar no sistema vascular e distribuir-se por toda parte do fluido extravascular tecidual, onde ela possui muitas funções de proteção (GERSHWIN, 2008).

Nas neoplasias das células linfóides há, segundo alguns relatos, o aumento de alfa-2 e betaglobulinas, embora nos linfomas e carcinomas hepáticos seja comum o aumento de beta e gamaglobulinas (BUSH, 2004). Em 20% dos cães com linfoma há hipergamaglobulinemia que leva à hiperglobulinemia (CARDOSO et al., 2004). No linfoma, pode ocorrer tanto gamopatia monoclonal como policlonal (ECKERSALL,

2008). Segundo Vieira et al. (2010), cães com linfoma apresentaram aumento significativo das frações protéicas AGP, TN, IgG e globulinas, comparados aos cães saudáveis.

Imunoglobulina A (IgA)

A IgA existe primariamente em duas formas, como um monômero (160 KD) no sangue e na forma secretória como um dímero (390 KD). Menos comumente, a IgA pode ocorrer na forma de polímero. Em animais domésticos, a IgA é importante como anticorpo secretório dentro do trato intestinal e dos pulmões. Ela é capaz de neutralizar vírus e prevenir aderências de patógenos bacterianos aos tecidos alvo. Ela não tem a função de opsonização e é incapaz de se fixar ao complemento (GERSHWIN, 2008).

A IgA encontra-se em maior concentração nas doenças infecciosas, doença do tecido conjuntivo, doença hepática, mieloma e outros tumores do sistema retículo endotelial. A IgA apresenta-se em menor concentração nos fetos, nos animais recém nascidos antes da ingestão do colostro, nas deficiências imunológicas e na agamaglobulinemia (KANEKO, 1997). A IgA está presente nas secreções externas (lágrima, saliva, secreções respiratórias, gastrintestinais e genitourinárias) em muitas espécies animais, sendo importante para defesa local e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral (JAIN, 1993).

2.2.6 Eletroforese

A eletroforese é uma técnica na qual os diferentes tipos de proteínas são separados, tornando possível a determinação de suas proporções relativas em uma dada amostra de material biológico. Em um suporte de gel de poliacrilamida, em pH alcalino, uma alíquota de soro é depositada e sob a ação de um campo elétrico há migração das diferentes frações proteicas, em diferentes velocidades, em direção ao ânodo. Após a coloração, tais frações aparecem como bandas de intensidades de cores variadas que, escaneadas por um densitômetro computadorizado, propiciam uma curva eletroforética (ECKERSALL, 2008).

Na eletroforese além da albumina, estão arranjadas as globulinas (α , β e γ) e, em muitos casos, cada uma delas pode ser claramente subdividida em duas bandas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , e γ_2) (BUSH, 2004).

Essa técnica tem sido utilizada para obtenção do proteinograma em diversas espécies (FAGLIARI et al., 2008; SAQUETTI et al., 2008).

3. OBJETIVOS

O presente ensaio teve como objetivos avaliar o perfil eletroforético das proteínas totais e suas frações, em cães com linfoma multicêntrico, e correlacioná-lo aos fatores prognósticos, tais como imunofenotipagem das subpopulações linfocitárias, estadiamento clínico e resposta ao tratamento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Instituições Envolvidas

Os cães com linfoma foram provenientes do Setor de Oncologia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista (FCAV/Unesp), Jaboticabal/SP, e do Centro Avançado de Veterinária (CAVET), localizado em Ribeirão Preto/SP. As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária e as análises eletroforéticas no Laboratório de Pesquisa, ambos da FCAV/Unesp, Jaboticabal/SP. A determinação do imunofenótipo foi realizada no Laboratório de Imunohistoquímica, do Serviço de Patologia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ/Unesp), Botucatu/SP. A classificação histopatológica foi feita no Laboratório de Patologia Veterinária VETPAT, Campinas/SP.

4.2 Grupos Experimentais

Trinta cães adultos foram distribuídos em três grupos experimentais:

Grupo Controle (GC): 10 cães hígidos, adultos, seis machos (60%) e quatro fêmeas (40%), raça Beagle, idade $4,9 \pm 3,03$ (anos), peso $12,34 \pm 1,39$ (kg) (Apêndice A), cujo estado de saúde foi avaliado por exames físicos e clínico-patológicos gerais.

Grupo Linfoma B (GLB): 12 cães com linfoma B, adultos, cinco machos (41,67%) e sete fêmeas (58,34%), sendo assim distribuídos, mestiços (SRD) (25%), Rottweiler (25%), Poodle (16,67%), Labrador (8,34%), Pinscher (8,34%), Basset Hound (8,34%) e Bull Terrier (8,34%), com idades entre $7,75 \pm 2,49$ (anos) e peso $24,98 \pm 15,06$ (kg) (Tabela 3).

Grupo Linfoma T (GLT): oito cães com linfoma T, adultos, dois machos (25%) e seis fêmeas (75%), sendo Boxer (37,5%), Dog Alemão, Beagle, Lhasa Apso, American Pit Bull Terrier e Bull Terrier (12,5%), com idades compreendidas entre $7,25 \pm 1,28$ (anos), e peso $24,41 \pm 10,11$ (kg) (Tabela 4).

As tabelas seguintes apresentam as características gerais dos grupos dos cães com linfoma.

Tabela 3. Características gerais de raça, sexo, idade e peso dos cães do grupo linfoma B (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Animais	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)
B1	Rottweiler	macho	05	40,00
B2	Poodle	fêmea	09	06,00
B3	Rottweiler	fêmea	05	51,00
B4	Rottweiler	macho	06	37,00
B5	Labrador	macho	04	30,00
B6	Pinscher	fêmea	08	04,00
B7	SRD	macho	12	30,00
B8	SRD	fêmea	08	33,00
B9	Poodle	fêmea	11	05,60
B10	SRD	macho	07	13,20
B11	Basset Hound	fêmea	10	28,00
B12	Bull Terrier	fêmea	08	22,00

SRD: Sem Raça Definida.

Tabela 4. Características gerais de raça, sexo, idade e peso dos cães do grupo linfoma T (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Animais	Raça	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)
T1	Dog Alemão	fêmea	07	41,00
T2	Beagle	fêmea	07	20,00
T3	Boxer	fêmea	08	32,00
T4	Boxer	fêmea	05	25,00
T5	Boxer	fêmea	06	20,00
T6	Lhasa Apso	macho	08	07,30
T7	Pit Bull	macho	09	30,00
T8	Bull Terrier	fêmea	08	20,00

4.3 Momentos Avaliados

Os cães com linfoma foram avaliados em três diferentes momentos: momento do diagnóstico da doença (M_0), momento da 5ª semana de quimioterapia (M_5) e momento da recidiva da doença (M_R). Os cães hígidos foram avaliados somente no M_0 . Um dos pacientes do GLB veio a óbito na anestesia para realização da biópsia excisional do linfonodo acometido, no M_0 . Dos animais do GLT, dois

pacientes não retornaram no M₅ e dois pacientes foram submetidos a eutanásia devido a complicações clínicas da doença após o M₀. Somente dois cães do GLB e três cães do GLT apresentaram recidiva da doença, durante o protocolo quimioterápico. A imunofenotipagem e o estadiamento clínico foram avaliados no M₀ e a resposta ao tratamento no M₅ (Tabela 5).

Tabela 5. Número de animais dos três grupos experimentais nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

GRUPOS	MOMENTOS	Nº DE ANIMAIS
GC	M ₀	10
	M ₅	10
	M _R	10
GLB	M ₀	12
	M ₅	11
	M _R	02
GLT	M ₀	08
	M ₅	04
	M _R	03

4.4 Avaliação das Parcelas Experimentais

Os cães com linfoma multicêntrico tiveram o diagnóstico firmado com base no exame físico, citológico, hematológico, bioquímico sérico (funções hepática e renal), mielograma, exames de imagem, imuno-histoquímico e histopatológico. Assim, os referidos animais foram classificados de acordo com os critérios propostos pela OMS (VAIL, 2000), em estádios I a V e subestádios a ou b.

4.5 Quimioterapia Antineoplásica

Os animais acometidos por linfoma foram tratados com o protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin modificado (19 semanas) (NELSON & COUTO, 2006), incluindo sulfato de vincristina (0,75mg/m², IV), L-asparaginase (400UI/kg, IM), ciclofosfamida (250mg/m², VO), doxorubicina

(30mg/m², perfusão) e prednisona (2mg/kg/dia, na 1^a semana; 1,5mg/kg/dia, na 2^a semana; 1mg/kg/dia, na 3^a semana; 0,5 mg/kg/dia, na 4^a semana) (Tabela 6).

A resposta ao tratamento foi classificada segundo os pacientes apresentassem remissão completa (RC: desaparecimento da doença clínica), remissão parcial (RP: diminuição em 50% do tamanho do tumor sem evidência de novos tumores), doença estável (DE: diminuição ou aumento em até 50% do tamanho do tumor, sem desenvolvimento de outro tumor) e doença progressiva (DP; aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor ou o aparecimento de novos tumores) (DHALIWAL; KITCHELL; MESSICK, 2003) .

Tabela 6. Protocolo quimioterápico antineoplásico de Madison-Wisconsin modificado (NELSON & COUTO, 2006) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).

Momentos	Semanas	Vincristina	L-asparaginase*	Ciclofosfamida	Doxorrubicina	Prednisona
		0,75mg/m ² , IV	400UI/kg, IM	250mg/m ² , VO	30mg/m ² , perfusão	
M0	S1	X	-	-	-	2,0 mg/kg/dia
	S2	-	-	X	-	1,5 mg/kg/dia
	S3	X	-	-	-	1,0 mg/kg/dia
	S4	-	-	-	X	0,5 mg/kg/dia
M5	S5	intervalo	-	-	-	-
	S6	X	-	-	-	-
	S7	-	-	X	-	-
	S8	X	-	-	-	-
	S9	-	-	-	X	-
	S10	intervalo	-	-	-	-
	S11	X	-	-	-	-
	S12	intervalo	-	-	-	-
	S13	-	-	X	-	-
	S14	intervalo	-	-	-	-
	S15	X	-	-	-	-
	S16	intervalo	-	-	-	-
	S17	-	-	-	X	-
	S18	intervalo	-	-	-	-
	S19	X	-	-	-	-

S1 a S10: Fase de indução da remissão, S11 a S19: Fase de manutenção.*L-asparaginase foi utilizada em todos os cães após a 5^a semana, em momentos diferentes. M₀: momento do diagnóstico, antes da 1^a sessão de quimioterapia, M₅: momento da 5^a semana, após o 1^o ciclo de quimioterapia

4.6 Colheita de Material Biológico

Os cães que apresentaram linfadenomegalia foram submetidos ao exame citológico, obtido através da citologia aspirativa por agulha fina do linfonodo. Confirmado o diagnóstico, foi realizada a biópsia do linfonodo acometido para obtenção de amostras. Na maioria dos cães com linfoma, nos estádios III, IV ou V, optou-se pelo linfonodo poplíteo, devido à facilidade de colheita. Todas as biópsias foram realizadas mediante anestesia geral intravenosa associada a anestesia local epidural. Após os procedimentos anestésicos foi realizada tricotomia, antissepsia e ressecção do linfonodo. O linfonodo excisado, foi fixado em formol a 10% tamponado (pH 7,6), por 24 horas, e posteriormente transferido para solução de álcool 70%, com vistas à análise imuno-histoquímica.

As amostras de sangue foram colhidas por venopunção jugular, após antissepsia, em sistema a vácuo (tubos de 10 mL), distribuídas em dois tubos, um com EDTA para realização do hemograma, e outro sem anticoagulante para realização de exames bioquímicos e eletroforéticos. Após a colheita, as amostras sem anticoagulante foram submetidas à centrifugação por 5 minutos, a 1257,6 g (2500 rpm), e obtenção do soro. Ato contínuo, o soro foi recolhido e envasado em microtubos (eppendorfs®) (1,5mL) e armazenado sob congelamento a -18°C, para posterior análise eletroforética.

4.7 Imunofenotipagem

4.7.1 Técnica de Imuno-histoquímica

A classificação do tipo celular predominante nos linfomas foi estabelecida utilizando-se de anticorpos primários marcadores de linfócitos T (CD3) e B (CD79 α), ambos contra antígenos humanos, produzidos pela DAKO® (Tabela 7).

O método de imuno-histoquímica empregado foi pelo polímero *horseradish peroxidase* (HRP - Dako K4068) e *3,3' diaminobenzidine tetrachloride* (DAB - Dako K3468-1). Os cortes de tecido (4 μ) foram distendidos em lâminas carregadas e permaneceram em estufa a 57°C por 24 horas e, posteriormente, foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em álcool etílico em concentrações

decrecentes. Na sequência, foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando uma solução de citrato pH 6,0 em panela de pressão (Pascal®; Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 segundos à 128°C, aproximadamente. Após essa etapa, ao atingirem a temperatura ambiente, as lâminas contendo os cortes foram lavadas em água deionizada. A seguir foram incubadas em dois banhos, de 10 minutos cada, em peróxido de hidrogênio 3% (10V) para o bloqueio da peroxidase endógena e então lavadas em água deionizada por cinco minutos. O bloqueio de proteínas inespecíficas foi conduzido com solução bloqueadora de reação inespecífica (*protein block serum-free* – catálogo nº X0909 – DAKO Corp.). As lâminas contendo os cortes foram incubadas com o anticorpo primário na diluição padronizada (Tabela 7) e, então, incubados a 4°C *overnight* (18 horas). Depois, foram novamente lavados em solução tampão de TRIS. Em seguida foram incubadas com polímero Envision (Dako, Carpinteria, CA, USA) e posteriormente lavadas em TRIS por três vezes. A coloração foi obtida utilizando-se o DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) e a contracoloração pela hematoxilina de Harrys, seguida da desidratação em concentrações crescentes de álcool e xilol. As lâminas, recobertas por lamínulas, foram montadas em resina.

Tabela 7. Anticorpos empregados nas reações imuno-histoquímicas em linfonodos caninos (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013).

Anticorpos	Clones	Diluições	Conservação do tecido
CD3* (Linfócitos T)	F.7.2.38	1/100	Parafinado
CD79α** (Linfócitos B)	HM57	1/20	Parafinado

* camundongo anti-humano (monoclonal). ** coelho anti-humano (policlonal)

4.8 Avaliação da Proteína Total e Frações Proteicas

4.8.1 Proteína Total

As proteínas totais séricas foram determinadas pelo Método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes (Labtest®) e leitura em espectrofotômetro semi-automático (Labquest®).

4.8.2 Albumina

A concentração sérica da albumina foi mensurada pelo método Verde de Bromocresol e pela técnica de SDS-PAGE. Porém, foi considerado o valor de albumina obtido pelo método Verde de Bromocresol. Foi utilizado um conjunto de reagentes (Labtest[®]) e leitura em espectrofotômetro semi-automático (Labquest[®]).

4.8.3 Globulina

A concentração sérica da globulina foi calculada à partir dos valores da proteína total e albumina (Globulina= PT - albumina).

4.8.4 Relação Albumina:Globulina (A:G)

A relação A:G foi calculada à partir dos valores da albumina e globulina (Relação A:G= albumina/globulina).

4.8.5 Fracionamento Eletroforético

A eletroforese permite o fracionamento das PFA que se localizam nas frações alfa e betaglobulinas, e das imunoglobulinas, sendo a maior parte destas proteínas com localização na fração gamaglobulina. Nesta técnica ocorre a separação da IgG em cadeia leve e pesada, devido a presença do mercaptoetanol no gel mix, que rompe as pontes de dissulfeto presentes na IgG. Desta forma, os resultados encontrados no ensaio em tela para a IgG são a somatória da IgG de cadeia leve e pesada.

O eletroforetograma foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI VERTICALELECTROPHORESIS CELLS[®] - BIO-RAD). A polimerização do gel ocorreu pela adição de 15µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED - Sigma, ST. Louis-MO, EUA) e 0,3µL de persulfato

de amônia (10%). A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão (pH 8,5), composta de 36,3g de tris-base, 112,5g de glicina, 10g de SDS e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. Para o fracionamento das proteínas, as amostras foram preparadas utilizando-se 10 μ L de soro sanguíneo diluídos em 30 μ L de tampão-fosfato (PBS) e 20 μ L de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 μ L das referidas amostras foi depositada no fosso do gel. A placa foi colocada em suporte apropriado (Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX, USA) e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de Azul de Comassie 0,2%, no agitador horizontal, e em seguida, foi retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares (PM) e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-9301, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão) por intermédio do escaneamento das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores (SIGMA MARKER™, *wide range* 6,5 a 200 KDa, Sigma-Aldrich Biotechnology LP) de PM 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KDa. Para avaliação densitométrica das bandas protéicas foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.9 Análise Estatística

Para determinar se a proteína total e suas frações diferiram significativamente entre os cães sadios e cães com linfoma B ou T, no M₀, de acordo com a imunofenotipagem e estadiamento clínico, os dados foram submetidos a Análise de Variância pelo Teste F ($p < 0,05$). Para avaliação da resposta ao tratamento entre os grupos remissão parcial x remissão completa, nos cães com linfoma no M₅, os dados foram submetidos a Análise de Variância pelo Teste F ($p < 0,05$). Os dados foram analisados em um delineamento em parcelas subdivididas no tempo (grupos x momentos), e as médias dos grupos confrontadas pelo Teste de Tukey (5%). Foi utilizado o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System - version 9) para consecução da análise estatística.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Imunofenotipagem, Estadiamento Clínico e Resposta ao Tratamento

A classificação imunofenotípica dos linfomas caninos, objeto deste ensaio, revelou 12 casos de cães acometidos por linfomas B (60%) e oito por linfomas T (40%) (Tabela 8). Tais resultados imunofenotípicos são semelhantes àqueles de Vail & Ogilvie (1998), em cujo estudo relataram aproximadamente 70 a 80% dos linfomas caninos com derivação imunofenotípica de célula B e 20 a 30% de células T. Sequeira et al. (1999), também relataram maior ocorrência do imunofenótipo B em linfomas caninos. No entanto, Coleta (2009) pesquisando imunofenotipagem no linfoma canino, relatou maior frequência do imunofenótipo T. Há de se ressaltar, que no grupo GLT não houve nenhum animal mestiço, corroborando os achados de Morrison (2005), que relatou que em cães de raça pura a predisposição genética para este tipo de neoplasia parece existir.

Com relação ao estadiamento clínico da doença, observou-se maior incidência do estágio IV (40%), seguido dos estádios III e V (20% cada), estágio I (15%) e estágio II (5%). Os subestádios “a” e “b” apresentaram incidências semelhantes (Tabela 8).

De acordo com os achados deste ensaio, e dentre os pacientes com linfoma B, seis deles apresentaram a doença linfoproliferativa no estágio IV (50%), três no III (25%) e três no estágio V (25%). Já, no caso dos pacientes acometidos por linfoma T, verificou-se que três deles apresentaram-se no estágio I (37,5%), dois no estágio IV (25%), um no estágio II (12,5%), um no estágio III (12,5%) e um no estágio V (12,5%). Além do mais, foi verificado que, a extensão da doença em outros órgãos foi melhor observada em pacientes com linfoma B, tendo em vista que 58,3% dos referidos pacientes apresentaram-se no subestádio a, ou seja, sem sinais clínicos da doença linfomatosa, com conseqüente melhor prognóstico. Na maioria dos pacientes com linfoma T a doença apresentou-se mais localizada, se restringindo a um único linfonodo ou a linfonodos regionais, sendo que 62,5% destes pacientes apresentaram-se em subestádio b, demonstrando um comportamento mais agressivo do linfoma de células T. De acordo com a resposta ao tratamento observada no momento M5 (5ª semana de quimioterapia), oito pacientes (40%)

apresentaram RP, seis pacientes (30%) RC, dois pacientes (10%) DP e nenhum paciente apresentou DE. Quatro pacientes (20%) não foram avaliados devido ao óbito após a 1ª sessão de quimioterapia. O único animal em estágio II e dois pacientes em DP foram excluídos do protocolo experimental, devido à baixa frequência ocorrida (Tabela 8).

Tabela 8. Imunofenotipagem (M_0), estadiamento clínico (M_0) e resposta ao tratamento (M_5) dos cães com linfoma (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Animal	Imunofenótipo	Estádio	Subestádio	Resposta ao Tratamento
1	B	III	b	Remissão Parcial
2	B	V	a	Remissão Completa
3	B	III	b	Remissão Parcial
4	B	IV	b	Remissão Completa
5	B	III	b	Remissão Completa
6	B	V	a	Remissão Parcial
7	B	V	a	Remissão Parcial
8	B	IV	a	Remissão Parcial
9	B	IV	a	Remissão Parcial
10	B	IV	b	Remissão Parcial
11	B	IV	a	-----
12	B	IV	a	Remissão Parcial
13	T	I	a	Remissão Completa
14	T	IV	a	Remissão Completa
15	T	III	b	Doença Progressiva
16	T	I	a	-----
17	T	IV	b	Remissão Completa
18	T	V	b	Doença Progressiva
19	T	II	b	-----
20	T	I	b	-----

Os pacientes acometidos por linfomas B foram classificados com relação às suas respostas ao tratamento, sendo oito deles com RP (66,6%), três com RC (25%) e um sem avaliação classificatória (8,33%). Já, com relação aos pacientes com linfoma T, três deles apresentaram RC (37,5%), dois DP (25%) e três não propiciaram avaliação classificatória (37,5%). Os animais que não apresentaram

avaliação classificatória foram aqueles que vieram a óbito após a 1ª consulta. Como pode ser verificado a RC ocorreu com maior frequência nos animais com linfoma T, corroborando os achados da literatura que relatam que pacientes com linfoma T respondem melhor a quimioterapia, no entanto, apresentam menor tempo de sobrevivência e de remissão da doença (MACEWEN; YOUNG; VAIL, 2001).

As proteínas séricas totais e as frações proteicas não apresentaram diferenças significativas com relação à resposta ao tratamento, entre os animais que apresentaram remissão completa e remissão parcial (Tabela 9), porém as concentrações das proteínas totais e da maioria das frações proteicas apresentaram-se mais elevadas no soro de animais em remissão parcial da doença linfoproliferativa, evidenciando uma maior concentração sérica de proteínas em cães acometidos com a doença ativa. Calazans (2006), comparando cães portadores de linfoma e com diferentes respostas ao tratamento (G1- remissão parcial ou completa e G2- doença estável ou progressiva), submetidos ao protocolo quimioterápico COP-1, também não observou diferenças entre os referidos grupos.

Os níveis séricos de albumina apresentaram diferenças significativas em função do estágio clínico da doença linfomatosa em cães (Tabela 10). As concentrações séricas de albumina apresentaram-se significativamente menores no soro de cães no estágio III, em comparação àqueles no estágio I. Da mesma forma, cães portadores de linfoma e classificados no estágio V, apresentaram níveis séricos de albumina, inferiores àqueles do estágio I. Além do mais, foi verificado que de acordo com a evolução clínica da doença, houve decréscimo na concentração sérica da albumina, porém dentro do intervalo de normalidade. Aqui, cabe ressaltar que a alteração na concentração sérica de albumina não é específica, e se deve dentre outras causas de hipoalbuminemia, a doença hepática crônica, síndrome nefrótica e desnutrição grave. Os pacientes com linfoma classificados nos estágios IV e V, podem apresentar invasão de células neoplásicas no fígado, levando ao comprometimento da função hepática, e conseqüente diminuição da biossíntese proteica.

Neste ensaio, a albumina apresentou níveis séricos significativamente menores no grupo subestádio b (com sinais clínicos da doença), quando comparado àqueles no subestádio a, porém ambos dentro do intervalo de normalidade (Tabela

11). A albumina é considerada em cães como PFA negativa, de tal maneira que os animais em subestádio b poderiam apresentar perdas protéicas pelas fezes e urina, além de diminuição da ingestão de proteínas em razão de provável hiporexia. A maioria das proteínas, com exceção da ceruloplasmina e da IgG, apresentou concentração sérica menor nos animais do subestádio b, corroborando os achados de Tecles et al. (2005), segundo os quais a resposta de fase aguda não é específica, muito rápida, e que ocorre em muitos casos antes dos sinais clínicos.

Tabela 9. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações protéicas, em cães acometidos por linfoma, segundo a resposta ao tratamento (M₅) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Proteína	Valores de Referência	Remissão Parcial	Remissão Completa
Proteína Total (g/dL)	5,50-8,50**	7,25 ± 1,27	7,02 ± 0,46
Albumina (g/dL)	2,50-4,00 (BUSH, 2004)	3,98 ± 0,75	3,79 ± 0,67
Globulina (g/dL)	2,50-4,50 (BUSH, 2004)	4,28 ± 1,57	3,99 ± 0,29
Relação A:G*	0,50-1,30 (BUSH, 2004)	0,84 ± 0,32	0,79 ± 0,12
AAT (mg/dL)	233,00 (HUGHES et al., 1995)	281,79 ± 155,01	211,98 ± 137,70
AGP (mg/dL)	28,60 (YUKI et al., 2010)	11,16 ± 5,35	12,79 ± 9,12
CP (mg/dL)	4,93 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002)	17,65 ± 14,21	6,01 ± 3,90
HP (mg/dL)	30-180 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004)	20,19 ± 7,54	22,35 ± 18,10
TN (mg/dL)	590-690 (STACY et al., 2009)***	161,52 ± 139,27	141,02 ± 91,08
IgG (g/dL)	1,00-2,00 (TIZARD, 2008)	1,23 ± 1,18	1,14 ± 0,75
IgA (mg/dL)	20-150 (TIZARD, 2008)	13,30 ± 12,34	11,19 ± 9,60

*A relação A:G não apresenta unidade de medida. **Laboratório de Patologia Clínica, FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP. ***Valor da fração beta-2-globulina. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 10. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações proteicas, em cães acometidos por linfoma, de acordo com o estadiamento clínico (M₀) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Proteína	Valores de Referência	Estádio I	Estádio III	Estádio IV	Estádio V
Proteína Total (g/dL)	5,50-8,50**	7,60 ± 1,52	6,25 ± 0,95	6,40 ± 0,73	5,52 ± 0,94
Albumina (g/dL)	2,50-4,00 (BUSH, 2004)	4,17 ± 0,46 ^a	3,08 ± 0,48 ^b	3,41 ± 0,57 ^{ab}	2,97 ± 0,22 ^b
Globulina (g/dL)	2,50-4,50 (BUSH, 2004)	5,27 ± 1,72	4,03 ± 1,02	3,74 ± 0,89	3,40 ± 1,12
Relação A:G*	0,50-1,30 (BUSH, 2004)	0,48 ± 0,21	0,55 ± 0,20	0,77 ± 0,29	0,75 ± 0,32
AAT (mg/dL)	233,00 (HUGHES et al., 1995)	313,54 ± 60,48	235,40 ± 101,68	192,90 ± 112,20	217,34 ± 75,30
AGP (mg/dL)	28,60 (YUKI et al., 2010)	1,84 ± 3,19	3,12 ± 2,80	14,12 ± 9,47	4,47 ± 3,42
CP (mg/dL)	4,93 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002)	11,65 ± 7,77	34,45 ± 26,45	24,16 ± 17,72	25,87 ± 23,72
HP (mg/dL)	30-180 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004)	28,64 ± 16,65	10,20 ± 7,04	11,62 ± 6,30	15,13 ± 11,08
TN (mg/dL)	590-690 (STACY et al., 2009)***	19,98 ± 34,60	108,83 ± 77,18	176,17 ± 116,38	183,50 ± 60,63
IgG (g/dL)	1,00-2,00 (TIZARD, 2008)	1,58 ± 0,71	1,49 ± 1,03	0,93 ± 0,61	0,87 ± 0,48
IgA (mg/dL)	20-150 (TIZARD, 2008)	7,03 ± 4,27	18,23 ± 10,07	16,82 ± 9,20	17,61 ± 8,21

*Relação A:G não apresenta unidade de medida. **Laboratório de Patologia Clínica, FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP. ***Valor para fração beta-2-globulina. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 11. Valores médios e desvios-padrão obtidos para a proteína total e frações proteicas, em cães acometidos por linfoma, de acordo com o subestádio clínico (M₀) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Proteína	Valores de Referência	Subestádio a	Subestádio b
PT (g/dL)	5,50-8,50**	6,63 ± 1,17	6,02 ± 0,94
Albumina (g/dL)	2,50-4,00 (BUSH, 2004)	3,62 ± 0,64 ^a	3,02 ± 0,42 ^b
Globulina (g/dL)	2,50-4,50 (BUSH, 2004)	4,12 ± 1,34	3,72 ± 1,01
Relação A:G*	0,50-1,30 (BUSH, 2004)	0,70 ± 0,31	0,65 ± 0,24
AAT (mg/dL)	233,00 (HUGHES et al., 1995)	230,53 ± 113,94	217,25 ± 81,58
AGP (mg/dL)	28,60 (YUKI et al., 2010)	9,79 ± 8,62	5,36 ± 7,62
CP (mg/dL)	4,93 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002)	22,65 ± 15,88	25,92 ± 22,98
HP (mg/dL)	30-180 (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004)	17,80 ± 13,12	10,71 ± 6,51
TN (mg/dL)	590-690 (STACY et al., 2009)***	163,07 ± 119,71	119,90 ± 78,54
IgG (g/dL)	1,00-2,00 (TIZARD, 2008)	0,97 ± 0,63	1,35 ± 0,76
IgA (mg/dL)	20-150 (TIZARD, 2008)	15,86 ± 9,53	15,50 ± 8,12

*A relação A:G não apresenta unidade. **Laboratório de Patologia Clínica, FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP. ***Valor para fração beta-2-globulina. Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

5.2 Histopatológico

A classificação morfológica do linfoma foi estabelecida segundo a OMS e revelou maior incidência do linfoma difuso de grandes células (55%), seguido do linfoplasmocítico (15%) e linfoblástico (10%). Os linfomas de grandes células imunoblástico, “burkitt like”, linfocítico de pequenas células e linfoplasmocítico de zona marginal, apresentaram a mesma incidência (5%) (Tabela 12).

Tabela 12. Classificação morfológica dos linfomas, segundo a OMS, nos cães portadores de linfomas B (GLB) e linfomas T (GLT) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Animais	Raça	Imunofenótipo	Histopatológico
1	Rottweiler	B	Grandes células imunoblástico
2	Poodle	B	“Burkitt Like”
3	Rottweiler	B	Linfoblástico
4	SRD	B	Linfocítico de pequenas células
5	Rottweiler	B	Difuso de grandes células
6	Labrador	B	Difuso de grandes células
7	Pinscher	B	Difuso de grandes células
8	SRD	B	Difuso de grandes células
9	Poodle	B	Difuso de grandes células
10	SRD	B	Difuso de grandes células
11	Basset Hound	B	Difuso de grandes células
12	Bull terrier	B	Difuso de grandes células
13	Dog Alemão	T	Difuso de grandes células
14	Boxer	T	Difuso de grandes células
15	Pit Bull	T	Difuso de grandes células
16	Beagle	T	Linfoplasmocítico
17	Lhasa Apso	T	Linfoplasmocítico
18	Bull Terrier	T	Linfoplasmocítico
19	Boxer	T	Linfoplasmocítico de zona marginal
20	Boxer	T	Linfoblástico

5.3 Proteína Total e Frações Protéicas

A técnica eletroforética de SDS-PAGE permitiu o fracionamento de 8 bandas proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 25 a 170 kilodáltons (KDa), incluindo albumina 65 KDa, AAT 60 KDa, AGP 37 KDa, CP 125 KDa, HP 39 KDa, TN 85 KDa, IgG (cadeia pesada 52 KDa + cadeia leve 25KDa) e IgA 170 KD. Além disso, determinaram-se a proteína total, albumina, globulinas e relação A:G.

Os níveis séricos de proteínas totais e frações proteicas, não apresentaram diferenças estatísticas na comparação de linfomas em cães dos grupos GLB e GLT, que pudessem ser atribuídas ao imunofenótipo do linfoma.

5.3.1 Proteína Total, Albumina, Globulinas e Relação A:G

As concentrações séricas das proteínas totais apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação grupos x momentos, particularmente no momento M_5 para os cães do GLB (Tabela 13 e Figura 2). Tanto a albumina quanto as globulinas aumentaram suas concentrações no GLB, na confrontação dos momentos M_5 e M_0 , contribuindo para a elevação das proteínas séricas totais. Os níveis séricos de proteínas totais nos cães acometidos por linfoma T (GLT) aumentaram, aparentemente, devido a elevação da albumina, quando contrastados os momentos M_5 e M_0 . Também verificou-se que as proteínas totais aumentaram em cães acometidos por linfoma de ambos os imunofenótipos, quando comparados os momentos M_R e M_0 . Tais achados, parecem indicar preliminarmente que a quimioterapia e a recidiva aumentaram a concentração sérica das proteínas totais, em ambos os grupos doentes.

Como asseverado, precedentemente, os níveis séricos de proteínas totais não apresentaram diferenças significativas entre pacientes portadores de linfomas B e T, no entanto, apresentaram-se mais elevadas no soro de animais controle (GC) no momento M_0 , e nos cães portadores de linfoma B (GLB) nos momentos M_5 e M_R . Desta maneira, ficou evidenciada uma maior concentração sérica das proteínas totais em cães com linfoma B, ao final do primeiro ciclo de quimioterapia ou na recidiva da doença. As menores concentrações séricas de proteínas totais nos cães portadores de linfoma no momento do diagnóstico (M_0), em comparação ao grupo de cães hígidos, contradiz Eckersall (2008), que relatou presença de hiperproteinemia em doenças inflamatórias e neoplásicas.

As concentrações séricas de albumina apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação grupos x momentos, no momento M_5 dos grupos doentes (Tabela 13 e Figura 2). A albumina aumentou no soro dos cães com linfoma, no momento M_5 em comparação ao M_0 , ainda que dentro do intervalo de normalidade. Por outro lado, verificou-se que a albumina diminuiu no soro de cães do grupo GLB e aumentou no GLT, quando comparados M_R e M_0 . Portanto, a quimioterapia contribuiu para o aumento da concentração sérica de albumina em ambos os grupos

doentes e a recidiva interferiu para o aumento dos níveis séricos de albumina nos cães portadores de linfoma T (GLT).

Os níveis séricos de albumina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, entretanto, apresentaram-se menores nos grupos doentes e abaixo do intervalo de normalidade, ou seja, comportou-se como PFA negativa. A presença da hipoalbuminemia encontrada nos cães acometidos por linfoma, neste ensaio, corrobora os achados de Paula e Silva; Lopes; Faria (2008), que relataram diminuição da albumina em infecções bacterianas graves, neoplasias malignas, doença cardíaca congestiva, distúrbios inflamatórios crônicos e dieta hipoprotéica. O aumento do catabolismo da albumina, como consequência da deficiência energética do indivíduo, estimula a utilização de reservas de aminoácidos para atuarem na gliconeogênese, a fim de recuperar a homeostase do organismo (LASSEN, 2007).

A redução na concentração sérica da albumina tem relação direta com o aumento na concentração sérica de outras PFA, significando que há um mecanismo compensatório, onde uma proteína diminui e outra aumenta (PEREIRA & BURINI, 1992; CALAZANS et al., 2009). Ademais, a albumina é considerada como uma PFA negativa, que tende a diminuir sua concentração sérica diante de processos inflamatórios, devido à inibição da sua síntese pelas citocinas pró-inflamatórias (PEREIRA & BURINI, 1992), além do aumento da sua permeabilidade vascular, e consequente saída para os espaços extravasculares (CORRÊA & BURINI, 2000).

Os resultados da albumina no atual estudo, corroboram àqueles de Calazans et al. (2009) e Vieira et al. (2010), que também relataram diminuição dos níveis séricos de albumina em cães acometidos por linfoma, quando comparados aos cães saudáveis. Adicionalmente, a albumina apresentou comportamento semelhante tanto em cães com linfoma B como linfoma T, e somente na recidiva do grupo GLT mostrou-se elevada, em relação ao M_0 .

As concentrações séricas de globulinas e relação A:G não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) para a interação grupos x momentos, nos cães com linfoma (Tabela 13 e Figura 3). No entanto, as globulinas apresentaram-se aumentadas no grupo GLB, no momento M_5 em relação ao M_0 , devido ao aumento das frações alfa (AAT, AGP, HP) e betaglobulina (TN). As globulinas apresentaram-

se diminuídas no soro de animais do grupo GLT, no momento M_5 em comparação ao M_0 , devido à diminuição das frações alfa (CR) e gamaglobulina (IgG). Portanto, a quimioterapia e a recidiva contribuíram para o aumento das globulinas no grupo GLB e para sua diminuição no grupo GLT.

A relação A:G aumentou no soro de cães do GLB no momento M_5 , em consequência do aumento da albumina. Da mesma forma, verificou-se seu aumento no grupo GLT no momento M_5 , devido ao aumento da albumina e à diminuição da globulina. Neste caso, a quimioterapia levou ao aumento da relação A:G em ambos os grupos de cães portadores de linfoma, e a recidiva aumentou a relação A:G nos cães acometidos por linfoma T (GLT).

As concentrações séricas de globulina não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais no momento do diagnóstico, porém apresentaram-se maiores no grupo GLT, mas dentro do intervalo de normalidade. No momento da recidiva da doença (M_R), cães acometidos por linfoma B (GLB) apresentaram hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, diferentemente dos cães do grupo GLT, sugerindo uma resposta de fase aguda mais intensa nos animais com linfoma B. De acordo com Ramos et al. (2008), em um estudo de cães portadores de linfoma, verificou-se incidência de hiperglobulinemia em 71% dos casos. No entanto, no referido estudo não foi avaliada a imunofenotipagem dos animais doentes.

A relação A:G não apresentou diferenças significativas entre os grupos estudados, todavia apresentou valores menores na recidiva (M_R) do grupo GLB, e abaixo do intervalo de normalidade. Tal achado, provavelmente esteja relacionado à diminuição da albumina e aumento das globulinas séricas nos cães portadores de linfoma B. De certa forma, o referido resultado corrobora aqueles de Eckersall (2008), que relatou que a relação A:G pode ajudar no diagnóstico clínico-patológico do linfoma canino, acentuando as alterações relativas nos dois principais compartimentos de proteínas.

Tabela 13. Valores médios e desvios-padrão obtidos para proteínas totais, albumina, globulina e relação Albumina:Globulina, em cães controle e acometidos por linfoma (GC, GLB e GLT), nos diferentes momentos de avaliação (M₀, M₅ e M_R) (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Proteínas	Momentos	Valor de Referência	GC	GLB	GLT
PT (g/dL)	M ₀	5,50–8,50**	6,47 ± 0,34	6,30 ± 0,69 ^B	6,38 ± 1,48
	M ₅	-----	6,47 ± 0,34	7,24 ± 1,08 ^A	6,53 ± 1,00
	M _R	-----	6,47 ± 0,34	7,40 ± 0,85 ^{AB}	6,47 ± 2,10
Albumina (g/dL)	M ₀	2,50–4,00***	2,69 ± 0,17	2,42 ± 0,56 ^B	2,40 ± 0,17 ^B
	M ₅	-----	2,69 ± 0,17	3,00 ± 0,50 ^A	3,22 ± 0,50 ^A
	M _R	-----	2,69 ± 0,17	2,16 ± 0,55 ^{AB}	3,06 ± 1,39 ^{AB}
Globulina (g/dL)	M ₀	2,50–4,50***	3,77 ± 0,25	3,89 ± 0,93	3,97 ± 1,54
	M ₅	-----	3,77 ± 0,25	4,23 ± 1,32	3,30 ± 0,63
	M _R	-----	3,77 ± 0,25	5,24 ± 1,40	3,40 ± 0,97
Relação A:G*	M ₀	0,50–1,30***	0,71 ± 0,05	0,68 ± 0,30	0,68 ± 0,24
	M ₅	-----	0,71 ± 0,05	0,78 ± 0,32	0,99 ± 0,16
	M _R	-----	0,71 ± 0,05	0,44 ± 0,23	0,90 ± 0,29

*Relação A:G não apresenta unidade de medida. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

** Laboratório de Patologia Clínica (L.P.C.), FCAV, Unesp, Jaboticabal, SP. ***BUSH, 2004.

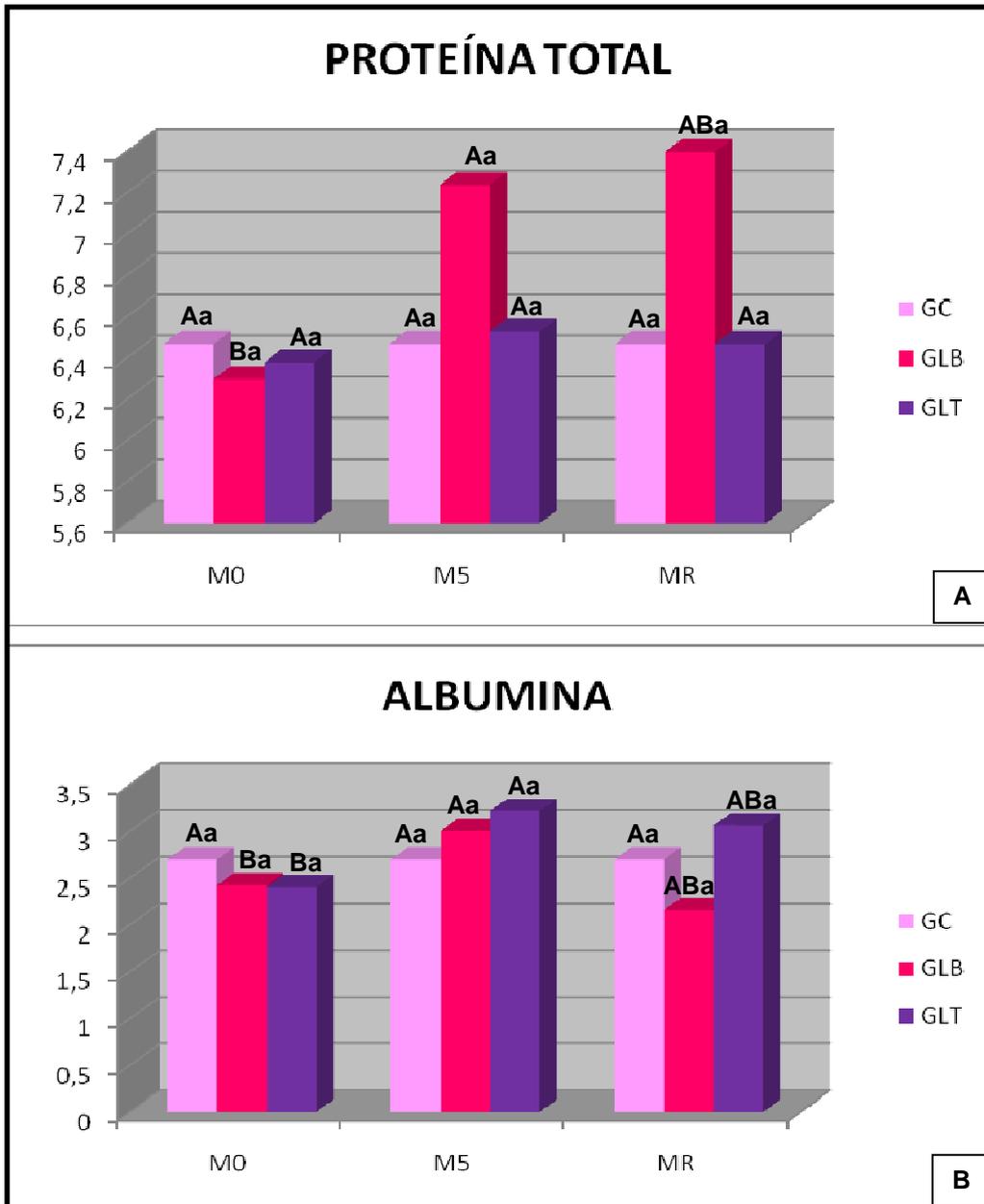


Figura 1. Representações gráficas da proteína total (A) e albumina (B) (g/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV / Unesp - Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

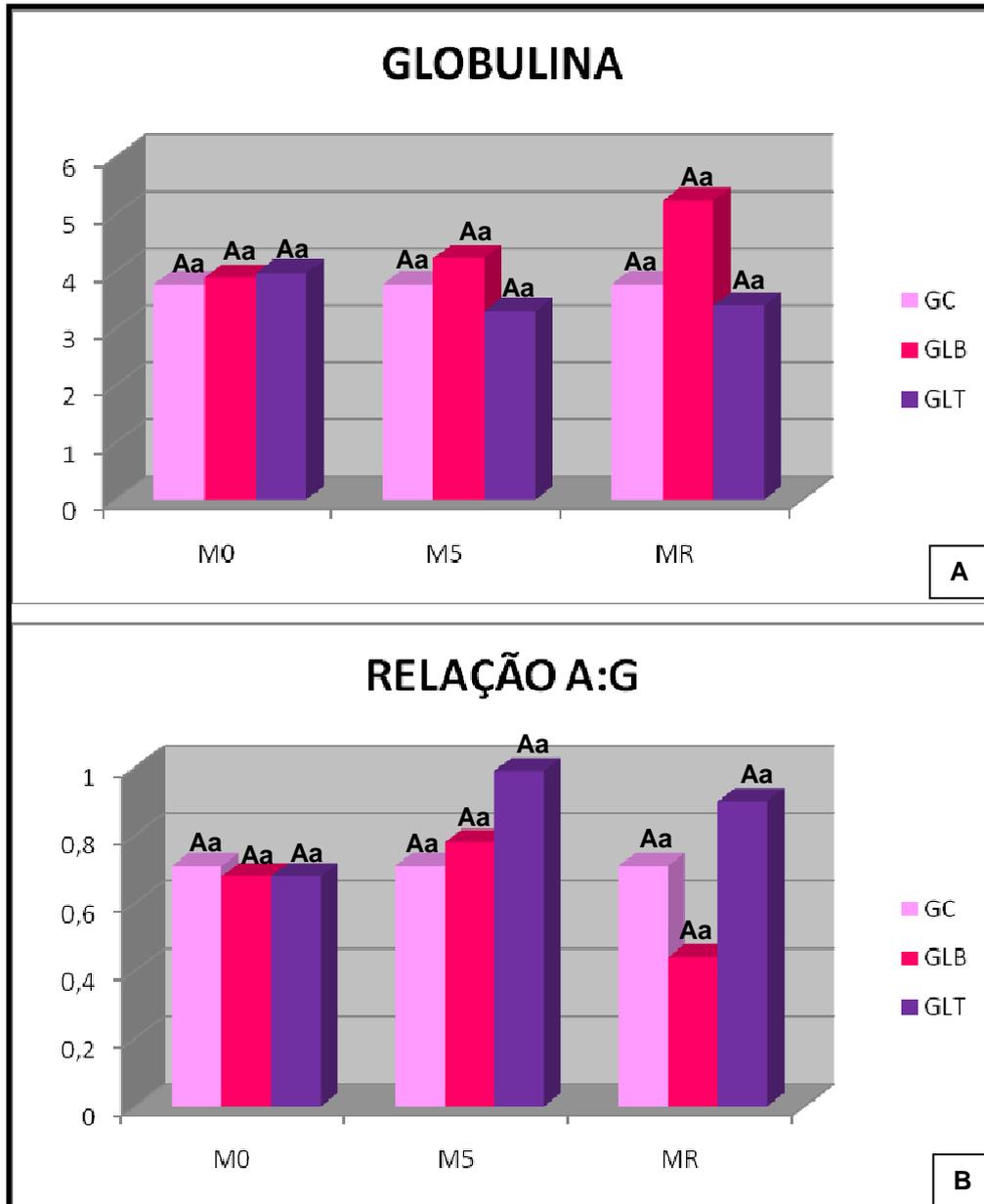


Figura 2. Representações gráficas da glogulina (A) e relação A:G (B) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M_0 , M_5 e M_R (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

5.3.2 Proteínas de Fase Aguda e Imunoglobulinas

a) Proteínas de Fase Aguda: AAT, AGP, CP, HP, e TN

As PFA positivas desempenham diversas funções fisiológicas para o sistema imunológico, como destruição ou inibição do crescimento de microrganismos, atuação nos estados de inflamação sistêmica associada à anorexia e alterações metabólicas. Outras são responsáveis pelo *feedback* negativo sobre a resposta inflamatória (JAIN et al., 2011).

No momento do diagnóstico (M_0) as PFA não apresentaram diferenças significativas entre os grupos GLB e GLT, no entanto, a AGP, CP e TN apresentaram maiores concentrações séricas no grupo GLB, e a AAT e HP nos soros de animais do grupo GLT. Neste caso, a resposta imune inata das PFA apresentou variações entre cães acometidos por linfomas de diferentes imunofenótipos. Além disso, pode-se sugerir maior possibilidade de metástase nos cães do GLT, devido ao aumento da AAT, responsável pela inibição das enzimas proteolíticas, e aumento da HP, que apresenta atividade angiogênica.

A AAT e AGP não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para a interação grupos x momentos, nos cães com linfoma. A alfa-1-globulina AAT aumentou em ambos os grupos com linfoma, no momento M_5 contrastado com o M_0 , diminuiu no GLB e aumentou no GLT, na comparação entre M_R e M_0 . Portanto, a quimioterapia contribuiu para elevação dos valores séricos da AAT nos grupos doentes e a recidiva interferiu no aumento da AAT no soro de cães do grupo GLT. A alfa-1-globulina AGP apresentou aumento de seus valores séricos nos animais acometidos por linfomas B e T, nos momentos M_5 e M_R em comparação ao M_0 . Sendo assim, é plausível admitir que a quimioterapia e a recidiva contribuíram para o aumento da AGP em ambos os grupos de pacientes acometidos por linfoma.

Os níveis séricos da AAT não apresentaram diferenças entre os grupos estudados, contudo apresentaram-se maiores em todos os momentos avaliados para cães dos grupos GLT e GC, e somente no momento M_5 para o grupo GLB, quando considerados os valores de normalidade (Tabela 13 e Figura 4). A AAT demonstrou sensibilidade a quimioterapia em ambos os grupos de cães portadores de linfoma, todavia apresentou resultados diferentes na recidiva da doença, na

comparação dos cães com linfoma B e T. Há de se ressaltar, que são escassos os valores de normalidade para as PFA encontrados na literatura, sendo assim, sugere-se o estabelecimento de valores de referência para estas proteínas, em cada laboratório de pesquisa clínico-patológica. Além disso, a resposta imune inata da AAT nos cães acometidos por linfoma T (GLT) na recidiva da doença, mostrou-se muito mais intensa.

Sabe-se que a AAT é o componente mais importante dentre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas com a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999; ECKERSALL, 2008). Desta maneira, o aumento das concentrações séricas da AAT em todos os momentos estudados para os cães do grupo GLT, sugere uma maior concentração de enzimas proteolíticas em cães com linfoma T, e conseqüentemente, maior risco de metástase.

As concentrações séricas da AGP não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados e além disso, tanto nos cães controle como portadores de linfoma, deste ensaio e, em todos os momentos avaliados, encontraram-se abaixo do intervalo de normalidade (Tabela 13 e Figura 4). Somente no M_R dos cães com linfoma B a AGP apresentou 2,6 vezes maior do que no M₀ deste mesmo grupo. Este resultado corrobora parcialmente com Yuki, Itoh & Takase (2009), que relataram que a AGP é uma glicoproteína que responde positivamente ao estímulo inflamatório.

A AGP liga-se à maioria das drogas (CÉRON et al., 2005), portanto esperava-se que após a quimioterapia esta proteína apresentasse suas concentrações diminuídas, no entanto, foi encontrado o inverso.

A AGP e HP aumentaram suas concentrações séricas no M₅ após o primeiro ciclo de quimioterapia, que inclui como um dos fármacos a prednisona. Estes achados concordam com um estudo, que relatou que os níveis séricos da AGP (HARVEY & WEST, 1987) e da HP (McGROTTY et al., 2005) são influenciados pela presença de glicocorticóides, de modo a apresentar concentração elevada após o tratamento com estas drogas e ainda, nos casos de hiperadrenocorticismos.

A CP apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação grupos x momentos, no momento M₀ do grupo GLB (Tabela 13 e Figura 5). A alfa-2-globulina

CP diminuiu em ambos os grupos de cães acometidos por linfoma, no momento M_5 em comparação ao M_0 , diminuiu no soro de animais do GLB e aumentou no GLT, no momento M_R comparado ao M_0 . Portanto, a quimioterapia contribuiu para a diminuição da CP em ambos os grupos de cães portadores de linfoma, e a recidiva contribuiu para o aumento da concentração sérica de CP nos animais do grupo GLT.

Os níveis séricos de CP apresentaram-se significativamente mais elevados no grupo GLB em relação aos cães do grupo controle (GC) no momento M_0 , e além disso mostraram-se maiores nos cães acometidos por linfoma, se comparados aos valores de normalidade, nos três momentos analisados. Este achado corrobora com Calazans et al. (2009), que relataram aumento da CP em cães com linfoma, sugerindo uma resposta à reação inflamatória nestes animais. A CP apresentou níveis séricos maiores nos animais do grupo GLT no momento M_R , sugerindo-se, portanto, que esta proteína apresenta comportamento biológico diferente entre cães portadores de linfomas B e T, pelo menos no momento da recidiva da doença. No entanto, segundo Lucas et al. (2010), a ausência de alteração da CP no linfoma canino e a influência da quimioterapia, faz dela uma PFA inapropriada para monitorar o linfoma canino. Além disso, estudos precedentes não evidenciaram valores séricos para CP que pudessem diferenciar significativamente cães acometidos por linfoma ou leucemia de cães hígidos (TECLES et al., 2005), discordando do ensaio em tela.

As concentrações séricas de HP apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação grupos x momentos, no momento M_5 dos cães portadores de linfoma B (GLB) (Tabela 13 e Figura 5). A alfa-2-globulina HP aumentou em ambos os grupos doentes, no momento M_5 em comparação ao M_0 . De outra parte, a HP diminuiu no soro dos cães portadores de linfoma B (GLB) e aumentou naqueles do grupo GLT, quando comparados os momento M_R e M_0 . Diante de tal comportamento, sugere-se que a quimioterapia auxiliou no aumento da HP nos cães com linfoma e a recidiva da doença contribuiu para o seu aumento nos cães acometidos por linfoma T (GLT). Os níveis aumentados de haptoglobina encontrado em inflamações crônicas podem desempenhar um papel importante na reparação tecidual, devido a sua atividade angiogênica (DABROWSKI et al., 2009; CRAY et al., 2012). Sendo assim, pode-se sugerir que os cães do grupo GLT poderiam

apresentar maior possibilidade de metástase no momento da recidiva da doença, devido ao aumento da haptoglobina nestes animais.

Os níveis séricos de HP variaram significativamente no caso dos cães do grupo GLB, cujas as médias mostraram-se mais elevadas no momento M_5 em comparação ao M_0 . Desta forma, a HP demonstrou sensibilidade ao uso de corticóides somente nos cães com linfoma B (GLB). Porém, é importante reafirmar que os valores médios obtidos para a HP sérica apresentaram-se dentro da normalidade, em todos grupos e momentos.

As concentrações séricas de TN obtidas para os cães do grupo controle, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para a interação grupos x momentos, no momento M_0 (Tabela 13 e Figura 6). A beta-2-globulina TN aumentou nos grupos dos cães acometidos por linfoma, nos momentos M_5 e M_R em contraste ao M_0 . Tais achados indicam que a quimioterapia e a recidiva contribuíram para o aumento da TN nos cães doentes. Além disso, a TN apresentou-se significativamente mais elevada nos cães hígidos em comparação àqueles portadores de linfoma, caracterizando-se como uma PFA negativa e corroborando Eckersall (2008).

As concentrações séricas da TN não apresentaram diferenças significativas entre os cães acometidos por linfoma, entretanto, mostraram-se menores nos animais com linfoma T, sugerindo que esta diminuição depende da magnitude da neoplasia. Priest et al. (2010), estudaram a expressão do receptor de transferrina no linfoma canino, e concluíram que tal expressão depende do grau e do fenótipo do tumor. Além disso, relataram que a expressão do receptor de transferrina foi significativamente menor nos tumores de células T de baixo grau comparativamente aos de alto grau, bem como aos linfomas B de baixo ou alto grau. No atual ensaio, os cães do GLT apresentaram valores menores de TN em comparação aos cães do GLB, no momento do diagnóstico (M_0), todavia, não foi avaliada a expressão de transferrina nestes animais.

Tabela 14. Valores médios e desvios-padrão obtidos para proteínas de fase aguda AAT, AGP, CP, HP e TN (mg/dL), nos grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Proteínas	Momentos	Valores de Referências	GC	GLB	GLT
AAT	M ₀	233 mg/dL (Hughes et al., 1995)	270,88 ± 60,05	210,94 ± 95,40	243,33 ± 101,75
	M ₅	-----	270,88 ± 60,05	254,83 ± 137,78	282,34 ± 191,70
	M _R	-----	270,88 ± 60,05	162,21 ± 110,60	270,44 ± 228,84
AGP	M ₀	28,6 mg/dL (Yuki et al., 2010)	7,72 ± 3,76	7,59 ± 7,86	7,55 ± 9,33
	M ₅	-----	7,72 ± 3,76	11,69 ± 7,13	15,23 ± 6,42
	M _R	-----	7,72 ± 3,76	19,76 ± 4,19	9,91 ± 4,74
CP	M ₀	4,93 mg/dL (Martinez et al., 2002)	3,06 ± 1,23 ^b	28,31 ± 16,50 ^a	18,25 ± 22,65 ^{ab}
	M ₅	-----	3,06 ± 1,23	14,87 ± 12,98	7,55 ± 6,41
	M _R	-----	3,06 ± 1,23	20,18 ± 16,09	34,76 ± 28,95
HP	M ₀	30 – 180 mg/dL (Martinez et al., 2004)	14,31 ± 16,25	13,10 ± 8,07 ^B	15,98 ± 14,28
	M ₅	-----	14,31 ± 16,25	23,09 ± 11,85 ^A	16,18 ± 11,58
	M _R	-----	14,31 ± 16,25	11,94 ± 3,49 ^{AB}	17,72 ± 11,56
TN	M ₀	590 – 960 mg/dL (Stacy et al., 2009)*	349,08 ± 140,69 ^a	240,34 ± 104,99 ^b	206,92 ± 109,26 ^b
	M ₅	-----	349,08 ± 140,69	308,32 ± 105,72	322,49 ± 155,69
	M _R	-----	349,08 ± 140,69	299,54 ± 173,75	312,77 ± 35,41

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. *Valor da fração beta-2-globulina.

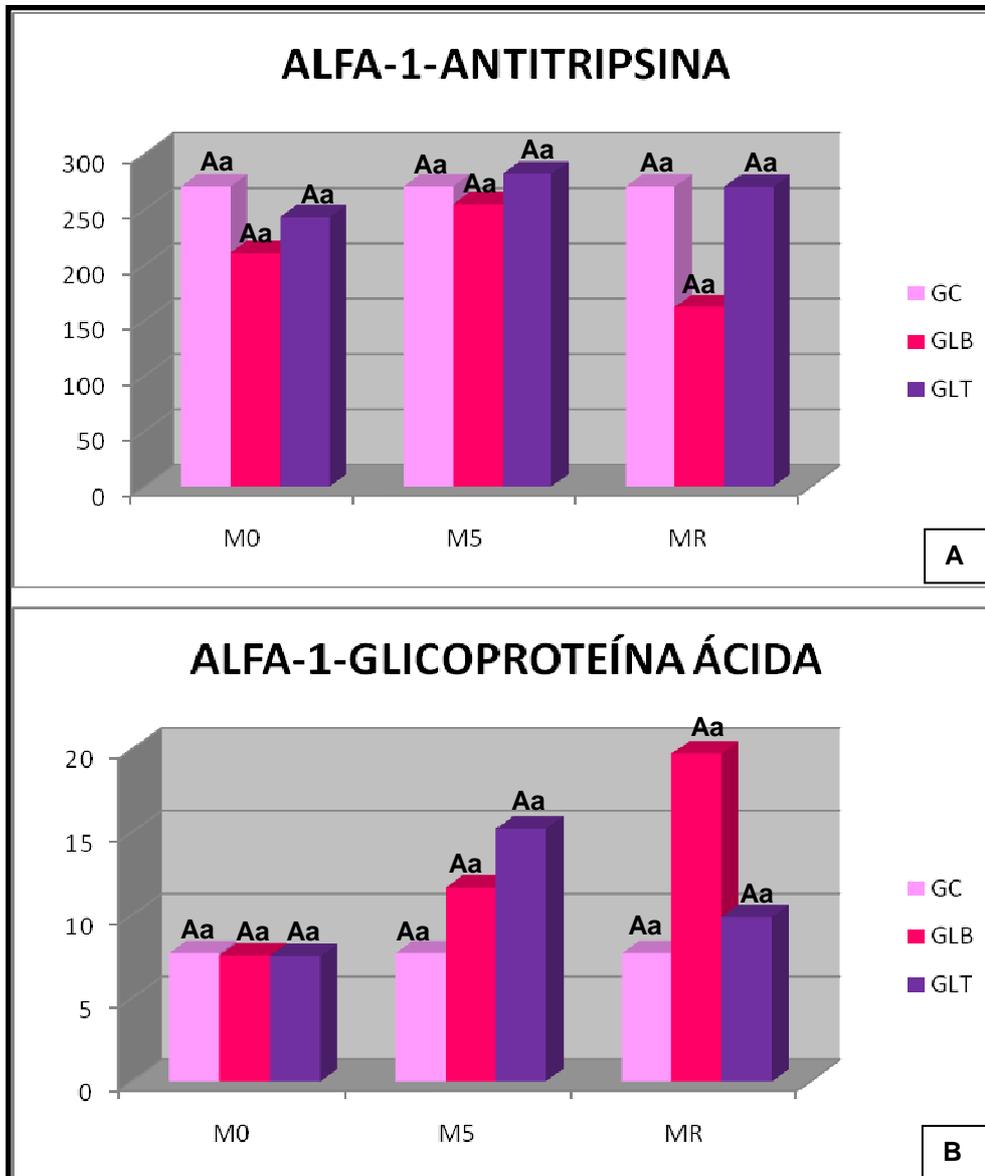


Figura 3. Representações gráficas da AAT (A) e AGP (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

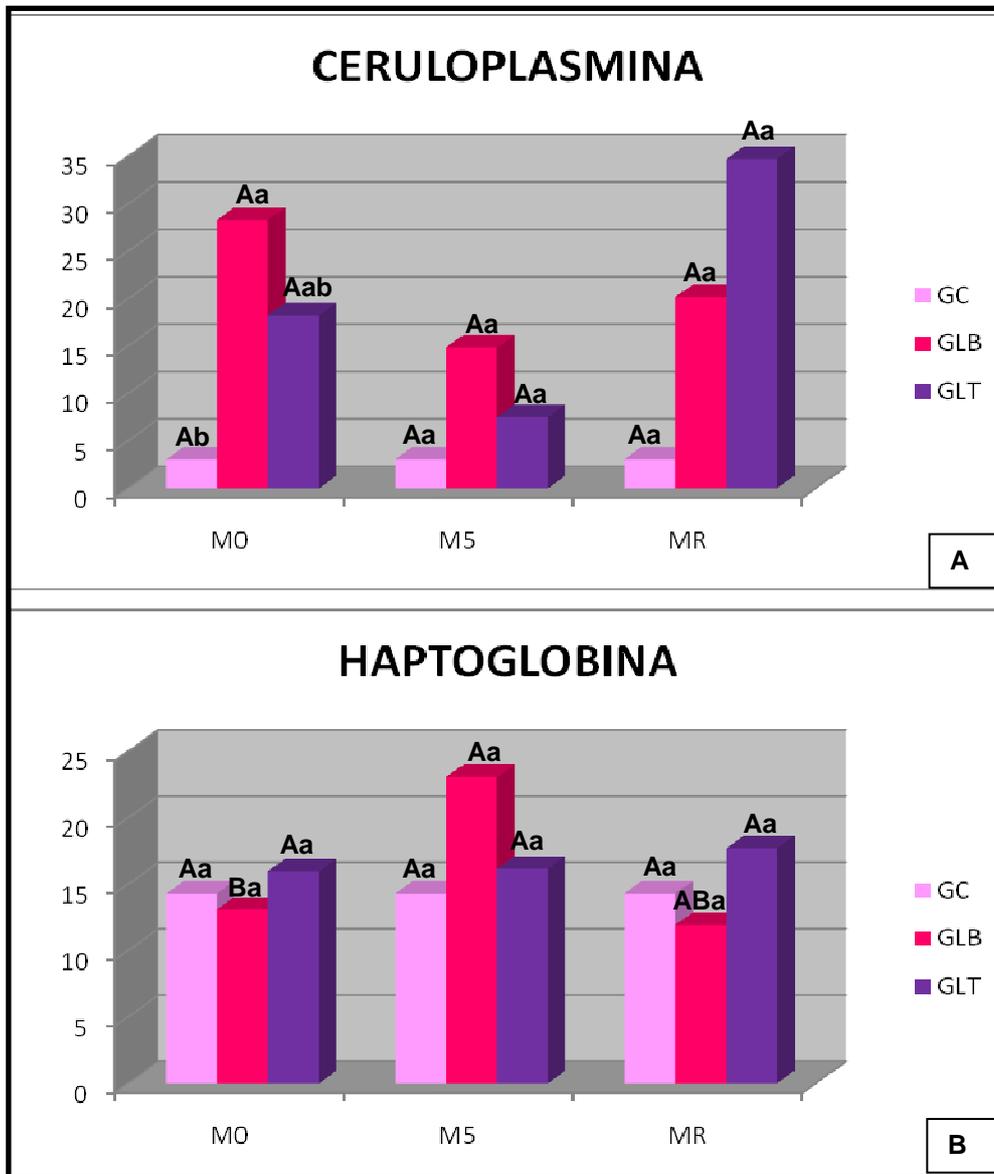


Figura 4. Representações gráficas da CP (A) e HP (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M_0 , M_5 e M_R (FCAV / Unesp – Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

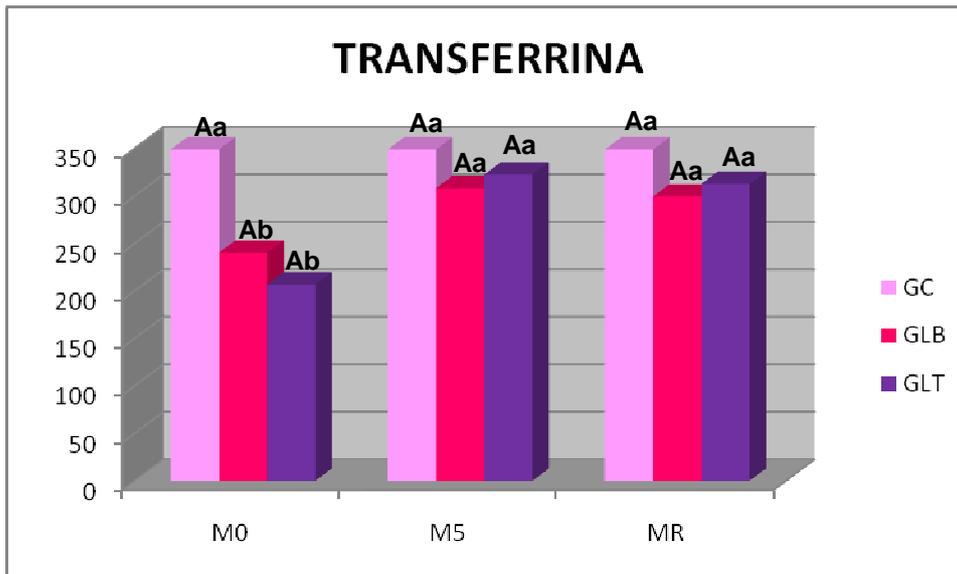


Figura 5. Representação gráfica da TN (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV/Unesp–Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

b) Imunoglobulinas: IgG e IgA

As concentrações séricas obtidas para as imunoglobulinas IgG e IgA não apresentaram diferenças significativas entre animais acometidos por linfoma B ou T, porém demonstraram-se mais elevadas no soro de cães do GLB, e dentro do intervalo de normalidade. Tais achados discordam de alguns dados da literatura, onde é referido que geralmente animais com tumores linfoides de células B, poderiam apresentar-se imunossuprimidos (DALECK et al., 2008; TIZARD, 2008).

Também como mostrado nos resultados deste ensaio, as concentrações séricas de IgG e IgA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) para interação grupos x momentos, nos cães acometidos por linfoma de ambos os grupos (Tabela 15 e Figura 7). Entretanto, os valores de IgG diminuíram nos cães acometidos por linfoma T, no momento M₅ em comparação ao M₀. Já no momento M_R em contraste ao M₀, houve aumento da IgG nos animais do grupo GLB e diminuiu naqueles do GLT. Do ponto de vista de tais achados, a quimioterapia contribuiu para a diminuição de IgG no grupo GLT e a recidiva auxiliou no aumento

da IgG no GLB, e diminuiu a IgG no GLT. Desta maneira, na recidiva da doença, os animais do GLB apresentaram as concentrações séricas de IgG próximas ao limite superior de normalidade. Já os animais do GLT, na recidiva da doença, apresentaram diminuição das concentrações séricas de IgG, e abaixo do intervalo de normalidade, evidenciando desta forma, imunossupressão nestes cães. Segundo Lassen (2007), é possível observar gamopatia monoclonal ou policlonal nos casos de linfoma e leucemia linfocítica, em cães. No entanto, no atual ensaio não foi observado esta alteração nas gamaglobulinas.

A IgA diminuiu no GLB e aumentou no GLT, no momento M_5 em comparação ao M_0 , e aumentou em ambos os grupos doentes, no M_R comparado ao M_0 . Estes resultados parecem indicar que a quimioterapia interfere na diminuição da IgA em cães com linfoma B (GLB) e a recidiva contribuiu para o aumento da referida IgA nos cães portadores de linfoma B e T.

As concentrações séricas de IgG não apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados, porém seus níveis séricos mais altos foram registrados no momento M_R de cães do grupo GLB, ainda que dentro do intervalo de normalidade. Esperava-se que os animais do GLB apresentassem menores concentrações séricas da IgG e IgA em relação ao GLT, posto que, geralmente no caso de tumores linfoides de células B, poderia ocorrer a imunossupressão da resposta imune humoral. No entanto, verificou-se que no momento do diagnóstico (M_0) dos cães portadores de linfoma, a IgG e IgA séricas apresentaram-se mais elevadas nos animais com linfoma B.

As concentrações séricas da IgA não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais, cuja maior concentração sérica foi verificada no momento da recidiva (M_R) dos animais do grupo GLT, contudo dentro dos valores de referência. Sendo assim, sugere-se que a IgG e IgA poderiam ser utilizada para monitorar a recidiva da doença linfoproliferativa em cães acometidos por linfomas B ou T.

Os resultados encontrados para imunoglobulinas neste ensaio são semelhantes àqueles relatados por Madewell (1997), tanto em cães com linfoma como sadios, traduzindo de certa forma a grande variação de imunoglobulinas em

cães. Sugere-se mais estudos com maior número de animais para avaliar a resposta imune inata nos casos de linfomas caninos B ou T.

Tabela 15. Valores médios e desvios-padrão obtidos para as imunoglobulinas IgG e IgA, nos três grupos experimentais (GC, GLB e GLT), nos momentos M_0 , M_5 e M_R (FCAV/Unesp–Jaboticabal, 2013).

Proteínas	Momentos	Valores de Referência*	GC	GLB	GLT
IgG (g/dL)	M_0	1–2 g/dL	0,95 ± 0,25	1,17 ± 0,78	1,16 ± 0,65
	M_5	-----	0,95 ± 0,25	1,17 ± 1,03	1,11 ± 0,92
	M_R	-----	0,95 ± 0,25	1,95 ± 1,74	0,78 ± 0,51
IgA (mg/dL)	M_0	20–150 mg/dL	9,55 ± 4,49	17,68 ± 8,51	12,68 ± 8,41
	M_5	-----	9,55 ± 4,49	12,09 ± 11,11	14,06 ± 10,12
	M_R	-----	9,55 ± 4,49	20,70 ± 22,48	27,81 ± 12,64

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%. *Tizard, 2008.

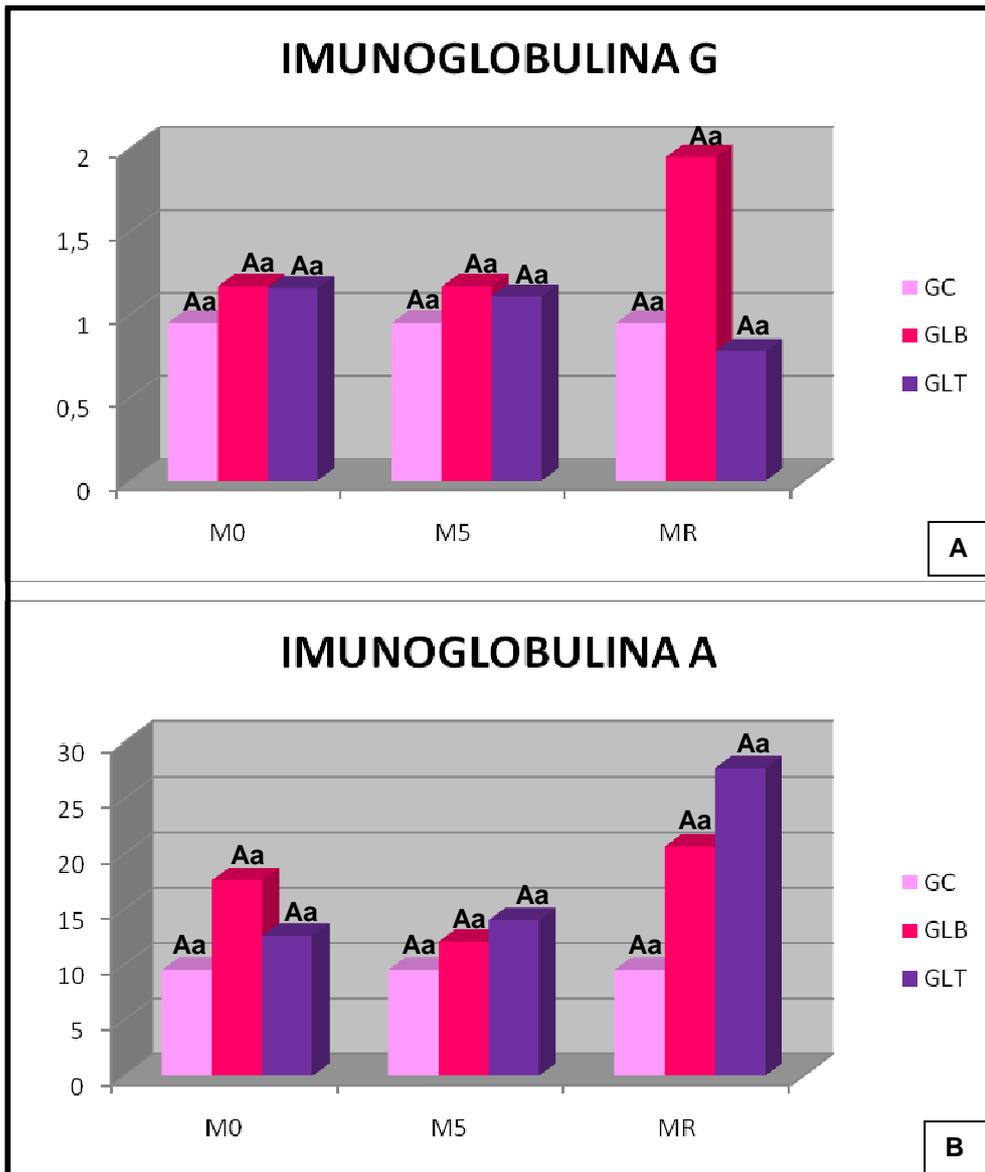


Figura 6. Representações gráficas da IgG (A) (g/dL) e IgA (B) (mg/dL) obtidas para os grupos GC, GLB e GLT, nos momentos M₀, M₅ e M_R (FCAV/Unesp–Jaboticabal, 2013). Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre momentos, e médias seguidas por letras minúsculas diferentes entre grupos, diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que este ensaio foi realizado, foi possível concluir que:

- Algumas PFA apresentaram variações biológicas importantes na sua biossíntese de acordo com o imunofenótipo do linfoma.
- Sugere-se maior possibilidade de metástase em cães do GLT, devido aumento da AAT e HP nestes cães.
- A albumina mostrou-se útil no estadiamento e subestadiamento clínico do linfoma canino.
- A maioria das proteínas apresentaram-se mais elevadas na remissão parcial da doença linfoproliferativa.
- Cães acometidos por linfoma B não apresentaram imunossupressão na resposta imune humoral.
- A albumina e a transferrina comportaram-se como PFA negativas nos cães com linfoma.
- A ceruloplasmina comportou-se como PFA positiva em cães portadores de linfoma.
- Inclusão da avaliação da relação A:G no monitoramento de animais portadores de linfoma.
- Não ocorreu gamopatia monoclonal nem policlonal nos cães acometidos por linfoma.
- Os cães do grupo GLT no momento da recidiva da doença apresentaram-se imunossuprimidos.
- A quimioterapia antineoplásica e a recidiva da doença interferiram na concentração séricas das proteínas totais e suas frações.

7. REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A. K. & LICHTMAN, A. H. Imunidade contra tumores. In:_____ **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, cap. 17, p. 411-412.

BACILA, M. Bioquímica veterinária, 2. ed. São Paulo: Robe Editorial, 2003. 583p.

BARGER, A. M. & GRINDEM, C. B. Hematologic abnormalities associated with cancer therapy. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5 ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, p.676-68, 2000.

BERGIN, D. A.; HURLEY, K.; McELVANEY, N. G. Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, Wroclaw, v. 60, p. 81-97, 2012.

BUSH, B. M. Bioquímica Plasmática. In:_____ **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004, cap. 5, p. 169-223.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; ROCHA, N. S.; MOUTINHO, F. Q.; CIAMPOLINI, P. Linfoma canino: Revisão de cinquenta e quatro casos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, MG, v.19, n.3, p.131-142, 2003.

CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; MOUTINHO, F. Q.; PADOVANI, C. R. Linfoma canino: achados clínico-patológicos. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 9, n. 2, p. 25-29, 2004.

CALAZANS, S. G. Hemograma e constituintes bioquímicos do sangue de cães com linfoma submetidos ou não à poliquimioterapia (ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona). 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária - área Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CALAZANS, S. G.; DALECK, C. R.; FAGLIARI, J. J.; REPETTI, C. F.; DE NARDI, A. B.; CASTRO, J. H. T.; FERNANDES, S. C.; CÉSAR, J. R. F.; RODIGHIERI, S. M. Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 5, p. 1044-1048, 2009.

CERÓN, J. J; ECKERSALL, P. D; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

¹ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023*: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 23 p.

COLETA, F. E. D. Avaliação hematológica e imunofenotípica de cães com linfoma. 2009. 101 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – área Clínica Médica) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; BAIN, R. K.; and DOUGLAS, T. A. The acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica* and *Ostertagia ostertagii* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 203-207, 1989.

COOPER, E. S.; WELLMAN, M. L.; CARSILLO, M. E. Hyperalbuminemia associated with hepatocellular carcinoma in a dog. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 516-520, 2009.

CORAZZA, M.; BIZZETI M.; VERGARI O.; DEMI S. Dati preliminari sulla determinazione dell'aptoglobinemia in cani sani ed affetti da patologie in fase acuta e cronica. **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria de Pisa**, Pisa, v. 12, p. 241-249, 1997.

CORRÊA, C. R. & BURINI, R. C. Proteínas plasmáticas positivas à fase aguda. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 48-56, 2000.

COUTO, C. G. Oncologia: principios de tratamento do cancer. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 78, p. 864-869, 2006.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, Danvers, v. 105, p. 113-150, 2012.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAL, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology**, Lublin, v. 72, n. 4, p. 471-476, 2009.

DALECK, C. R.; CALAZANS, S. G.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**, São Paulo: Roca. Cap 31. p.481-506, 2008.

DE MOURA, V. M. B. D.; SEQUEIRA, J. L.; BANDARRA E. P. Linfoma canino. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 29-33, 1999.

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine lymphosarcoma: clinical features. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 25, n. 8, p. 573-581, 2003.

DOBSON, J. M.; GORMAN, N. T. Canine Multicentric lymphoma. 2: Comparison of response two chemotherapeutic protocols. **Journal of Small Animal Practice**, London, v. 35, p. 9-15, 1994.

DORFMAN, M. e DIMSKI, D. S. Paraproteinemias in small animal medicine. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 14, n. 5, p. 621-632, 1992.

ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. **Irish Veterinary Journal**, Dublin, v. 53, n. 6, p. 307-311, 2000.

ECKERSALL, P. D. The time is right for acute phase protein assays. **The Veterinary Journal**, Ithaca, v. 168, n. 1, p. 3-5, 2004.

ECKERSALL, P. D. & BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, London, v.185, p. 23-27, 2010.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155.

EVANS, T. W. Review article: albumin as a drug: biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 6-11, 2002.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, G. T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, p.322-328, 2008.

FAN, T.M. & LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p. 285-294, 2005.

FIGHERA, R. A. **Anemia em medicina veterinária**. Santa Maria: O autor, 2001. 214p. Cap.7: Anemias por insuficiência medular: p.145-158.

FRÁGUAS, M. S. Estudo retrospectivo de casos de linfoma canino, ocorridos entre maio de 2003 e dezembro de 2006, atendidos junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel". 2008. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FOURNEL-FLEURY, C. The Lymph Node. In: _____ **Atlas en Couler de Cytologie du Cancer chez le Chien et le Chat/ Color Atlas of Cancer Cytology of the Dog and Cat**. Conference Nationale des Veterinaires Specialises en Petits Animaux, cap. 4, 1994.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 104, n. 8, p. 1258-1264, 2004.

GERMAN, A. J.; HERVERA , M.; HUNTER , L.; HOLDEN , S. L.; MORRIS , P. J.; BIOUSSE, V.; TRAYHURN, P. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 37, p. 214-226, 2009.

GERSHWIN, L. J. Clinical Veterinary Immunology. In: KANEKO J. J., HARVEY J. W.; BRUSS M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008, p. 157-172.

GOMES, E. G. A.; JUCÁ, M. J.; MENEZES, H. L.; NUNES, B. L. B. B. P.; COSTA, H.; LIMA, F. O.; MATOS, D. Correlation between the immunohistochemical expressions of MP-1, MMP-7 and VEGF and prognostic factors in colorectal adenocarcinoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 24, n.4, p. 303-310, 2009.

GORMAN, N. T. & HALLIWELL, R. E. W. The immunoglobulins: structure, genetics and function. In: HALLIWELL, R. E. W.; GORMAN, N. T. (Eds.). **Veterinary Clinical Immunology**, London: Saunders, p. 19-54, 1989.

HAGMAN R. Serum a-1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 40, n.1, p. 52-59. 2011.

HARVEY, J. W. & WEST, C. L. Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentration in dogs. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 24, n. 1, p. 90-92, 1987.

HIRATSUKA, S.; NAKAMURA, K.; IWAI, S.; MURAKAMI, M.; ITOH, T.; KIJIMA, H.; SHIPLEY, J.M.; SENIOR, R.M.; SHIBUYA, M. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 2, p. 289-300, 2002.

HUGHES, D.; ELLIOTT, D. A.; WASHABAU, R. J.; KUEPPERS, F. Effects of age, sex, reproductive status, and hospitalization on serum alpha-1-antitrypsin concentration in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 568-572, 1995.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 417.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: as diagnostic tool. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 3, p.118-127, 2011.

JONES, C.J., HUNT, R.D., KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Philadelphia: Willians & Wilkins, 1997.

KANEKO, J. J. Serum proteins and dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, 1997. p.117-138.

KIUPEL, M.; TESKE, E.; BOSTOCK, D. Prognostic factors for treated canine malignant lymphoma. **Veterinary Pathology**, Thousand Oaks, v.36, p.292-300, 1999.

KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K. ; DELAYTE, E. H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M. K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

KVALOY, S.; LANGHOLM R.; KAALHUS, O.; MICHAELSEN, T.; FUNDERUD, S.; FOSS ABRAHAMSEN, A.; GODAL, T. Transferrin receptor and B lymphoblast antigen: their relationship to DNA synthesis, histology and survival in B-cell lymphomas. **International Journal of Cancer**, New York, v. 33, p. 173–177, 1984.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia Anticancerígena**. Sao Paulo: Roca, 191p, 2004.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo. In: THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. São Paulo: Roca, 2007, cap. 26, p 376-387.

LEVY, A. P.; ASLEH, R.; BLUM S.; LEVY, N. S.; MILLER-LOTAN, R.; KALET-LITMAN, S.; ANBINDER, Y.; LACHE, O.; NAKHOUL, F. M.; ASAF, R.; FARBSTAIN, D.; POLLAK, M.; SOLOVEICHIK, Y. Z.; STRAUSS, M.; ALSHIEK, J.; LIVSHITS, A.; SCHWARTZ, A.; AWAD, H.; JAD, K.; GOLDENSTEIN, H. Haptoglobin: basic and clinical aspects. **Antioxid Redox Signal**, Larchmont, v. 12, p. 293–304, 2010.

LUCAS, S. R. R.; MERLO, A.; MIRANDOLA, R. M. S.; GASPARIN, T. P. Ceruloplasmin concentration in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 47, n. 6, p. 477-482, 2010.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**, 2th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996. cap. 28 B, p. 451-479.

MACEWEN, E. G.; YOUNG, K. M; VAIL, D.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 3. ed Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. p. 558-590.

- MADEWELL, B. R. Tumor markers. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. p.761-784.
- MARTINEZ, S. F.; TECLES, M. D.; PARRA, J. J.; CERÓN. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinária. **Anales Veterinaria Murcia**, Murcia, v. 17, p. 97-114, 2001.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D, et al. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Record*, London, 2002, v. 150, p. 241–244.
- MARTINEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P.J.; CERÓN, J. J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Veterinary Record*, London, 2004, v. 154, p. 814–817.
- MARTINEZ-SUBIELA, S. & CERÓN, J.J. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. **Veterinarni Medicina**, Praha, v. 50, p. 39–46, 2005.
- McGROTTY, Y. L.; ARTEAGA, A.; KNOTTENBELT, C. M.; RAMSEY, I. K.; ECKERSALL, P. D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 255-258, 2005.
- MITCHELL, K. D.; KRUTH, S. A.; WOOD, R. D.; JEFFERSON, B. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 585–591, 2009.
- MORENO, K. & BRACARENSE, A. P. F. R. L. Estudo retrospectivo de linfoma canino no período de 1990-2004 na região norte do Paraná. **Brazilian Journal of Veterinary Research of Animal Science**, São Paulo, v.44, supl., p. 46-52, 2007.
- MORRISON, W. B. Commonly used protocols: Canine lymphoproliferative neoplasms: Doxorubicin. In: HAHN, K. A.; RICHARDSON, R. C. **Cancer Chemotherapy - A Veterinary Handbook**. Malvern: Williams & Wilkins, p. 156,1998.
- MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Texas: Teton New Media, 2005.
- MOULTON, J. E. & HARVEY, J. W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. In: MOULTON, J.E. **Tumors in domestic animals**, 3.ed. California: University of California, 1990, p.240-244.
- NAOUM, P. C.; CERON, C. R.; DOMINGOS, C. R. B. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1999. p. 1-38.

NELSON, R.W. & COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1087-1096, 2006.

OGILVIE, G. K. & MOORE, A. S. Management of Specific Diseases: Clinical Briefing: Lymphoma. In: **Managing the Veterinary Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems. p. 228-259, 1995.

OWEN, L. **TNM classification of tumors in domestic animals**. 1st Geneva: World Health Organization, 1980, p.46-47.

PAULA e SILVA, R. O; LOPES, A. F; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. Seric proteins electrophoresis: clinical interpretation and correlation. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, n.18, v.2, p.116-122, 2008.

PEREIRA, P. C. M. & BURINI, R. C. Reação metabólica à infecção no hospedeiro. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina**. São Paulo, v. 47, p.111-115, 1992.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, Les Ulis, v. 35, p. 163-187, 2004.

PIRES. L. S. A.; DITTRICH, R. L.; SOUZA, A. C. S.; BERTO, M. A. F.; PATRICIO, L. F. L. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 272-277, 2011.

PLANELLAS, M.; BASSOLS, A.; SIRACUSA, C.; SACO, Y.; GIMÉNEZ, M.; PATO, R.; PASTOR, J. Evaluation of serum haptoglobin and c-reactive protein in dogs with mamary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 38, p. 348-352, 2009.

PRIEST, H.; McDONOUGH, S.; ERB, H.; DADDONA, J.; STOKOL, T. Transferrin receptor expression in canine lymphoma. v. 48, n. 2, p. 466-474 **Veterinary Pathology**, v. 48, n. 2, p. 466-474, 2010.

PRINSEN, B. H. C. M.; de SAIN-van der VELDEN, M. Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal disease. **Clinica Chimica Acta**. Amsterdam, v. 347, p. 1-14, 2004.

RAMOS, R. D. S.; MACHADO, L. H. A.; CONCEIÇÃO, L. C.; HECKLER, M. C. T. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma- relato de casos. **Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, v. 15. n. 3, p. 38- 39, 2008.

RASKIN, R.E. & KRENBIEL, J.D. Prevalence of leukaemia blood and bone marrow in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.194, n.10, p.1427-1429, 1989.

RODASKI, S. & DE NARDI, A. B. Classificação dos quimioterápicos. In:_____ **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 3 reimp. rev. São Paulo:MedVet, 2008, cap. 2, p.43-139.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 6 ed. São Paulo: Manole, 2003. 481p.

SANTANA, A. E.; SEKI, M. C.; GAMA, F. G. V.; SOBREIRA, M. F. R.; CANESIN, A. P. M. Citologia Aspirativa com Agulha Fina Aplicada ao Estudo das Neoplasias. In: DALECK, R. C.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em Cães e Gatos**. São Paulo:Roca, 2008, cap. 4, p. 76-91.

SAQUETTI, C. H. C.; FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, p. 794-799, 2008.

SAS version 9, Statistical Analysis System - Institute Inc Cary, NC, USA, 2002.

SEQUEIRA, J. L., FRANCO, M., BANDARRA, E. P.; ROCHA, N. S.; FIGUEIREDO, L. M. A. Características anatomoclínicas dos linfomas caninos na região de Botucatu, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.51, n.3, p. 245-250, 1999.

SÖZMEN, M.; TASCA, S.; CARLI, E.; DE LORENZI, D.; FURLANELLO, T.; CALDIN, M. Use of fine needle aspirates and flow cytometry for the diagnosis, classification, and immunophenotyping of canine lymphomas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p. 323-329, 2005.

STACY, N. I.; NABITY, M. B.; HACKENDAHL, N.; BUOTE, M.; WARD, J.; GINN, P. E.; VERNAU, W.; CLAPP, W. L.; HARVEY, J. W. B-cell lymphoma with Mott cell differentiation in two young adult dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, Baton Rouge, v. 38, p. 113-120, 2009.

SUTHERLAND, R.; DELIA, D.; SCHNEIDER, C.; NEWMAN, R.; KEMSHEAD, J.; GREAVES, M. Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 78, p. 4515–4519, 1981.

TECLES, F; SPIRANELLI, E; BONFANTI, U; CERÓN, J. J; PALTRINIERI, S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, n.19, p.865-870, 2005.

TIZARD, I. R. *Veterinary Immunology: A Introduction*. 8ª ed. Philadelphia: Elsevier, 2008, p. 147.

ULUTAS, P. A.; MUSAL, B.; KIRAL, F.; BILDIK, A. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. **Research in Veterinary Science**, London, v. 86, p. 373–376, 2009.

VAIL, D. M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. cap. 91, p. 620-625.

VAIL, D. M. & OGILVIE, G. K. Neoplasias Linfoides. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders – Clínica de Pequenos Animais**. Sao Paulo: Roca. cap. 6, p. 218-225, 1998.

VAIL, D. M. & YOUNG, K.M. Hematopoietic tumors. In: Withrow, Macewen's. **Small Animal Clinical Oncology**. Eds. S. J. Withrow & D. M. Vail. Saint Louis: Saunders Elsevier. cap. 31, p.699-722, 2007.

VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P. S; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according to the WHO. **Veterinary and Comparative Oncology**. v. 8, p. 38-49, 2009.

VIEIRA, M. C.; COLETA, F. E. D.; GODOY, A. V.; SOBREIRA, M. F. R.; GALVÃO, A. L. B.; BORIN, S.; CRIVELENTI, L. Z.; ANAI, L. A.; NOGUEIRA, A. F. S.; SANTANA, A. E. Acute phase proteins in canine lymphoma during antineoplastic chemotherapy. **Brazilian Journal of Veterinary Pathology**, Botucatu, v. 3, p. 86-92, 2010.

WU, J. M.; BOROWITZ, M. J.; WEIR, E. G. The usefulness of CD71 expression by flow cytometry for differentiating indolent from aggressive CD10+ B-cell lymphomas. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, 126:39–46, 2006.

YUKI, M.; ITOH, H.; TAKASE, K. Serum α 1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**. v. 39, p. 65-71, 2010.

APÉNDICE A

Tabela 1 - Características gerais de sexo, idade e peso dos cães do grupo controle (GC), da raça Beagle (FCAV/Unesp, Jaboticabal, 2013).

Animais	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)
C1	M	6,00	11,51
C2	M	6,00	12,73
C3	M	9,00	11,40
C4	M	3,00	10,50
C5	M	2,00	11,40
C6	F	9,00	13,30
C7	F	2,00	14,00
C8	F	8,00	15,00
C9	F	2,00	11,87
C10	M	2,00	11,70

APÊNDICE B

SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

GEL DE SEPARAÇÃO (50mL a 10%)

- 18,8 mL de água deionizada
- 9,3 mL de Tris HCl 2 M, pH $8 \pm 0,1$
- 16,7 mL de Acrilamida/Bis (30% T/2,67% C)
- 2,6 mL de glicerol
- 1 mL de EDTA 0,5 M, pH $8,3 \pm 0,1$
- 1 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 20%
- 380 μ L de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso (1 mL de H₂O deionizada + 0,1g de persulfato)
- 38 μ L de TEMED

GEL DE EMPILHAMENTO (10 mL a 4%)

- 6,3 mL de água deionizada
- 960 μ L de Tris HCl 0,617 M, pH $6,8 \pm 0,1$
- 1,4 mL de Acrilamida/Bis (30% T/2,67% C)
- 480 μ L de glicerol
- 197 μ L de EDTA 0,5 M, pH 8,3
- 197 μ L de SDS a 20%
- 96 μ L de persulfato de amônio a 10%
- 19 μ L de TEMED 51

TRIS HCl – 2M – Ph 8,9 (GEL DE CORRIDA)

Tris base (PM: 121,1).....60,55 g

Completar para 250 mL com água deionizada;

Acertar para pH 8,9:

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

TRIS HCl 0,1617M (GEL EMPILHADOR)

Tris base (PM: 121,1).....7,475 g

Completar para 100 mL com água deionizada;

Acertar para pH 6,8;
Filtrar a solução e guardar em geladeira.

ACRILAMIDA/BIS (30% T/ 2,67% C)

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08).....73,00 g
N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma.....2,00 g
Completar para 250 mL com água deionizada;
Aquecer se necessário.

EDTA 0,5M

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrasódico (PM: 380,20).....9,50 g
Completar para 50 mL com água deionizada;
Acertar para pH 8,3.

LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 20%

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4).....20,00 g
Completar para 100 mL com água deionizada.

COMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R-250)

Metanol.....500 mL
Ácido acético.....100 mL
Água bidestilada.....400 mL
Coomassie Blues (Brilliant blue R).....2 g
Deixar em repouso durante duas horas e filtrar.

GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)

Lauril sulfato de sódio 20%.....5,0 mL
EDTA 0,5 M.....4,0 mL
Tris-fosfato 0,617 M, pH 6,8.....5,0 mL
Mercaptoetanol.....2,5 mL
Glicerol.....10,0 mL
Água deionizada.....23,5 mL

Azul de bromofenol (Bromophenol Blue).....5,0 mg
 Separar em frações de 1 mL – manter no freezer até o momento do uso.

PERSULFATO DE AMÔNIA 10%

Persulfato de amônia.....0,1 g
 Água deionizada.....1,0 mL
 (Preparar no momento da confecção do gel)

DESCORANTE

Metanol.....250,00 mL
 Ácido acético.....100,00 mL

Completar para 1000 mL com água destilada;

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40° C.

TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10X)

Trizma base.....30 g
 Glicina.....144 g
 SDS.....10 g

Completar para 1000 mL com água destilada.

Obs: para uso na corrida usar o tampão de corrida diluído

TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (Tampão de uso na cuba)

Medir 100 mL do tampão de corrida concentrado (10X) e completar o volume para 1000 mL (1 litro).