

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PREVALÊNCIA DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS
CANINOS EM CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris*) E
INVESTIGAÇÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS
E DA OCORRÊNCIA DE ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS
EM LOBOS-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*) E
CACHORROS-DO-MATO (*Cerdocyon thous*)
CRIADOS NO BRASIL**

Adriana Alonso Novais

Pós-Graduanda

Prof. Dr. José Jurandir Fagliari

Orientador

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, para obtenção do Título de Doutor.

Jaboticabal – SP

Fevereiro – 2003

N935p Novais, Adriana Alonso
Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos em cães domésticos (*Canis familiaris*) e investigação dos parâmetros hematológicos e da ocorrência de antígenos eritrocitários em lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) criados no Brasil / Adriana Alonso Novais. -- Jaboticabal, 2003

xiii, 63 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2003

Orientador: José Jurandir Fagliari

Banca examinadora: Áureo Evangelista Santana, José Maurício Barbanti Duarte, Aguemi Kohayagawa, Luis Carlos de Mattos

Bibliografia

1. Hematologia. 2. Bioquímica clínica. 3. Grupos sanguíneos. 4. Cães. 5. Lobo-Guará. 6. Cachorro-do-Mato. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.15:636.7

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ADRIANA ALONSO NOVAIS – nascida em 28 de outubro de 1966, na cidade do Rio de Janeiro-RJ, é médica veterinária formada pela Universidade Federal Fluminense em 1989. Completou residência em Clínica Médica de Pequenos Animais na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Câmpus de Jaboticabal em 1994, e mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração Patologia Animal, na mesma instituição, em 1996.

À Amanda,

por seu sorriso maroto, sua alegria contagiante, seus argumentos perturbadores,
seu charme irresistível, e pela oportunidade de estar sempre aprendendo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. José Jurandir Fagliari**, por ter me acolhido como sua orientada e acreditado neste projeto, respeitando as minhas limitações e me socorrendo nos momentos de dificuldade.

Ao **Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana**, por estar sempre presente e me receber com tanta atenção e carinho.

A **Profa. Dra. Miriam Luz Giannoni**, por suas idéias inovadoras que iluminaram este projeto, e pela grande ajuda para sua elaboração.

Ao **Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte**, pelos questionamentos e sugestões que enriqueceram este trabalho.

Ao **Prof. Dr. Luis Carlos de Mattos**, pela atenção, paciência e disponibilidade dispensadas.

A **Profa. Dra. Aguemí Kohayakawa**, por sua boa vontade e críticas construtivas durante a elaboração e redação dessa tese.

A **Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado**, por suas sugestões e idéias.

A **Profa. Dra. Mirela Tinucci Costa**, pela correção e questionamentos importantes.

Ao **Prof. Dr. Aulus Cavalieri**, por sua atenção e ajuda ao ceder animais para esta pesquisa.

Ao pós-graduando **Rodrigo (Stanley)**, por sua boa vontade e auxílio durante a fase experimental do projeto.

A pós-graduanda **Fernanda**, pela colaboração na colheita de sangue de cães Pastores Alemães.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro concedido à este projeto.

A equipe dos **zoológicos de São José do Rio Preto, Sorocaba, Brasília, Belo Horizonte, São Carlos, Rio de Janeiro e ao criadouro conservacionista CBMM em Araxá**, por sua boa vontade e auxílio no envio de amostras de sangue para esta pesquisa.

Aos técnicos de laboratório **Eugênio de Campos Filho**, **Ligia Sanches Guadanhim** e **Cláudia Aparecida da Silva**, por sua disponibilidade e ajuda indispensáveis para a realização desta pesquisa.

A **Isabel**, **Shizuku** e **Nice**, por sua eficiência e simpatia.

A enfermeira **Eulália**, pela boa vontade e grande ajuda durante a colheita de sangue dos cães do canil.

Ao amigo **Suedney de Lima Silva**, por toda a sua disponibilidade e apoio.

A amiga **Débora Zuccari**, pela sua amizade e apoio em todos os momentos.

A amiga **Selma Vinhola**, por toda a alegre convivência e grande amizade.

Ao **curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/UNESP**, Câmpus de Jaboticabal, pela oportunidade concedida.

Ao meu amigo e companheiro **Marcos Vinicius Luz Giannoni**, pelo caminho percorrido juntos e todas as lições de vida.

Aos meus pais, **Antonio** e **Janine**, por sua dedicação incessante e apoio incondicional.

As minhas tias **Jane** e **Juracy**, pelo carinho e preces.

Aos meus irmãos **Cristina** e **André**, por uma vida compartilhada.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para este trabalho.

Muito Obrigado

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Biologia dos canídeos	3
2.2. O lobo-guará	3
2.3. O cachorro-do-mato	4
2.4. Evolução dos canídeos	5
2.5. Grupos sanguíneos dos cães domésticos	7
2.6. Valores sanguíneos de referência	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Animais	16
3.2. Colheita de amostras de sangue	16
3.3. Tipagem sanguínea	17
3.3.1. Tipagem anti-DEA 1	17
3.3.2. Tipagem anti-DEA 3,4,5 e 7	18
3.4. Análises laboratoriais	18
3.5. Produção dos anti-soros policlonais para tipagem sanguínea	19
3.5.1. Produção de anti-DEA 1.X	19
3.5.1.1. Etapas da sensibilização	19
3.5.1.2. Titulação e padronização do anti-soro	20
3.5.1.3. Colheita e armazenamento do anti-soro	20
3.5.2. Produção de anti-DEA 1.1	21
3.5.2.1. Etapas da sensibilização	21
3.6. Análise estatística	21

	Página
4. RESULTADOS	23
4.1. Tipagem sanguínea dos cães domésticos	23
4.1.1. Cães da raça Pastor Alemão	23
4.1.2. Cães sem raça definida (SRD)	24
4.2. Tipagem sanguínea dos cães silvestres	25
4.2.1. Lobos-guará	25
4.2.2. Cachorros-do-mato	26
4.3. Parâmetros hematológicos dos cães silvestres	27
4.4. Produção dos anti-soros policlonais para tipagem sanguínea	28
4.4.1. Produção de anti-DEA 1.X	28
4.4.2. Produção de anti-DEA 1.1	28
5. DISCUSSÃO	29
5.1. Prevalência dos grupos sanguíneos em cães domésticos	29
5.2. Tipagem sanguínea dos cães silvestres	31
5.3. Parâmetros hematológicos dos cães silvestres	34
5.3.1. Lobos-guará	34
5.3.2. Cachorros-do-mato	36
5.4. Produção dos anti-soros policlonais para tipagem sanguínea	37
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS	41
APÊNDICES	46
A - Valores individuais encontrados em lobos-guará (n = 29)	47
B - Valores individuais encontrados em cachorros-do-mato (n = 16) ..	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos	11
TABELA 2 - Valores hematológicos de referência para cães domésticos (<i>Canis familiaris</i>)	13
TABELA 3 - Valores hematológicos de referência para lobos-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>)	13
TABELA 4 - Valores hematológicos de referência para cachorros-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	14
TABELA 5 - Constituintes bioquímicos séricos de referência para cães domésticos (<i>Canis familiaris</i>)	14
TABELA 6 - Constituintes bioquímicos séricos de lobos-guará (<i>Chrysocyon brachiurus</i>)	15
TABELA 7 - Constituintes bioquímicos séricos de cachorros-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	15
TABELA 8 - Prevalência dos grupos sanguíneos na população de cães domésticos Pastores Alemães (n = 50)	23
TABELA 9 - Frequência de combinações entre os grupos sanguíneos na população de cães domésticos Pastores Alemães (n=50)	23
TABELA 10 - Prevalência dos grupos sanguíneos na população de cães domésticos SRD (n = 150)	24
TABELA 11 - Frequência de combinações entre os grupos sanguíneos em cães domésticos mestiços (n=150)	24
TABELA 12 - Prevalência dos grupos sanguíneos na população de lobos-guará (n = 32)	25
TABELA 13 - Frequência de combinações entre grupos sanguíneos em lobos-guará (n=32)	25
TABELA 14 - Prevalência dos grupos sanguíneos na população de cachorros-do-mato (n = 16)	26

TABELA 15 -	Freqüência de combinações entre grupos sanguíneos em cachorros-do-mato (n = 16)	26
TABELA 16 -	Média e desvio padrão dos constituintes do hemograma de 29 lobos-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) e 16 cachorros-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	27
TABELA 17 -	Média e desvio padrão das concentrações séricas de proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina, uréia, creatinina e bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), bem como das atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) de 29 lobos-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) e 16 cachorros-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	27
TABELA 18 -	Valores hematológicos individuais encontrados em lobos-guará (n=32)	47
TABELA 19 -	Valores individuais de bioquímica sérica encontrados em lobos-guará (n=32)	48
TABELA 20 -	Valores hematológicos individuais encontrados em cachorros-do-mato (n=16)	49
TABELA 21 -	Valores individuais de bioquímica sérica encontrados em cachorros-do-mato (n=16)	50

**PREVALÊNCIA DOS ANTÍGENOS ERITROCITÁRIOS CANINOS
EM CÃES DOMÉSTICOS (*Canis familiaris*) E INVESTIGAÇÃO DOS
PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DA OCORRÊNCIA DE ANTÍGENOS
ERITROCITÁRIOS EM LOBOS-GUARÁ (*Chrysocyon brachyurus*)
E CACHORROS-DO-MATO (*Cerdocyon thous*) CRIADOS NO BRASIL**

RESUMO - O propósito desse estudo foi verificar a prevalência dos antígenos eritrocitários caninos em cães domésticos criados no Brasil e compará-la com aquela descrita na literatura consultada, para cães oriundos de outros países. Além disso, verificar os valores sangüíneos normais e a ocorrência dos antígenos eritrocitários caninos em lobos-guará e cachorros-do-mato, na expectativa de adicionar novos dados sobre valores sangüíneos de referência e investigar as relações filogenéticas entre os caninos silvestres e domésticos. Para tanto, obteve-se amostras de sangue de 200 cães domésticos, sendo 150 cães mestiços e 50 Pastores Alemães, oriundos do município de Jaboticabal - São Paulo, 32 lobos-guará e 16 cachorros-do-mato, pertencentes aos zoológicos de São Carlos - SP, Rio de Janeiro - RJ, São José do Rio Preto - SP, Brasília - DF, Belo Horizonte - MG, Sorocaba - SP, e também do criadouro conservacionista da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), localizado em Araxá - MG. A prevalência dos grupos sangüíneos encontrada para os mestiços (SRD) foi: 85 (57%) positivos para o grupo DEA 1.1; 61 (41%) positivos para o grupo DEA 1.2; 19 (13%) positivos para o grupo DEA 3; 140 (93%) positivos para o grupo DEA 4; 11 (7%) positivos para o grupo DEA 5 e 17 (11%) positivos para o grupo DEA 7. As combinações de grupos sangüíneos mais observadas foram DEA 1.1,4 (35%) e DEA 1.2,4 (32,5%). A prevalência encontrada para os Pastores Alemães foi: 32 (64%) positivos para o grupo DEA 1.1; 18 (36%) positivos para o grupo DEA 1.2; 4 (8%) positivos para o grupo DEA 3; 50 (100%) positivos para o grupo DEA 4; 7 (14%) positivos para o grupo DEA 5 e 4 (8%) positivos para o grupo DEA 7 (Figura 1). As combinações de grupos sangüíneos mais observadas foram DEA 1.1,4 (50%) e DEA 1.2,4 (28%). A alta prevalência encontrada para o grupo DEA 1

em cães mestiços e Pastores Alemães representou um fator favorável por reduzir grandemente o risco de reação transfusional. Este risco calculado para reação transfusional inicial contra os grupos DEA 3, DEA 5 ou DEA 7 equivale a 7,6 % para mestiços e 6% para Pastores Alemães. Os antígenos eritrocitários caninos puderam ser observados nas duas espécies silvestres pesquisadas. A frequência dos grupos sanguíneos caninos, entretanto, variou entre as espécies. No que se refere ao grupo DEA 1, a grande maioria dos cães silvestres foi positiva para o subgrupo 1.2. O antígeno DEA 4 esteve presente em alta frequência nas duas espécies e houve baixa incidência dos outros antígenos eritrocitários caninos, assim como ocorre nos cães domésticos. A semelhança antigênica encontrada para os antígenos de grupo sanguíneo de cães domésticos, lobos-guará e cachorros-do-mato aproxima estas espécies, sugerindo que tenham evoluído a partir de um ancestral comum (teoria monofilética). Entretanto, serão necessários estudos moleculares dos antígenos eritrocitários para confirmar sua presença sobre a superfície das hemácias dos canídeos silvestres. Os parâmetros hematológicos encontrados para lobos-guará foram semelhantes àqueles descritos em cães domésticos. Entretanto, os parâmetros hematológicos de cachorros-do-mato foram inferiores àqueles descritos para as duas espécies acima, enquanto o volume corpuscular médio obtido em cachorros-do-mato apresentou-se superior ao VCM de lobos-guará e cães domésticos. A produção de anti-soros policlonais para tipagem sanguínea demonstrou ser uma técnica viável e de baixo custo, cuja utilização pode eliminar o risco de reação transfusional.

Palavras-chave: hematologia, bioquímica clínica, grupos sanguíneos, cães, cachorro-do-mato, lobo guará.

**DEA (dog erythrocyte antigen) PREVALENCE IN DOMESTIC
DOGS (*Canis familiaris*) AND INVESTIGATION ON BLOOD VALUES AND THE
OCURRENCE OF DOG ERYTHROCYTE ANTIGEN IN THE MANED WOLF
(*Chrysocyon brachyurus*) AND THE CRAB EATING DOG
(*Cerdocyon thous*) FROM BRAZIL**

ABSTRACT - The goal of this study was to verify the prevalence of dog erythrocyte antigen (DEA) in domestic dogs reared in Brazil, in order to compare with the described prevalence found in the literature for dogs reared in other countries. Also, to verify normal blood values and the occurrence of dog erythrocyte antigen in maned wolf and crab eating dog, to investigate phylogenetic relationship between wild and domestic dogs. For this purpose, we collected anticoagulated blood samples from 200 domestic dogs (150 mixed breed and 50 German Shepherd - GSH) from the city of Jaboticabal, in Sao Paulo state, and 32 maned wolves and 16 crab eating dogs, from zoos located in São Carlos-SP, Rio de Janeiro-RJ, São José do Rio Preto-SP, Brasília-DF, Belo Horizonte-MG, Sorocaba-SP and from a conservationist breeder called CBMM, located in Araxá/MG. The obtained prevalence of dog erythrocyte antigens in mongrels was the following: 57% positive for DEA 1.1, 41% positive for DEA 1.2, 13% positive for DEA 3, 93% positive for DEA 4, 7% positive for DEA 5 and 11% positive for DEA 7. The obtained blood group prevalence for GSH dogs was: 64% positive for DEA 1.1, 36% positive for DEA 1.2, 8% positive for DEA 3, 100% positive for DEA 4, 14% positive for DEA 5 and 8% positive for DEA 7. The most common combinations of blood groups encountered were DEA 1.1,4 (representing 50% in mongrels and 35% in GSH) and DEA 1.2,4 (representing 28% in mongrels and 32,5% in GSH). The high prevalence of DEA 1 blood group in mongrel and GSH dogs represents a favorable factor, once it reduces the risk for a transfusion reaction. The risk for a initial transfusion reaction against groups DEA 3, DEA 5 or DEA 7 is 7,6% for mongrel and 6% for GSH dogs. Dog erythrocyte antigens were observed in the two studied wild species, but there was a variation on prevalence

of blood groups: the majority of dogs was positive for DEA 1 (1.1, 1.2) and DEA 4, while few were positive for DEA 3, DEA 5 and DEA 7. Specifically for DEA 1 group, the incidence for DEA 1.2 was higher than the DEA 1.1, that is the most prevalent DEA 1 subgroup in the domestic dog. The antigenic similarity observed may approximate the maned wolf, crab eating dog and domestic dog, suggesting that they may have evolved from a common ancestor, like in the monophyletic theory. Nevertheless, molecular studies are necessary to confirm the antigen occurrence onto the red cell surface of wild dogs. Blood values obtained for the maned wolf were similar to the domestic dog's values. However, the obtained results for the crab eating dog were lower to those two species, while medium cellular volume was superior. The production of polyclonal antisera for blood typing purposes presented to be a cheap and valuable technic, the could avoid the risc of transfusion reaction.

Key words: hematology, clinical biochemistry, blood groups, maned wolf, crab eating dog, dogs.

1. INTRODUÇÃO

O estudo da imunoematologia canina iniciou-se em 1910 e obteve grandes avanços na década de 50, em virtude da necessidade da classe médica em compreender os mecanismos de identificação das células do próprio organismo e de rejeição das células estranhas, os quais conduziam ao sucesso ou fracasso das terapias transfusionais (HALE, 1995). Entretanto, quando os pesquisadores perceberam que o cão não poderia servir como um modelo experimental para o estudo dos grupos sanguíneos de humanos, as pesquisas arrefeceram, deixando muitos pontos obscuros a serem esclarecidos.

Desde então, as investigações sobre os grupos sanguíneos dos cães tornaram-se esporádicas até que, na década de 80, com os avanços da medicina veterinária, as pesquisas foram retomadas (BULL, 1992). Isso ocorreu em virtude da necessidade de maior compreensão do assunto, uma vez que os pacientes caninos passaram a ser submetidos rotineiramente às transfusões de sangue. Não obstante, apesar dos esforços empreendidos até o momento para se investigar os grupos sanguíneos dos cães, admite-se que ainda existem várias perguntas a serem esclarecidas.

No Brasil, o conhecimento sobre grupos sanguíneos dos cães é muito escasso. Isto ocorre devido à dificuldade de obtenção de reagentes importados para tipagem sanguínea, o que encarece e inviabiliza o método para a grande maioria dos hospitais veterinários. Não obstante, apesar de todas as dificuldades, o estudo da prevalência do grupo sanguíneo DEA 1 em cães atendidos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, deu início às investigações sobre imunoematologia canina no Brasil (NOVAIS, 1996).

Paralelamente, a disciplina de medicina dos animais silvestres tem se expandido devido à conscientização social sobre essas populações de animais e à conseqüente necessidade de cuidar da sua sanidade. Além disso, pelo fato das populações silvestres serem reservatórios de várias doenças, a ruptura do equilíbrio do ecossistema como conseqüência da redução dessas populações representa um risco de migração dos vetores para centros urbanos e o aparecimento de novos reservatórios, como os animais domésticos.

Os fatores limitantes para o desenvolvimento da medicina de animais silvestres são dependentes da obtenção de informações básicas sobre essas espécies, as quais são fundamentais para a compreensão das respostas hematológicas aos vários estímulos ambientais sofridos por elas.

Destaca-se ainda a questão da filogenia dos canídeos, a qual ainda é um assunto controvertido e, indubitavelmente, de solução complexa.

Sendo assim, este estudo objetivou: ampliar conhecimentos sobre grupos sanguíneos de cães domésticos criados no Brasil; difundir o conhecimento e a prática da tipagem sanguínea em cães, garantindo a segurança e a eficácia das transfusões de sangue nesta espécie; verificar a prevalência dos grupos sanguíneos padronizados internacionalmente na população de caninos domésticos criados no Brasil e compará-las com aquelas descritas para cães de outros países; investigar se os antígenos eritrocitários caninos DEA 1 (1.1, 1.2 e 1.3), DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7 estão presentes nas hemácias de canídeos silvestres, por pertencerem à mesma subfamília *Caninae* e possuírem ancestrais em comum; investigar sobre os parâmetros hematológicos fisiológicos dos lobos-guará e cachorros-do-mato do Brasil; realizar a produção de anti-soros nacionais e padronizá-los, objetivando viabilizar a prática de tipagem sanguínea de cães em nosso país; incentivar novos estudos sobre a fauna brasileira silvestre, uma vez que existe grande escassez de pesquisas neste campo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biologia dos Canídeos

A ordem *Carnivora* possui 7 famílias, dentre elas a família *Canidae*. A família *Canidae* está subdividida em 3 subfamílias, com base em sua dentição: **Caninae**, com os gêneros *Canis*, *Alopex*, *Vulpes*, *Fennecus*, *Urocyon*, *Nyctereutes*, *Dusicyon*, *Cerdocyon*, *Atelocynus* e *Chrysocyon*; **Simocyoninae**, com os gêneros *Speothos*, *Cuon* e *Lycaon*; e **Otocyoninae**, com o gênero *Otocyon* (NOWAK, 1991).

A fórmula dentária básica para os canídeos é I3/3, C1/1, PM4/4, M3/3, atingindo um total de 42 dentes. Possuem quatro ou cinco dígitos em cada membro, sendo que o primeiro dígito pode estar reduzido ou ausente. Além disso, os canídeos são digitígrados, ou seja, andam sobre os seus dedos (NOWAK, 1991).

Segundo o mesmo autor, a classificação dos canídeos silvestres e domésticos incluídos na presente pesquisa é a seguinte:

- **Cão doméstico**

Gênero: *Canis*

Espécie: *Canis familiaris*

- **Lobo-Guará**

Gênero: *Chrysocyon*

Espécie: *Chrysocyon brachyurus*

- **Cachorro-do-Mato**

Gênero: *Cerdocyon*

Espécie: *Cerdocyon thous*

2.2. O Lobo-Guará

O lobo-guará é o maior canídeo da América do Sul, chegando a medir 120 cm de altura e 140 cm de comprimento (NOWAK, 1991). Tem um porte esguio, destacado pelas pernas compridas. Os pêlos são espessos com tonalidades castanhas e brilhantes, quase

avermelhadas. É um animal de hábitos noturnos, muito tímido e solitário, mas não é feroz e só ataca quando acuado e com medo (CARVALHO, 1976).

No Brasil, esta espécie vive nos cerrados abertos onde caminha livremente e se alimenta de pequenos animais e de frutas silvestres como a lobeira (NOWAK, 1991). Há alguns anos, o lobo-guará podia ser encontrado do Piauí ao Rio Grande do Sul e Mato Grosso, além do Paraguai, Argentina e Bolívia (CARVALHO, 1976). Infelizmente, a espécie encontra-se em franca extinção, como decorrência da caça predatória e devastação dos cerrados (CAVINATO, 1999). O lobo-guará está classificado como espécie ameaçada de extinção pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e como espécie vulnerável pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (PESSUTTI et al., 2001). Felizmente, vários zoológicos têm obtido sucesso na manutenção e reprodução de seus exemplares em cativeiro (BRADY & DITTON, 1979).

2.3. O Cachorro-do-Mato

É um animal pequeno que geralmente pesa de 5 a 8 kg e mede cerca de 65 cm de comprimento. Sua cor é pardo cinzenta ou cinzenta amarelada com o dorso, focinho, pescoço e cauda predominantemente negros. São animais de hábito noturno, abrigando-se em tocas, fendas, ocos de árvores. São solitários, formando pares apenas na época da reprodução. Ocupam em média uma área de 60 hectares, vivendo em florestas, campos e matas de galeria que ocorrem em países como Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, leste do Peru, Bolívia, Paraguai, norte da Argentina e Brasil, com exceção da planície amazônica. Quanto à alimentação são animais onívoros, alimentando-se principalmente de insetos (cupim), caranguejos, pequenos mamíferos, aves e outros animais pequenos, além de ovos de aves e tartarugas, carniça e frutas. O manejo em cativeiro é obtido com sucesso e as fêmeas chegam a ter duas ninhadas de três a seis filhotes por ano, com intervalo de oito meses. A maturidade sexual ocorre aos nove meses, o período de gestação varia de cinquenta e dois a cinquenta e nove dias e a expectativa média de vida é acima de dez anos (RODRIGUES & AURICCHIO, 1994).

2.4. Evolução dos Canídeos

A evolução cria dois padrões através do tempo e espaço – evolução filética ou anagênese e a ramificação filogenética ou cladogênese. Enquanto na anagênese ocorrem modificações sucessivas dentro de uma única linhagem, na cladogênese ocorrem divisões em uma linhagem ancestral, as quais geram o aparecimento de um grupo de espécies, ou clade. O processo crítico na formação de duas espécies a partir de uma espécie ancestral é a diferenciação dos grupos de genes dos descendentes, em virtude da alteração das frequências gênica e alélica, como resultado da ação de agentes evolucionários. Este processo de interrupção do fluxo gênico entre populações, que caracteriza o fenômeno de especiação, pode ocorrer devido à barreiras físicas, barreiras reprodutivas ou poliploidia (STRICKBERGER, 1996).

Os primeiros canídeos existentes pertenceram ao gênero *Hesperocyon* e viveram a partir do período oligoceno, na América do Norte (MARTIN, 1990). Representantes da família *Caninae* provavelmente chegaram à América do Sul no final do período Plioceno ou início do pleistoceno, na era terciária, quando ocorreu a ligação entre os continentes sul e norte americanos através do istmo do Panamá. Durante algum tempo a evolução destes animais produziu formas semelhantes em ambos os continentes. Em seguida, eles passaram a acumular diferenças genéticas entre si, e a seleção, sob a forma de radiação adaptativa, levou as populações a divergirem gradativamente umas das outras, em decorrência das diferenças ambientais e dos hábitos de vida de cada animal (GIANNONI, 1979; EISENBERG & REDFORD, 1999).

A despeito dos numerosos estudos sobre sistemática, as relações entre muitas espécies de canídeos permanece não resolvida (CHIARELLI, 1975; WAYNE et al., 1997). A determinação de árvores filogenéticas torna-se difícil uma vez que os ancestrais comuns a diferentes espécies geralmente estão extintos há muito tempo, e os achados fósseis são incompletos. Sendo assim, ocorre grande ênfase sobre a construção de filogenias por meio de comparações entre espécies conhecidas, sejam elas extintas ou existentes. Quanto maior o número de atributos hereditários em comum, maior a probabilidade das espécies descenderem de um ancestral comum (STRICKBERGER, 1996).

O termo homologia é usado para descrever a ocorrência de uma mesma característica em espécies diferentes, em virtude dela derivar diretamente de um ancestral comum. A homologia é a base para o estabelecimento de linhagens filogenéticas, pois compartilhar um fenótipo, devido a um ancestral comum, significa uma relação mais estreita entre organismos do que qualquer outra causa de semelhança fenotípica (STRICKBERGER, 1996).

O lobo-guará, o cachorro-do-mato e o cão doméstico possuem número diplóide de cromossomas igual a 76, 74 e 78, respectivamente. Porém, enquanto os autossomas do lobo-guará e cão doméstico são totalmente acrocêntricos, o cachorro-do-mato possui 34 autossomas metacêntricos e 38 acrocêntricos (WAYNE et al., 1987).

A morfologia dos canídeos sul americanos foi estudada por diversos autores (LANGGUTH, 1975; CLUTTON-BROCK et al., 1976; BERTA, 1988), que apresentaram resultados conflitantes. LANGGUTH (1975) defende a idéia de que o lobo-guará e o cachorro-do-mato só evoluíram para suas formas atuais após sua entrada na América do Sul, uma vez que não foram encontrados restos fósseis desses gêneros fora do Brasil. Contudo, segundo BERTA (1988) e WAYNE (1997), foram encontrados fósseis de lobos-guará e cachorros-do-mato na América do Norte, datados de 3 a 6 milhões de anos. De acordo com BERTA (1988), os achados fósseis indicam que os lobos-guará só apareceram na América do Sul a cerca de meio milhão de anos.

O estudo sobre padrão de banda G cromossomial em sete espécies de canídeos, realizado por WAYNE et al. (1987), assume que um cariótipo canino semelhante ao do lobo cinza e com alto número diplóide seria primitivo para o lobo-guará, o cachorro-do-mato e o cão doméstico. WAYNE & O'BRIEN (1987) examinaram os produtos protéicos oriundos de 51 locus gênicos de 17 espécies de canídeos e concluíram que lobo-guará parece representar uma espécie terminal de uma linhagem de 6 milhões de anos. Isto é, sua linhagem e das raposas sul americanas divergiram da dos lobos canídeos, dentre eles o cão doméstico, a aproximadamente sete milhões de anos, muito provavelmente na América do Norte. Pouco tempo depois, a linhagem do lobo-guará divergiu das raposas e se distinguiu geneticamente muito antes da entrada dos canídeos na América do Sul, a cerca de três milhões de anos. Por outro lado, as raposas sul americanas, dentre elas o

cachorro-do-mato, evoluíram para suas formas atuais somente após a união entre os dois continentes.

Os estudos cariotípicos parecem sugerir uma íntima associação entre o cachorro-do-mato e as raposas sul americanas (do grupo *Dusicyon*), e entre o cão doméstico e o lobo cinza (*Canis lupus*), embora a situação do lobo-guará ainda não esteja resolvida (WAYNE, 1990).

Um estudo morfológico apresentado por TEDFORD et al. (1995) indica que o lobo-guará, o cachorro-do-mato e o cão doméstico derivam de um ancestral semelhante ao lobo, e apresenta uma árvore filogenética em concordância com os estudos cariotípicos e biomoleculares. Ou seja, que essas três espécies constituem um grupo monofilético e possuem o mesmo padrão de ramificação evolutiva.

WAYNE et al. (1997) analisaram o DNA mitocondrial de 23 espécies de canídeos e postularam a ocorrência de três invasões da América do Sul, representando o lobo-guará uma dessas linhagens, enquanto as raposas sul americanas representam uma outra invasão, embora o cachorro-do-mato possa ter divergido evolutivamente desse grupo antes dela ter ocorrido.

2.5. Grupos Sangüíneos dos Cães Domésticos

Os antígenos de grupos sangüíneos são marcadores de superfície celular, caracteristicamente herdados e localizados na superfície dos eritrócitos. Sua detecção e descrição baseiam-se em sorologia por meio de anticorpos policlonais ou monoclonais. Os antígenos podem variar em imunogenicidade e significado clínico. Em medicina veterinária, este significado está ligado à ocorrência de reações transfusionais, isoeritrolise neonatal e disputa de paternidade. Além disso, embora ainda não comprovado, os antígenos de grupos sangüíneos podem exercer algum papel na anemia hemolítica imuno-mediada e servirem como marcadores de doenças (ANDREWS, 2000).

Os tipos sangüíneos dos cães domésticos consistem, atualmente, de cinco grupos compostos por sete determinantes antigênicos. São eles: DEA 1 (subgrupos 1.1, 1.2, 1.3), DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7 (HALE, 1995; SYMONS & BELL, 1991). Contudo, outros

sistemas antigênicos já foram descritos, mas ainda não estão padronizados internacionalmente (SYMONS & BELL, 1992; ANDREWS et al., 1993).

O sistema do grupo DEA 1 é composto por três fatores (1.1, 1.2, 1.3) e quatro fenótipos (1.1, 1.2, 1.3, negativo). Os estudos sugerem um padrão de herança dominante autossômica, sendo a ordem de dominância de DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 1.3 até DEA 1 negativo. Cada indivíduo exibe somente um dos fenótipos para o grupo DEA 1. Como característica, o anti-soro isoimune produzido contra um dos antígenos pode exibir graus de reatividade cruzada com os outros antígenos desse grupo (WARDROP, 2000). O anti-soro anti-DEA 1.X (anti-DEA 1.1, 1.2, 1.3) é produzido por meio da imunização de um cão DEA 1 negativo com hemácias de outro indivíduo DEA 1.1 positivo sendo, portanto, uma mistura de anti-DEA 1.1, 1.2 e 1.3. O anti-soro anti-DEA 1.1 é produzido imunizando-se um cão DEA 1.2 positivo com hemácias de outro animal DEA 1.1 positivo. Sendo assim, este anti-soro só reage com hemácias DEA 1.1. As tentativas em produzir anti-soro específico anti-DEA 1.2 e anti-DEA 1.3 não foram bem sucedidas (HALE, 1995).

O sistema DEA 1 é o mais importante no que diz respeito às transfusões de sangue. Os anticorpos naturais não foram documentados, de forma que não ocorrem reações nas primeiras transfusões. Entretanto, uma vez sensibilizados em transfusões prévias, os pacientes podem desenvolver reações transfusionais hemolíticas graves após uma transfusão incompatível subsequente (HALE, 1995).

Excetuando os antígenos do sistema DEA 1, os quais não podem ocorrer simultaneamente na mesma célula por serem alelos do mesmo locus, um cão pode apresentar qualquer combinação dos antígenos eritrocitários reconhecidos sobre a superfície do eritrócito (BULL, 1992).

Os grupos sanguíneos também têm sido estudados por pesquisadores do Japão, os quais desenvolveram 16 anti-soros denominados anti-D1, anti-D2, anti-A, anti-B, anti-C, anti-E, anti-F, anti-G, anti-H, anti-I, anti-L, anti-M, anti-2a, anti-43, anti-44 e anti-180a. Os dois primeiros anti-soros foram obtidos a partir de coelhos imunizados com hemácias caninas. Anti-A, anti-E, anti-F, anti-G, anti-L, anti-M e anti-2a foram produzidos em cães por meio de iso-imunização. Anti-B, anti-H, anti-I, anti-44, anti-43 e anti-180a são anticorpos naturais e anti-C é uma lecitina extraída da semente de *Clerodendron trichotomum*. Entretanto, a comparação entre os anti-soros japoneses e americanos

apenas conseguiu detectar especificidade semelhante entre anti-D1 e anti-E com anti-DEA 3, anti-A com anti-DEA 5 e anti-180a com anti-DEA 8. Nenhum anti-soro possuiu a mesma especificidade de anti-DEA 1.1,2, anti-1.1, anti-4 ou anti-7, sendo que os anti-soros japoneses restantes não se identificaram com nenhum dos reagentes americanos (EJIMA e KUOKAWA, 1980). Estes reagentes não são reconhecidos internacionalmente e não estão disponíveis comercialmente.

De acordo com estudos relacionados à membrana dos eritrócitos, os antígenos de grupos sanguíneos são compostos por carboidratos complexos associados a lipídios ou proteínas inseridos na membrana eritrocitária, sendo denominados de glicolipídios ou glicoproteínas. Antígenos semelhantes ocorrem sob a forma solúvel em vários líquidos e secreções tissulares (MOORE, 1976). Entretanto, a especificidade sorológica nos dois casos é determinada pela estrutura do carboidrato (JAIN, 1986).

ANDREWS et al. (1992) relataram que o antígeno eritrocitário DEA 1.1 reside em duas proteínas de membrana com peso molecular de 50 e 200 KDa, respectivamente. Os mesmos autores desenvolveram um teste de aglutinação em cartão utilizando anticorpos monoclonais IgM anti-DEA 1.1. Experimentos utilizando eletroforese em gel de poliacrilamina e anticorpo monoclonal anti-DEA 3 identificaram cinco bandas com peso molecular de 34, 53, 59, 64 e 71 KDa (HARA et al., 1991).

Um estudo recente sobre a caracterização bioquímica dos antígenos DEA 1.2, DEA 4 e DEA 7 descreveu pesos moleculares de 85, 32 a 40 e 53 a 66 KDa para esses antígenos, respectivamente (CORATO et al., 1997).

A expressão de um antígeno de grupo sanguíneo sobre a membrana eritrocitária é geneticamente controlada por um único locus gênico e não há evidência da ocorrência de interações gênicas. Além disso, por definição geral, os sistemas de grupos sanguíneos são geneticamente polimórficos, podendo este polimorfismo genético pode ser simples ou complexo. A organização genética mais simples de um antígeno de grupo sanguíneo seria aquela em que só há um gene controlando a expressão de um antígeno, de forma que a presença do gene no locus resulta na expressão do antígeno. A ausência do gene significa a ausência do antígeno de grupo sanguíneo sobre o eritrócito. Este é o caso dos grupos sanguíneos caninos DEA 3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7. Os grupos sanguíneos complexos são aqueles que possuem expressão alélica do gene no locus, os quais são

chamados sistemas de grupos sangüíneos, pois todos os animais da espécie possuem algum alelo ou forma do antígeno expressa em suas hemácias, ao invés da simples presença ou ausência do antígeno de grupo sangüíneo. O polimorfismo, neste caso, significa a variação da expressão dos alelos. O grupo DEA 1 enquadra-se neste último grupo (BULL, 1992).

A prevalência do grupo sangüíneo DEA 1 é bastante alta, tanto em cães de raça como em mestiços. Estudando cães mestiços, SWISHER & YOUNG (1961) descreveram uma freqüência mínima de 60% para o grupo DEA 1, sendo 40% para o sub-grupo 1.1 e 20% para o subgrupo 1.2. Também relataram uma freqüência de 6% para o grupo DEA 3, 98% para o grupo DEA 4, 22% para o grupo DEA 5 e 45% para o grupo DEA 7. SUZUKI et al. (1975) estudaram a prevalência dos grupos sangüíneos em 217 cães mestiços e constataram que 36% eram positivos para o grupo DEA 1.1, 51% para o grupo DEA 1.2 e 10% para o grupo DEA 3. Em 1976, VRIESENDORP et al. relatou o resultado da tipagem sangüínea em 31 cães mestiços, revelando que 37% eram positivos para o grupo DEA 1.1, 4% positivos para o grupo DEA 1.2, 5% para o grupo DEA 3, 56% para o grupo DEA 4, 8% para o grupo DEA 5 e 31% para o grupo DEA 7.

Em 1986, EJIMA et al. estudaram a freqüência dos grupos sangüíneos em cães criados no Japão mestiços e da raça Beagle, encontrando uma positividade de 44% para o grupo DEA 1.1, 22% para o grupo DEA 1.2 e 24% para o grupo DEA 3. Este autor descreveu uma prevalência superior para o grupo DEA 1 em cães mestiços. GIGER et al. (1995) analisaram 224 cães e constataram uma freqüência de 33% para o grupo DEA 1.1, 7% para o grupo DEA 1.2, 97% para o grupo DEA 4 e 8% para o grupo DEA 7. A tipagem sangüínea de 150 cães mestiços, atendidos no Hospital Veterinário da FCAV/UNESP – Campus de Jaboticabal, demonstrou uma prevalência de 91,3% para o grupo DEA 1, compreendendo 51,3% de cães do tipo DEA 1.1, 40% de cães do tipo DEA 1.2, e os 8,7% restantes sendo negativos para o referido grupo (NOVAIS, 1996). A tabela 1 apresenta a prevalência dos antígenos eritrocitários caninos relatada por diferentes autores na bibliografia consultada.

Tabela 1. Prevalência dos antígenos eritrocitários caninos.

Autor	Nº de Cães	Grupo Sangüíneo DEA (%)					
		1.1	1.2	3	4	5	7
SWISHER & YOUNG (1961)	332	40	20	6	98	22	45
SUZUKI et al. (1975)	217	36	51	10	nd	nd	nd
VRIESENDORP (1976)	31	37	4	5	56	8	31
EJIMA et al. (1986)	545	44	22	24	nd	nd	nd
GIGER et al. (1995)	224	33	7	Nd	97	nd	8
NOVAIS (1996)	150	51	40	Nd	nd	nd	nd

nd = não descrito

O grupo DEA 3 tem sido pouco considerado devido à sua baixa incidência na população canina dos Estados Unidos (6%). Contudo, os cães da raça Greyhound apresentaram uma prevalência de 23% (HALE, 1995).

Os anticorpos de ocorrência natural são encontrados em 20% dos cães DEA 3 negativos, e os estudos indicam que podem provocar reações transfusionais tardias, caracterizadas pelo seqüestro e destruição das hemácias no baço em um período de 72 horas. Sendo assim, os cães DEA 3 positivos não devem ser usados como doadores de sangue, exceto para cães do tipo DEA 3 (HALE, 1995).

O grupo DEA 4 é de alta prevalência na população canina, atingindo índices de 98%. Os cães negativos para todos os outros grupos e positivos somente para o DEA 4 são considerados “doadores universais”, uma vez que os anticorpos naturais anti-DEA 4 não ocorrem e, além disso, os cães DEA 4 negativos sensibilizados não apresentam hemólise intra ou extravascular, após terem sido transfundidos com sangue DEA 4 positivo. Sendo assim, os cães que só apresentam reações positivas para o grupo DEA 4 são os melhores doadores de sangue (HALE, 1995).

O grupo DEA 5 é de prevalência baixa e os anticorpos naturais são encontrados em cerca de 10% dos cães DEA 5 negativos. Este anticorpo é capaz de causar uma reação transfusional tardia, semelhante àquela desencadeada pelo anticorpo anti-DEA 3. Conseqüentemente, os cães DEA 5 positivos não são bons doadores (HALE, 1995).

O fator DEA 7 não é um antígeno integral de membrana eritrocitária. Acredita-se que seja secretado no plasma e adsorvido sobre a superfície das hemácias (BULL, 1992). Os estudos sobre a ocorrência de anticorpos naturais contra este antígeno sugerem que o anticorpo anti DEA 7 tenha uma prevalência próxima à 50% nos cães DEA 7 negativos.

Contudo, este anticorpo de ocorrência natural é fraco, raramente atingindo um título maior do que 1:8. Mesmo assim, é capaz de provocar uma reação transfusional tardia numa primeira transfusão, como ocorre com o anti-DEA 3 e anti-DEA 5. Devido ao exposto, os cães DEA 7 positivos não são recomendados como doadores (HALE, 1995).

Os grupos DEA 6 e DEA 8, anteriormente descritos e reconhecidos no *Segundo Encontro Internacional sobre Imunogenética Canina*, não têm sido estudados devido à inexistência de anti-soros para estes antígenos (VRIESENDORP et al., 1976). As últimas tentativas de iso-imunização em cães não obtiveram sucesso na produção dos anticorpos policlonais anti-DEA 6 e anti-DEA 8 (HALE, 1995).

Outros antígenos eritrocitários também foram descritos mas, devido à inexistência de anti-soros específicos contra esses antígenos, os estudos comparativos tornam-se inviáveis (HALE, 1995).

2.6. Valores Sangüíneos de Referência

Raros são os trabalhos que abordam parâmetros hematológicos e bioquímicos dos canídeos silvestres. Em 1953, HOEHNE & ROSENFELD realizaram um estudo hematológico em quatro exemplares de cachorro-do-mato. BUSCH (1980) relatou valores hematológicos e bioquímicos de lobos-guará pertencentes ao Parque Zoológico Nacional de Washington, nos Estados Unidos. WALLACE & BOEVER (1983) apresentaram valores hematológicos de diferentes canídeos silvestres, estabelecidos por diferentes autores. CAVALIERO et al. (1989) determinaram os parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de seis lobos-guará, em condições de cativeiro, pertencentes ao Jardim Zoológico Silvio Hollembach, em Belo Horizonte, MG. SANTOS (1999) publicou parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de cachorros-do-mato oriundos de Foz do Iguaçu, PR. Os valores hematológicos e bioquímicos encontrados pelos autores supra citados encontram-se descritos nas tabelas 3, 4, 6 e 7. Paralelamente, os parâmetros hematológicos de cães domésticos têm sido amplamente estudados e já estão bem definidos (JAIN, 1986), estando descritos nas Tabelas 2 e 5.

Tabela 2. Valores hematológicos de referência para cães domésticos (*Canis familiaris*).

Parâmetros	Hem (x 10 ⁶ /mL)	VG (%)	Hb (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHC M (%)	(x 10 ³ /mL)						
							Leuc	N. Segm	N. Bast	Linf	Eos	Mon	Bas
JAIN (1986)	5,5-8,5	37-55	12-18	60-77	19- 23	31-34	6,0- 18,0	3,6-13,8	0-0,5	0,7-5,4	0,1-1,8	0,1- 1,8	0-0,1

Hem = hemácias; VG = volume globular; Hb = hemoglobina; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média;

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; Leuc. = leucócitos; N.Segm = neutrófilos segmentados; N.Bast = neutrófilos bastonetes; Linf = linfócitos; Eos = eosinófilos; Mon = monócitos; Bas = basófilos

Tabela 3. Valores hematológicos de referência para lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Parâmetros Autores	Hem (x 10 ⁶ /mL)	VG (%)	Hb (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHC M (%)	(x 10 ³ /mL)						
							Leuc	N. Segm	N. Bast	Linf	Eos	Mon	Bas
BUSCH (1980)	5,4	46	15,2	84,7	28,4	33,3	13,2	9,4	nd	2,8	0,6	0,3	nd
WALLACE & BOEVER (1983)	3,0-5,0	35-40	11,5	nd	nd	nd	10,0- 14,0	5,0-9,8	nd	2,5-5,6	nd	0-1,4	nd
CAVALIERO (1989)	5,9-7,1	43- 50	13,5- 15,0	67,9- 76,4	20,0- 23,3	27,5- 31,5	9,8- 14,4	6,1- 10,6	0,1- 0,6	1,9- 3,5	0,2- 1,2	0,1- 0,5	0- 0,2
SMITH (1990)	4,1-6,3	34-50	11,5- 17,3	nd	nd	nd	7,3- 16,3	4,4- 11,6	nd	1,1- 3,5	0,2- 1,2	0,07- 0,7	0- 0,2

Hem = hemácias; VG = volume globular; Hb = hemoglobina; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média;

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; N.Segm = neutrófilos segmentados; N.Bast = neutrófilos bastonetes; Linf = linfócitos; Eos = eosinófilos; Mon = monócitos; Bas = basófilos; nd = não descrito

Tabela 4. Valores hematológicos de referência para cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Parâmetros Autores	Hem (x 10 ⁶ /mL)	Ht (%)	Hb (g%)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHC M (%)	Leuc	N. Segm	N. Bast	Linf Eos Mon Bas			
										(x 10 ³ /mL)			
HOEHNE & ROSENFEL D (1953)	5,1	49,7	12,7	98,7	24,7	nd	7,2	3,8	0,4	1,7	0,6	0,4	0,05
WALLACE & BOEVER (1983)	4,2-8,0	33,5- 38,0	11, 2	nd	nd	nd	6,8- 10,5	2,9- 6,4	nd	1,4- 2,9	0- 0,02	0- 0,3	0- 0,01
SANTOS (1999)	5,5	44	14, 8	82,0	27,4	34,9	11,0	8,5	0,1	1,7	0,8	0,2	nd

Hem = hemácias; VG = volume globular; Hb = hemoglobina; VCM = volume corpuscular médio; HCM = hemoglobina corpuscular média;

CHCM = concentração de hemoglobina corpuscular média; N.Segm = neutrófilos segmentados; N.Bast = neutrófilos bastonetes;

Linf = linfócitos; Eos = eosinófilos; Mon = monócitos; Bas = basófilos; nd = não descrito

Tabela 5. Constituintes bioquímicos séricos de referência para cães domésticos (*Canis familiaris*).

Parâmetros Autor	PT (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)	ALP (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	BT (mg/dL)	BD (mg/dL)	BI (mg/dL)
JAIN (1986)	5,8-7,9	2,6-4,0	10-40	10-40	10-50	15-65	0,5-1,5	0,1-0,5	0,06- 0,12	0,04-0,38

PT = proteínas totais; ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; BT = bilirrubina total;

Tabela 6. Constituintes bioquímicos séricos de lobos-guará (*Chrysocyon brachiurus*).

Parâmetros Autores	PT (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)	ALP (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	BT (mg/dL)
BUSCH (1980)	7,6	nd	64	35	52	23	1,1	0,2
CAVALIERO (1989)	5,8- 7,9	2,8-3,8	nd	nd	9,3 -26,8	nd	nd	nd

PT = proteínas totais; ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; BT = bilirrubina total;
 nd = não descrito

Tabela 7. Constituintes bioquímicos séricos de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Parâmetros Autor	PT (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/mL)	AST (U/mL)	ALP (U/L)	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	BT (mg/dL)
SANTOS (1999)	6,28	3,21	32,54	36,66	nd	46,97	0,74	nd

PT = proteínas totais; ALT = alanina aminotransferase; AST = aspartato aminotransferase; ALP = fosfatase alcalina; BT = bilirrubina total;
 nd = não descrito

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram colhidas amostras de sangue de 200 cães domésticos adultos, machos e fêmeas, oriundos dos seguintes locais: Canil Municipal de Jaboticabal, Canil Experimental do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAV/UNESP – Câmpus de Jaboticabal) e animais atendidos na rotina do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”. Os animais foram divididos em 2 grupos: **Grupo 1** - Pastor Alemão (n=50) e **Grupo 2** - cães mestiços (SRD) (n=150).

No que diz respeito aos canídeos silvestres, obteve-se amostras de sangue de 32 lobos-guará e 16 cachorros-do-mato, machos e fêmeas adultos, pertencentes aos zoológicos de São Carlos-SP (n=3), Rio de Janeiro-RJ (n=5), São José do Rio Preto-SP (n=2), Brasília-DF (n=5), Belo Horizonte-MG (n=9), Sorocaba-SP (n=7), do criadouro conservacionista da Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM), localizado em Araxá-MG (n=13) e do setor de animais silvestres da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal (n=1).

3.2. Colheita de sangue

As amostras de 5 mL de sangue obtidas dos caninos domésticos foram colhidas e preservadas em solução anticoagulante-preservante contendo citrato de sódio, fosfato, dextrose e adenina (CPDA-1), na proporção de 1 parte de solução para 7 partes de sangue.

A colheita do sangue dos canídeos silvestres foi realizada pelo veterinário responsável de cada zoológico, após contenção física dos animais, procedendo-se a punção da veia cefálica e a retirada de 5 mL de sangue, utilizando-se seringas e agulhas descartáveis. Logo após o procedimento, confeccionou-se um esfregaço sangüíneo em lâmina de vidro e este foi fixado em álcool absoluto (metílico). Em seguida, 1 mL do sangue foi colocado em frasco contendo solução anticoagulante-preservante CPDA-1, destinado às contagens globais do hemograma e à tipagem sangüínea. Os 4 mL restantes foram acondicionados em frascos sem anticoagulante e mantidos em posição inclinada à temperatura ambiente, durante 2 horas, visando a separação do soro sangüíneo, o qual foi enviado para as análises bioquímicas. As amostras foram mantidas em refrigeração durante

o transporte por correio aéreo, até chegarem ao Laboratório de Patologia Clínica da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

3.3. Tipagem Sangüínea

As amostras de sangue fresco para tipagem sangüínea foram submetidas a três lavagens consecutivas com 1,5 volume de solução tampão fosfato (PBS), seguidas pela centrifugação a 750 g (2.000 rpm), durante 3 minutos, e preparação da suspensão de hemácias a 4% (80 µL de papa de hemácias diluídos em 200 µL de PBS).

A tipagem sangüínea dos cães domésticos e silvestres foi realizada por meio do teste de aglutinação em tubos, padronizado pelo Laboratório de Imunoematologia e Sorologia da Universidade de Michigan (Michigan - Estados Unidos) empregando-se os reagentes específicos (soro policlonal produzido em cães por meio de iso-imunização) fornecidos pelo referido laboratório americano.

3.3.1. Tipagem anti-DEA 1

Para cada animal testado, três tubos 12 x 75 mm foram identificados como se segue: tubo 1 controle, tubo 2 anti-DEA 1.X e tubo 3 anti-DEA 1.1. Em seguida, foi adicionado 50 µL de PBS no primeiro tubo (utilizado como controle), 50 µL de anti-DEA 1.X no segundo tubo e 50 µL de anti-DEA 1.1 no terceiro tubo, respectivamente. Na etapa seguinte foi acrescentado 50 µL de suspensão de hemácias a 4% do animal a ser tipado, em cada tubo. Seguiu-se a incubação durante 15 minutos a 37°C, em banho-maria, e posteriormente, a centrifugação a 2.250 g (3.500 rpm), durante 15 segundos, realizando-se a leitura para a reação de aglutinação.

A leitura utilizou o esquema que se segue: negativo (-), uma cruz (+1), duas cruces (+2), três cruces (+3) e quatro cruces (+4), significando, respectivamente, nenhuma reação, vários grumos pequenos em sobrenadante avermelhado, vários grumos um pouco maiores em sobrenadante ligeiramente avermelhado, um grumo médio e alguns grumos pequenos em sobrenadante quase límpido, e um grumo grande em sobrenadante límpido.

Os tubos que apresentaram resultado negativo ou +1 foram submetidos ao teste de Coombs, após três lavagens consecutivas das suspensões de hemácias acrescidas dos anti-soros, presentes nos tubos. Em seguida, adicionou-se o reagente de Coombs

(Imunoglobulina (IgG) de coelho anti-IgG de cão), cuja função é promover a aglutinação de hemácias sensibilizadas com anticorpos. A mistura foi homogeneizada, e os tubos incubados a 37°C durante 15 minutos. Finalmente, os tubos foram centrifugados a 2.250 g durante 15 segundos e avaliados quanto à ocorrência de aglutinação.

3.3.2. Tipagem anti-DEA 3,4,5 e 7

Para cada animal testado, cinco tubos 12 x 75 mm foram identificados como se segue: tubo 1 controle, tubo 2 anti-DEA 3, tubo 3 anti-DEA 4, tubo 4 anti-DEA 5 e tubo cinco anti-DEA 7. Em seguida, foi adicionado 50 µL PBS no primeiro tubo (utilizado como controle) e 50 µL de anti-DEA 3, 4 5 e 7 nos tubos restantes, respectivamente. Na etapa seguinte foi acrescentado 50 µL de suspensão de hemácias a 4% do animal a ser tipado, em todos os tubos, os quais foram incubados durante 30 minutos a 4°C, em geladeira, e posteriormente centrifugados a 2.250 g (3.500 rpm), durante 15 segundos, realizando-se a leitura para a reação de aglutinação.

A leitura foi realizada utilizando-se o esquema descrito anteriormente.

3.4. Análises Laboratoriais

Os seguintes exames foram realizadas junto ao Laboratório de Patologia Clínica Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto, do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAV/UNESP): hemograma, determinação das concentrações séricas de proteínas totais, albumina, uréia, creatinina e bilirrubinas, bem como atividades séricas de aspartato amino-transferase (AST), alanina amino-transferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP).

As contagens globais do hemograma foram realizadas em amostras de 1 mL de sangue com anticoagulante CPDA-1, utilizando-se contador automático¹. Para a contagem diferencial de leucócitos, os esfregaços sangüíneos foram corados com corante Rosenfeld².

As análises bioquímicas foram feitas utilizando-se soro sangüíneo obtido a partir dos 4 ml de sangue sem anticoagulante. Aferiu-se a concentração sérica de proteínas totais e albumina por meio dos métodos de biureto e verde de bromocresol, respectivamente. As atividades das enzimas aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase foram

¹ contador automático Coulter ACT8

² coloração cuja composição contém metanol e corantes May Grunwald e Giensa.

determinadas através do método de Reitman e Frankel, e da fosfatase alcalina pelo método de Bowers e McComb modificado. Para tanto, utilizou-se conjunto de reagentes de uso comercial³. Os métodos utilizados para a determinação das concentrações de uréia, creatinina, bilirrubina total e direta foram, respectivamente, o método da urease, o método de Lustosa-Basques e o método de Sims-Horn. A bilirrubina indireta foi calculada subtraindo-se a concentração de bilirrubina direta da bilirrubina total. A leitura das amostras foi realizada por meio de espectrofotometria⁴, com luz de comprimento de onda específico para cada constituinte.

3.5. Produção dos Antisoros Policlonais para Tipagem Sangüínea⁵

3.5.1. Produção de anti-DEA 1.X

3.5.1.1. Etapas da Sensibilização

Dois cães previamente tipados foram escolhidos por serem DEA 1 negativos. Em seguida, foi escolhido um doador de hemácias do grupo DEA 1 (subgrupo DEA 1.1). As inoculações de 0,5 mL de suspensão de hemácias a 50% em PBS foram feitas semanalmente por um período de aproximadamente 30 dias (4 inoculações).

3.5.1.2. Titulação e Padronização do Antisoro

A primeira titulação dos anti-soros ocorreu 15 dias após o início do protocolo de sensibilização. Para tanto, foram colhidos 10 mL de sangue de cada animal sensibilizado, sem uso de anticoagulante. Em seguida, a amostra foi mantida à temperatura ambiente durante 20 minutos e posteriormente submetida à centrifugação (1.600 g ou 3.000 rpm durante 20 minutos) para a obtenção do soro, o qual permaneceu em banho-maria, a 56° C durante 30 minutos, para que ocorresse a inativação do complemento.

³ LABTEST, Belo Horizonte - MG

⁴ espectrofotômetro semi-automático LABQUEST

⁵ protocolo utilizado pelo Laboratório de Imunohematologia e Sorologia da Universidade de Michigan (Michigan - Estados Unidos).

Para o procedimento de titulação foram utilizados 8 tubos para cada amostra de soro, diluídos em solução PBS, desde 1:1 até 1:128, cujo volume final foi de 100 μ L em cada tubo. A este volume foram adicionados 50 μ L de suspensão de hemácias a 4% do respectivo doador de hemácias. Após homogeneização, os tubos foram incubados em banho-maria, a 37°C durante 15 minutos e, posteriormente, centrifugados a 2.250 g durante 15 segundos. Em seguida realizou-se a leitura macroscópica contra fonte luminosa para verificar a ocorrência de aglutinação das hemácias.

A titulação foi auferida semanalmente, sendo considerados anti-soros aquelas amostras que mantiveram um título 1:32 nas três últimas titulações e apresentaram o resultado esperado quando testados contra 20 cães DEA 1.1 positivos e 20 cães DEA 1.1 negativos.

3.5.1.3. Colheita e Armazenagem do Anti-soro

Foram colhidas duas amostras de 500 mL de sangue, em bolsa plástica para transfusão, sem uso de anticoagulante, respeitando-se um intervalo de 3 semanas entre cada colheita. Após descanso da bolsa à temperatura ambiente, durante 1 hora, foi retirado o soro através de seringa estéril, sendo este transferido para tubos plásticos esterilizados e submetidos à centrifugação (2.750 g ou 4.000 rpm durante 10 minutos) com o intuito de realizar uma ótima separação do soro. Em seguida, o soro acondicionado em tubos esterilizados foi mantido em banho-maria, a 56° C durante 30 minutos, para inativação do complemento. Finalmente, o anti-soro foi armazenado em tubos plásticos do tipo “Eppendorf”, em alíquotas de 1,5 mL, a -18°C.

3.5.2. Produção de anti-DEA 1.1

3.5.2.1. Etapas da Sensibilização

Oito cães previamente tipados e positivos para os antígenos 1.2 e 4 foram escolhidos por serem DEA 1.1 negativos. Em seguida, foi escolhido um doador de hemácias do grupo mencionado (subgrupo DEA 1.1). As etapas seguintes obedeceram o mesmo protocolo descrito para a produção de antisoro anti-DEA 1.X.

3.6. Análise Estatística⁶

Os níveis de probabilidade para a identificação dos anticorpos foram calculados construindo-se uma tabela na qual a presença e ausência de reatividade sérica foram correlacionadas com a presença e ausência de um antígeno particular entre as amostras de hemácias testadas.

Hemácias			
Reações do Soro	Antígeno Presente	Antígeno Ausente	Total de Antígenos
Positiva	A	B	A + B
Negativa	C	D	C + D
Total	A + C	B + D	N

Onde:

A = número de reações positivas observadas com amostras de hemácias positivas para o antígeno.

B = número de reações positivas observadas com amostras de hemácias negativas para o antígeno.

C = número de reações negativas observadas com amostras de hemácias positivas para o antígeno.

D = número de reações negativas observadas com amostras de hemácias negativas para o antígeno.

N = número total de amostras de hemácias testadas.

Fórmula para o cálculo da probabilidade (p) a partir da tabela:

$$\frac{(A+B)! \times (C+D)! \times (A+C)! \times (B+D)!}{$$

$$N! \times A! \times B! \times C! \times D!$$

OBS.: ! é o símbolo de fatorial, ou seja, o produto de todos os números desde 1 até o número envolvido (Ex.: 3! = 3 x 2 x 1 = 6).

⁶ De acordo com “Technical Manual of American Association of Blood Banks” (AABB), 11th ed., 1993.

4. RESULTADOS

4.1. Tipagem Sangüínea dos Cães Domésticos (*Canis familiaris*)

4.1.1. Cães da raça Pastor Alemão

Foram tipados 50 cães sadios, machos e fêmeas, e obteve-se a seguinte prevalência: 32 (64%) positivos para o subgrupo DEA 1.1; 18 (36%) positivos para os subgrupos DEA 1.2 ou DEA 1.3; 4 (8%) positivos para o grupo DEA 3; 50 (100%) positivos para o grupo DEA 4; 7 (14%) positivos para o grupo DEA 5 e 4 (8%) positivos para o grupo DEA 7 (Tabela 8). A frequência de combinações entre os grupos sangüíneos em cada animal está descrita na Tabela 9.

Tabela 8 – Prevalência dos grupos sangüíneos na população de cães domésticos Pastores Alemães (n = 50).

Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1	32	64
DEA 1.2 ou 1.3	18	36
DEA 3	4	8
DEA 4	50	100
DEA 5	7	14
DEA 7	4	8
Total	50	100

Tabela 9 – Frequência de combinações entre os grupos sangüíneos na população de cães domésticos Pastores Alemães (n = 50).

Combinações de Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1 e DEA 4	25	50
DEA 1.2/1.3 e DEA 4	14	28
DEA 1.1, DEA 4 e DEA 7	3	6
DEA 1.1, DEA 3, DEA 4 e DEA 5	3	6
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 5	2	4
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 7	1	2
DEA 1.1, DEA 4 e DEA 5	1	2
DEA 1.2/1.3, DEA 3 e DEA 4	1	2
Total	50	100

4.1.2. Cães Sem Raça Definida (SRD)

Foram tipados 150 cães adultos, machos e fêmeas, e obteve-se a seguinte prevalência: 85 (57%) positivos para o subgrupo DEA 1.1; 61 (41%) positivos para os subgrupos DEA 1.2 ou DEA 1.3; 19 (13%) positivos para o grupo DEA 3; 140 (93%) positivos para o grupo DEA 4; 11 (7%) positivos para o grupo DEA 5 e 17 (11%) positivos para o grupo DEA 7 (Tabela 10). A frequência de combinações entre os grupos sanguíneos em cada animal está descrita na tabela 11.

Tabela 10 – Prevalência dos grupos sanguíneos na população de cães domésticos SRD (n = 150).

Grupos Sanguíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1	85	57
DEA 1.2 ou 1.3	61	41
DEA 3	19	13
DEA 4	140	93
DEA 5	11	7
DEA 7	17	11
Total	150	100

Tabela 11 – Frequência de combinações entre os grupos sanguíneos em cães domésticos mestiços (n = 150).

Combinações de Grupos Sanguíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1 e DEA 4	52	35
DEA 1.2/1.3 e DEA 4	46	32,5
DEA 1.1, DEA 3 e DEA 4	10	7
DEA 1.1, DEA 4 e DEA 7	6	4
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 7	6	4
DEA 1.1, DEA 4 e DEA 5	6	4
DEA 1.1	4	3
DEA 1.2/1.3	4	3
DEA 4 e DEA 7	4	3
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 5	2	1,5
DEA 1.1, DEA 3, DEA 4 e DEA 5	2	1,5
DEA 1.1 e DEA 3	2	1,5

DEA 1.2/1.3, DEA 3, DEA 4 e DEA 7	2	1,5
DEA 1.1, DEA 3, DEA 4 e DEA 7	2	1,5
DEA 1.2/1.3, DEA 3 e DEA 4	1	0,6
DEA 1.1, DEA 4, DEA 5 e DEA 7	1	0,6
Total	150	100

4.2. Tipagem Sangüínea dos Cães Silvestres

4.2.1. Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*)

Foram tipados 32 lobos-guará e encontrou-se o seguinte resultado: 1 (3%) foi positivo para DEA 1.1; 31 (97%) foram positivos para DEA 1.2 ou DEA 1.3; 24 (75%) foram positivos para DEA 4; 1 (3%) foi positivo para DEA 5 e 7 (22%) foram positivos para DEA 7 (Tabela 12). A freqüência de combinações entre os grupos sangüíneos está descrita na tabela 13.

Tabela 12 – Prevalência dos grupos sangüíneos no grupo de lobos-guará estudado (n = 32).

Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1	1	3
DEA 1.2 ou 1.3	31	97
DEA 3	0	0
DEA 4	24	75
DEA 5	1	3
DEA 7	7	22
Total	32	100

Tabela 13 – Freqüência de combinações entre grupos sangüíneos em lobos-guará (n = 32).

Combinações de Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.2/1.3 e DEA 4	17	53
DEA 1.2/1.3	5	17
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 7	4	12
DEA 1.2/1.3 e DEA 7	2	6
DEA 1.1 e DEA 4	1	3

DEA 4	1	3
DEA 1.2/1.3, DEA 3, DEA 4 e DEA 7	1	3
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 5	1	3
Total	32	100

4.2.2. Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)

Foram tipados 16 animais e encontrou-se o seguinte resultado: 1 (6%) foi positivo para DEA 1.1; 15 (94%) foram positivos para DEA 1.2 ou DEA 1.3; 16 (100%) foram positivos para DEA 4; 3 (19%) foram positivos para DEA 5 e 7 (44%) foram positivos para DEA 7 (Tabela 14). A frequência de combinações entre os grupos sangüíneos está descrita na tabela 15.

Tabela 14 – Prevalência dos grupos sangüíneos no grupo de cachorros-do-mato (n = 16).

Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.1	1	6
DEA 1.2 ou 1.3	15	94
DEA 3	0	0
DEA 4	16	100
DEA 5	3	19
DEA 7	7	44
Total	150	100

Tabela 15 – Frequência de combinações entre grupos sangüíneos em cachorros-do-mato (n = 16).

Combinações de Grupos Sangüíneos	Nº de Animais	Porcentagem (%)
DEA 1.2/1.3 e DEA 4	8	50
DEA 1.2/1.3, DEA 4 e DEA 7	5	32
DEA 1.2/1.3, DEA 4, DEA 5 e DEA 7	1	6
DEA 1.1, DEA 4 e DEA 5	1	6
DEA 4, DEA 5 e DEA 7	1	6
Total	16	100

4.3. Parâmetros Hematológicos dos Canídeos Silvestres

Os valores obtidos para hemograma e bioquímica sérica dos lobos-guará e cachorros-do-mato encontram-se descritos nas tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Média e desvio padrão dos constituintes do hemograma de 29 lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e 16 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Parâmetros	Lobo-Guará	Cachorros-do-Mato
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	5,50 ± 0,93	4,80 ± 0,60
Hemoglobina (g/dL)	13,30 ± 5,69	14,00 ± 5,64
Volume Globular (%)	41,30 ± 1,83	42,00 ± 1,96
VCM (fL)	75,00 ± 5,84	89,00 ± 5,90
HCM (pg)	27,00 ± 4,040	29,00 ± 1,35
CHCM (%)	32,00 ± 1,15	33,00 ± 1,56
Leucócitos (x 10 ³ /μL)	14,80 ± 4,50	9,50 ± 1,35
Neutrófilos Segmentados (x 10 ³ /μL)	10,20 ± 3,50	6,90 ± 0,88
Neutrófilos Bastonetes (x 10 ³ /μL)	0,10 ± 0,10	0,10 ± 0,11
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	3,60 ± 1,70	1,30 ± 0,42
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	0,70 ± 0,70	0,20 ± 0,07
Monócitos (x 10 ³ /μL)	0,20 ± 0,20	0,10 ± 0,06
Basófilos (x 10 ³ /μL)	0,03 ± 0,05	-

VCM- volume corpuscular médio; HCM- hemoglobina corpuscular média; CHCM- concentração de hemoglobina corpuscular média

Tabela 17. Média e desvio padrão das concentrações séricas de proteínas plasmáticas totais (PPT), albumina, uréia, creatinina e bilirrubinas total (BT), direta (BD) e indireta (BI), bem como das atividades de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) de 29 lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e 16 cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*).

Parâmetros	Lobo-Guará	Cachorros-do-Mato
PPT (g/dL)	7,60 ± 0,61	7,50 ± 0,56
Albumina (g/dL)	3,40 ± 0,54	3,30 ± 0,31
ALT (U/mL)	70,00 ± 26,51	51,00 ± 17,46
AST (U/mL)	49,00 ± 14,77	25,00 ± 12,81
ALP (U/mL)	33,00 ± 26,49	22,00 ± 4,42
Uréia (mg/dL)	55,00 ± 18,31	44,00 ± 23,84
Creatinina (mg/dL)	1,40 ± 0,31	0,90 ± 0,18
BT (mg/dL)	0,12 ± 0,06	0,16 ± 0,06
BD (mg/dL)	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,02
BI (mg/dL)	0,08 ± 0,06	0,10 ± 0,02

4.4. Produção dos Anti-soros Policlonais para Tipagem Sangüínea

4.4.1. Produção de anti-DEA 1.X

Dois cães desenvolveram anticorpos anti-DEA 1.X. Os títulos variaram de 1:1 até 1:64, porém a aglutinação máxima foi obtida com um título de 1:4. Assim, o anti-soro produzido foi diluído em PBS na proporção 1:4 e utilizado simultaneamente com o anti-soro anti-DEA 1.X obtido comercialmente, para a tipagem sangüínea de 50 cães testados no experimento. Os níveis de probabilidade (p) calculados para os dois anti-soros foram 0,035 e 0,050, respectivamente, representando significância estatística.

4.4.2. Produção de anti-DEA 1.1

Três animais desenvolveram anticorpos anti-DEA 1.1 em título de até 1:128, sendo que a mais forte aglutinação foi conseguida com o título de 1:4. Duas cadelas não desenvolveram anticorpos anti-DEA 1.1 em título superior a 1:4, o que foi considerado insatisfatório e, portanto, este anti-soro não foi recolhido.

Os anti-soros produzidos foram diluídos em PBS, na proporção 1:4, e utilizados simultaneamente com o anti-soro anti-DEA 1.1 obtido comercialmente para a tipagem sangüínea de 70 cães testados no experimento. Os níveis de probabilidade (p) calculados para os três anti-soros foram 0,025, 0,030 e 0,050, respectivamente, representando significância estatística.

5. DISCUSSÃO

5.1. Prevalência dos Grupos Sangüíneos em Cães Domésticos

A tipagem sangüínea dos cães domésticos revelou uma alta prevalência do grupo DEA 1, tanto no grupo de cães mestiços (98%) como no de Pastores Alemães (100%). Dentro do grupo DEA 1, a prevalência do subgrupo 1.1 foi de 57% no grupo de cães mestiços e 64% no grupo de Pastores Alemães. A prevalência dos subgrupos 1.2/1.3 foi de 41% em mestiços e 36% em Pastores. Esses resultados se assemelham àqueles descritos por NOVAIS (1996). Entretanto, os trabalhos de SWISHER & YOUNG (1961), SUZUKI et al. (1975), VRIESENDORP (1976), EJIMA et al. (1986) e GIGER et al. (1995) revelaram uma prevalência menor para o grupo DEA 1. EJIMA (1986) já havia descrito uma prevalência superior (82%) para o grupo DEA 1 em cães mestiços, quando comparada àquela encontrada em cães Beagle (55%). Contudo, esta diferença não foi observada entre os dois grupos de cães domésticos (mestiços e Pastores Alemães) testados neste estudo.

Pelo fato do grupo DEA 1 possuir maior relevância por ser altamente antigênico, a alta prevalência encontrada nesse estudo, tanto para os mestiços como para os Pastores Alemães, pode ser interpretada como benéfica. Isto é, se 57 a 64% dos pacientes forem positivos para DEA 1.1 e a possibilidade de encontrarmos um paciente DEA 1 negativo é de somente 2%, multiplicando-se estas frequências ($0,57 \times 0,02$; $0,64 \times 0,02$) encontraríamos o valor aproximado de 1%, o que representaria o risco potencial de sensibilização de um paciente DEA 1 negativo contra o grupo DEA 1.1 em uma primeira transfusão. Como não ocorrem anticorpos naturais contra este grupo, o teste de compatibilidade não revelaria a diferença entre eles. Caso este mesmo paciente, já sensibilizado, viesse a sofrer uma segunda transfusão no futuro, o risco dele receber sangue DEA 1 positivo e desenvolver uma reação transfusional hemolítica aguda seria praticamente 0% ($0,01 \times 0,57$; $0,01 \times 0,64$).

A experiência clínica em nosso meio traduz esta situação. A maioria das transfusões de sangue ainda são feitas ao acaso, sem a tipagem sangüínea ou mesmo um teste de compatibilidade entre doador e receptor. No entanto, as reações transfusionais felizmente são raras, à despeito desse procedimento inadequado. Sendo assim, a alta prevalência do grupo DEA 1 representa um fator altamente favorável para os nossos pacientes caninos.

A prevalência encontrada para o grupo DEA 3 nos dois grupos estudados (13% em mestiços e 8% em Pastores Alemães) se assemelhou àquela descrita por outros autores,

mas foi inferior àquela encontrada por EJIMA et al. (1986). Entretanto, segundo HALE (1995), os anticorpos de ocorrência natural são encontrados em 20% dos cães DEA 3 negativos. Sendo assim, poderíamos inferir que 2% ($0,13 \times 0,87 \times 0,20$) dos cães mestiços e 1% ($0,08 \times 0,92 \times 0,20$) dos cães Pastores Alemães devem possuir anticorpos naturais anti-DEA 3, sendo esta a possibilidade de ocorrência de reação transfusional inicial anti-DEA 3, após transfusão de sangue feita ao acaso (sem que seja realizado o teste de compatibilidade entre o doador e o receptor).

A prevalência encontrada para o grupo DEA 4 nos dois grupos estudados (93% em mestiços e 100% em Pastores Alemães) se assemelhou àquela descrita por SWISHER & YOUNG (1961) e GIGER et al. (1995), mas diferiu daquela encontrada por VRIESENDORP (1976), o qual relatou menor prevalência para este grupo. Não foram encontrados animais positivos somente para este grupo sanguíneo nos dois grupos estudados, ou seja, cães que poderiam ser considerados “doadores universais”.

A prevalência encontrada para o grupo DEA 5 nos dois grupos estudados (7% em mestiços e 14% em Pastores Alemães) foi superior à descrita por VRIESENDORP (1976), mas inferior àquela descrita por SWISHER & YOUNG (1961). Como os anticorpos naturais podem ser encontrados em 10% dos cães DEA 5 negativos (HALE, 1995), poderíamos inferir que 0,6% ($0,07 \times 0,93 \times 0,10$) dos mestiços e 1% ($0,14 \times 0,86 \times 0,10$) dos Pastores Alemães podem apresentar reações transfusionais iniciais anti-DEA 5.

O grupo DEA 7 apresentou baixa prevalência entre os dois grupos de cães estudados (11% em mestiços e 8% em Pastores Alemães), se assemelhando aos resultados de GIGER et al. (1995). Entretanto, SWISHER & YOUNG (1961) e VRIESENDORP (1976) encontraram maior frequência para este antígeno. Assim como para os grupos DEA 3 e DEA 5, os anticorpos naturais também podem ser encontrados nos cães DEA 7 negativos em 50% dos animais (HALE, 1995), o que seria equivalente à 5% ($0,11 \times 0,89 \times 0,50$) dos mestiços e 4% ($0,08 \times 0,92 \times 0,50$) dos Pastores Alemães apresentando reações transfusionais iniciais anti-DEA 7. Acredita-se, então, que este grupo sanguíneo seja o responsável pela grande maioria das reações transfusionais iniciais observadas em nosso meio. Contudo, somando-se as probabilidades de reações transfusionais iniciais contra esses três grupos sanguíneos (DEA 3, DEA 5, DEA 7), obtém-se um risco de reação transfusional inicial equivalente a 7,6 % para mestiços e 6% para Pastores Alemães.

As combinações entre grupos sanguíneos mais frequentemente encontradas foram DEA 1.1, DEA 4 (50% em mestiços e 35% em Pastores Alemães) e DEA 1.2/1.3, DEA 4

(28% em mestiços e 32,5% em Pastores Alemães). Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos por SWISHER & YOUNG (1961) e MOORE (1976) e refletem a maior prevalência desses antígenos eritrocitários sobre os outros grupos.

5.2. Tipagem Sangüínea dos Caninos Silvestres

Os resultados da tipagem sangüínea das duas espécies silvestres pesquisadas, utilizando-se os reagentes para antígenos eritrocitários caninos, foram positivos e semelhantes àqueles observados em cães domésticos. A freqüência dos grupos sangüíneos caninos, entretanto, variou entre as espécies. No que se refere ao grupo DEA 1, a grande maioria dos cães silvestres foi positiva para o subgrupo DEA 1.2/1.3, enquanto poucos foram positivos para DEA 1.1. Estas freqüências se invertem em cães domésticos, dentre os quais há maior prevalência do subgrupo 1.1. Esta simples observação levanta uma questão interessante a respeito do processo evolutivo das espécies doméstica e silvestres estudadas. Por que ocorre esta inversão de freqüências? Será que ela representa uma evolução ou um retrocesso? Sabe-se que o processo evolutivo das espécies domésticas não ocorre através da seleção natural, a qual prevalece nas espécies silvestres. A interferência humana criou padrões raciais voltados para características específicas, gerando uma alteração na prevalência dos grupos sangüíneos. Além disso, a consangüinidade dentro das raças de cães domésticos direcionou a ocorrências dos antígenos eritrocitários. Ou seja, os genes de grupos sangüíneos que estavam ausentes nos primeiros representantes de cada raça que chegaram no Brasil, tornaram-se pelo menos temporariamente excluídos do genoma dos descendentes daqueles indivíduos. Conseqüentemente, se a ocorrência de um antígeno já era baixa, tornou-se inexistente.

Por outro lado, nas espécies silvestres, a presença de um antígeno de grupo sangüíneo, como por exemplo o DEA 1.1, pode determinar a não sobrevivência de um filhote de mãe DEA 1 negativa, se ocorrer isoeritrólise neonatal. Neste caso, a mãe previamente sensibilizada produz anticorpos anti-DEA 1.1, os quais são absorvidos pelo filhote através do colostro e provocam a sua morte devido à anemia hemolítica. Este fato poderia nos conduzir a pensar que não seria vantajoso possuir este antígeno eritrocitário, e a própria seleção natural provocaria o seu desaparecimento. Enquanto isso, como os outros alelos do grupo

DEA 1 não seriam responsáveis por esse problema, sua ocorrência tenderia a aumentar ao longo do tempo. Esta poderia ser uma explicação para a inversão entre as prevalências dos subgrupos DEA 1.1 e DEA 1.2/1.3, observada nesta pesquisa.

O antígeno DEA 4 esteve presente em alta frequência nas duas espécies e houve baixa incidência dos outros antígenos eritrocitários caninos, assim como ocorre nos cães domésticos.

No que diz respeito às combinações de grupos sanguíneos sobre a superfície dos eritrócitos, DEA 1.2/1.3 e DEA 4 foi a combinação mais frequente, tanto em lobos-guará quanto em cachorros-do-mato, representando aproximadamente 50% dos animais. Esta ocorrência possivelmente se deve à maior prevalência desses antígenos nas duas espécies. Além disso, a alta frequência da combinação DEA 1.2/1.3, DEA 4 pode nos indicar que esta seria uma associação favorável para a sobrevivência dessas espécies, uma vez que ambas foram submetidas ao processo de seleção natural ao longo do tempo. A partir desses resultados, acredita-se que os antígenos eritrocitários dos cães domésticos estejam presentes sobre as hemácias das espécies silvestres estudadas. O padrão de reatividade quanto à intensidade das reações de aglutinação foi semelhante e, no que se refere ao grupo DEA 1, as reações inicialmente negativas foram amplificadas através da utilização do teste da antiglobulina de Coombs, apresentando resultado final positivo.

Sabe-se, entretanto, que o resultado positivo da reação sorológica não significa que os antígenos encontrados possam ser exatamente os mesmos, uma vez que os anticorpos policlonais utilizados podem ter se ligado a epítopos diferentes sobre a superfície das hemácias dessas espécies silvestres, os quais poderiam apresentar alguma semelhança antigênica com os grupos sanguíneos dos cães domésticos. Esta dúvida só será elucidada após análise molecular dos antígenos de membrana eritrocitária das espécies silvestres, e comparação com os resultados obtidos para cães domésticos.

Embora os estudos sobre a filogenia dos canídeos sejam altamente controversos, e as relações filéticas entre eles ainda não sejam conclusivas, a semelhança antigênica ou homologia encontrada para os antígenos de grupo sanguíneo de cães domésticos, lobos-guará e cachorros-do-mato aproxima estas espécies, sugerindo que tenham evoluído a partir de um ancestral comum (teoria monofilética). A partir daí, é provável que tenha ocorrido o fenômeno de especiação, no qual são formadas novas espécies a partir de segregações

gênicas e mutações, as quais ocorrem em grupos diferentes de indivíduos que tornam-se isolados por barreiras físicas ou reprodutivas.

Os graus de variabilidade genética dentro das populações de canídeos presumivelmente refletem o tamanho da população, o grau de isolamento populacional e a taxa de mutação do locus estudado. As espécies altamente abundantes tendem a possuir altos níveis de variação genética, enquanto as espécies ameaçadas possuem o menor nível de variação genética molecular.

Os resultados obtidos sugerem que os genes para grupos sanguíneos são relativamente estáveis, sofrendo pouca alteração ao longo do processo evolutivo. Além disso, a aparente compatibilidade entre grupos sanguíneos encontrada entre essas três espécies de caninos merece ser melhor investigada, uma vez que possibilita a realização de transfusão sanguínea empregando-se sangue heterólogo. Esta possibilidade seria de grande ajuda para os clínicos de animais silvestres, pois são freqüentes as mortes causadas por anemia devido à ectoparasitismo nos indivíduos mantidos em zoológicos.

5.3. Parâmetros Hematológicos dos Caninos Silvestres

5.3.1. Lobos-guará

Verifica-se que os valores encontrados para o número de eritrócitos em lobos-guará adultos se assemelharam àqueles obtidos por BUSCH (1980) e SMITH (1990), mas diferiram dos encontrados por WALLACE & BOEVER (1983) e CAVALIERO (1989), os quais apresentaram resultados inferiores e superiores, respectivamente. Uma explicação possível pode ter sido o fato dos primeiros autores terem trabalhado com um grupo de lobos-guará adultos jovens, o que explicaria um número de eritrócitos ligeiramente inferior aos obtidos para animais adultos. Já CAVALIERO (1989) trabalhou com coletas seriadas semanais e, durante o período experimental (aproximadamente 2 meses), realizou a desverminação dos animais e o fornecimento de dieta balanceada. É possível que este tratamento possa ter interferido nos resultados causando elevação do número de eritrócitos. Os valores encontrados para hematócrito foram semelhantes àqueles descritos por SMITH (1990), mas superiores aos descritos por WALLACE & BOEVER (1983) e inferiores aos citados por

BUSCH (1980) e CAVALIERO (1989). Como BUSCH (1980) havia descrito um número de eritrócitos semelhante, a explicação para um hematócrito elevado é dada por um volume corpuscular médio (VCM) superior encontrado. O teor de hemoglobina foi semelhante aos descritos por BUSCH (1980), WALLACE & BOEVER (1983), CAVALIERO (1989) e SMITH (1990). Quanto aos índices hematimétricos absolutos, o valor obtido para o VCM foi semelhante àquele descrito por CAVALIERO (1989), porém foi inferior ao obtido por BUSCH (1980), como já foi mencionado. Quanto aos demais índices (HCM, CHCM), não houve discrepância entre os resultados obtidos.

Os valores de leucócitos totais obtidos neste estudo foram superiores àqueles descritos por outros autores. Assim como nos cães domésticos, os neutrófilos segmentados apresentaram-se como a variedade leucocitária numericamente mais expressiva, seguida dos linfócitos. Os valores encontrados para neutrófilos segmentados também foram superiores àqueles descritos por outros autores. Uma possível explicação para este aumento pode ter sido o estresse sofrido pelos animais durante a captura, manejo e colheita de sangue, uma vez que não foram utilizados sedativos para contenção química. O número de linfócitos foi semelhante ao descrito por WALLACE & BOEVER (1983), mas superior ao descrito por BUSCH (1980), CAVALIERO (1989) E SMITH (1990). Os valores encontrados para eosinófilos, monócitos e basófilos não diferiram daqueles descritos na literatura. Quando comparados com os valores descritos para cães domésticos, os resultados obtidos para contagem leucocitária de lobos-guará foram semelhantes entre estas duas espécies.

Os valores encontrados para proteínas totais e albumina foram semelhantes aos descritos por outros autores. As atividades de ALT, AST e ALP também foram de acordo com aquelas já descritas, bem como os níveis de uréia, creatinina e bilirrubinas total e indireta. Não foi encontrada na literatura consultada valor referente a bilirrubina direta. Os resultados obtidos para bioquímica clínica de lobos-guará se assemelharam àqueles descritos para cães domésticos, mas foram superiores àqueles descritos para cachorros-domato.

5.3.2. Cachorros-do-mato

Verifica-se que os valores encontrados para o número de eritrócitos em cachorros-domato adultos se assemelharam àqueles obtidos por HOEHNE & ROSENFELD (1953) e SANTOS (1999), mas diferiram dos encontrados por WALLACE & BOEVER (1983), os quais

apresentaram resultados superiores. Os valores encontrados para hematócrito foram semelhantes àqueles descritos por SANTOS (1999), mas superiores aos descritos por WALLACE & BOEVER (1983) e inferiores aos citados por HOEHNE & ROSENFELD (1953). A explicação para estas diferenças residiu no valor encontrado para VCM, o qual foi inferior àquele obtido por HOEHNE & ROSENFELD (1953), mas semelhante ao citado por SANTOS (1999). O teor de hemoglobina foi semelhante ao encontrado por SANTOS (1999), mas ligeiramente superior aos valores encontrados por HOEHNE & ROSENFELD (1953) e WALLACE & BOEVER (1983). Quanto aos demais índices (HCM, CHCM), não houve discrepância entre os resultados obtidos nesse estudo e aqueles encontrados por SANTOS (1999) mas, em conformidade com o valor obtido para teor de hemoglobina, HOEHNE & ROSENFELD (1953) também obteve HCM inferior. É interessante notar que o volume corpuscular médio dessa espécie é superior ao dos cães domésticos e lobos-guará, os quais apresentam VCM semelhante entre si. Esta parece ser a única diferença marcante no eritrograma entre as três espécies de canídeos estudadas.

O valor obtido para leucócitos totais em cachorros-do-mato foi ligeiramente superior àqueles descritos por HOEHNE & ROSENFELD (1953) e WALLACE & BOEVER (1983), mas ligeiramente inferior ao obtido por SANTOS (1999). Assim como nos cães domésticos e lobos-guarás, os neutrófilos segmentados apresentaram-se como a variedade leucocitária numericamente mais expressiva, seguida dos linfócitos. Os valores encontrados para neutrófilos segmentados foram semelhantes aos valores descritos por SANTOS (1999), mas superiores àqueles descritos por HOEHNE & ROSENFELD (1953) e WALLACE & BOEVER (1983). Os valores obtidos para linfócitos neste estudo foram ligeiramente inferiores aos descritos pelos outros autores. O valor encontrado para eosinófilos foi inferior ao descrito por HOEHNE & ROSENFELD (1953) e SANTOS (1999), mas superior ao encontrado por WALLACE & BOEVER (1983). Quanto aos monócitos, HOEHNE & ROSENFELD (1953) descreveram número superior, mas os valores encontrados por WALLACE & BOEVER (1983) e SANTOS (1999) foram semelhantes. O número de basófilos não diferiu daquele descrito na literatura. Pode-se observar que os valores obtidos para leucócitos totais, neutrófilos segmentados e linfócitos no cachorro-do-mato foram inferiores àqueles descritos para lobos-guará e cães domésticos, mas a relação neutrófilo/linfócito permaneceu semelhante, variando de 2:1 até 4:1 nas duas espécies. A explicação para a contagem leucocitária inferior pode ser um menor grau de estresse sofrido por esta espécie, devido ao procedimento de captura e colheita de sangue, quando comparados aos lobos-guará.

Os valores encontrados para proteínas totais e albumina foram semelhantes aos descritos por SANTOS (1999). As atividades de ALT, AST variaram ligeiramente, enquanto os níveis de uréia e creatinina se assemelharam àqueles descritos pelo mesmo autor. Não foi encontrada na literatura consultada valor referente a atividade de ALP e teores de bilirrubina total e frações. Verificou-se que os resultados de bioquímica clínica obtidos em cachorros-do-mato foram ligeiramente inferiores àqueles observados em lobos-guará e cães domésticos.

5.4. Produção dos Anti-soros Policlonais para Tipagem Sangüínea

Os cães foram sensibilizados através da administração semanal de sangue contendo antígeno de grupo sangüíneo desconhecido e, efetivamente, produziram títulos de anticorpos anti-DEA. De acordo com a técnica de sensibilização, pôde-se observar que os maiores títulos alcançados ocorreram por volta da quinta semana após o início do protocolo. Este título, então, manteve-se alto durante um período de tempo que variou em função do antígeno utilizado e, mesmo em presença de novas inoculações de sangue incompatível, não houve aumento significativo. No caso do anti-soro anti-DEA 1.X, produzido pelos cães negativos para o grupo DEA 1 e sensibilizados com sangue tipo 1.1, observou-se que os títulos permaneceram altos por mais tempo e decaíram muito pouco, após a suspensão do protocolo de sensibilização. Na verdade, seis meses após esse período, os títulos ainda se mantiveram aceitáveis, sendo necessário apenas um “reforço antigênico” (nova inoculação de sangue incompatível) para que se elevassem rapidamente e voltassem a atingir os níveis altos anteriores. Esses resultados corroboram as observações de GIGER et al. (1995), que relataram a presença de anticorpos anti-DEA 1.1 provocando uma reação hemolítica aguda pós-transfusional em um cão DEA 1 negativo, vários anos depois de uma primeira transfusão com sangue incompatível. Ou seja, os anticorpos anti-DEA 1.1 permanecem circulantes durante anos e a memória imunológica é ativada após uma nova inoculação do antígeno, mesmo que em pequena quantidade.

Por outro lado, os títulos de anticorpos anti-DEA 1.1 produzidos nos cães DEA 1.2 sensibilizados com sangue tipo 1.1, também foram aceitáveis e se mostraram estáveis durante aproximadamente 2 meses. Porém, em seguida, decaíram para metade, e uma nova inoculação de antígeno não foi eficiente para provocar o retorno para os títulos iniciais, demonstrando que o antígeno 1.1 isoladamente é menos antigênico do que quando

associado ao 1.2. Esta ocorrência parece comprovar que a presença conjunta dos antígenos 1.1 e 1.2/1.3 deve favorecer a imunogenicidade, provavelmente em função do maior tamanho da molécula antigênica.

Os anticorpos gerados após a imunização experimental consistiram numa mistura de moléculas de diferentes especificidades e afinidades (anti-soro). Parte dessa heterogeneidade ocorreu devido à produção de anticorpos contra diferentes epítomos do antígeno imunizante. Não obstante, os anti-soros policlonais produzidos foram eficientes na detecção dos antígenos de grupo sanguíneo DEA 1 (subgrupos 1.1 e 1.2/1.3). Além disso, a relativa simplicidade e baixo custo do protocolo experimental ainda favorecem a sua utilização nos hospitais veterinários e instituições de ensino em nosso país. Pode-se dizer que a maior dificuldade encontrada, durante o protocolo experimental, foi a obtenção de cães negativos para o grupo DEA 1, visto ser a prevalência para este sistema muito alta em nosso meio. Sendo assim, a geração de anti-soros policlonais nacionais para tipagem sanguínea dos cães domésticos demonstra ser uma técnica viável e eficiente, cuja utilização poderia eliminar os riscos de reações transfusionais geradas por incompatibilidade de grupos sanguíneos entre doador e receptor.

6. CONCLUSÕES

1. A tipagem sangüínea dos cães domésticos revelou uma alta incidência do grupo DEA 1 em cães mestiços (98%) e Pastores Alemães (100%).
2. A alta prevalência do grupo DEA 1 representa um fator altamente favorável pois reduz grandemente o risco de reação transfusional.
3. As combinações entre grupos sangüíneos mais freqüentemente encontradas em cães domésticos foram DEA 1.1,4 e DEA 1.2,4.
4. O risco de reação transfusional inicial contra os grupos DEA 3, DEA 5 ou DEA 7 equivale a 7,6 % para mestiços e 6% para Pastores Alemães.
5. Os resultados da tipagem sangüínea das duas espécies silvestres pesquisadas foram positivos e semelhantes àqueles observados em cães domésticos. A freqüência dos grupos sangüíneos caninos, entretanto, variou entre as espécies.
6. A homologia encontrada para os antígenos de grupo sangüíneo de cães domésticos, lobos-guará e cachorros-do-mato aproxima estas espécies, sugerindo que tenham evoluído a partir de um ancestral comum (teoria monofilética).
7. Os resultados obtidos sugerem que os genes para grupos sangüíneos são relativamente estáveis, sofrendo pouca alteração ao longo do processo evolutivo.
8. A aparente compatibilidade entre grupos sangüíneos encontrada entre essas três espécies de caninos merece ser melhor investigada, uma vez que possibilita a realização de transfusão sangüínea empregando-se sangue heterólogo.
9. O volume corpuscular médio de cachorros-do-mato é superior ao de lobos-guará, o qual apresenta VCM semelhante ao do cão doméstico.

10. Assim como nos cães domésticos, os neutrófilos segmentados apresentaram-se como a variedade leucocitária numericamente mais expressiva, seguida dos linfócitos, tanto em lobos-guará como em cachorros-do-mato.
11. Os valores obtidos para leucócitos totais, neutrófilos segmentados e linfócitos em cachorros-do-mato são inferiores àqueles descritos para lobos-guará e cães domésticos, mas a relação neutrófilo/linfócito permanece semelhante, variando de 2:1 até 4:1 nas duas espécies.
12. Os anti-soros policlonais produzidos foram eficientes na detecção dos antígenos de grupo sanguíneo DEA 1.
13. A produção de anti-soros policlonais nacionais para tipagem sanguínea dos cães domésticos demonstra ser uma técnica viável e eficiente, cuja utilização poderia eliminar os riscos de reações transfusionais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, G.A. Red blood cell antigens and blood groups in the dog and cat. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. (Ed.). **SCHALM'S Veterinary hematology**, Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., p. 767-773, 2000.

ANDREWS,G.A., CHAVEY,P.S., SMITH, J. E. Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg, v. 201, n. 10, p. 1549-1552, 1992.

ANDREWS,G.A., CHAVEY,P.S., SMITH, J. E. Reactivity of purified lectins with blood typed canine erythrocytes. **Comp. Haematol. Int.**, v. 3, p. 135-141, 1993.

BERTA, A. Quaternary evolution and biogeography of the large South American Canidae. **Univ. Calif. Publ. Geol. Sci.**, California, v. 39, p. 455-471, 1988.

BRADY, C. A; DITTON, M. K. Management and breeding of maned wolves at the National Zoological Park, Washington. **International Zoo Yearbook**, v. 19, p. 171-176, 1979.

BULL, R. W. Inmunohematología. In: Halliwell, R. E. W. & Gorman, N. T. (Ed.) **Inmunologia clinica veterinaria**, Zaragoza: Editorial Acribia S. A, 1992.

BUSCH, H. Medical manegement of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). In: American Association of Zooveterinarians, **Proceeding**, p. 132-134, 1980.

CARVALHO, C. T. Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo guará. **Boletim Técnico I.F.** São Paulo, v. 21, p. 1-18, 1976.

CAVALIERO, I. C. **et al.** Valores hematológicos, bioquímicos do soro e temperatura interna de lobos guarás (*Chrysocyon brachyurus*). **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, v. 5, n. 1, p. 25-32, 1989.

CAVINATO, M. L. **Espécies ameaçadas: guia prático**. São Paulo: Ed. Nobel S.A, 1999, 64p.

CHIARELLI, A. B. The chromosomes of the canidae. In: FOX, M. W. (Ed.). **The Wild Canids**. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 40-53, 1975.

CLUTTON-BROCK, J., CORBETT, G.B., HILLS, M. A review of the family Canidae with a classification by numerical methods. **Bull. Br. Mus. Zool.**, v. 29, p. 119-199, 1976.

CORATO, A., MAZZA, G., HALE, A.S., BARKER, R.N., DAY, M.J. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous do human Rhesus. **Vet. Immun. and Immunopat.**, v. 59, p. 312-323, 1997.

EISENBERG, J.F., REDFORD, K.H. Order carnivora (fissipedia). In: _____. **Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, Vol. 3, 1999, p. 279-311.

EJIMA, H.; KUROKAWA, K. Comparison test of antibodies for dog blood grouping. **Jpn. J. Vet. Sci.**, v. 42, p. 435-441, 1980.

EJIMA, H.; KUROKAWA, K.; IKEMOTO, S. Phenotype and gene frequency of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. **Jpn. J. Vet. Sci.** , v. 48, p. 363-368, 1986.

GIANNONI, M. A. Citogenética, especiação e a deriva continental. In: OSUNA, J. A. & ARAUJO, S. M. C. (Org.). **Genética Ecológica. Melhoramento Genético Animal e Vegetal. Anais da XIII Reunião da Sociedade Brasileira de Genética Regional de São Paulo**, p. 43-72, 1979.

GIGER, U. ET AL. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. **JAVMA**, v.206, n. 9, p. 1358-1362, 1995.

HALE, A. S. Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion medicine. In: KRISTENSEN & FELDMAN (Ed.). **The Vet. Clin. of North Am. - Small Anim. Pract.**, v. 25, n. 6, p. 1323-32, 1995.

HARA, Y. et al. Preparation of monoclonal antibodies against dog erythrocyte antigen D1 (DEA 3). **J. Vet. Med. Sci.**, v. 53, p. 1105-07, 1991.

HOEHNE, L., ROSENFELD, G. Estudos de hematologia comparada. II. Dados hematológicos do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous azarae*). **Mem. do Instituto Butantan**, v. 25, n. 2, p. 55-57, 1953.

JAIN, N. C. Immunohematology. In: SCHALM, O . W (Ed.). **Veterinary Hematology**, Philadelphia: Lea & Febiger, 4. ed., 1986, 1221 p.

LANGGUTH, A. Ecology and evolution in the South American canids. In: FOX, M.W. (Ed.). **The Wild Canids**. New York: Van Nostrand Reinhold Co., 1975, p. 192-206.

MARTIN, L.D. Fossil history of the terrestrial carnivora. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.). **Carnivore behavior, ecology and evolution**. New York: Ccornell University Press, 1990, p. 536-568.

MOORE, D. J. The blood grouping systems of dogs. **J. South Afr. Vet. Assoc.**, Onderstepoort, v. 47, p. 282-284, 1976.

NOVAIS, A . A . **Prevalência do grupo sanguíneo DEA 1 (subgrupos 1.1 e 1.2) em cães (*Canis familiaris*) (Linnaeus, 1758)**. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária - FCAV/UNESP, Jaboticabal, 1996.

NOVAIS, A . A ; SANTANA, A E; VICENTIN, L A. Prevalence of DEA 1 canine blood group system in dogs (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758) reared in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 1/3, p.23-27, 1999.

NOWAK, R. M. Order Carnivora. In: _____. **Walker's Mammals of the World**. Baltimore: The Johns Hopkins University Press., v. II, 1991, p. 1045-1083.

PESSUTTI, C., SANTIAGO, ME.B., OLIVEIRA, L.T.F. Order carnivora, family canidae (dogs, foxes, maned wolves). In: FOWLER, M. E. (Ed.). **Biology, Medicine and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa: Iowa State University Press, p. 279-290, 2001.

RODRIGUES, A. S. M., AURICCHIO, P. Canídeos do Brasil. **Coleção Terra Brasilis. Série zoologia – Zoo II. Mamíferos do Brasil**. Arujá: Terra Brasilis, 1994, 13 p.

SANTOS, L.C. **Laboratório Ambiental**. Cascavel: Edunioeste, 1999, 341 p.

SMITH, J.E. Comparative hematology. In: WILLIAMS, E.B. et al. (Ed.). **Hematology**. New York: McGraw-Hill Inc., 1990, p. 119-121.

STRICKBERGER, M. W. Systematics and classification. In: _____. Evolution, ed. 2, Massachusetts, Jones and Bartlett Pub., p. 227-245, 1996.

SUZUKI, K. ET AL. New antibodies in dog blood groups. **Transplantation Proceedings**, v. 7, n. 3, p. 365-367, 1975.

SWISHER, S. N., YOUNG, L. E. The blood grouping systems of dogs. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v. 41, p. 495-520, 1961.

SYMONS, M., BELL, K. Expansion of the canine A blood group system. **Anim. Genet.**, Oxford, v. 22, p. 227-235, 1991.

SYMONS, M., BELL, K. Canine blood groups: description of 20 specificities. **Ani. Genet.**, v. 23, p. 509-515, 1992.

TEDFORD, R.H.; TAYLOR, B.E.; WANG, X. Phylogeny of the caninae (Carnivora:Canidae): the living taxa. **American Museum Novitates**, New York, n. 3146, p. 1-37, 1995.

VRIESENDORP, H. M. et al. Joint Report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. **Transplant. Proc.**, v. 8, p. 289-314, 1976.

WAYNE, R.K.; NASH,W.G.; O'BRIEN,S.J. Chromosomal evolution of the canidae I. Species with high diploid numbers. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 44, p. 123-133, 1987.

WAYNE, R.K. & O'BRIEN, S.J. Allozyme divergence within the canidae. **Syst. Zool.**, v. 36, n. 4, p. 339-355, 1987.

WAYNE, R.K.; BENVENIESTE, R.E.; O'BRIEN, S.J. Molecular and biochemical evolution of the Carnivora. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.). **Carnivore behavior, ecology and evolution**. New York: Cornell Univ. Press, 1990, p. 465-494.

WAYNE, R.K. et al. Molecular systematics of the canidae. **Syst. Biol.**, v. 46, n. 4, p. 622-653, 1997.

WALLACE, J. D., BOEVER, W. J. Canids. In: _____. **Diseases of exotic animals - medical and surgical management**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1983, p. 409.

WARDROP, K.J. Clinical blood typing and crossmatching. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N. C. (Ed.). **SCHALM'S Veterinary Hematology**. Lippincott Williams & Wilkins, 5 ed., 2000, p. 795-798.

APÊNDICES

A - VALORES INDIVIDUAIS ENCONTRADOS EM LOBOS-GUARÁ.

Tabela 18 – Valores hematológicos individuais encontrados em lobos-guará (n = 29).

Nº	Hem (10 ⁶ /mL)	Hb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leuc	N. Segm	N. Bast	Linf Eos Mon Bas (10 ³ /mL)			
										Linf	Eos	Mon	Bas
1	5,0	38	11,2	76,0	33,9	29,4	17.900	10.919	0	4475	1969	358	179
2	6,7	48	14,3	71,6	33,5	29,7	15.000	11.550	0	1950	1200	115	115
3	6,1	48	15,3	78,6	31,3	31,8	11.300	7.458	0	3164	300	600	0
4	6,0	45	15,0	75,0	30,0	33,3	11.900	9.163	119	2142	119	357	0
5	3,7	28	8,7	75,6	32,1	31,0	12.500	7375	0	5000	0	125	0
6	5,5	46	14,9	83,6	30,8	32,3	15.000	10035	300	4200	0	150	0
7	4,1	30	9,9	73,1	30,3	33,0	8.900	6497	0	1869	356	178	0
8	5,5	42	14,0	76,3	30,0	33,3	11.700	8658	0	2925	0	117	0
9	5,3	40	13,4	75,4	29,8	33,5	14.900	10430	149	3129	447	745	0
10	4,7	39	12,5	82,9	31,2	32,0	12.100	7381	0	3509	726	484	0
11	5,2	36	11,8	69,2	30,5	32,7	11.300	6780	113	2938	791	565	0
12	5,3	43	13,9	81,1	26,2	32,3	17.000	13090	510	3060	170	170	0
13	5,0	37	12,2	74,0	24,4	32,9	11.000	6490	220	3300	770	220	0
14	5,6	44	14,4	78,5	25,7	32,7	11.700	7020	585	3744	1287	117	117
15	5,1	42	13,3	82,3	26,0	31,6	17.900	11098	0	6265	179	358	0
16	5,2	38	12,6	73,0	24,2	33,1	15.300	11322	153	2448	1224	153	0
17	6,3	46	14,9	73,0	23,6	32,4	16.100	9177	161	4186	2415	161	0
18	5,7	44	14,1	77,2	24,7	32,0	11.500	6900	115	3680	575	230	0
19	7,2	41	12,8	56,9	17,7	31,2	17.000	11730	170	4420	510	170	0
20	3,6	30	9,3	83,3	25,8	31,0	12.400	9796	0	2480	0	124	0
21	7,6	48	15,0	63,1	19,7	31,2	22.400	15008	224	5376	1120	672	0
22	6,5	49	15,8	75,4	24,3	32,2	13.300	11305	0	1197	798	0	0
23	6,3	48	15,4	76,2	24,4	32,0	27.700	15235	0	9695	2770	0	0

24	6,4	49	15,4	76,6	24,0	31,4	25.900	22274	259	3108	0	259	0
25	6,1	41	13,1	67,2	21,5	31,9	14.300	10153	0	3003	858	286	0
26	5,6	41	14,0	73,2	25,0	34,1	13.200	9504	132	2640	792	132	0
27	5,0	39	13,4	78,0	26,8	34,3	9.100	6734	273	1911	91	91	0
28	5,7	41	13,8	71,9	24,2	33,6	13.000	7020	0	5460	520	0	0
29	4,7	37	12,1	78,7	25,7	32,7	19.600	15680	0	2940	588	196	196

Tabela 19 - Valores individuais de bioquímica sérica encontrados em lobos-guará (n = 29).

Nº	Proteína	Albumina	ALT	AST	FA	Uréia	Creatinin a	BT	BD	BI
1	8,00	3,97	94,28	41,90	16,50	48,36	1,90	0,20	0,00	0,20
2	7,40	4,63	62,86	52,38	16,50	52,47	2,17	0,17	0,05	0,12
3	8,10	3,46	83,81	52,38	24,80	77,56	1,60	0,17	0,07	0,10
4	7,30	2,95	83,81	57,62	33,10	52,02	1,80	0,12	0,02	0,10
5	7,00	3,45	78,57	36,67	33,10	50,13	1,30	0,12	0,05	0,07
6	7,00	2,60	62,86	47,14	24,80	54,86	1,60	0,07	0,02	0,05
7	7,10	3,90	52,38	52,38	16,50	63,33	1,70	0,12	0,07	0,05
8	7,80	4,00	83,81	52,38	16,50	65,26	1,80	0,20	0,07	0,13
9	7,20	3,90	68,09	41,90	16,50	92,69	1,60	0,15	0,07	0,08
10	6,80	3,40	68,09	52,38	16,50	56,75	2,00	0,15	0,02	0,13
11	7,30	3,30	110,00	62,86	24,80	84,18	1,20	0,12	0,02	0,10
12	7,00	3,60	20,95	41,90	74,60	31,21	1,50	0,12	0,02	0,10
13	7,00	3,20	26,19	68,09	99,50	31,21	1,60	0,07	0,05	0,02
14	8,50	3,70	94,28	41,90	24,80	59,59	1,50	0,25	0,05	0,20
15	7,00	3,80	31,43	47,14	82,90	36,46	1,50	0,38	0,05	0,33
16	7,20	2,90	57,62	36,67	16,50	49,18	1,50	0,12	0,07	0,05
17	8,30	3,70	36,67	57,62	99,50	32,22	1,30	0,12	0,02	0,10
18	7,60	3,10	78,57	36,67	16,50	45,40	1,60	0,20	0,05	0,15
19	8,30	3,00	57,62	47,14	16,50	33,89	1,20	0,20	0,10	0,10
20	8,40	2,80	110,00	83,81	16,50	44,45	1,10	0,12	0,10	0,02
21	7,90	3,60	57,62	104,80	16,50	52,19	1,50	0,20	0,07	0,13

22	8,80	3,90	78,50	-	24,80	33,35	0,70	0,20	0,02	0,18
23	7,50	3,90	31,40	47,14	82,90	44,50	1,10	0,17	0,02	0,15
24	8,70	4,30	78,60	-	24,80	38,20	1,20	0,17	0,02	0,15
25	7,90	3,10	110,00	57,62	33,10	66,20	1,10	0,15	0,02	0,13
26	7,50	4,10	62,86	47,14	24,80	56,00	1,30	0,23	0,10	0,13
27	7,90	4,00	52,38	62,86	16,50	85,30	1,30	0,17	0,02	0,15
28	8,80	4,10	110,00	62,86	41,40	85,00	1,20	0,17	0,02	0,15
29	7,20	2,40	110,00	52,38	16,00	84,00	1,20	0,05	0,02	0,03

B - VALORES INDIVIDUAIS ENCONTRADOS EM CACHORROS-DO-MATO.

Tabela 20 – Valores hematológicos individuais encontrados em cachorros-do-mato (n = 16)

Nº	Hem (10 ⁶ /mL)	Hb (g/dL)	VG (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leuc	N. Segm	N. Bast	(10 ³ /mL)			
										Linf	Eos	Mon	Bas
1	4,34	39,00	12,40	90,60	31,40	31,80	9000	7110	0	1066	284	142	0
2	4,91	41,00	13,00	87,20	31,50	31,70	8100	6480	0	842	172	259	0
3	5,67	40,00	13,20	71,40	30,30	33,00	11500	7590	230	1366	150	150	0
4	4,37	38,00	12,80	88,30	29,60	33,60	11800	7080	0	2548	70	210	0
5	3,60	31,00	10,50	86,10	29,50	33,80	8700	5307	87	1751	212	53	0
6	4,79	42,00	14,60	89,30	28,70	34,70	7000	5110	70	970	153	204	0
7	5,05	47,00	15,90	94,00	29,50	33,80	9200	6900	276	1242	138	138	0
8	5,48	51,00	16,80	94,40	30,30	32,90	9800	7840	98	940	312	235	0
9	3,72	34,00	10,00	91,90	27,00	29,40	7800	6318	0	947	126	63	0
10	4,56	44,00	14,00	97,70	31,40	31,80	10300	8034	206	1285	80	140	0
11	5,10	48,00	15,70	94,10	30,50	32,70	9200	6900	92	1311	207	138	0
12	4,78	40,00	14,50	85,10	27,50	36,20	11500	8050	345	1771	240	160	0
13	5,55	50,00	16,00	90,90	31,20	32,00	10400	7800	208	1560	156	78	0
14	4,87	41,00	14,30	85,40	28,60	34,80	9400	6956	282	1252	138	207	0
15	5,34	48,00	15,80	90,50	30,30	32,90	9500	7600	190	1216	76	76	0
16	5,22	46,00	15,30	88,40	30,00	33,20	8800	6688	176	1203	132	132	0

Tabela 21 - Valores individuais de bioquímica sérica encontrados em cachorros-do-mato (n = 16).

Nº	Proteína	Albumin a	ALT	AST	FA	Uréia	Creatinina	BT	BD	BI
1	6,90	3,00	27,24	10,48	24,80	96,50	0,70	0,10	0,05	0,05
2	7,40	2,70	36,67	47,14	22,10	24,60	1,10	0,10	0,05	0,05
3	7,60	3,50	89,05	15,71	24,80	97,00	0,80	0,10	0,05	0,05
4	7,70	3,20	47,14	15,71	22,60	46,30	0,90	0,10	0,06	0,04
5	7,30	3,30	57,62	14,14	24,80	43,50	1,20	0,11	0,05	0,06
6	6,50	3,50	41,90	26,19	16,50	53,00	1,20	0,20	0,12	0,08
7	8,50	4,00	36,67	31,43	23,70	27,40	1,20	0,17	0,06	0,11
8	8,50	2,90	47,14	10,48	16,50	55,80	1,10	0,15	0,05	0,10
9	7,80	3,30	50,47	32,98	24,80	33,80	0,90	0,20	0,09	0,11
10	7,80	3,20	88,78	20,95	16,50	28,00	0,90	0,20	0,07	0,13
11	7,20	3,20	47,10	15,71	33,10	22,90	0,90	0,17	0,05	0,12
12	7,30	3,10	31,40	47,14	24,80	20,30	1,10	0,20	0,10	0,10
13	7,20	3,70	62,90	47,14	24,80	33,00	1,10	0,33	0,10	0,23
14	7,10	3,50	55,76	17,45	16,50	28,90	0,70	0,16	0,06	0,10
15	7,40	3,20	49,77	21,34	23,40	31,20	0,90	0,11	0,05	0,06
16	6,90	3,30	48,90	25,78	20,80	27,40	0,70	0,10	0,05	0,05