

Proteinograma sérico de cães saudáveis e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE)

[Serum protein concentrations in healthy dogs and dogs with lymphoma by means of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)]

S.G. Calazans¹, C.R. Daleck², J.J. Fagliari², C.F. Repetti³, A.B. De Nardi⁴, J.H.T. Castro¹, S.C. Fernandes¹, J.R.F. César¹, S.M. Rodigheri¹

¹Aluno de pós-graduação - FCAV-UNESP – Jaboticabal

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Jaboticabal, SP

³Universidade de Marília (Unimar) – Marília, SP

⁴Universidade de Franca (Unifran) – Franca, SP

RESUMO

Foram avaliadas amostras de soro sanguíneo de 10 cães saudáveis e de 12 com linfoma, utilizando-se a eletroforese em gel de poliácridamida contendo dodecil sulfato de sódio. Houve diferença entre as médias dos teores de proteína total de cães saudáveis, 7,68g/dL±0,46 e de cães com linfoma, 7,93g/dL±2,49. As concentrações de IgA e IgG não foram diferentes entre os grupos. Os teores das proteínas de pesos moleculares 142000, 110000, 52000, 49000, 24000 e 18000 dalttons foram mais elevados em cães com linfoma. Os cães com linfoma apresentaram concentrações mais elevadas de ceruloplasmina, 43,95mg/dL±18,19, e haptoglobina, 554mg/dL±449,51, e menores de albumina, 2908mg/dL±476,67, em comparação aos cães saudáveis (ceruloplasmina: 3,42mg/dL±7,44; haptoglobina: 94,54mg/dL±59,50 e albumina: 4207mg/dL±206,18). Conclui-se que concentrações séricas mais elevadas de ceruloplasmina e haptoglobina e menores de albumina podem estar associadas ao linfoma em cães.

Palavras-chave: cão, linfoma, proteinograma

ABSTRACT

Blood serum samples of ten healthy dogs and 12 dogs with lymphoma were evaluated by means of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. There was difference in total protein concentrations among healthy dogs, 7.68g/dL±0.46 and dogs with lymphoma, 7.93g/dL±2.49 values of immunoglobulins A and G presented no difference between groups. Serum proteins with molecular weights 142,000; 110,000; 52,000; 49,000; 24,000; and 18,000 Daltons presented increased concentrations in dogs with lymphoma. Dogs with lymphoma presented increased ceruloplasmin (43.95mg/dL±18.19) and haptoglobin (554mg/dL±449.51) values and lesser albumin concentration (2,908mg/dL±476.67) when compared to healthy dogs (ceruloplasmin: 3.42mg/dL±7.44; haptoglobin: 94.54mg/dL±59.50, and albumin: 4,207mg/dL±206.18). In conclusion, increased ceruloplasmin and haptoglobin and lesser albumin serum concentrations are possibly related to lymphoma in dogs.

Keywords: dog, lymphoma, serum protein

INTRODUÇÃO

O linfoma em cães é muito semelhante ao linfoma humano, particularmente com relação às características histológicas e imunológicas

(Teske, 1996). Devido a essa similaridade, a espécie canina torna-se modelo de estudo para a espécie humana (Greenlee et al., 1990; Teske, 1996; Dhaliwal et al., 2003).

Por causar distúrbios na homeostase, o desenvolvimento de neoplasias pode desencadear

Recebido em 24 de novembro de 2008

Aceito em 31 de agosto de 2009

E-mail: sgalazans@gmail.com

resposta de fase aguda, ocasionando alteração de algumas proteínas sanguíneas, denominadas proteínas de fase aguda, sobretudo quando há necrose tecidual ou reação inflamatória secundária (Gruys et al., 1994). Essas proteínas são, em sua maioria, glicoproteínas sintetizadas pelo fígado e reguladas por citocinas, tais como: fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1) e principalmente interleucina-6 (IL-6) (Gruys et al., 1994; Gabay e Kushner, 1999; Mischke e Eckersal, 2005).

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, requerendo microquantidade de amostra (Gordon, 1995). Essa técnica tem sido utilizada para obtenção do proteinograma em diversas espécies (Fagliari et al., 1998, 2008; Saquetti et al., 2008).

O presente estudo teve como objetivo caracterizar o perfil das proteínas de fase aguda do soro sanguíneo de cães saudáveis e cães com linfoma.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 22 cães com ou sem raça definida, sendo 10 animais saudáveis (cinco machos e cinco fêmeas), constituindo o grupo-controle e 12 animais com linfoma (sete machos e cinco fêmeas), cujo diagnóstico foi obtido mediante avaliação citológica e/ou histopatológica do tecido ou órgão acometido, por citologia aspirativa por agulha fina, biópsia incisional ou excisional.

Os cães foram submetidos à coleta de sangue, mediante punção da veia jugular. Após obtenção do soro, as concentrações de proteínas totais foram determinadas pelo método do biureto. Para o fracionamento das proteínas, realizou-se técnica descrita por Lammeli (1970). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada¹. Para a identificação das proteínas, foram utilizados marcadores de pesos moleculares 29000, 45000, 66000, 94000 e

205000 dalttons (D) além das proteínas purificadas haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, antitripsina e imunoglobulina G. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas, foram confeccionadas curvas de referência com base na leitura do marcador padrão.

Para determinar se os proteinogramas diferiram entre os cães saudáveis e com linfoma, os dados foram submetidos à análise de variância, considerando nível de significância de 5%, utilizando-se o programa estatístico SAS/1999-2002.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos traçados densitométricos do soro sanguíneo de cães saudáveis e de cães com linfoma, foram detectadas 16 e 17 proteínas, respectivamente (Tab. 1) (Fig. 1). Com relação ao teor de proteína total, notou-se menor valor ($P < 0,05$) em cães saudáveis, $7,68\text{g/dL} \pm 0,46$, em comparação com o verificado em cães com linfoma, $7,93\text{g/dL} \pm 2,49$. Cães com alta taxa de proteína total, ou com evidência da fração de globulina alta no perfil bioquímico devem ser avaliados mediante eletroforese sérica (Vail et al., 2001). A hiperglobulinemia é observada em aproximadamente 20% dos cães com linfoma, provavelmente por consequência da hipergamaglobulinemia (Cardoso et al., 2004). As neoplasias linfoproliferativas originárias das células B estão ocasionalmente associadas às gamopatias, devido à maior produção de globulinas (Dorfman e Dimski, 1992; Giraudel et al., 2002) ou uma subunidade da imunoglobulina (componente M) (MacEwen e Hurvitz, 1977). As imunoglobulinas A e G (cadeia leve e pesada) foram identificadas nos traçados eletroforéticos dos animais e não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os animais saudáveis e com linfoma. Este resultado, semelhante ao obtido por Madewell (1997) em cães com linfoma e saudáveis, é atribuído ao fato de haver grande variação na concentração sérica de imunoglobulinas tanto em cães saudáveis, como em cães com linfoma.

¹Shimadzu CS-9301- Tóquio, Japão.

Tabela 1. Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das proteínas (mg/dL) verificadas no proteinograma obtido em gel de poliacrilamida de cães saudáveis e cães com linfoma

Proteína	Peso molecular (d)	Cães saudáveis (n=10)	Cães com linfoma (n=12)
Proteína 1	168.000	56,98±17,88	24,44±10,17
Imunoglobulina A	145.000	25,91±10,06	19,11±16,99
Proteína 2	142.000	29,78±8,27	31,25±20,74
Proteína 3	138.000	54,13±32,11a	17,72±20,78b
Ceruloplasmina	125.000	3,42±7,44a	43,95±18,19b
Proteína 4	110.000	17,89±7,53a	30,04±30,38b
Albumina	65.000	4.207±206,18a	2.908±476,67b
Proteína 5	63.000	54,20±77,23	122,10±108,06
Imunoglobulina G (cadeia pesada)	57.000	1.002±499,11	998±907,23
Proteína 6	52.000	16,80±4,89a	32,34±23,33b
Proteína 7	49.000	5,91±4,88a	28,12±18,85b
Proteína 8	45.000	7,66±6,17	19,00±9,96
Haptoglobina	42.000	94,54±59,50a	554±449,51b
Imunoglobulina G (cadeia leve)	36.000	603±596,50	814±666,91
Proteína 9	32.000	876±140,41	556±211,02
Proteína 10	24.000	0a	7,43±16,92b
Proteína 11	18.000	4,77±7,69a	121±115,48b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) entre as proteínas.

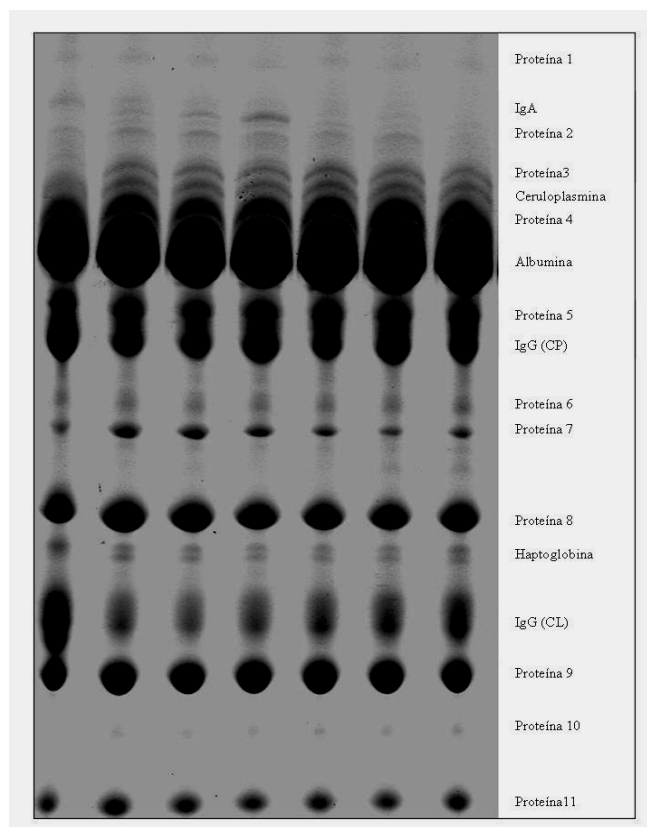


Figura 1. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) realizada com amostras de soro sanguíneo de cães com linfoma.

Algumas proteínas de fase aguda como a ceruloplasmina e haptoglobina podem ser úteis em indicar a intensidade da reação inflamatória, como descrito por Solter et al. (1991). Os cães com linfoma apresentaram concentrações mais altas de ceruloplasmina em relação aos sadios ($P < 0,05$), sugerindo reação inflamatória nestes animais. Com relação à haptoglobina, os cães com linfoma apresentaram concentrações mais elevadas quando comparados aos cães sadios ($P < 0,05$), semelhante aos resultados obtidos por Mischke e Eckersall (2005) que, ao avaliarem essa proteína em cães com linfoma, consideraram esses achados indicadores de infecção e septicemia. A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa nos mamíferos, ou seja, sua concentração diminui em resposta à inflamação aguda (Murata et al., 2004). Essa proteína apresentou concentrações maiores nos cães sadios ($P < 0,05$) devido à manifestação de hipoalbuminemia em cães com linfoma, o que pode sugerir prognóstico desfavorável (Price et al., 1991).

Em cães com linfoma, as concentrações das proteínas de pesos moleculares 142000, 110000, 52000, 49000, 24000 e 18000D foram mais elevadas ($P < 0,05$). Os traçados densitométricos dos cães sadios e dos cães com linfoma mostraram que a proteína de peso molecular 24000D esteve ausente nas amostras dos cães sadios. As proteínas com pesos moleculares 168000, 138000, 63000, 45000 e 32000D não diferiram estatisticamente entre os cães sadios e com linfoma.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos pela SDS-PAGE sugerem que concentrações séricas mais elevadas de ceruloplasmina e haptoglobina e menores de albumina podem estar associadas ao linfoma em cães.

AGRADECIMENTO

À FUNDUNESP, pelo auxílio financeiro concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CARDOSO, M.J.L.; MACHADO, L.H.A.; MOUTINHO, F.Q. et al. Sinais clínicos do linfoma canino. *Arch. Vet. Sci.*, v.9, p.25-29, 2004.
- DHALIWAL, R.S.; KITCHELL, B.E.; MESSICK, J.B. Canine lymphosarcoma: clinical features. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.25, p.573-581, 2003.
- DORFMAN, M.; DIMSKI, D.S. Paraproteinemias in small animal medicine. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.*, v.14, p.621-632, 1992.
- FAGLIARI, J.J.; McCLENAHAN, D.; EVANSON, O.A. et al. Changes in plasma protein concentration in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v.59, p.1234-1237, 1998.
- FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L.; SILVA, P.C. et al. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.322-328, 2008.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.*, v.340, p.448-454, 1999.
- GIRAUDEL, M.J.; PAGÈS, J.; GUELFY, J. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, v.38, p.135-147, 2002.
- GORDON, A. H. *Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels*. New York: Elsevier, 1995. 213p.
- GREENLEE, P.G.; QUIMBY, F.W.; CALVANO, S.E. et al. Lymphomas in dogs. *Cancer*, v.66, p.480-490, 1990.
- GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSAINT, M. J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, v.64, p.1009-1018, 1994.
- LAMMELI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.277, p.680-685, 1970.
- MacEWEN, E.G.; HURVITZ, A.I. Diagnosis and management of monoclonal gamopathies. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.*, v.7, p.119-132, 1977.
- MADEWELL, B.R. Tumor markers. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. San Diego: Academic, 1997. p.761-784.

- MISCHKE, R.; ECKERSALL, P.D. Changes in c-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON ANIMAL ACUTE PHASE PROTEINS, 2005, Dublin, Ireland. *Abstracts and Proceedings Book*. Dublin, 2005. p.35.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIMOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet. J.*, v.168, p.28-40, 2004.
- PRICE, G.S.; PAGE, R.L.; FISCHER, B.M. et al. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. *J. Vet. Int. Med.*, v.5, p.259-262, 1991.
- SAQUETTI, C.H.C.; FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.794-799, 2008.
- SOLTER, P.F.; WALTER, E.H.; HUNGERFORD, L.L. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v.52, p.1738-1742, 1991.
- TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.*, v.6, p.59-71, 1996.
- VAIL, D.M.; MacEWEN, E.G.; YOUNG, K.M. Canine lymphoma and lymphoid leukemias. In: WITHROW, S.; MacEWEN, E.G. *Small animal clinical oncology*. 3.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. p.558-90.