

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

**“ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS DE
CÃES LINFOMATOSOS, SUBMETIDOS AO PROTOCOLO
QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN”**

Manuela Cristina Vieira

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**“ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM
CÃES LINFOMATOSOS, SUBMETIDOS AO PROTOCOLO
QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN”**

Manuela Cristina Vieira

Orientador: Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho 2009

V657e Vieira, Manuela Cristina
Eletroforetograma de proteínas séricas de cães linfomatosos,
submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin /
Manuela Cristina Vieira. -- Jaboticabal, 2009
xv, 91 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009
Orientador: Aureo Evangelista Santana
Banca examinadora: Alessandra Kataoka, Maria Angélica Dias
Bibliografia

1. Cão. 2. Linfoma. 3. Proteínas de fase aguda
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 619:636.7:616.006.44

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

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MANUELA CRISTINA VIEIRA – nascida em 4 de novembro de 1977, na cidade de Ituverava-SP; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) – Alfenas-MG, em março de 1996, concluindo-o em dezembro de 2000. Trabalhou na área de Clínica, Cirurgia e Patologia Clínica de Pequenos Animais, em Ribeirão Preto-SP, nos anos de 2001 à 2007. Realizou curso de especialização “Lato Sensu” em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais, na Fundação de Ensino Octávio Bastos (UNIFEOB), São João da Boa Vista-SP, no período de maio de 2001 à junho de 2002. Realizou curso de especialização “Lato Sensu” em Homeopatia Veterinária, no Instituto Homeopático Françoi Lamasson, Ribeirão Preto-SP, no período de março de 2003 à dezembro de 2005. Ingressou no curso de mestrado na área de Cirurgia Veterinária em agosto de 2007, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sendo este concluído em julho de 2009.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da FCAV – UNESP (protocolo nº 018137-08).

Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade; outras, para alcançarem fama, e isso é vaidade; outras, para enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificarem os outros, e isso é caridade.

(São Tomás de Aquino)

DEDICO

*Aos meus queridos pais, Erlon e Darci,
pelo amor incondicional, carinho,
incentivo e apoio durante toda minha vida...*

*À minha melhor amiga, minha irmã Helena,
que sempre me mostrou como é divino ter uma irmã...*

*À minha querida avó Maria, que sempre
abençoou meu caminho com suas orações...*

*À todos os animais que fizeram parte deste estudo,
auxiliando o desenvolvimento da ciência...*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre iluminar minha vida, me abençoando e conduzindo aos melhores caminhos....

Ao Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, pela oportunidade e orientação no mestrado, e pelo apoio e credibilidade durante esses dois anos de convívio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo importante auxílio financeiro em forma de bolsa de estudo, propiciando a dedicação exclusiva a pós-graduação.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia Clínica, Eugênio de Campos Filho e Mateus Yamasaki, pela ajuda e disposição sempre que necessário.

Ao Grupo de Patologia Clínica, “Grupo Linfoma”, composto pelo Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana e pelas pós-graduandas Dra. Maria Luisa Buffo Cápua, Dra. Flávia Eiras Dela Coleta, MSc. Aline Vieira Godoy, MSc. Mariana Miotto e Profa. Dra. Ana Paula M. Nakage Canesin, que foram sempre solícitas desde o início.

Às ex-residentes do Laboratório de Patologia Clínica, Letícia Abrahão Anai e Andressa F. Silva Nogueira, e à residente Alessandra Hideko Sumitomo pela amizade e convivência.

À nova amiga, Aline Vieira Godoy, pelas palavras carinhosas e apoio durante todo o mestrado.

Às amigas de coração M.V. Karina Ferreira de Castro, MSc. Thais de Paula Melo, MSc. Vanessa Páfaro e MSc. Natália Nespolo, pela amizade e pelos bons momentos que passamos juntas.

À amiga Profa. Dra. Elizabeth M. dos S. Schmidt, que mesmo diante de tantas dificuldades, me auxiliou nas correções da minha dissertação e participou da minha banca de qualificação.

À Profa. Dra. Márcia Ferreira da Rosa Sobreira, pela amizade, pelas correções e por ter participado da minha banca de qualificação.

À Profa. Dra. Alessandra Kataoka, pela simpatia e pela participação na minha banca de defesa.

À Profa. Dra. Maria Angélica Dias, por aceitar o convite de participar na minha banca de defesa.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, pela atenção e auxílio nas dúvidas sobre eletroforese.

Ao Dr. Paulo César da Silva e a Cláudia A. da Silva Nogueira, funcionários do Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal/SP, pelo auxílio na realização do experimento das análises eletroforéticas.

À Dra. Heloísa da Silva, pela amizade e por ter sido tão prestativa durante a fase de experimentos no CPPAR.

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

À Profa. Dra. Rosângela Zacarias Machado, pelo auxílio nas dúvidas sobre diagnóstico.

Ao Prof. Dr. Hélio José Montassier, pela ajuda nas dúvidas de imunologia.

À MSc. Sabryna Gouveia Calazans, pelo auxílio nas dúvidas sobre eletroforese .

À Dra. Paula Alessandra Di Filippo, pelo material cedido de eletroforese.

À pós-graduação e seus funcionários, que sempre foram solícitos na resolução de todas as dúvidas no decorrer do mestrado.

Aos funcionários da Biblioteca da FCAV/Unesp, Jaboticabal, em especial à Núbia Lopes Brichi, Tieko Sugahara e Fátima Isabel Ziviane, pelo auxílio nas referências bibliográficas.

Às ex-graduandas Fernanda K'roll e Lívia Semolin, pelo auxílio na eletroforese.

Às estagiárias Natália Luz e Cristiane C. Vilela dos Reis, pelo auxílio durante a fase de experimento.

Muito Obrigada!!!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Linfoma Canino.....	2
2.2 Quimioterapia Antineoplásica.....	4
2.3 Proteínas Séricas Totais.....	7
2.4 Eletroforese de Proteínas de Fase Aguda (PFA).....	8
2.5 Relação Albumina:Globulina.....	16
2.6 Eletroforese de PFA no Linfoma.....	20
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Parcelas Experimentais.....	20
4.2 Quimioterapia Antineoplásica.....	21
4.3 Colheita de Sangue.....	22
4.4 Preparação das Amostras.....	22
4.5 Análises Laboratoriais.....	23
4.6 Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Frações Protéicas.....	32
5.2 Proteína Total.....	34
5.3 Albumina.....	36

5.4 Globulina.....	38
5.5 Relação Albumina:Globulina.....	40
5.6 Alfa-1-Antitripsina.....	42
5.7 Alfa-1-Glicoproteína Ácida.....	44
5.8 Ceruloplasmina.....	46
5.9 Haptoglobina.....	48
5.10 Transferrina.....	50
5.11 Imunoglobulina A.....	52
5.12 Imunoglobulina G (cadeia pesada).....	54
5.13 Imunoglobulina G (cadeia leve).....	56
5.14 Proteína nº9 (33KD).....	58
5.15 Proteína nº11 (23KD).....	60
6. DISCUSSÃO.....	62
7. CONCLUSÕES.....	75
8. REFERÊNCIAS.....	76
Apêndice.....	91

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Dados gerais dos cães linfomatosos.....	21
Tabela 2. Protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (RODASKI e DE NARDI, 2006 (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	22
Tabela 3. Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das frações protéicas (g/dL), verificadas na SDS-PAGE em cães saudáveis e linfomatosos, antes da primeira sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	30
Tabela 4. Médias e desvios-padrão das concentrações séricas das frações protéicas (g/dL), verificadas na SDS-PAGE em cães linfomatosos, antes de cada sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cubas de eletroforese e placas de vidro (Arquivo pessoal).....	25
Figura 2. Agitador horizontal (Arquivo pessoal).....	25
Figura 3. Densitômetro computadorizado (Arquivo pessoal).....	25
Figura 4. Escaneamento das amostras (Arquivo pessoal).....	25
Figura 5. Marcação de pontos (Arquivo pessoal).....	25
Figura 6. Curva eletroforética (Arquivo pessoal).....	25
Figura 7. Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães com linfoma. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1-antitripsina (60 KD) e a IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37 KD). Ao final (F) do gel estão as proteínas nº 9 (33 KD), IgG (cadeia leve) (25 KD) e a proteína nº 11 (23 KD) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	27
Figura 8. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) das frações protéicas albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada), IgG (cadeia leve), proteína nº 9 (33 KD) e proteína nº 11 (23 KD), respectivamente, verificadas na SDS-PAGE, em cães sadios e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	33
Figura 9. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína Total, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal).....	35
Figura 10. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Albumina, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).....	37

- Figura 11. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) das Globulinas, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 39
- Figura 12. Representação gráfica das relações Albumina:Globulina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 41
- Figura 13. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Alfa-1-antitripsina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 43
- Figura 14. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Alfa-1-glicoproteína ácida, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 45
- Figura 15. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Ceruloplasmina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009) 47
- Figura 16. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Haptoglobina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009) 49
- Figura 17. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Transferrina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009) 51
- Figura 18. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Imunoglobulina A (IgA), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e

- linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 53
- Figura 19. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Imunoglobulina G (IgG) (cadeia pesada), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 55
- Figura 20. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Imunoglobulina G (IgG) (cadeia leve), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 57
- Figura 21. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína nº 9 (33 KD), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 59
- Figura 22. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína nº 11 (23 KD), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009)..... 61

“ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM CÃES LINFOMATOSOS, SUBMETIDOS AO PROTOCOLO QUIMIOTERÁPICO DE MADISON-WISCONSIN”

RESUMO – O linfoma é o principal tumor hematopoiético no cão e é caracterizado pela proliferação de células originadas do tecido linfóide, histiócitos e seus precursores. Os animais com linfoma frequentemente apresentam alterações hematológicas e bioquímico-séricas, tais como anemia normocítica normocrômica não regenerativa, anemia hemolítica, hipercalcemia e gamopatia monoclonal. O objetivo desse estudo foi quantificar e qualificar as proteínas séricas totais e suas frações, em cães saudáveis e linfomatosos, sendo estes submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin. Após sinérese, centrifugação e obtenção das amostras de soro, de 10 cães saudáveis e 10 cães linfomatosos, as proteínas de fase aguda foram separadas por eletroforese em matriz de gel de poliácridamida, e suas concentrações determinadas por densitometria computadorizada. Foram encontradas de 18 a 31 proteínas no fracionamento eletroforético, com pesos moleculares variando de 18 a 245 KD (kilodáltons). Os pesos moleculares obtidos foram: IgA, 170 KD; ceruloplasmina, 125 KD; transferrina, 85KD; albumina, 65 KD; α 1-antitripsina, 60 KD; IgG (cadeia pesada), 50 KD; haptoglobina, 39 KD; α 1-glicoproteína ácida, 37 KD; proteína nº 9, 33 KD; IgG (cadeia leve), 25 KD; e proteína nº 11, 23 KD. Os resultados mostraram que algumas proteínas de fase aguda se alteram no linfoma. A α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida, transferrina, IgG (cadeia pesada) e globulinas apresentaram diferenças significativas entre cães saudáveis e linfomatosos, no momento zero, antes da 1ª sessão de quimioterapia. Já nos cães linfomatosos, somente a concentração da proteína nº 9 (33KD) apresentou diferença significativa, durante o protocolo quimioterápico.

Palavras-chave: cão, eletroforese, linfoma, proteínas de fase aguda, quimioterapia

“ELECTROPHORETOGRAM OF SERUM PROTEINS IN DOGS WITH LYMPHOMA, UNDER WENT THE MADISON-WISCONSIN CHEMOTHERAPY PROTOCOL”

SUMMARY- The lymphoma is the principal hematopoietic tumor in dogs and it is characterized by the proliferation of cells from lymphoid tissue, histiocytes and its precursors. Animals with lymphoma often showed changes in biochemical and hematological parameters of those animals such as non-regenerative normocromica normocytic anemia, hemolytic anemia, hypocalcemia and monoclonal gamopatia. The purpose of this study was quantify and qualify the serum total proteins and its fraction, in dogs healthy and with lymphoma, these under went the Madison-Wisconsin chemotherapy protocol. After centrifugation and fractioning of the serum samples, the acute phase proteins were separated by polyacrilamide gel electrophoresis, and their concentrations were determined by computer densitometry. Between eighteen and thirty proteins were separated by eletrophoresis, with molecular weights ranged from 18 to 245 KD (kilodaltons). The molecular weights of the proteins more found were: IgA, 170 KD; ceruloplasmin, 125 KD; transferrin, 85 KD; albumin, 65 KD; α 1-antitripsin, 60 KD; IgG (weighty chain), 50 KD; haptoglobin, 39 KD; α 1-acid glycoprotein, 37 KD; protein n^o 9, 33 KD; IgG (light chain), 25 KD and protein n^o 11, 23 KD. The results showed that some acute phase proteins changed in lymphoma. The α 1-antitripsina, α 1-acid glycoprotein, transferring, IgG (weighty chain) and globulins, showed significantly differences between healthy and lymphoma dogs, in time zero, before 1^a chemotherapy session. In dogs with lymphoma, only protein n^o 9 (33KD) showed significantly diference, during chemotherapy protocol.

Keywords: dog, electrophoresis, lymphoma, acute phase proteins, chemotherapy

1. INTRODUÇÃO

O linfoma é uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas no cão e corresponde a mais de 80% das neoplasias hematopoiéticas nesta espécie (ROSENTHAL e MACEWEN, 1990; OGILVIE e MOORE, 1995; DHALIWAL et al., 2003a). O linfoma é caracterizado pela proliferação de células linfóides malignas, que afeta primariamente os linfonodos ou órgãos viscerais sólidos como fígado e baço. Sua incidência é considerável em todas as espécies de animais domésticos, principalmente em cães e gatos (MACEWEN e YOUNG, 1996).

Animais acometidos por linfoma, frequentemente apresentam alterações nos índices hematológicos e bioquímicos, como anemia normocítica normocrômica não regenerativa, anemia hemolítica, hipercalcemia e gamopatia monoclonal, muitas vezes consideradas como síndromes paraneoplásicas (DHALIWAL et al., 2003a).

A quimioterapia antineoplásica é a principal conduta terapêutica para o tratamento de cães com linfoma, uma vez que este é o tumor que melhor responde a esta modalidade de tratamento (ROSENTHAL e MACEWEN, 1990; OGILVIE e MOORE, 1995; DHALIWAL et al., 2003b). Entretanto, os fármacos antineoplásicos podem causar vários efeitos tóxicos, especialmente aos sistemas celulares que estão em constante divisão, como o tecido hematopoiético, exigindo que os animais em quimioterapia sejam monitorados periodicamente durante todo o tratamento (KOCHEVAR e MEALEY, 1997; BARGER e GRINDEM, 2000).

Em neoplasias, como no linfoma, pode ocorrer a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado. A fase aguda é caracterizada como uma resposta inicial às diferentes modalidades de injúrias, invasão bacteriana, inflamação localizada ou sistêmica, sendo acompanhada de febre, liberação de glicocorticóides, ativação do complemento (BAUMANN e GAULDIE, 1994; HEINDRICH et al., 1990), busca do reequilíbrio e síntese de certas proteínas plasmáticas pelo fígado (GRUYS et al., 1994). Estas proteínas são glicoproteínas reguladas por citocinas, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1 (IL-1) e principalmente a interleucina-6 (IL-6) (GRUYS et

al., 1994; KANEKO, 1997; GABAY e KUSHNER, 1999; MISCHKE e ECKERSAL, 2005; THOMAS, 2000).

A separação das diferentes frações protéicas é alcançada graças à carga elétrica da molécula de proteína, tamanho da proteína, pH alcalino do meio e tampão de corrida eletroforética. A eletroforese se caracteriza pela migração da proteína em um campo eletromagnético em diferentes velocidades (NELSON e COX, 2000). O fracionamento eletroforético é um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação de proteínas dos fluidos corpóreos (KANEKO et al., 2008).

Os cães linfomatosos apresentam importantes alterações no traçado eletroforético (ECKERSALL, 2008), portanto idealizou-se o presente ensaio com o objetivo principal de avaliar estas alterações desde o momento do diagnóstico até o final do protocolo quimioterápico, utilizando-se a técnica de eletroforese em matriz de gel de poliacrilamida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linfoma Canino

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

A etiologia é desconhecida (VAIL et. al., 2003; DHALIWAL et al., 2003a; ETTINGER, 2003; FAN, 2003) sendo acometidos normalmente os cães a partir da meia-idade, não havendo predileção por sexo e raça (ETTINGER, 2003). A presença de agentes virais não foi comprovada na espécie canina, diferentemente do que relatado no homem, felinos, bovinos, roedores, aves e primatas. Fatores ambientais como exposição crônica a substâncias químicas, como o herbicida 2,4 ácido fenoxiacético, predispõem ao desenvolvimento de linfoma em cães. Pode haver, também

predisposição genética para o desenvolvimento de linfoma em cães de raça pura (MORRISON, 2004). De acordo com o mesmo autor, as raças mais acometidas são os Boxers, Scottish Terriers, Basset Hounds, Airdale Terriers, Chow Chows, Poodles, Pastores Alemães, São Bernardos, Beagles, Golden Retrievers e Bulldogs.

O linfoma é classificado quanto a sua localização anatômica em multicêntrico (mais comum), alimentar (digestivo), cutâneo, mediastinal (tímico) e extranodal (solitário). O multicêntrico acomete os linfonodos periféricos e profundos, podendo envolver órgãos como o fígado, baço, rins, pulmão, coração, trato gastrointestinal e medula óssea. O alimentar acomete o trato gastrointestinal e linfonodos regionais, podendo envolver órgãos abdominais como o fígado, baço e rins. O mediastinal acomete o timo e linfonodos regionais. A forma cutânea acomete a pele sob a forma de massas sólidas ou múltiplas, estas, acompanhadas ou não de envolvimento sistêmico. O extranodal envolve apenas um órgão (DHALIWAL et al., 2003a).

O estadiamento clínico obedece às regras estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que classifica o linfoma em estágio I (comprometimento de um linfonodo), II (comprometimento de linfonodos regionais), III (linfadenomegalia generalizada), IV (comprometimento do fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia) e V (comprometimento do sangue, medula óssea e/ou outros órgãos), com sub-estádios “a”, sem sinais sistêmicos e “b”, com sinais sistêmicos (FAN e KITCHELL, 2002).

O linfoma multicêntrico (estádio III ou IV) representa a maioria dos casos (80 a 85%) nos cães. As formas alimentar (7%), cutânea (6%), mediastinal (3%) e extranodais diversas (neurológico, ósseo, cardíaco, nasal, ocular) são encontrados com menor frequência (VAIL, 2003). De acordo com o esquema de classificação histológica utilizado (Kiel ou *National Cancer Institute*), a maioria (80%) dos linfomas caninos é similar aos linfomas não-Hodgkin humanos de médio e alto grau. Aproximadamente 70 a 80% dos linfomas caninos têm derivação imunofenotípica de célula B e o restante é derivado de células T (VAIL, 2003).

O prognóstico de cães com linfoma está relacionado à imunofenotipagem e sub-estádio estabelecido pela OMS. Os tumores imunorreativos CD3 (derivados de células

T) têm remissão mais curta e os animais com sinais clínicos de linfoma (sub-estádio “b”) têm prognóstico reservado (VAIL, 2003).

Com relação à classificação histológica, dispõe-se do sistema *Revised European American Lymphoma (REAL)* (HARRIS et. al., 1994), que classifica o linfoma baseado na histologia, imunofenótipo (de células T ou B), genótipo e fatores clínicos, com valor prognóstico relevante, especialmente quando associado ao estadiamento clínico da OMS (ISAACSON, 2000; DOBSON, 2004; PONCE et al., 2004). A oncologia veterinária tem procurado adaptar vários esquemas da classificação histológica do linfoma humano para a classificação de linfoma em animais. O esquema de Rappaport e Kiel são esquemas de classificação antigos utilizados tanto na oncologia humana quanto veterinária (MORRISON, 2004).

O linfoma canino apresenta muitas semelhanças com o linfoma humano, particularmente com relação às características histológicas e imunológicas e à responsividade aos agentes antineoplásicos (TESKE, 1994). Devido a esta similaridade, o linfoma canino torna-se um potencial modelo de estudo para a espécie humana (GREENLEE et al., 1990; TESKE, 1994; DHALIWAL et al., 2003a).

As principais diferenças entre o linfoma em humanos e em animais refere-se a uma maior proporção de linfomas de alto grau e a baixíssima frequência de tumores de Hodking em animais (MORRISON, 2004).

O protocolo quimioterápico COP (ciclofosfamida, sulfato de vincristina e prednisona) há muito tempo tem sido usado no tratamento de linfoma canino, sendo considerado como padrão (MYERS et al., 1997). Porém, no protocolo de Madison-Wisconsin há uma alta proporção de pacientes que sobrevivem por um a dois anos. Desta forma, há uma tendência em eleger-se, hoje em dia, o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin para o tratamento de linfoma em cães (CHUN et al., 2000).

2.2 Quimioterapia Antineoplásica

O linfoma é a neoplasia que melhor responde à quimioterapia antineoplásica, sendo esta a principal conduta terapêutica para os cães linfomatosos (ROSENTHAL e MACEWEN, 1990; OGILVIE e MOORE, 1995; DHALIWAL et al., 2003b).

A resposta do paciente à quimioterapia pode ser classificada em (1) remissão completa: desaparecimento da doença clínica; (2) remissão parcial: diminuição em 50% do tamanho do tumor sem evidência de novos tumores; (3) doença estável: diminuição ou aumento em até 50% do tamanho do tumor, sem desenvolvimento de outro tumor e (4) doença progressiva: aumento em pelo menos 50% do tamanho do tumor, ou o aparecimento de novos tumores.(DHALIWAL et al., 2003a).

As etapas da quimioterapia do linfoma canino incluem a indução da remissão, manutenção da remissão e reindução da remissão ou terapia de resgate (MACEWEN e YOUNG, 1996).

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

A poliquimioterapia é a modalidade mais utilizada e eficaz no tratamento de cães com linfoma (DHALIWAL et al., 2003b).

O protocolo quimioterápico padrão para o tratamento de linfoma canino é a associação de ciclofosfamida, vincristina e prednisona (COP) (KITCHELL e DHALIWAL, 2000; RODASKI e DE NARDI, 2006). Aproximadamente 90% dos casos de linfoma multicêntrico respondem favoravelmente a este protocolo e, embora exista uma variação individual considerável, o tempo médio de sobrevivência é de nove meses (DOBSON e GORMAN, 1994) e o de remissão é de seis meses (KITCHELL e DHALIWAL, 2000).

Outro protocolo que se tornou popular no tratamento do linfoma canino é o protocolo de Madison-Wisconsin, uma combinação das drogas L-asparaginase, vincristina, prednisona, ciclofosfamida e doxorrubicina. Há relatos de que o referido protocolo é capaz de promover a mais longa remissão e tempo de sobrevivência para cães com linfoma (MORRISON, 2004).

A L-asparaginase é um agente antineoplásico obtido de organismos como a *Escherichia coli* e a *Erwinia carotovora*. Ela é uma enzima capaz de destruir as reservas

exógenas do aminoácido asparagina, uma vez que este aminoácido é vital ao processo de síntese protéica das células neoplásicas. A enzima L-asparaginase é um antitumoral específico do ciclo celular. A vincristina é um alcalóide vegetal extraído da planta “Vinca Rósea” (*Catharanthus roseus*) que age inibindo a mitose, pois é um fármaco ciclo celular específico. A prednisona é um hormônio que atua em receptor celular específico, causando a cisão do DNA, prevenindo a divisão celular. A ciclofosfamida é uma mostarda nitrogenada, classificada como agente alquilante que atua inibindo a síntese e divisão do DNA e é um fármaco antineoplásico ciclo celular não específico. A doxorrubicina é um antibiótico antitumoral derivado de culturas de *Streptomyces peucetius*, e é um inibidor da transcriptase reversa da RNA polimerase. Sendo assim, impede a síntese de DNA e RNA e é um agente ciclo celular não específico (RODASKI e DE NARDI, 2006).

A toxicidade hematológica é um fator limitante da quimioterapia. Trata-se do efeito colateral mais freqüente e mais grave, por dois motivos. Primeiramente, porque pode comprometer a quimioterapia de maneira transitória ou definitiva, uma vez que a diminuição da dose determinada pode prejudicar a eficácia do tratamento. Em segundo lugar, porque relaciona-se ao risco potencial de morte do animal em decorrência de neutropenia séptica. A ciclofosfamida possui mielotoxicidade elevada e a vincristina, na dose de $0,75 \text{ mg/m}^2$, possui mielotoxicidade moderada (LANORE e DELPRAT, 2004).

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

2.3 Proteínas Séricas Totais

As proteínas são substâncias essenciais à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica sob a forma de anticorpos (JAIN, 1993; KANEKO et al., 2008).

As proteínas séricas totais compreendem a albumina e globulinas sem o fibrinogênio, pois este é totalmente consumido na formação do coágulo sanguíneo. Já as proteínas plasmáticas totais compreendem a albumina, globulinas e o fibrinogênio. A albumina e todas as outras proteínas, com exceção das imunoglobulinas, são sintetizadas pelo fígado, incluindo o fibrinogênio e as α -globulinas. As imunoglobulinas (IgG, IgA, IgM e IgE) são sintetizadas pelos plasmócitos e linfócitos B no tecido linfóide em resposta à estimulação antigênica, e estão incluídas nas frações beta e gama-globulinas (ECKERSALL, 2008).

Em animais com distúrbios na homeostase devido à infecção, inflamação, injúria tecidual, neoplasia ou desordem imunológica, há uma resposta de fase aguda inespecífica. Esta resposta compreende alterações na concentração de algumas proteínas séricas referidas como proteínas de fase aguda (PFA). Quando uma PFA apresenta sua concentração aumentada no soro ou plasma é considerada uma proteína de fase aguda positiva (alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina e haptoglobina), e quando sua concentração está diminuída é considerada uma proteína de fase aguda negativa (pré-albumina, albumina e transferrina). As PFA positivas são glicoproteínas produzidas e liberadas pelos hepatócitos a partir de estímulo específico de citocinas (interleucina-1-IL-1, interleucina-6-IL-6, fator alfa de necrose tumoral-TNF- α) (GRUYS et al., 1994; KANEKO, 1997, ECKERSALL, 2008).

A mensuração das concentrações das proteínas de fase aguda, pode auxiliar, muitas vezes, no monitoramento de protocolos terapêuticos em cães com determinadas neoplasias (CÉRON et al., 2005). Segundo ECKERSALL (2004), estas proteínas, além de úteis no auxílio diagnóstico de linfomas em pacientes humanos, leucemia e mieloma múltiplo, são indicadoras de prognóstico, permitindo detectar precocemente a sepse.

Pesquisas recentes têm evidenciado que a qualificação e a quantificação de proteínas séricas podem subsidiar o diagnóstico e trazer valiosas informações prognósticas e de monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000).

Apesar de 289 proteínas serem relatadas em soros humanos (ANDERSON e ANDERSON, 2002), somente 70 foram validadas. Dessas proteínas, somente 10 são comumente empregadas para teste diagnóstico em animais domésticos (ECKERSALL, 2008).

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

2.4 Eletroforese de Proteínas de Fase Aguda (PFA)

A eletroforese é uma técnica na qual os diferentes tipos de proteínas séricas ou plasmáticas são separados, tornando possível a determinação de suas proporções relativas em uma dada amostra. Em um pH alcalino, o soro ou o plasma, em um suporte de gel de poliacrilamida ou outro meio, é colocado em um campo elétrico que propicia a migração das diferentes frações de proteínas em diferentes velocidades em direção ao ânodo. Após a coloração, estas frações aparecem como bandas de intensidade de cor variável, que podem ser escaneadas por um densitômetro computadorizado para produzir uma curva eletroforética (THOMAS, 2000; ECKERSALL, 2008).

O mecanismo fisiopatológico que envolve a resposta de fase aguda, pode ser útil para realçar as três maiores características dessa resposta. A resposta de fase aguda é uma resposta rápida, que se desenvolve antes da estimulação da resposta imune específica e em muitos casos antes do início dos sinais clínicos. Portanto, isso pode ser considerado como uma indicação precoce para algum processo patológico ou doença. A resposta de fase aguda é altamente não específica, porque se desenvolve secundariamente a numerosas condições que podem produzir injúria tecidual. A produção e resposta das PFA depende de cada espécie. Por exemplo, em cães, uma

resposta forte ocorre com a proteína C reativa, entretanto, em gatos, um aumento significativo dessa proteína não tem sido detectado após um estímulo inflamatório (CERÓN et al., 2005).

A albumina migra com maior rapidez e aparece como um pico alto e distinto em uma das pontas da curva, geralmente localizada à esquerda. Além da albumina, estão arranjadas as globulinas, alfa, beta e gama (α , β e γ) e, em muitos casos, cada uma delas pode ser claramente subdividida em duas bandas (α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ_1 , e γ_2). A aparência do traçado eletroforético pode ser distinta em doenças específicas, como por exemplo, nos casos de hipoalbuminemia e gamopatias policlonais e monoclonais (BUSH, 2004; ECKERSALL, 2008).

A eletroforese permite uma avaliação aproximada das concentrações de várias proteínas importantes, cujas alterações estruturais, seja de regulação de suas sínteses, ou de seu maior consumo, podem refletir nas suas modalidades eletroforéticas ou nas suas concentrações (KANEKO et al., 1997; NAOUM et al., 1999; FELDMAN, 2000).

O eletroforetograma das proteínas pode ser obtido utilizando-se de soro ou plasma. O soro geralmente é preferido, pois o fibrinogênio do plasma pode tornar obscuro o eletroforetograma na região β - γ . Na eletroforese, as proteínas são separadas de acordo com suas taxas de migração em um campo elétrico. A taxa de migração depende da carga e tamanho da proteína, da força do campo elétrico e do meio que as proteínas migram. A taxa de migração das proteínas pode ser afetada pelo pH, força iônica e composição do sistema tampão usado (KANEKO, 1997; THOMAS, 2000).

Entre os meios disponíveis para fracionamento das proteínas em laboratórios clínicos, existem as eletroforeses em acetato de celulose, gel de agarose, papel, gel de amido e gel de poliacrilamida (NAOUM et al., 1999).

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 protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, necessitando apenas microquantidades de amostra (GORDON, 1995). Esta técnica tem sido utilizada para obtenção do proteinograma em diversas espécies (FAGLIARI et al., 1998; FAGLIARI e SILVA, 2002; FAGLIARI, et al., 2003).

Em cães saudáveis, o traçado eletroforético das proteínas séricas consiste no pico agudo da albumina, que migra primeiro em direção ao ânodo, seguida pela alfa-1 e alfa-2-globulinas, beta-1 e beta-2-globulinas, gama-1 e gama-2-globulinas (KANEKO et al., 2008).

A albumina corresponde a 60% da concentração total de proteínas, portanto, é a proteína mais abundante no plasma (KANEKO et al., 2008). A albumina é sintetizada pelos ribossomos no citoplasma de hepatócitos, transferida para o retículo endoplasmático rugoso, retículo endoplasmático liso e complexo de golgi, através da membrana dos sinusóides (PRINSEN e SAIN-VAN der VELDEN, 2004). A albumina aparece no citoplasma dos hepatócitos como um precursor chamado pré-albumina (KANEKO et al., 2008). A taxa de albumina sintetizada é controlada pela pressão coloidosmótica, embora ela possa ser influenciada por hormônios tais como a insulina, tiroxina e cortisol (EVANS, 2002). Somente cerca de 30 a 40% da albumina está no sangue, o restante está no espaço intersticial. Músculos, fígado e rins são os principais colaboradores para o catabolismo da albumina com 40 a 60% da albumina total metabolizada nesses tecidos (PRINSEN e SAIN-VAN der VELDEN, 2004).

Além da manutenção da pressão coloidosmótica, a segunda principal função da albumina é o transporte de substâncias. Diversos metabólitos no sangue se unem a albumina, e essa união auxilia o transporte de substâncias que são solúveis em meio aquoso e também evita perdas, através do rim, de importantes moléculas pequenas. Assim, ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, óxido nítrico e íons circulam com a albumina (EVANS, 2002; KANEKO et al., 2008). Adicionalmente, a interpretação da diminuição da concentração sérica das proteínas de fase aguda negativa é complicada, porque elas também são afetadas pelo estado nutricional, perdas protéicas e diminuição da síntese (ECKERSALL, 2008).

A fração alfa é a que migra mais rapidamente de todas as globulinas e, na maioria das espécies, exceto nos ruminantes, desdobra-se nas subfrações alfa-1 e alfa-2. As proteínas mais importantes destas frações são as alfalipoproteínas (lipoproteína de alta densidade - HDL), que migram como alfa-1, as pré-betalipoproteínas (lipoproteína de densidade muito baixa - VLDL) e haptoglobinas, as quais migram na

região de alfa-2. Na região alfa também há globulina-tiroxina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, alfa-1-antitrombina III, alfa-2-macroglobulina e a ceruloplasmina (TRUMEL et al., 1996; KANEKO et al., 2008; ECKERSALL, 2008).

Segundo THOMAS (2000), elevados picos de alfa-globulina podem ocorrer na reação de fase aguda e têm sido relatados em cães com diversas neoplasias.

A haptoglobina é uma glicoproteína composta de subunidades 2-alfa e 2-beta, com a subunidade alfa tendo peso molecular de 16 a 23 KD (kilodáltons) e a subunidade beta de 35 a 40 KD. A haptoglobina é uma alfa-2-globulina e, forma um complexo protéico com a hemoglobina livre plasmática que é removido, posteriormente, por fagocitose realizada por células do sistema mononuclear fagocitário. Nas síndromes hemolíticas ocorre marcante diminuição das haptoglobinas podendo, por isso, ser utilizada como um sensível índice de hemólise (BOWMAN, 1992; NAOUM et al., 1999; YANG et al., 2003).

O perfil de fase aguda da haptoglobina difere entre as espécies animais. Em caninos, felinos, eqüinos e suínos, o nível normal é de 0,1g/dL a 0,2g/dL, entretanto, durante doenças inflamatórias e infecciosas ela pode aumentar para 0,5g/dL ou mais (ECKERSALL, 2008).

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda positiva moderada em cães e aparece em injúria tecidual, doenças inflamatórias e infecciosas. Entretanto, a haptoglobina canina é particularmente sensível a glicocorticosteróides, e o nível elevado de haptoglobina é encontrado após o tratamento com glicocorticosteróides e durante a ocorrência normal de hiperadrenocorticismos (HARVEY e WEST, 1987; SKINNER et al., 1999; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004; McGROTTY et al., 2005).

A alfa-1-antitripsina (AAT) é o componente mais importante entre os “inibidores de proteases”, que é um grupo de proteínas com a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante um processo inflamatório agudo. Desta forma, sua síntese é estimulada durante a resposta inflamatória aguda. O aumento da AAT é característico das hepatopatias crônicas e agudas, porém tende a diminuir na cirrose (NAOUM et al., 1999) e também aumenta na doença pulmonar crônica (KANEKO et al., 2008).

A alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) é uma alfa-1-globulina, porém não é um “inibidor das proteases” como a AAT, e sua concentração sérica altera-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1989). KOGIKA et al (2003), trabalhando com cães infectados com parvovirose canina que apresentavam gastrite hemorrágica aguda, verificaram níveis de AGP extremamente aumentados na circulação sanguínea dos animais, com pico de elevação sérica ao redor do terceiro e quarto dias do processo inflamatório, que se manteve elevada por até 12 dias, o que permitiu a indicação dessa proteína como parâmetro de eleição para a avaliação do processo agudo.

A AGP é uma das principais proteínas glicosiladas no soro com peso molecular por volta de 43 KD (ECKERSALL, 2008). Embora a principal função da AGP não seja esclarecida, ela se liga a um número de metabólitos endógenos tais como a heparina, histamina, serotonina, esteróides e catecolaminas (ISRAILI e DAYTON, 2001). Há indicações na literatura sobre a capacidade da alfa-1-glicoproteína ácida se ligar a fármacos. Essa capacidade de ligação pode ter implicações terapêuticas, tais como a quantidade de fármaco ligado, além de afetar a concentração de droga livre, que é metabolicamente uma fração ativa. O aumento da AGP devido a uma resposta de fase aguda pode reduzir a concentração de fármacos livres e por isso poderá afetar a farmacocinética (IKENOUE et al., 2000).

A habilidade da AGP em se ligar a substâncias de baixo peso molecular pode também ter uma função de proteção geral, tal como a ligação a lecitinas e endotoxinas. A AGP também tem várias funções na defesa inata contra infecção e modulação da resposta imune. Ela pode inibir a ligação do *Mycoplasma pneumoniae* aos macrófagos alveolares e pode inibir alguns vírus de influenza. Além disso, fagocitose, ativação de neutrófilos e agregação plaquetária são inibidos pela alfa-1-glicoproteína ácida, e ela parece exercer algum papel na maturação de linfócitos B e T (ISRAILI e DAYTON, 2001).

Na maioria das espécies, a AGP é uma proteína de fase aguda moderada, aumentando mais lentamente, mas também permanecendo elevada por mais tempo do que a proteína de fase aguda principal, como a proteína C-reativa de caninos ou a

proteína amilóide-A de bovinos e haptoglobina. Entretanto, isso pode ser vantajoso no diagnóstico, e a inclusão da pesquisa de AGP no estudo da fase aguda da inflamação poderá fornecer informações de como elas se comportam da fase aguda para crônica (HORADAGODA et al., 1999).

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva que se desloca para fração alfa-2-globulina (KANEKO, 1997). A ceruloplasmina aumenta nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto o decréscimo é observado ao nascimento, na desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias hepáticas associadas à intoxicação de cobre, e a sua meia vida é de aproximadamente quatro dias (JAIN, 1993).

A inflamação aguda, a lesão tecidual e a febre produzem um aumento nas alfa-globulinas, como a haptoglobina, às vezes acompanhadas por um aumento nas beta-globulinas, como o fibrinogênio. A inflamação subaguda produz um aumento nas alfa e gama-globulinas. Já na inflamação crônica, há um aumento das gama-globulinas (BUSH, 2004).

As beta-globulinas fracionam-se em beta-1 e beta-2, na maioria dos animais domésticos, exceto nos ruminantes. Algumas proteínas importantes que compõem tais sub-frações são aquelas do complemento (C3 e C4), hemopexina, transferrina, ferritina, proteína C-reativa e fibrinogênio. As imunoglobulinas IgM e IgA, prolongam-se da região beta-2 para gama-2. Portanto, nas infecções e doenças linfoproliferativas envolvendo plasmócitos, as imunoglobulinas podem migrar na zona beta-2, bem como nas zonas gama-1 e gama-2 (KANEKO et al., 1997). Na região beta existe também as beta-2-lipoproteínas (lipoproteína de baixa densidade - LDL) e o plasminogênio (ECKERSALL, 2008).

A transferrina é uma beta-globulina sintetizada pelas células hepáticas e sua função é o transporte do ferro plasmático, sendo o seu aumento a expressão de carência de ferro (NAOUM et al., 1999). Essa é a única proteína do plasma que transporta íons e sua meia vida é de oito a dez dias. Esta glicoproteína tem atividade antibacteriana e anti-viral, sua concentração no plasma aumenta em casos de deficiência de ferro e na gestação. Reduções de transferrina são observadas em

doenças hepáticas, infecções agudas e crônicas, leucemia (JAIN, 1993) e nas anemias hemolíticas, onde os níveis de ferro sérico estão elevados (TIZARD, 2008). KANEKO (1997) relatou que esta é uma proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de condição inflamatória. O ferro é grandemente associado com as proteínas ligadoras de ferro, como a transferrina, lactoferrina, haptoglobina e ferritina. Após a invasão bacteriana, cessa a absorção de ferro intestinal. A interleucina-1 produzida por macrófagos estimula a secreção de transferrina e haptoglobina pelos hepatócitos, e há aumento da incorporação de ferro dentro do fígado. Isso reduz a disponibilidade de ferro e, então, retarda a invasão bacteriana (TIZARD, 2008).

A fração gama também se divide em duas subfrações, gama-1 e gama-2. As imunoglobulinas IgA, IgM e IgE são encontradas primariamente na região gama-1 e a IgG na região gama-2 (KANEKO et al., 1997). Segundo BUSH (2004), a IgA localiza-se na região beta-2. A concentração de gamaglobulinas aumenta com a estimulação antigênica, especialmente nas infecções crônicas e doenças autoimunes (BUSH, 2004).

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

As imunoglobulinas agem como anticorpos e são produzidas em resposta a antígenos. Elas são altamente específicas e somente um antígeno determinante está envolvido. Naturalmente, entretanto, determinados antígenos múltiplos estão comumente envolvidos. A linha de células linfocíticas exerce uma função central no sistema imune. Há duas subpopulações, os linfócitos B e linfócitos T, que podem ser identificados por técnicas imunológicas especiais. Os linfócitos T são encontrados no sangue e nos linfonodos na área cortical profunda. Eles estão associados a imunidade mediada por células. Os linfócitos B foram originalmente identificados na bursa de

fabricius de aves. No adulto, eles são encontrados no sangue e no centro germinativo dos linfonodos. As células B respondem a estímulo de antígenos com a proliferação de plasmócitos e produção de anticorpos específicos contra a estimulação antigênica. Há cinco classes de imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE, que tem sido identificadas em humanos, mas na maioria das espécies domésticas somente a IgG, IgA, IgM, e IgE são evidentes, embora a IgD possa ser raramente expressada (GORMAN e HALLIWELL, 1989).

Uma população específica de plasmócitos de origem genética definida, um clone, produz uma imunoglobulina específica. O crescimento descontrolado de um clone de células B únicas (malignidade) resulta em uma super produção de espécies químicas únicas de imunoglobulinas, que aparecem como um pico monoclonal pontiagudo ou gamopatia monoclonal no eletroforetograma. Ocasionalmente, uma gamopatia triclonal ou biclonal pode ser identificada. Um grupo de clones, cada um de origem genética diferente, pode também super produzir uma mistura heterogênea de imunoglobulinas, que aparece como uma região hiperglobulinêmica ampla ou difusa no eletroforetograma. Essa região é descrita como uma gamopatia policlonal (ECKERSALL, 2008).

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

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

A IgA encontra-se em maior concentração nas doenças infecciosas, doenças do tecido conjuntivo, doenças hepáticas, mielomas e outros tumores do sistema retículo endotelial. A IgA apresenta-se em menor concentração nos fetos, nos animais recém-nascidos antes da ingestão do colostro, nas deficiências imunológicas e na

agamaglobulinemia (KANEKO, 1997). A IgA está presente nas secreções externas (lágrima, saliva, secreções respiratórias, gastrintestinais e genitourinárias) em muitas espécies animais, sendo importante para defesa local e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral (JAIN, 1993).

As IgGs são as principais imunoglobulinas encontradas no sangue e são responsáveis pela imunidade humoral do organismo, estas apresentam várias atividades biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação de complemento (JAIN, 1993). A IgG apresenta elevações e diminuições na sua concentração sérica semelhantes a IgA (KANEKO, 1997).

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

A Imunoglobulina E (IgE) é um anticorpo que aumenta nas alergias e anafilaxias. A Imunoglobulina M (IgM) é um anticorpo formado precocemente em resposta à agentes inespecíficos. Esta globulina aumenta nas doenças inflamatórias, nas reações celulares primárias e na macroglobulinemia (ECKERSALL, 2008).

2.5 Relação Albumina:Globulina (A:G)

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

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

Disproteïnemias são anormalidades quantitativas e qualitativas nas concentrações de proteínas plasmáticas, e neste caso também o método indicado para avaliação global do quadro protéico é a eletroforese. O perfil eletroforético das proteínas séricas e o cálculo dos valores absolutos das frações protéicas fornece bases excelentes para um diagnóstico presumível para estudos adicionais em animais. O estabelecimento do perfil eletroforético das frações protéicas séricas em conjunto com a relação A:G fornece subsídios para interpretação das discrasias protéicas (ECKERSALL, 2008).

O perfil eletroforético normal de proteínas séricas traduz uma relação A:G normal. Essa relação A:G normal pode ser devido a uma hiperproteïnemia ou hipoproteïnemia. A hiperproteïnemia ocorre por desidratação, e nesse caso todas as frações protéicas aumentam proporcionalmente, incluindo a albumina. A hipoproteïnemia acontece principalmente por uma super hidratação, mas também pode ocorrer por perda aguda de sangue ou de plasma, onde haverá um deslocamento do fluido intersticial para o plasma. Essa diluição pode ser intensificada pelo mecanismo compensatório de ingestão de água para satisfazer a sede (ECKERSALL, 2008).

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

Uma diminuição da albumina é uma forma comum de disproteïnemia. Fundamentalmente, a diminuição pode ser atribuída a qualquer perda ou insuficiência na síntese de albumina. Por causa do tamanho pequeno e da sensibilidade osmótica para o fluido movimentar, a albumina é seletivamente perdida na doença renal (GRAUER, 2005), doença gastrintestinal (KANEKO et al., 1965; MEUTEN et al., 1978), e no parasitismo intestinal (DOBSON, 1965).

O aumento das globulinas pode ocorrer pelo aumento das alfa-globulinas. O aumento da alfa-1-globulina, mas principalmente da alfa-2-globulina, é comumente encontrado e é um importante achado diagnóstico. Muitas proteínas de fase aguda migram na região alfa-1 e alfa-2-globulina, assim os aumentos dessas globulinas são achados comuns nas doenças inflamatórias agudas e representam uma resposta da fase aguda (ECKERSALL, 2008).

O aumento das globulinas também pode ser desencadeado pelo aumento da fração betaglobulina. O aumento isolado das betaglobulinas é infrequente na maioria das espécies e encontra-se em associação com doença hepática ativa, dermatopatia supurativa e na síndrome nefrótica. A transferrina parece ser o maior componente que eleva-se na doença hepática ativa junto com hemopexina e complemento, mas como acredita-se que a transferrina seja uma proteína de fase aguda negativa, ela pode diminuir durante doença inflamatória e infecciosa (ECKERSALL, 2008). A maioria dos aumentos nas betaglobulinas é policlonal com aumentos nas gamaglobulinas e, somente ocasionalmente, o pico monoclonal pontiagudo é visto no mieloma múltiplo, na macroglobulinemia de Waldenstrom's e no linfoma (MACEWEN et al., 1977).

A ponte beta-gama é um fenômeno de ligação de beta e gamaglobulinas e sugere uma hepatite ativa crônica. Nesse caso não há uma separação clara entre as frações beta-2 e gama-1, o que resulta de um aumento de IgA, IgM ou de ambos. Raramente uma gamopatia de grau leve, no linfoma, pode resultar em uma ponte beta-gama (ECKERSALL, 2008).

O aumento das globulinas pode ocorrer pelo aumento das gamaglobulinas (aumento amplo). Aumento amplo nas gamaglobulinas caracteriza a gamopatia policlonal e é o resultado da heterogenicidade de clones de linfócitos B e de plasmócitos, a qual produzem uma mistura heterogênia de imunoglobulinas. Uma ou todas as imunoglobulinas IgM, IgG ou IgA podem estar presentes, mas predomina uma. O perfil da inflamação crônica pode ser manifestado por uma variedade de determinadas doenças tais como tumor maligno, infecções crônicas e doenças do colágeno. Há diminuição concomitante da albumina como resultado da diminuição de sua síntese. Os linfomas podem provocar hiperglobulinemia monoclonal ou policlonal. O

pico hiperglobulinêmico pode ocorrer em algum lugar entre a região beta-1 e gama-2, e alcançar picos difusos, pontiagudos e monoclonais. Os picos policlonais do linfoma podem ser o resultado de um grupo de tumores de clones em contraste com clones discretos simples, os quais aumentam os picos monoclonais (ECKERSALL, 2008).

O aumento das globulinas pode ser desencadeado pelo aumento das gamaglobulinas (aumento pontiagudo). A forma monoclonal é caracterizada por picos agudos de imunoglobulinas. Eles podem ocorrer na região beta, mas são frequentemente limitados a região gama. Nos linfomas podem estar presentes picos monoclonais dependendo do grau de clonagem das células tumorais. A proteína monoclonal dominante IgM tem sido relatada no caso de leucemia linfocítica em cães (BRAUND et al., 1978). Uma gamopatia biclonal foi observada em cães com uma combinação de mieloma e linfoma cutâneo (JACOBS et al., 1986). Um estudo retrospectivo de 18 casos de gamopatia monoclonal em cães confirmou que a maioria estava associada a tumores linfoproliferativos, incluindo mieloma múltiplo, macroglobulinemia de Waldenström's, linfoma, leucemia linfocítica crônica e plasmocitoma mucocutâneo (GIRAUDEL et al., 2002). Entretanto, gamopatias monoclonais não mielomatosas foram identificadas em casos de leishmaniose e ehrlichiose, nesses e em outros estudos (BREITSCHWERDT et al., 1987). As gamopatias monoclonais também foram relatadas na amiloidose canina (SCHWARTZMAN, 1984).

O aumento verdadeiro de albumina não ocorre em nenhum animal. Assim, a hiperalbuminemia é relativa por causa de uma hemoconcentração como o resultado de perda de água e desidratação (ECKERSALL, 2008).

A diminuição de globulinas pode ocorrer pela ausência de gamaglobulinas no soro fetal, no soro antes da ingestão do colostro, ou em animais neonatais privados de colostro (WEAVER et al., 2000) e pode ser imediatamente observada na eletroforese de proteínas séricas.

2.6 Eletroforese de PFA no Linfoma

Nas neoplasias das células linfóides pode haver o aumento de alfa-2 e betaglobulinas, embora nos linfomas e carcinomas hepáticos seja comum haver um aumento de beta e gamaglobulinas (BUSH, 2004). Em 20% dos cães com linfoma há hipergamaglobulinemia que causa a hiperglobulinemia (CARDOSO et al., 2004).

No linfoma, pode haver gamopatia monoclonal ou policlonal (KANEKO et al., 2008). Gamopatias monoclonais representam doenças decorrentes de alterações na síntese de imunoglobulinas, ou seja, uma proliferação de células do tipo B que resulta em síntese excessiva de uma imunoglobulina monoclonal (MACEWEN & HURVITZ, 1977). Assim, esta gamopatia está associada a doenças linfoproliferativas, especialmente aos linfomas de células B (DORFMAN e DIMSKI, 1992; GIRAUDEL et al., 2002).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo quantificar e qualificar as proteínas séricas totais e suas frações, em matriz de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em cães saudáveis e linfomatosos, sendo estes tratados com o protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Parcelas Experimentais

Utilizaram-se 20 cães, com ou sem raça definida, machos ou fêmeas, distribuídos em dois grupos. No grupo controle reuniram-se 10 cães saudáveis e no grupo doente, 10 cães linfomatosos (Tabela 1), atendidos junto ao Setor de Oncologia Veterinária do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal/SP. O diagnóstico do linfoma foi estabelecido com base nos exames clínicos, citologia e/ou histopatologia do tecido ou órgão.

Tabela 1. Dados gerais dos cães linfomatosos (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

Animais	Raça	Idade	Sexo	Peso	Classificação anatômica	Estadia-mento clínico	Sub-estadia-mento
A1	Teckel	7anos	fêmea	13kg	multicêntrico	V	a
A2	Rottweiler	7anos	fêmea	31kg	multicêntrico	III	a
A3	Cocker	9anos	fêmea	13kg	cutâneo	V	a
A4	Rottweiler	6anos	macho	40kg	multicêntrico	V	a
A5	Rottweiler	5anos	fêmea	32kg	multicêntrico	IV	b
A6	SRD	6anos	fêmea	39kg	extranodal	V	a
A7	Rottweiler	3,5anos	fêmea	34kg	cutâneo	V	b
A8	Labrador	6,5anos	macho	29kg	multicêntrico	II	b
A9	Rottweiler	9anos	macho	35kg	cutâneo	I	a
A10	Poodle	15anos	macho	8kg	cutâneo	V	a

I- único linfonodo, II- vários linfonodos, III- linfadenomegalia, IV- fígado e/ou baço com ou sem linfadenomegalia, V- sangue, medula óssea e/ou outros órgãos, a- sem sinais sistêmicos, b- com sinais sistêmicos

4.2 Quimioterapia Antineoplásica

Os cães linfomatosos foram avaliados durante oito sessões de quimioterapia por nove semanas, pois a 5^a e 10^a semanas foram de intervalo quimioterápico. A quimioterapia antineoplásica foi instituída com base no Protocolo de Madison-Wisconsin, utilizando-se somente a fase de indução com duração de dez semanas, constituído pelos seguintes fármacos (Tabela 2):

- sulfato de vincristina: dose intra-venosa de 0,75mg/m², nas 1^a, 3^a, 6^a e 8^a semanas.
- L-asparaginase: dose intra-muscular de 400UI/kg, na 1^a semana, em dose única.
- ciclofosfamida: dose oral de 250mg/m², nas 2^a e 7^a semanas.
- doxorubicina: dose intra-venosa de 30mg/m², nas 4^a e 9^a semanas.
- prednisona: dose oral de 2mg/kg/dia, na 1^a semana, por sete dias; depois 1,5mg/kg/dia, na 2^a semana, por sete dias; depois 1mg/kg/dia, na 3^a semana, por sete dias; e por fim, 0,5 mg/kg/dia, na 4^a semana, por mais sete dias.

Tabela 2. Protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin (RODASKI e DE NARDI, 2006) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

semanas	vincristina 0,75mg/m ² , I.V.	L-asparaginase 400UI/kg, I.M.	ciclofosfamida 250mg/m ² , V.O.	doxorrubicina 30mg/m ² , infusão I.V.	prednisona 0,5 a 2mg/kg/dia V.O.
S1	X	X	–	–	2mg/kg/dia
S2	–	–	X	–	1,5mg/kg/dia
S3	X	–	–	–	1mg/kg/dia
S4	–	–	–	X	0,5mg/kg/dia
S5	–	–	–	–	–
S6	X	–	–	–	–
S7	–	–	X	–	–
S8	X	–	–	–	–
S9	–	–	–	X	–

As semanas S1 a S4 e S6 a S9 correspondem às sessões de tratamento quimioterápico.

4.3 Colheita de Sangue

As amostras de sangue foram obtidas por veni-punção jugular ou cefálica, com seringas descartáveis de 5 mL e agulhas hipodérmicas 25x7, após antissepsia local, e armazenadas em tubos de ensaio (10x70), sem anticoagulante.

4.4 Preparação das Amostras

Cada tubo foi submetido à centrifugação por 5 minutos, à 1.257,6 g (2500 rpm), para obtenção do soro. Ato contínuo, o soro sanguíneo foi envasado e armazenado em eppendorfs (1,5 mL), sob congelamento a – 18°C, até o momento da análise eletroforética.

As amostras dos cães sadios foram obtidas uma única vez, e dos cães linfomatosos, no momento do diagnóstico e semanalmente, momentos antes de cada sessão quimioterápica, durante 9 semanas.

4.5 Análises Laboratoriais

4.5.1 Proteínas Séricas Totais

As proteínas séricas totais foram determinadas pelo Método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes¹ e leitura em espectrofotômetro semi-automático².

4.5.2 Fracionamento Eletroforético

As análises laboratoriais foram conduzidas no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da FCAV – Unesp, Jaboticabal, SP. O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI-VERTICALELETROPHORESIS CELLS[®] - BIO-RAD).

A polimerização do gel foi possível pela adição de 15,0 µL de tetrametiletilenodiamina (TEMED)³ e 0,3 µL de persulfato de amônia a 10%.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina, 10g de dodecil sulfato de sódio (SDS) e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. A parte superior da placa que continha o gel entrou em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10g de SDS, em um litro de água destilada estéril (Apêndice A). As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. As amostras para o fracionamento das proteínas foram preparadas utilizando-se 10 µL de soro sanguíneo diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS) e 20 µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL das referidas amostras era depositada no fosso do gel.

¹ Labtest – Sistema de Diagnósticos Ltda - Belo Horizonte – MG.

² Labquest – Sistema de Diagnósticos Ltda – Belo Horizonte – MG.

³ Sigma, ST. Louis-MO, Estados Unidos.

A placa era colocada em suporte apropriado¹ (Figura 1), em contato com solução tampão com pH 8,5 e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel era corado durante duas horas em solução de azul de comassie 0,2%, no agitador horizontal (Figura 2), para uma coloração uniforme e, em seguida, retirado o excesso de corante com solução descorante (Apêndice A), até que as frações se apresentassem nítidas.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada² (SHIMADZU CS-9301) (Figura 3) através do escaneamento das amostras (Figura 4). Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores³ (Figura 5) (SIGMA MARKER™, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD, além das proteínas purificadas albumina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e IgG. Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão (Figura 6). À seguir, as etapas da técnica da SDS-PAGE:

¹ Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX-USA.

² Shimadzu, Shimadzu Corp., Kyoto-Japão.

³ © Sigma-Aldrich Biotechnology LP.



Figura 1. Cubas de eletroforese e placas de vidro (Arquivo pessoal)



Figura 2. Agitador horizontal (Arquivo pessoal)



Figura 3. Densitômetro computadorizado (Arquivo pessoal)



Figura 4. Escaneamento das amostras (Arquivo pessoal)



Figura 5. Marcação de pontos (Arquivo pessoal)



Figura 6. Curva eletroforética (Arquivo pessoal)

4.6 Análise Estatística

Para verificar se as proteínas séricas e seu fracionamento eletroforético diferiram entre os cães sadios e linfomatosos antes do início da quimioterapia, e para os cães linfomatosos nas sessões de quimioterapia, utilizou-se a Análise de Variância pelo Teste F. O Teste de Tukey a 5% de probabilidade foi utilizado para comparação das médias entre os cães sadios e linfomatosos, e entre os cães linfomatosos nos diferentes momentos.

Utilizou-se o programa estatístico AGROESTAT (versão 1.0, 2008) para a realização destas análises (BARBOSA e MALDONADO JR, 2008).

5. RESULTADOS

O proteinograma sérico foi obtido em matriz de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). A Figura 9 ilustra a separação em SDS-PAGE das proteínas séricas nos cães.

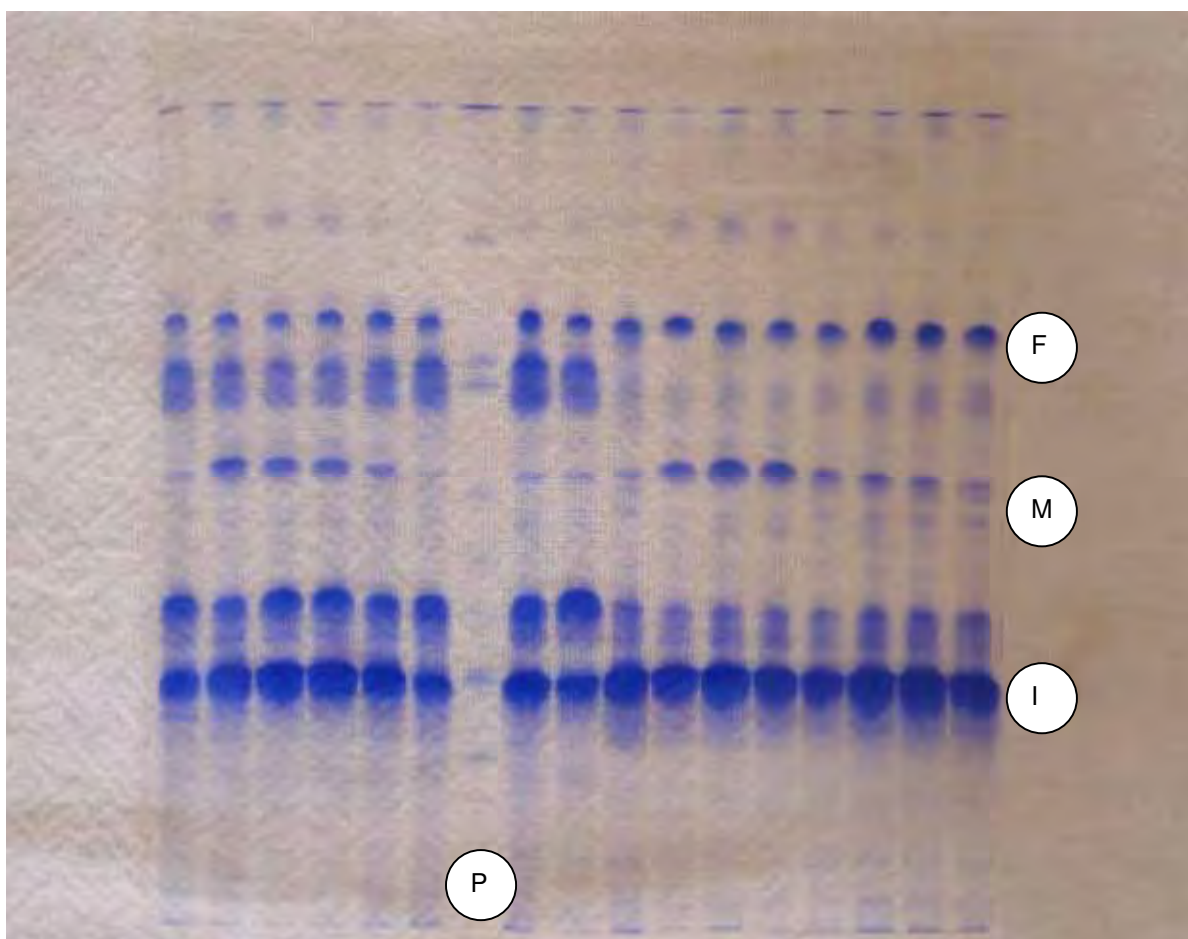


Figura 7. Eletroforese de proteínas séricas em matriz de gel de poliacrilamida mostrando a separação das frações protéicas em cães. Há 17 amostras de soro sanguíneo, sendo a amostra padrão (P) o espaço 7. As proteínas com maior peso molecular localizam-se no início (I) da corrida eletroforética, estando entre elas as proteínas IgA (170 KD), ceruloplasmina (125 KD), transferrina (85 KD), albumina (65 KD), alfa-1- antitripsina (60 KD) e IgG (cadeia pesada) (52 KD). No meio (M) do gel estão as proteínas haptoglobina (39 KD) e alfa-1-glicoproteína ácida (37 KD). Ao final (F) do gel estão as proteínas nº 9 (33 KD), IgG (cadeia leve) (25 KD) e proteína nº 11 (23 KD).

A técnica SDS-PAGE permitiu o fracionamento de 18 a 31 proteínas, dependendo da amostra utilizada, cujos pesos moleculares variaram de 18 a 245 kilodáltons (KD). Para os animais saudáveis e linfomatosos estudados neste ensaio, 11 proteínas apresentaram importância na eletroforese e somente nove foram identificadas nominalmente (Tabelas 3 e 4): albumina, 65 KD (Figura 12); alfa-1-antitripsina (AAT), 60 KD (Figura 15); alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), 37 KD (Figura 16); ceruloplasmina, 125 KD (Figura 17); haptoglobina, 39 KD (Figura 18); transferrina, 85 KD (Figura 19); imunoglobulina A (IgA), 170 KD (Figura 20); imunoglobulina G (IgG) (cadeia pesada), 52 KD (Figura 21) e imunoglobulina G (IgG) (cadeia leve), 25 KD (Figura 22). As proteínas nominalmente não identificadas foram reconhecidas pelos respectivos pesos moleculares: proteína nº 9 de 33 KD (Figura 23), e proteína nº 11 de 23 KD (Figura 24). Os valores das proteínas séricas totais estão representados nas Tabelas 3 e 4 e Figura 11, das globulinas nas Tabelas 3 e 4 e Figura 13, e das relações Albumina:globulina nas Tabelas 3 e 4 e Figura 14. Todas as frações protéicas, no momento zero, estão representadas pela Figura 10.

As concentrações séricas das proteínas AAT, AGP, transferrina, IgG (cadeia pesada) e globulinas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cães saudáveis e linfomatosos, no momento zero, antes da 1ª sessão de quimioterapia. Entre os cães linfomatosos, durante o tratamento quimioterápico, apenas a concentração sérica da proteína nº 9 (33KD) apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$).

A proteína total e as frações protéicas encontradas foram descritas na seguinte ordem: proteína total, albumina, globulinas, relação A:G, alfa-globulinas (AAT, AGP, ceruloplasmina e haptoglobina), beta-globulina (transferrina), gama-globulinas (IgA, IgG de cadeia pesada e leve), proteína nº 9 (33KD) e proteína nº 11 (23KD).

No presente estudo, nos cães linfomatosos, as proteínas de fase aguda que se apresentaram como positivas foram a AGP, transferrina e haptoglobina, sendo esta última sem diferença estatística. E a proteína de fase aguda que apresentou-se como negativa nos cães linfomatosos foi a AAT, pois suas concentrações mostraram-se estatisticamente maior nos cães saudáveis.

A classificação da resposta das proteínas de fase aguda é dividida em principal, moderada e negativa. A proteína C-reativa e amilóide A sérica são classificadas como resposta principal. A AGP, ceruloplasmina, haptoglobina e proteína-C são classificadas como resposta moderada e a albumina como resposta negativa (CERÓN et al., 2005; ECKERSALL, 2008). No entanto, nesse experimento, não foi encontrada nenhuma proteína de fase aguda com resposta principal, com resposta moderada foram encontradas a AGP, ceruloplasmina e haptoglobina, e com resposta negativa a albumina, porém somente a AGP apresentou-se estatisticamente maior nos cães linfomatosos.

Tabela 3. Médias e desvios padrão das concentrações séricas das proteínas (g/dL), verificadas no proteinograma obtido em matriz de gel de poliacrilamida em cães saudáveis e cães com linfoma, antes da primeira sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

PROTEÍNA	PESO	CÃES	CÃES
	MOLECULAR (KD)	SADIOS (n=10)	LINFOMATOSOS (n=10)
Proteína Total	—	7,36±0,59	8,57±1,93
albumina	65	3,62±0,26	3,51±0,64
Globulina	—	3,62±0,5 ^a	5,31±1,68 ^b
Relação A:G	—	0,98±0,15	0,78±0,30
α1-antitripsina	60	0,47±0,13 ^a	0,33±0,16 ^b
α1-glic. ácida	37	0,02±0,01 ^a	0,04±0,03 ^b
Ceruloplasmina	125	0,02±0,01	0,01± 0,01
Haptoglobina	39	0,01±0,004	0,02±0,01
Transferrina	85	0,21±0,02 ^a	0,28±0,11 ^b
IgA	170	0,021±0,01	0,023±0,01
IgG (cp)	52	0,94± 0,26 ^a	1,55±0,83 ^b
IgG (cl)	25	0,52±0,24	1,11±0,86
Proteína n°9	33	0,17±0,06	0,28±0,18
Proteína n°11	23	0,85±0,18	0,85±0,4

Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação de médias. A ausência de letras na mesma linha corresponde a médias iguais.

Tabela 4. Médias gerais e desvios-padrão das concentrações séricas das frações protéicas (g/dL), verificadas na SDS-PAGE, em cães linfomatosos antes de cada sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

proteína	1ª sessão	2ª sessão	3ª sessão	4ª sessão	6ª sessão	7ª sessão	8ª sessão	9ª sessão
proteína total	8,57±1,93	8,84±1,62	9,07±1,19	8,6±1,37	8,79±1,44	8,9±1,95	8,71±1,32	8,4±1,33
albumina	3,51±0,64	3,84±0,62	4,16±0,76	3,80±0,92	3,99±0,43	3,76±0,67	3,7±0,77	3,42±0,83
globulina	5,06±1,77	5±1,43	4,9±0,98	4,8±0,91	4,8±1,47	5,14±1,71	5,01±1,44	4,98±1,41
relação A:G	0,78±0,3	0,83±0,24	0,88±0,23	0,82±0,23	0,9±0,27	0,78±0,23	0,8±0,29	0,74±0,29
antitripsina	0,33±0,16	0,34±0,11	0,45±0,08	0,38±0,06	0,42±0,12	0,41±0,21	0,43±0,18	0,39±0,14
glicoproteína	0,04±0,03	0,02±0,02	0,02±0,01	0,02±0,01	0,04±0,03	0,04±0,02	0,04±0,03	0,04±0,03
ceruloplasmina	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,02±0,01	0,01±0,01	0,01±0,01	0,02±0,02	0,03±0,05
haptoglobina	0,02±0,01	0,03±0,02	0,04±0,02	0,04±0,02	0,03±0,02	0,03±0,03	0,03±0,02	0,03±0,01
transferrina	0,28±0,11	0,25±0,1	0,25±0,8	0,23±0,1	0,25±0,09	0,3±0,12	0,24±0,12	0,25±0,11
IgA	0,02±0,01	0,02±0,02	0,01±0,01	0,01±0,02	0,02±0,02	0,02±0,02	0,02±0,02	0,02±0,02
IgG (cp)	1,55±0,83	1,38±0,65	1,07±0,56	1,1±0,53	1,1±0,77	1,35±0,62	1,33±0,71	1,54±0,76
IgG (cl)	1,11±0,86	0,8±0,72	0,7±0,53	0,64±0,57	0,74±0,64	0,88±0,7	0,88±0,63	0,9±0,57
proteína nº9	0,28±0,18 ^c	0,63±0,3 ^{ab}	0,78±0,35 ^a	0,7±0,29 ^{ab}	0,53±0,22 ^{bc}	0,35±0,11 ^{bc}	0,35±0,18 ^{bc}	0,29±0,18 ^c
proteína nº11	0,85±0,39	0,92±0,33	1,01±0,34	0,98±0,34	1,09±0,41	1,05±0,38	1,05±0,25	0,92±0,29

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade para comparação das médias. A ausência de letras na mesma linha corresponde a médias iguais pelo teste de Tukey a 5%.

5.1 Frações Protéicas

No momento zero, ou seja, no momento do diagnóstico, antes da 1ª sessão de quimioterapia, as médias das concentrações séricas (g/dL) da alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, transferrina e IgG (cadeia pesada), apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 8), entre os cães saudáveis e linfomatosos. Os cães saudáveis apresentaram aumento de alfa-1-antitripsina, e os cães linfomatosos apresentaram aumento de alfa (alfa-1-glicoproteína ácida), beta (transferrina) e gamaglobulinas (IgG cadeia pesada).

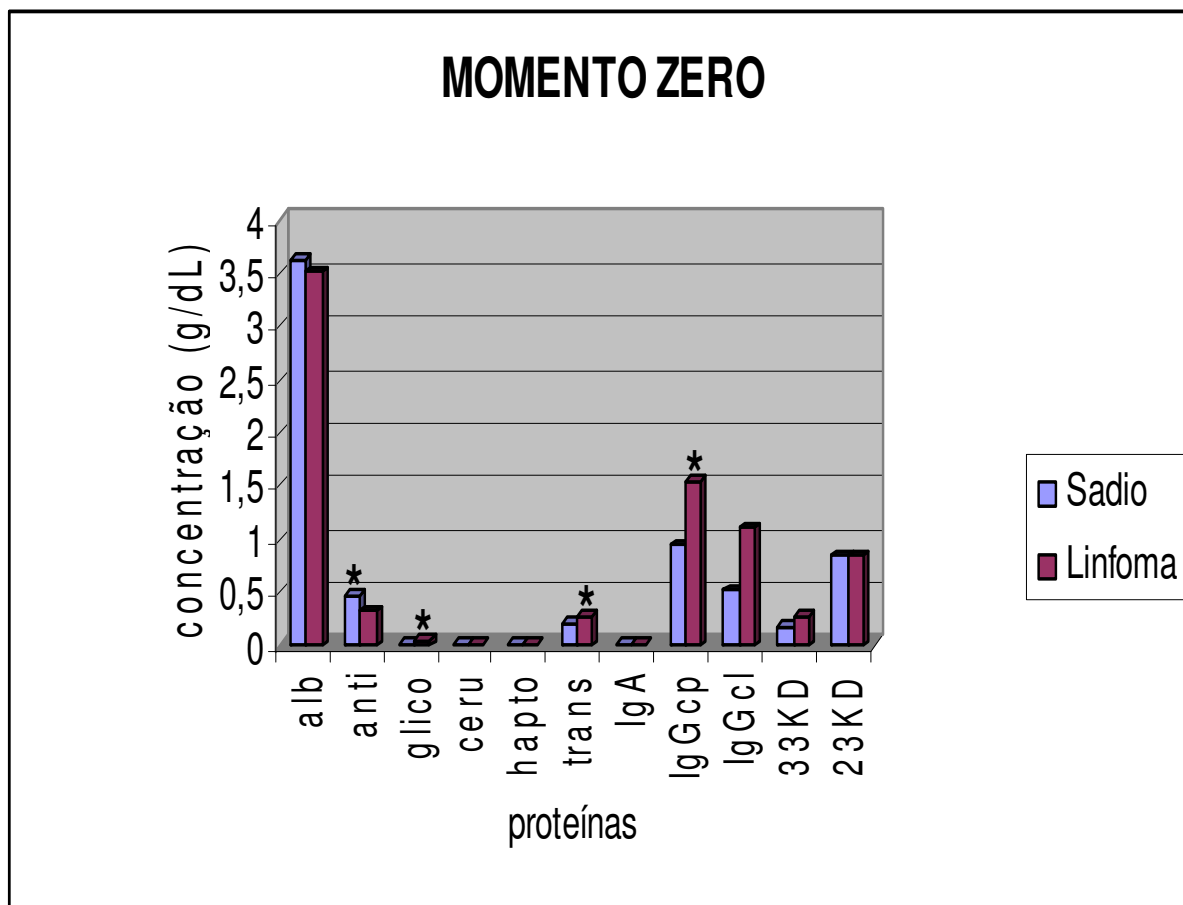


Figura 8. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) das frações protéicas, albumina, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina, IgA, IgG (cadeia pesada), IgG (cadeia leve), proteína nº 9 (33KD) e proteína nº 11 (23 KD), respectivamente, verificadas na SDS-PAGE, em cães sadios e linfomatosos antes da 1ª sessão de quimioterapia (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.2 Proteína Total

As médias das concentrações séricas (g/dL) das proteínas totais entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 9A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) das proteínas totais entre os cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 9B).

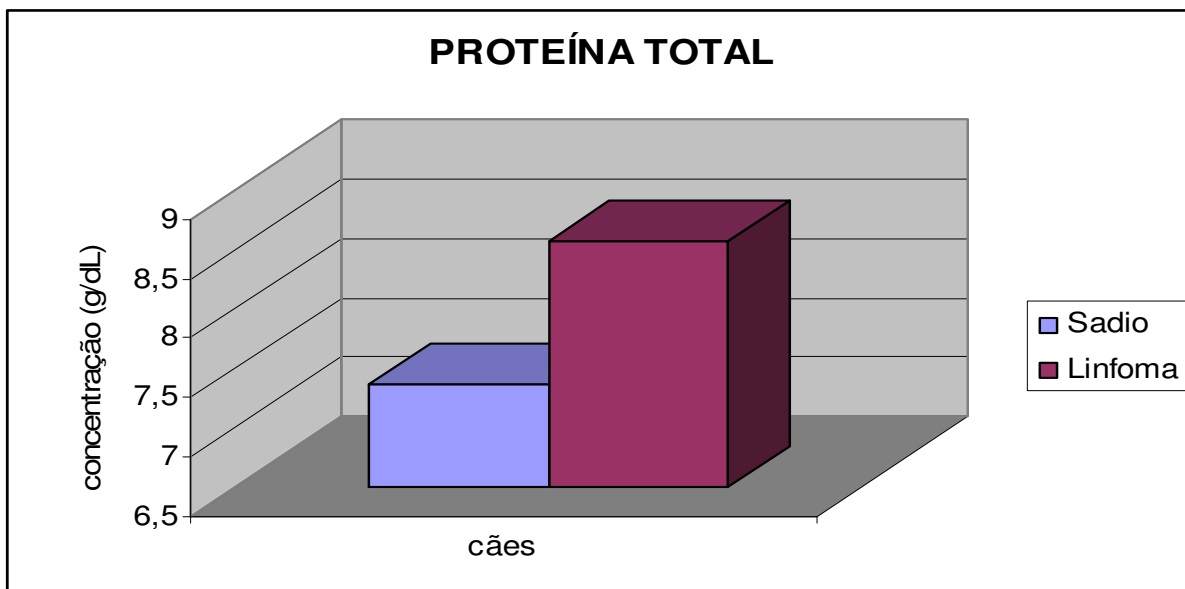
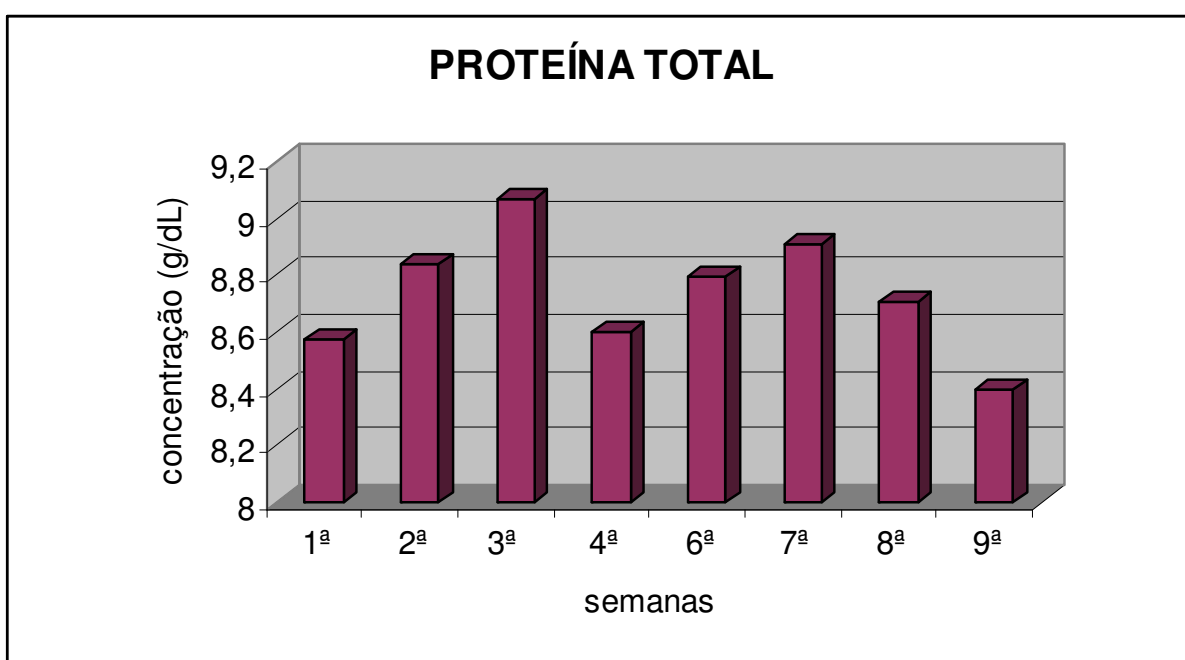
A**B**

Figura 9. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína Total, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.3 Albumina

As médias das concentrações séricas (g/dL) da albumina entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 10A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da albumina entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 10B).

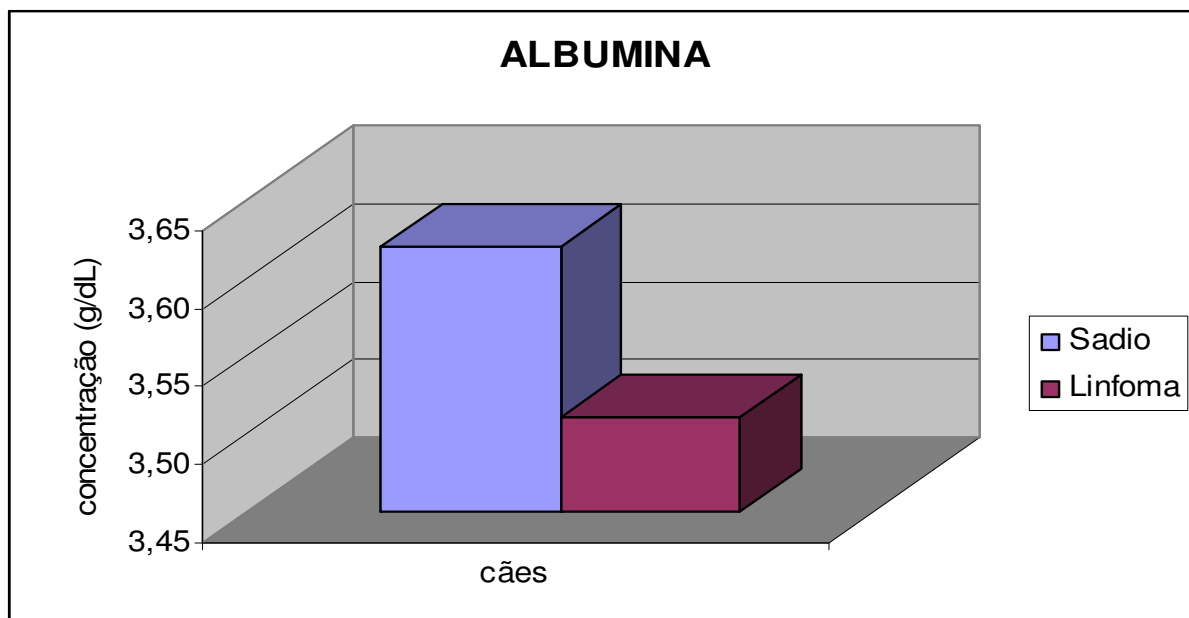
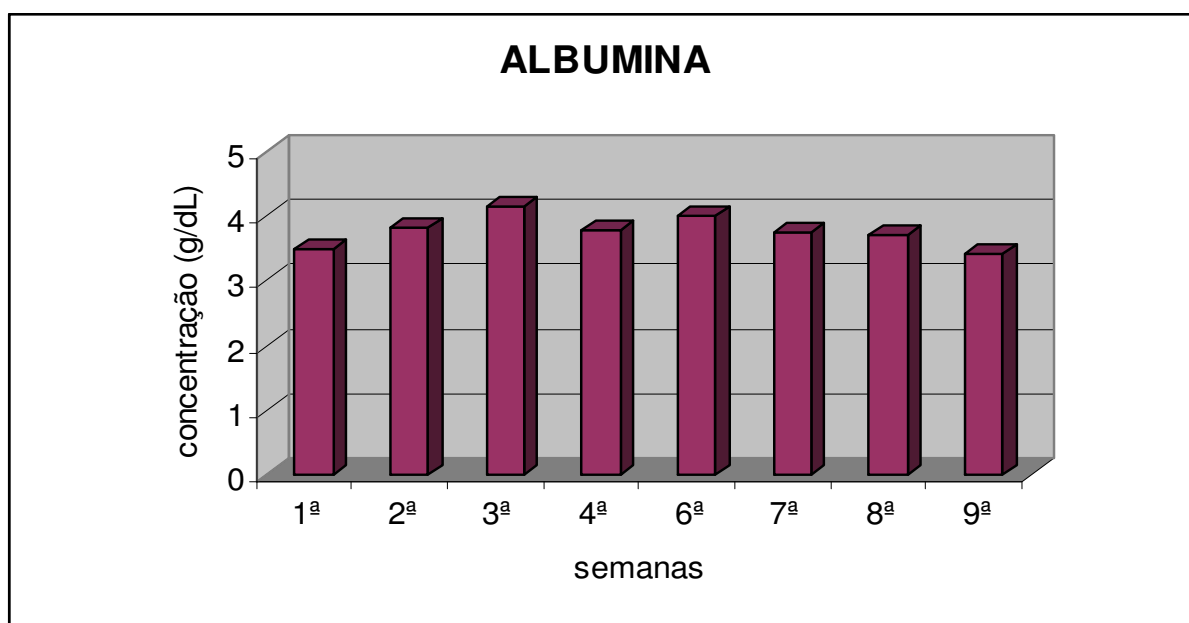
A**B**

Figura 10. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Albumina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.4 Globulinas

As médias das concentrações séricas (g/dL) das globulinas entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 11A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) das globulinas entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 11B).

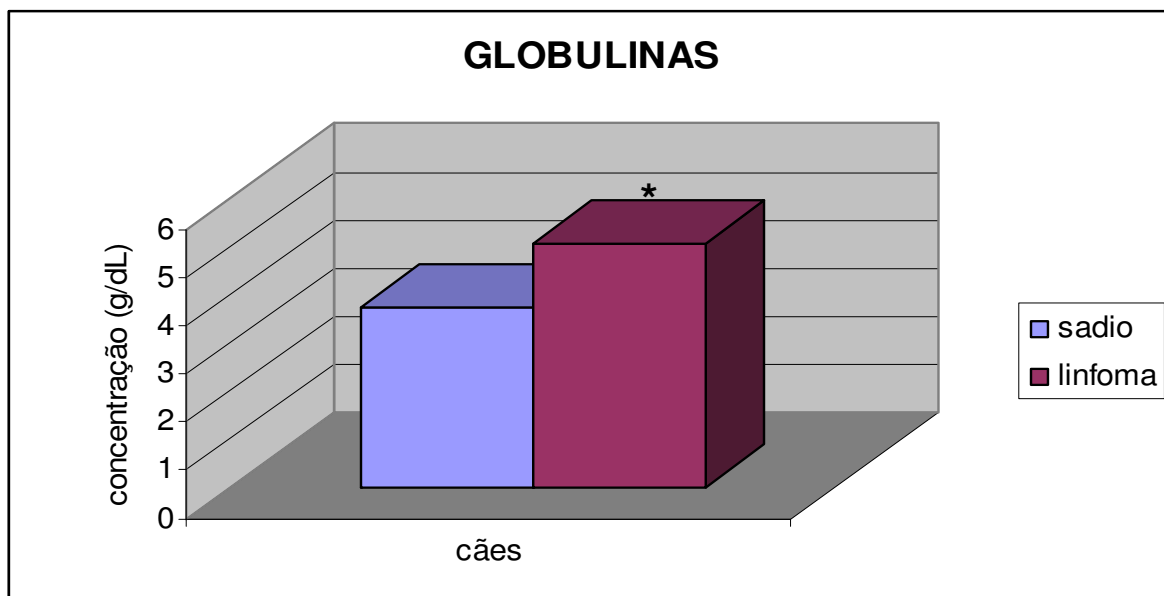
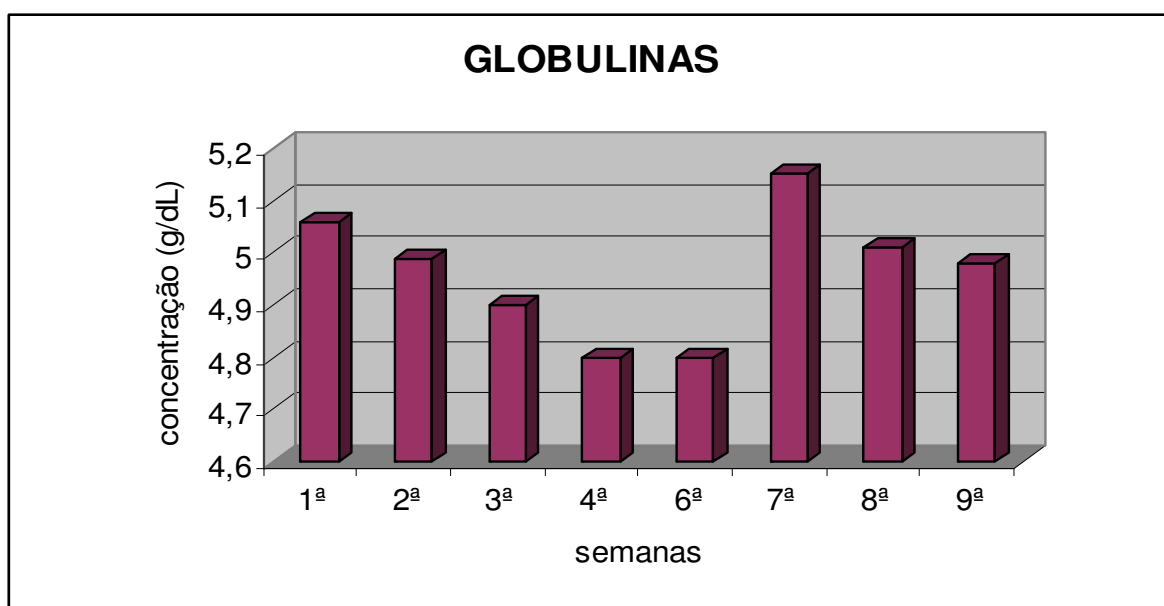
A**B**

Figura 11. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) das globulinas, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.5 Relação Albumina:Globulina (A:G)

As médias das relações A:G entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 12A).

As médias das relações A:G entre os cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 12B).

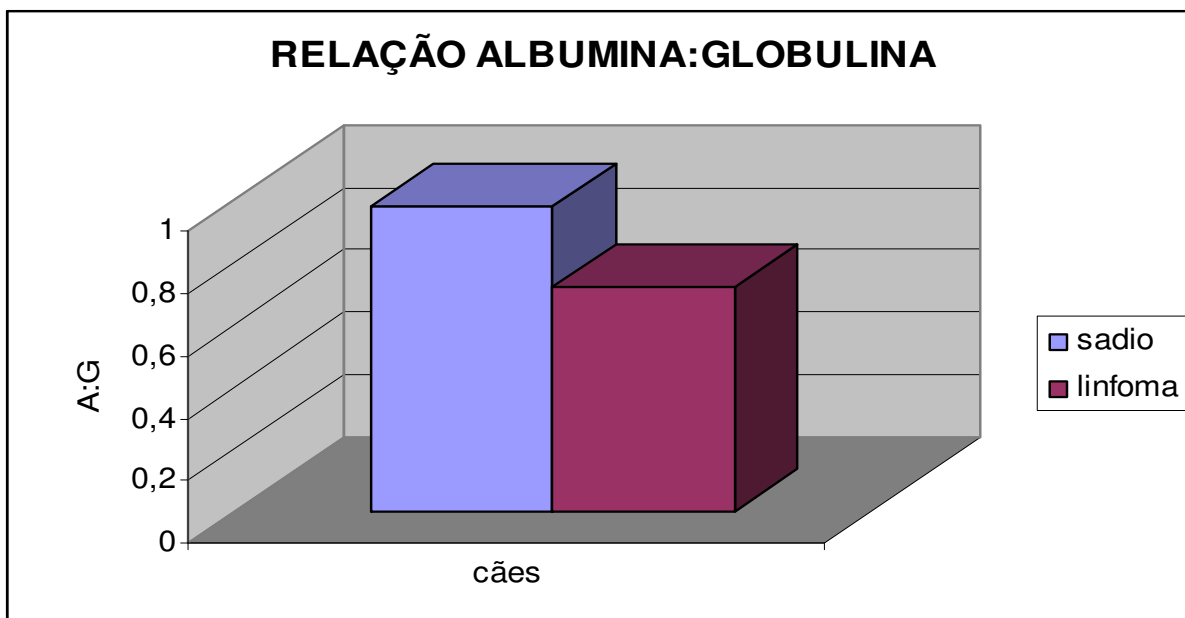
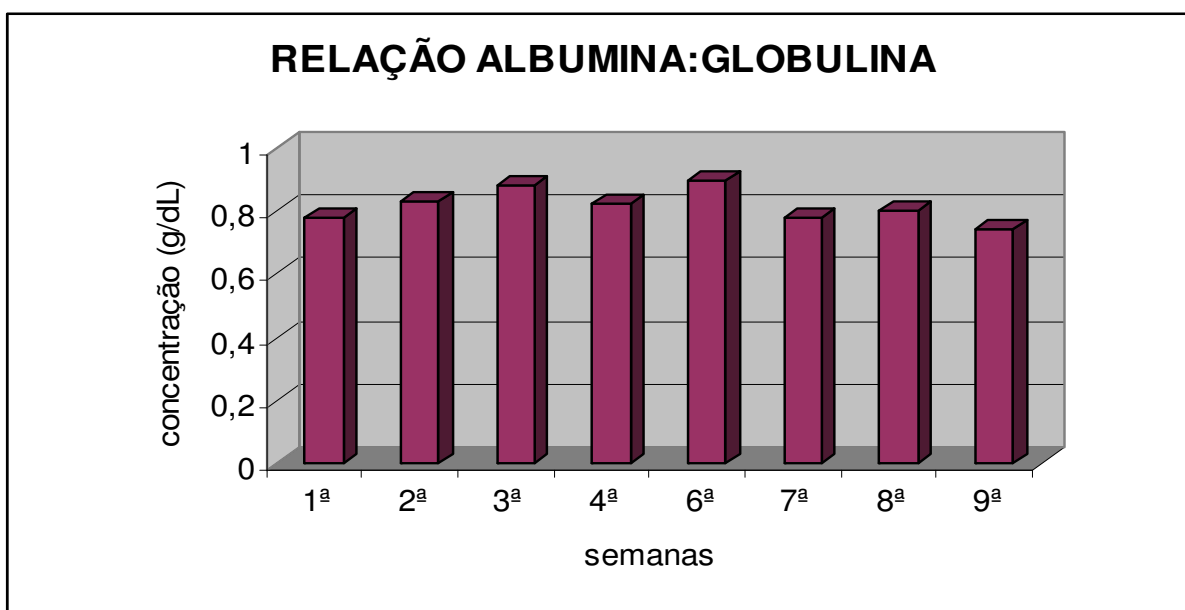
A**B**

Figura 12. Representação gráfica das relações Albumina:Globulina, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.6 Alfa-1-Antitripsina (AAT)

As médias das concentrações séricas (g/dL) da AAT entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 13A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da AAT entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 13B).

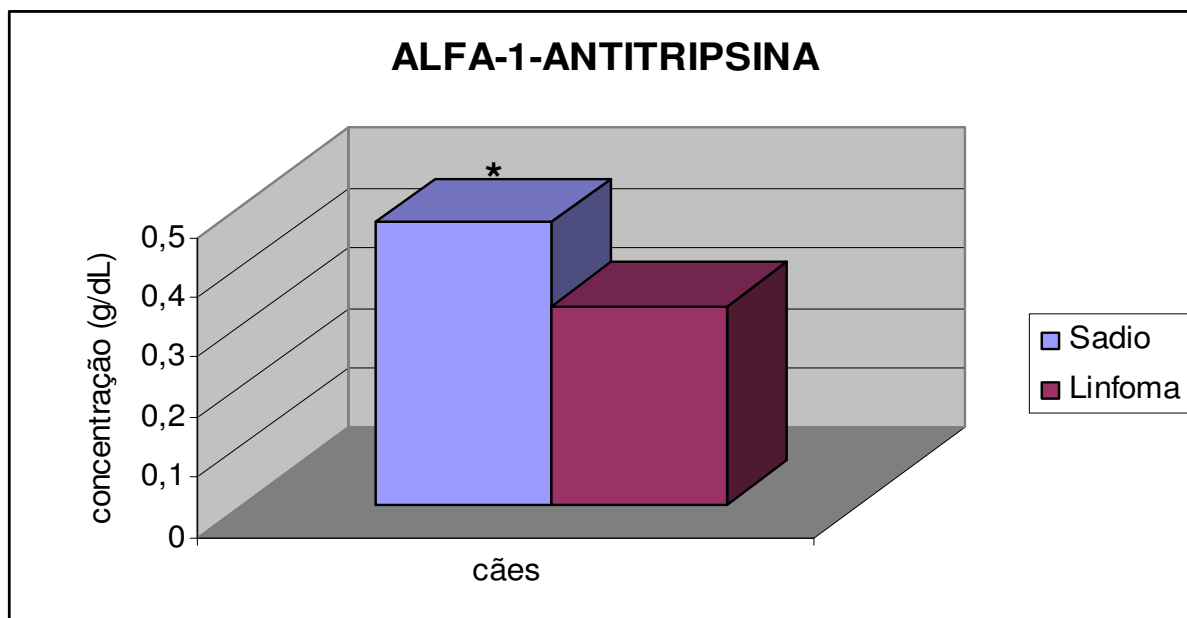
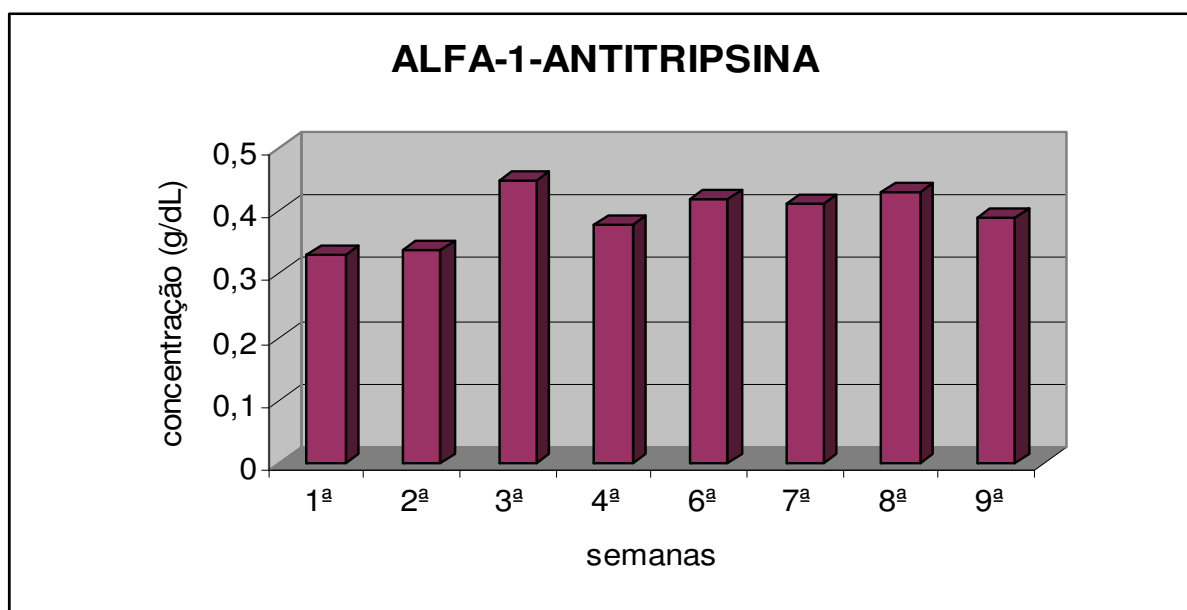
A**B**

Figura 13. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Alfa-1-Antitripsina, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.7 Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP)

As médias das concentrações séricas (g/dL) da AGP entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 14A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da AGP entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 14B).

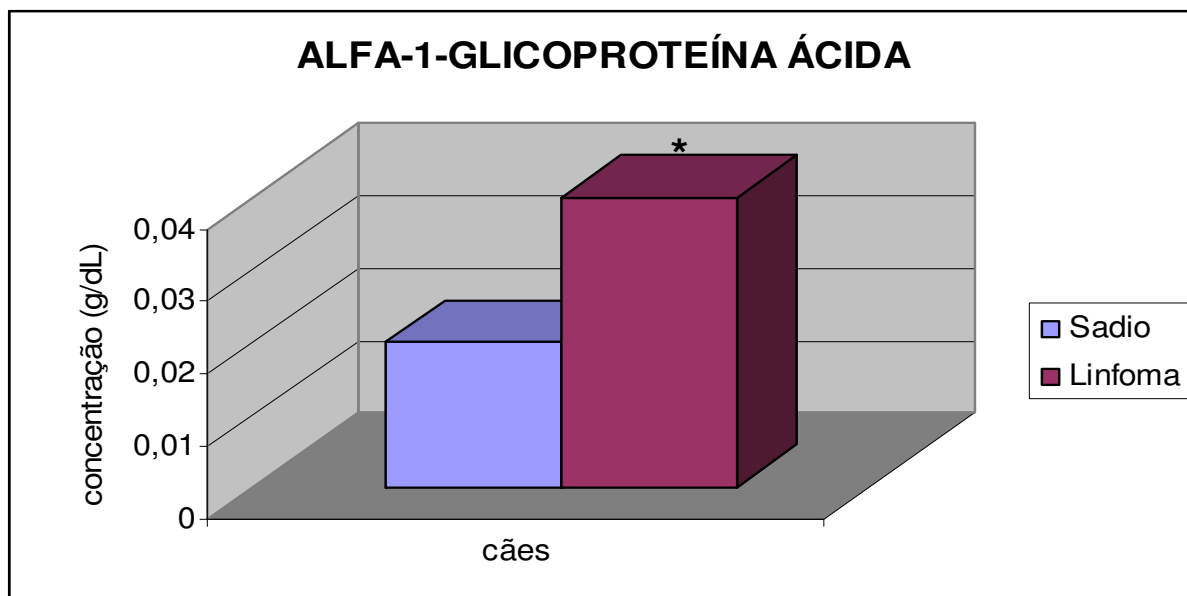
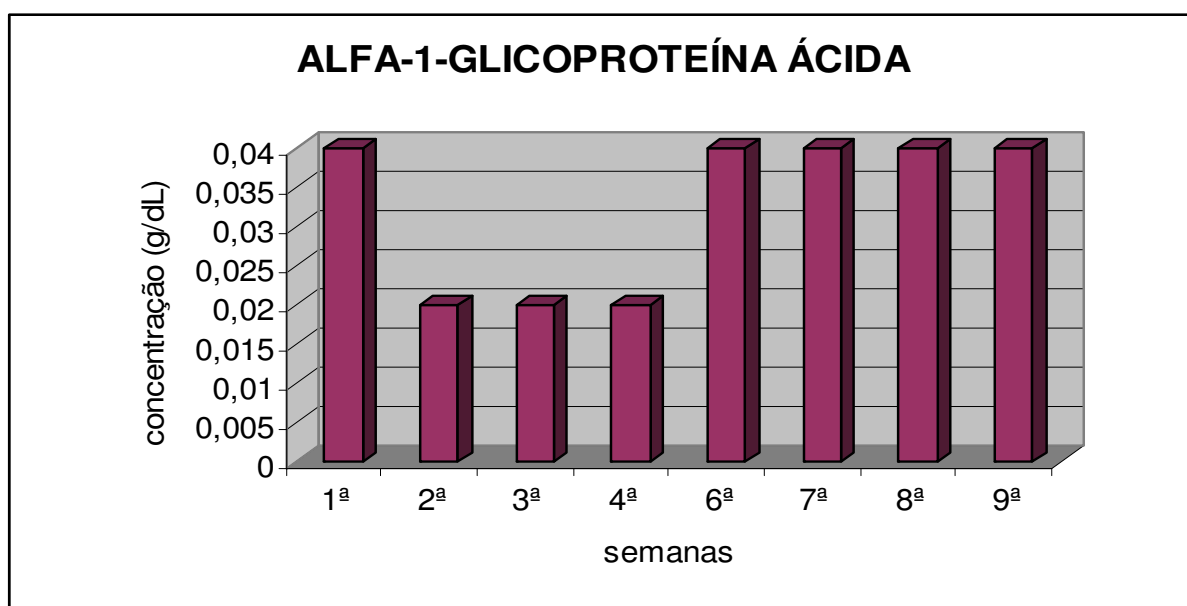
A**B**

Figura 14. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Alfa-1-Glicoproteína Ácida, verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1^a sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.8 Ceruloplasmina

As médias das concentrações séricas (g/dL) da ceruloplasmina entre cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 15A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da ceruloplasmina entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 15B).

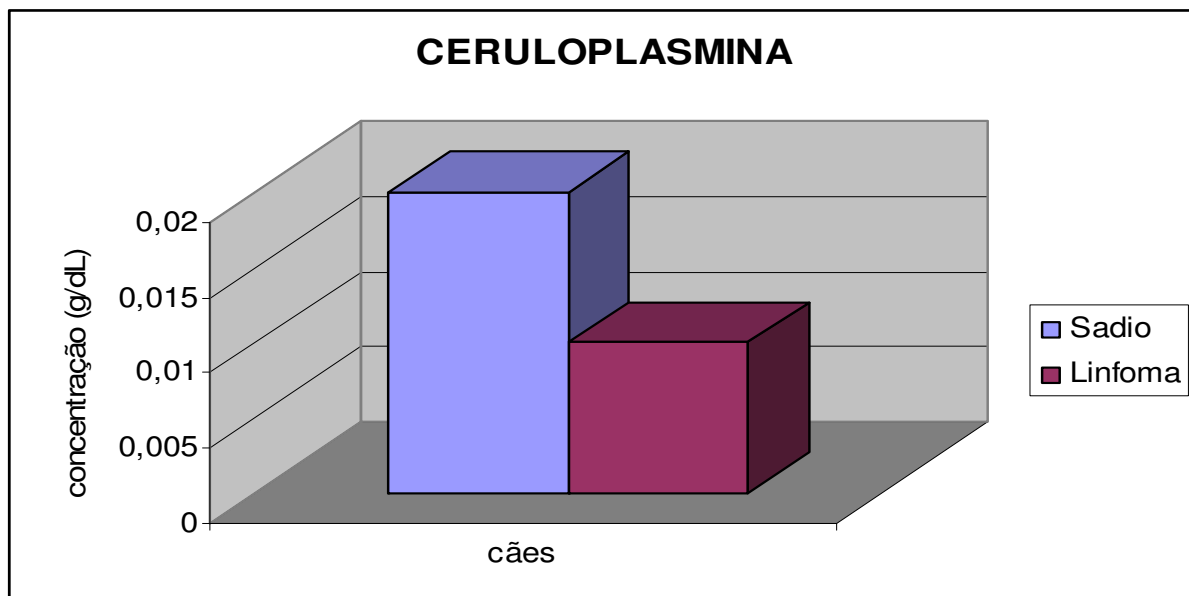
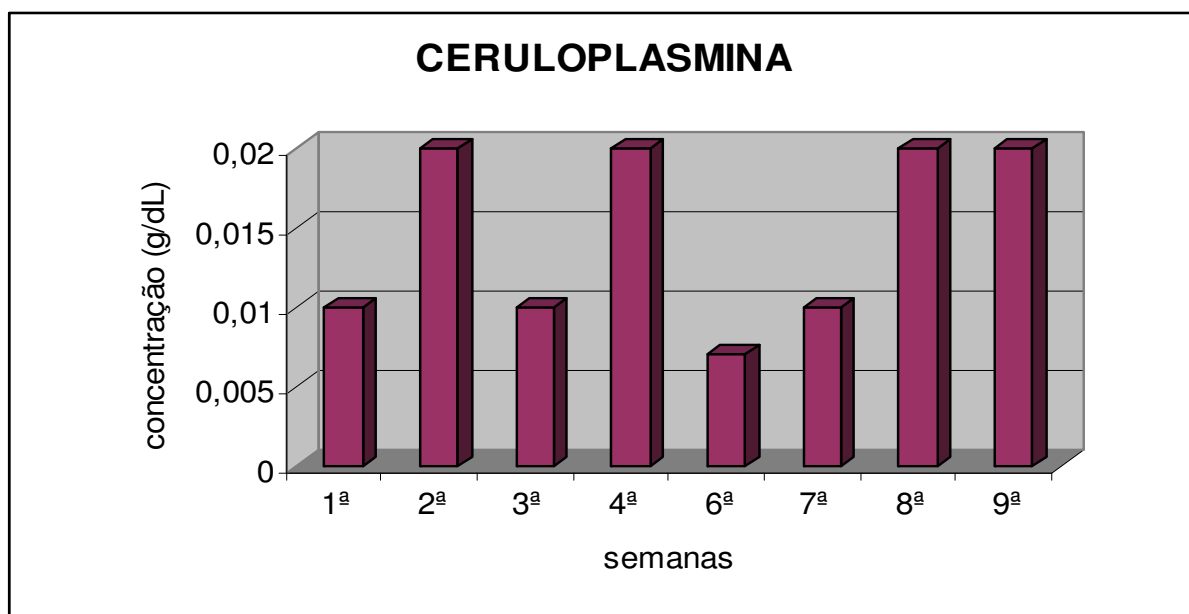
A**B**

Figura 15. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Ceruloplasmina, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.9 Haptoglobina

As médias das concentrações séricas (g/dL) da haptoglobina entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 16A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da haptoglobina entre cães linfomatosos durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 16B).

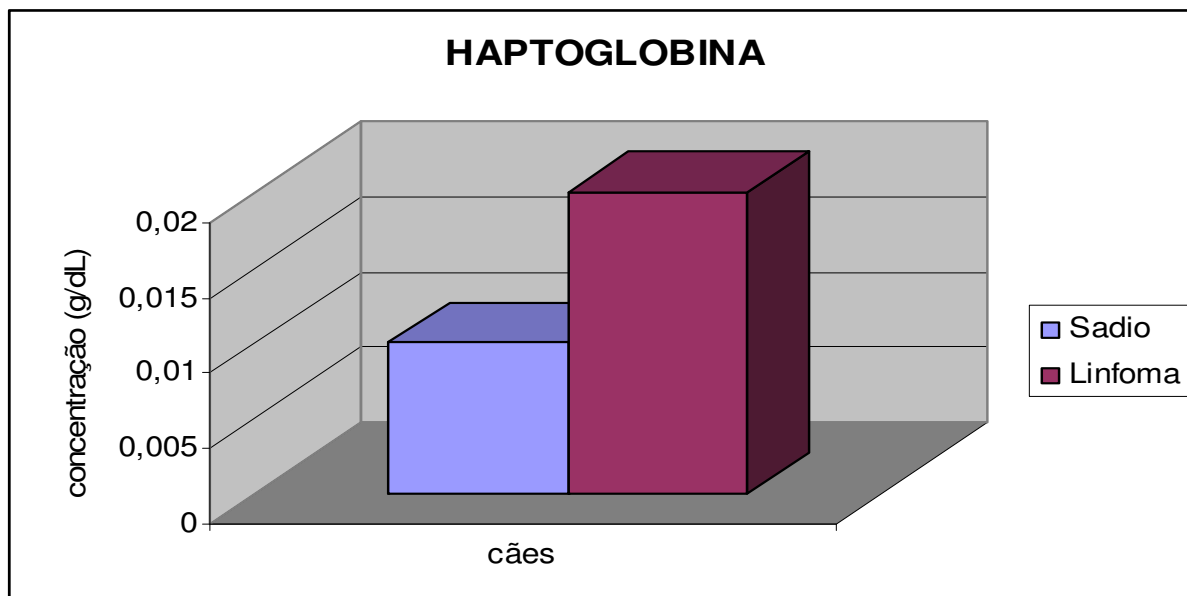
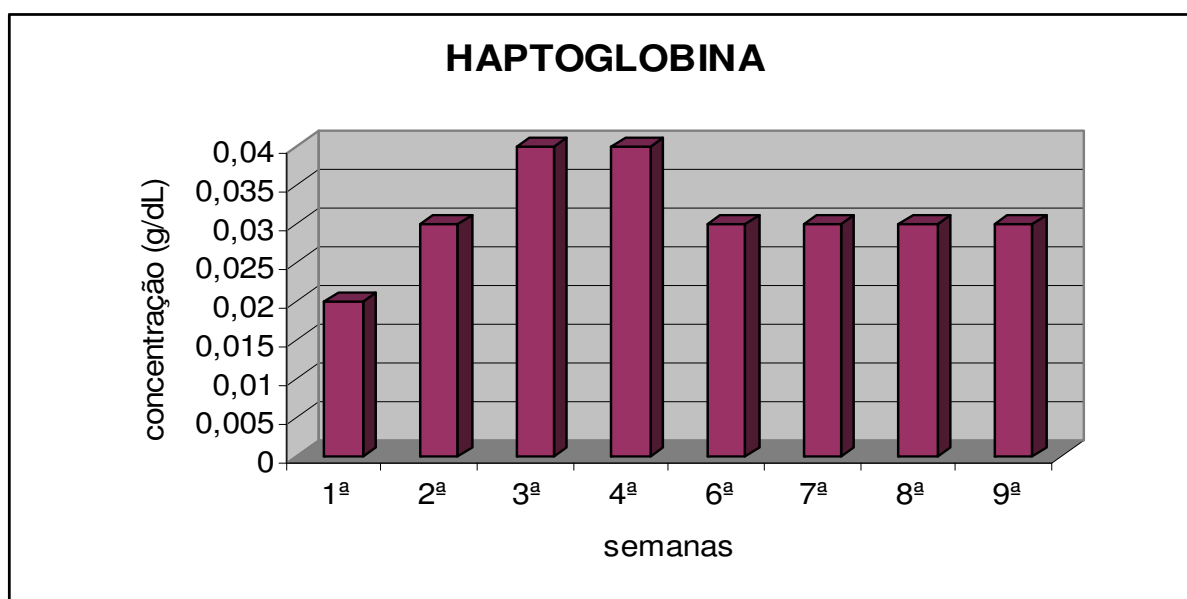
A**B**

Figura 16. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Haptoglobina, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.10 Transferrina

As médias das concentrações séricas (g/dL) da transferrina entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 17A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da transferrina entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 17B).

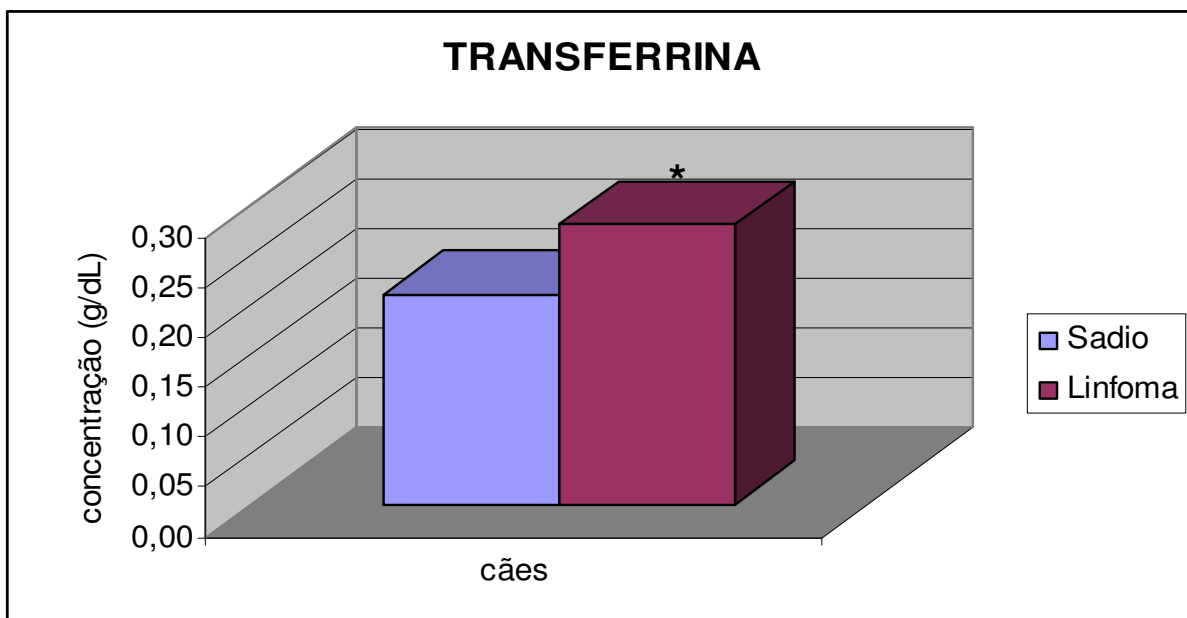
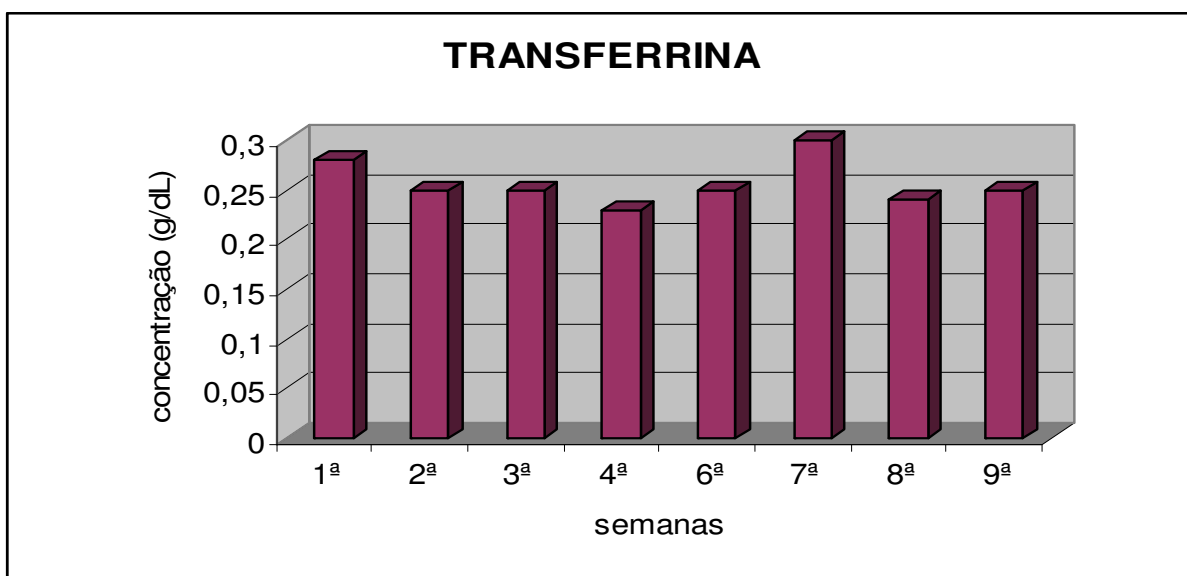
A**B**

Figura 17. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína Transferrina, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.11 Imunoglobulina A (IgA)

As médias das concentrações séricas (g/dL) da IgA entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 18A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da IgA entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 18B).

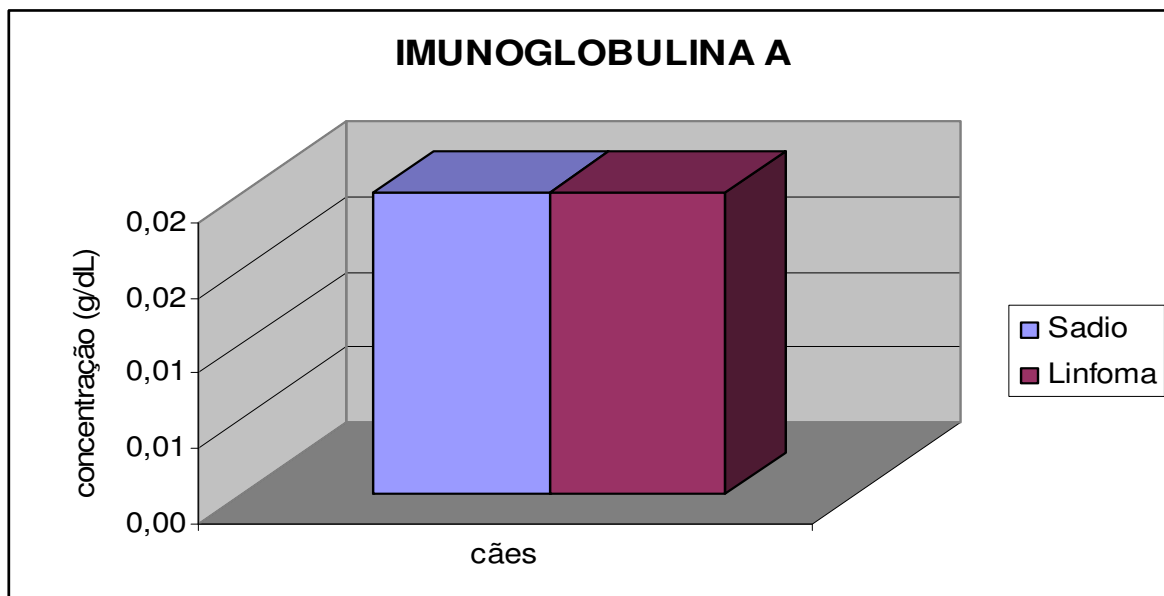
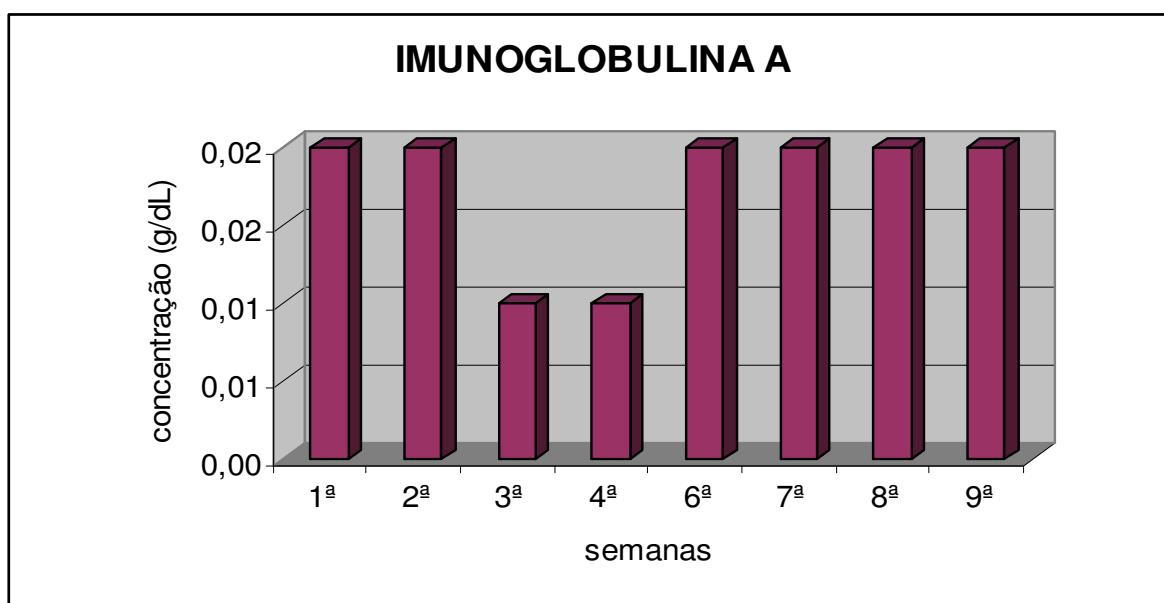
A**B**

Figura 18. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína IgA, verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.12 Imunoglobulina G (cadeia pesada)

As médias das concentrações séricas da IgG (cp) entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) (Figura 19A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da IgG (cp) entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 19B).

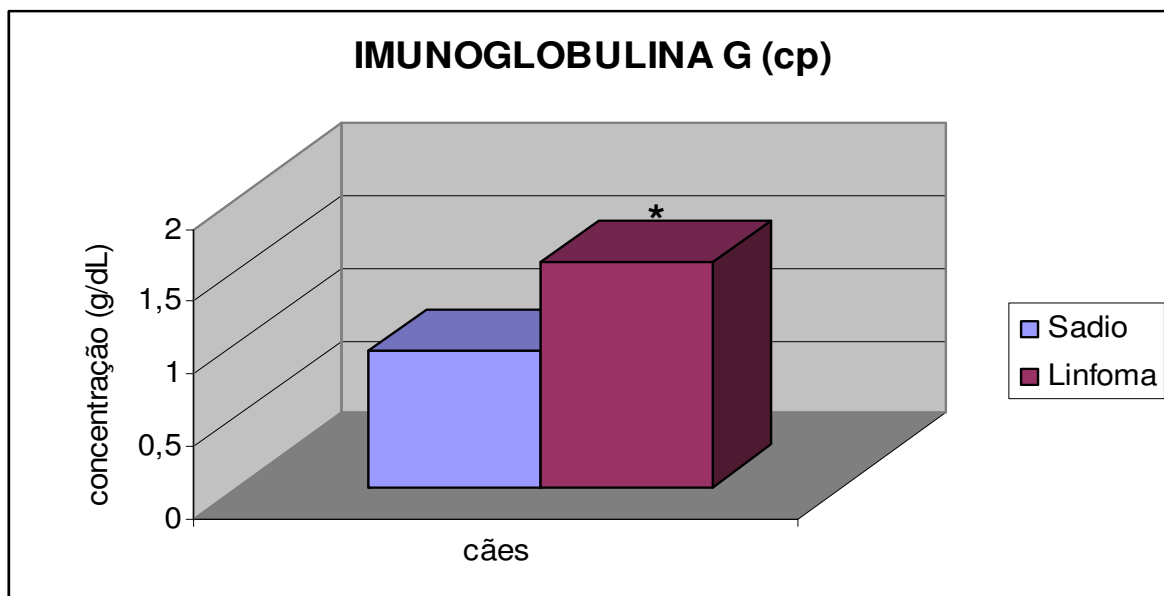
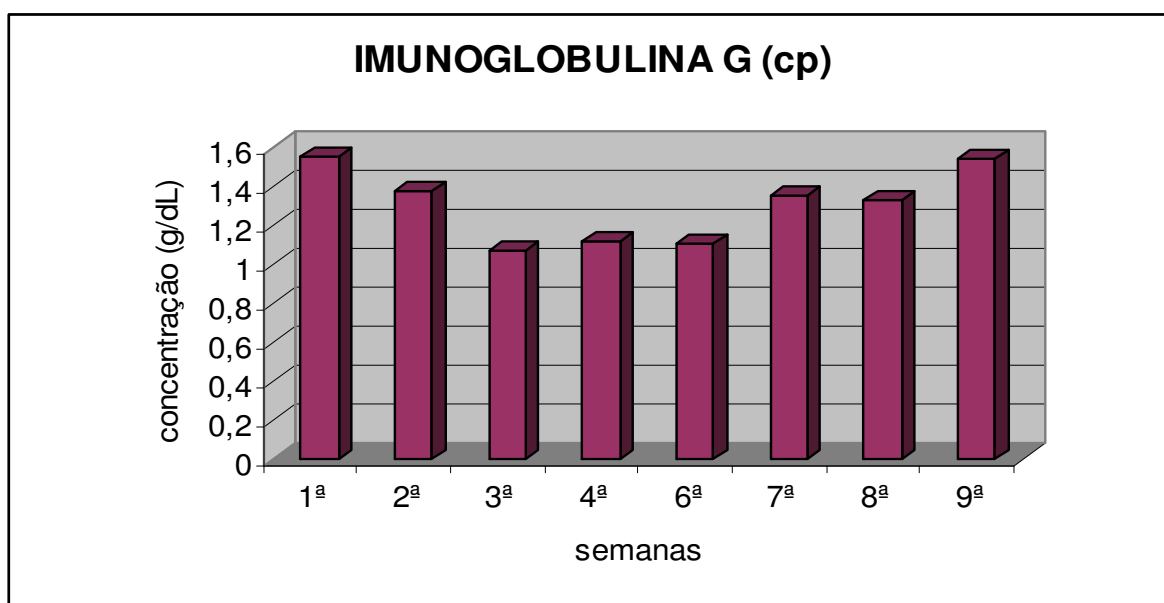
A**B**

Figura 19. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína IgG (cp), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.13 Imunoglobulina G (cadeia leve)

As médias das concentrações séricas (g/dL) da IgG (cl) entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 20A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da IgG (cl) entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) (Figura 20B).

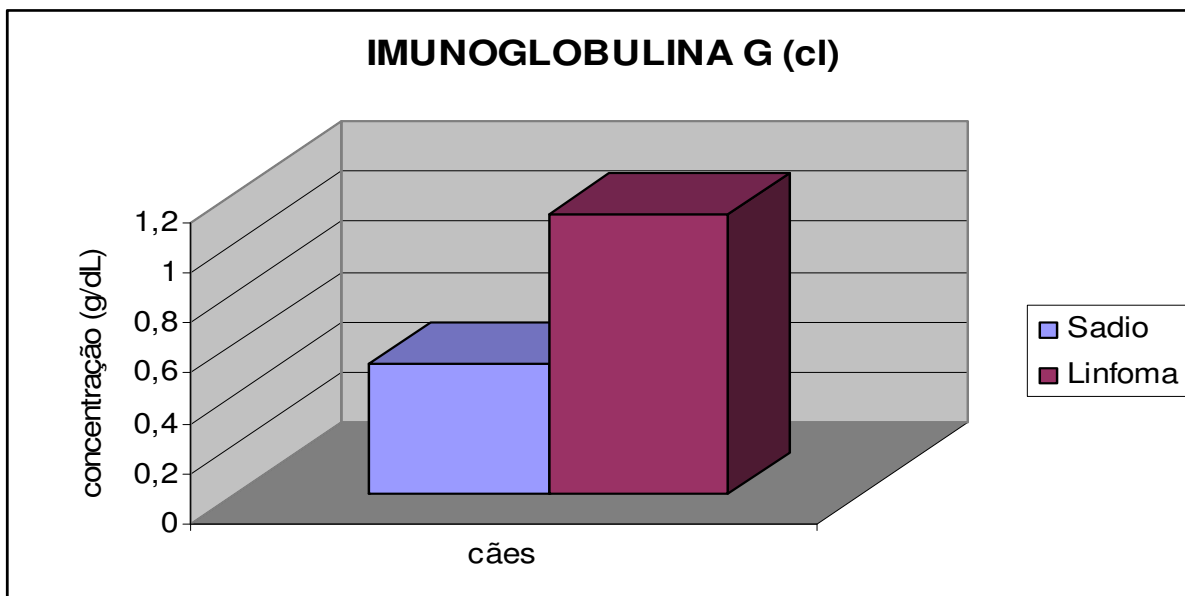
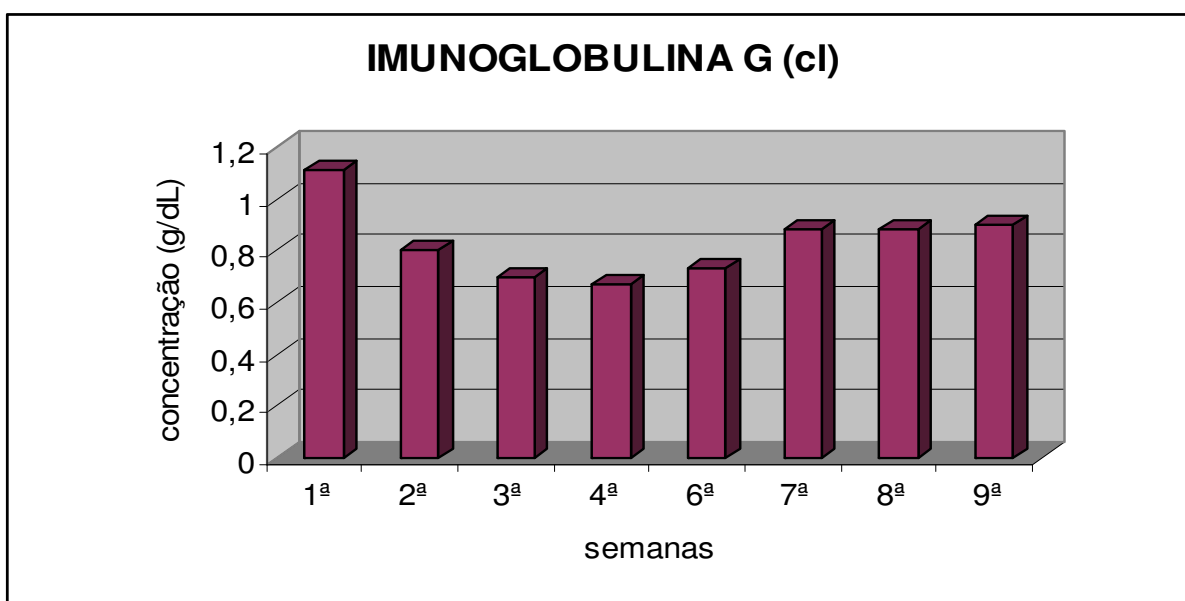
A**B**

Figura 20. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da proteína IgG (cI), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1^a sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.14 Proteína nº 9 (33KD)

A médias das concentrações séricas (g/dL) da proteína nº 9 (33 KD) entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 21A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) proteína nº 9 (33 KD) entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$) (Figura 21B). A proteína nº 9 (33KD) nas 3ª (vincristina e prednisona) e 6ª (vincristina) semanas de quimioterapia, apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) de todas as outras semanas, a 1ª semana (vincristina, L-asparaginase e prednisona) não apresentou diferença significativa com a 9ª semana (doxorubicina), a 2ª semana (ciclofosfamida e prednisona) não apresentou diferença significativa com a 4ª semana (doxorubicina) e a 7ª semana (ciclofosfamida) não apresentou diferença significativa com a 8ª semana (vincristina).

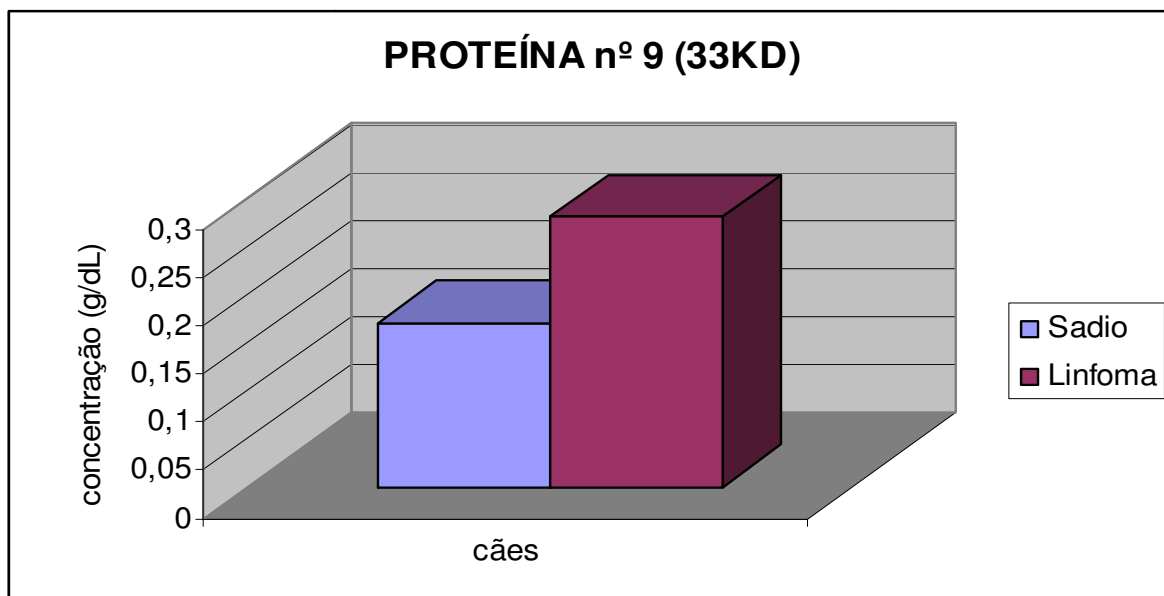
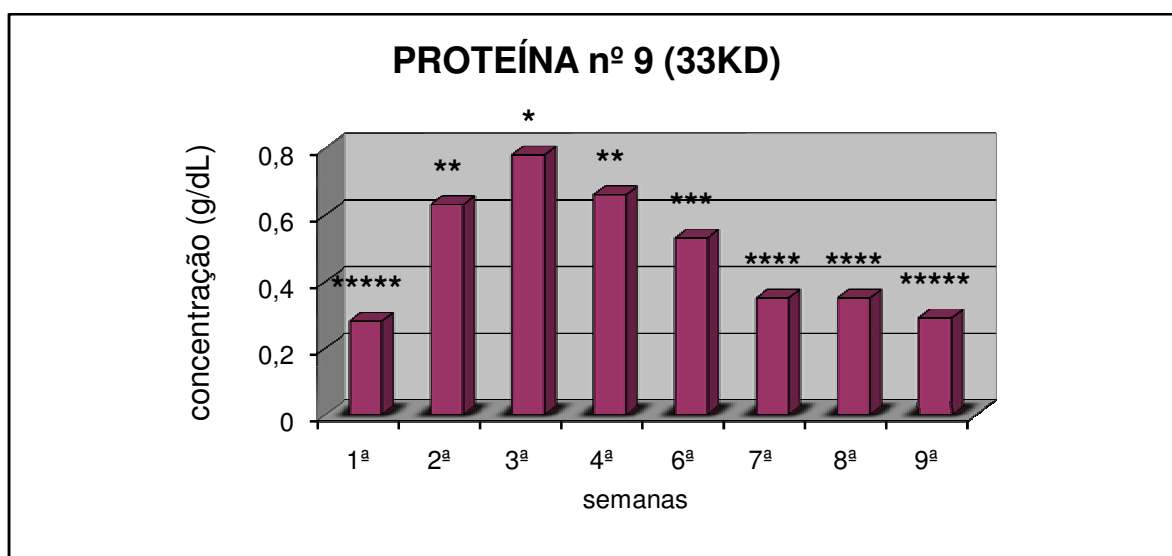
A**B**

Figura 21. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína nº 9 (33KD), verificadas na SDS-PAGE, de cães saudáveis e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

5.15 Proteína nº 11 (23KD)

As médias das concentrações séricas (g/dL) da proteína nº 11 (23 KD) entre cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 22A).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da proteína nº 11 (23 KD) entre cães linfomatosos, durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) (Figura 22B).

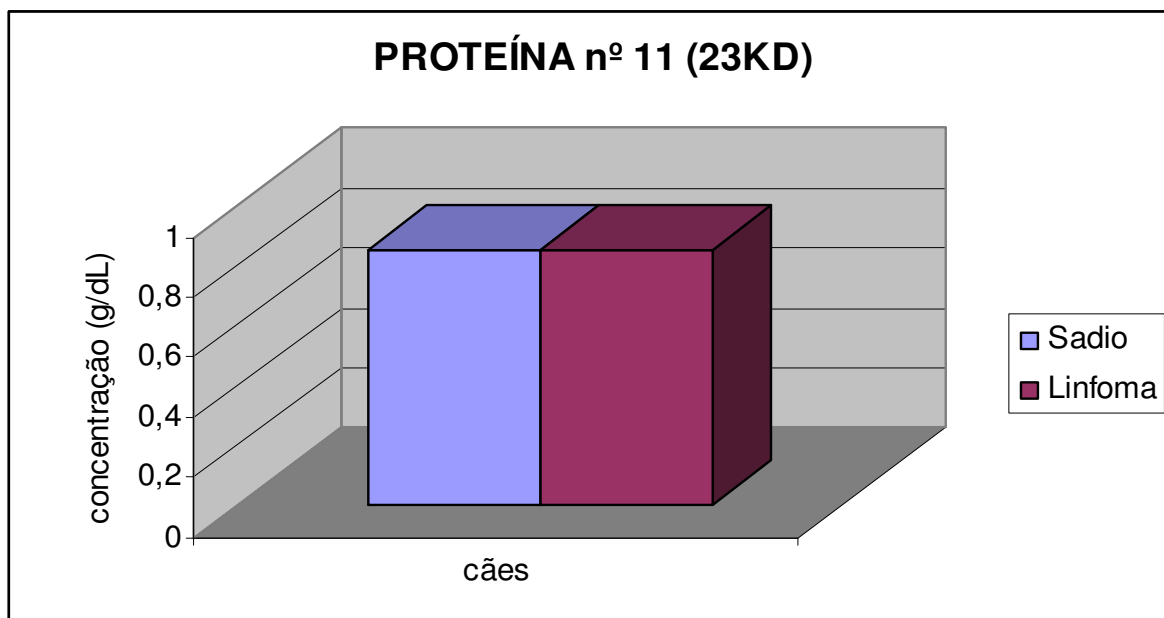
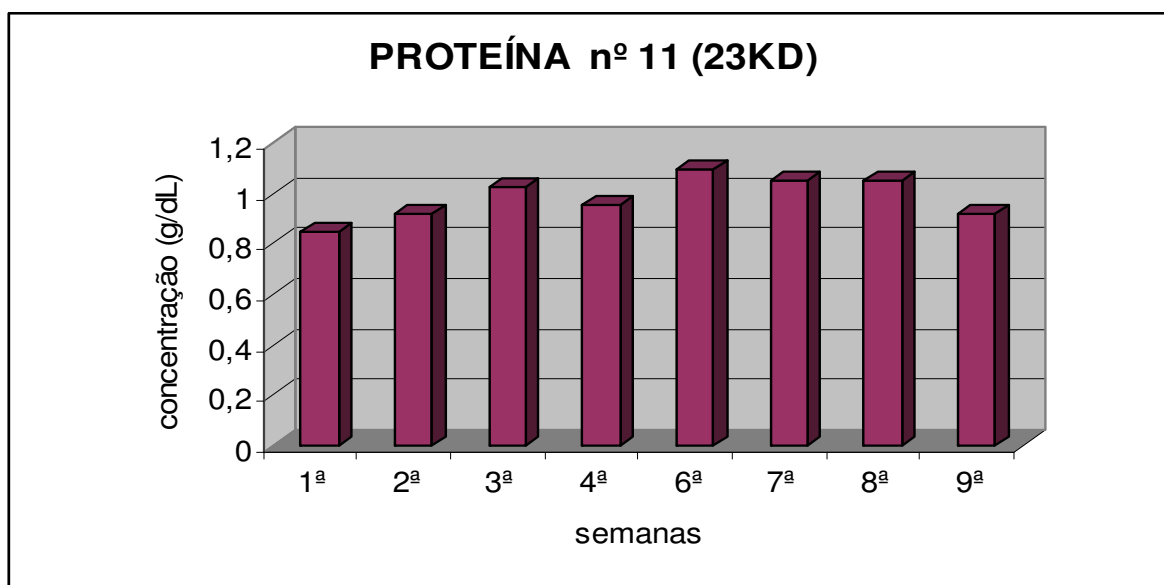
A**B**

Figura 22. Representação gráfica das concentrações séricas (g/dL) da Proteína nº 11 (23KD), verificadas na SDS-PAGE, de cães sadios e linfomatosos, antes da 1ª sessão de quimioterapia (A), e de cães linfomatosos antes de cada sessão semanal de quimioterapia (B) (FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2009).

6. DISCUSSÃO

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações (albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas, e gama-globulinas), obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico (KANEKO et al., 1997).

O proteinograma sérico em SDS-PAGE, representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas dos fluidos corporais (KANEKO et al., 2008). O desenvolvimento de neoplasias pode causar alterações nas concentrações séricas de proteínas de fase aguda (PFAs), conseqüente ao estímulo biossintético dos hepatócitos por ação das citocinas inflamatórias (ECKERSALL, 2008).

Neste estudo, foram encontradas de 18 a 31 frações protéicas nos cães saudáveis e linfomatosos, porém somente 11 frações apresentaram evidência no traçado eletroforético. As proteínas séricas totais incluem albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas. As subfrações de alfa-globulinas encontradas neste ensaio incluíram alfa-1-antitripsina (AAT), alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), alfa-2-ceruloplasmina e alfa-2-haptoglobina. A transferrina foi a beta-globulina encontrada. A IgA foi encontrada e há controvérsias na sua localização na curva eletroforética. Segundo BUSH (2004), a IgA localiza-se na fração beta-globulina, já NAOUM (1999), relata entre alfa-2-globulina e gama-globulina. As gama-globulinas detectadas incluíram IgG de cadeia pesada e leve. Além dessas proteínas, também foram encontradas duas proteínas não identificadas, nominalmente, as proteínas nº 9 (33KD) e nº 11 (23KD).

As médias das concentrações séricas das proteínas totais dos cães saudáveis e linfomatosos antes da quimioterapia, e nestes durante o protocolo quimioterápico, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), no entanto, apresentaram-se maiores nos cães linfomatosos, corroborando os achados de CALAZANS (2006), ECKERSALL (2008) e SEMOLIN (2008), que relataram maior produção de globulinas em doenças inflamatórias e neoplásicas. Tais achados também corroboram aqueles de COUTO (2001a), que relata a hiperproteinemia como sendo uma anormalidade paraneoplásica

que ocorre raramente e é secundária à produção de proteína monoclonal pelas células do linfoma, podendo resultar em síndromes de hiperviscosidade.

Segundo DALECK et al., (2008), deve-se avaliar pacientes que exibem alta taxa de proteína total, comum nos linfomas alimentares, ou com evidência da fração de globulina alta no perfil bioquímico, mediante eletroforese sérica. Podem-se observar hipoalbuminemia e picos nas frações alfa-2 e beta em proteinogramas de cães linfomatosos, resultantes do aumento de proteínas de fase aguda como parte da reação inflamatória. No ensaio atual, cães linfomatosos apresentaram aumento da alfa-1-glicoproteína ácida (AGP), betaglobulina transferrina e gamaglobulina IgG (cp), e valores normais para proteína total e albumina, portanto, somente os aumentos das beta e gamaglobulinas foram semelhantes aos de DALECK et al., (2008).

Segundo NAKAGE (2000), houve decréscimo significativo nos níveis séricos de proteínas totais, em cães saudáveis expostos à doxorubicina (30 mg/m²), à partir da terceira administração do antineoplásico. Neste ensaio, não houve diminuição nas concentrações séricas das proteínas totais dos cães linfomatosos, após a primeira administração de doxorubicina (6^a semana).

Segundo SILVA (2005), embora a concentração de proteínas séricas totais não tenha diferido significativamente na comparação entre cães saudáveis submetidos a dois diferentes protocolos quimioterápicos, combinando lomustina, vincristina e prednisona, verificou-se significância estatística entre animais tratados com diferentes protocolos, com relação a concentração sérica de albumina. No estudo em suma, cães linfomatosos foram submetidos aos fármacos vincristina, prednisona, L-asparaginase, ciclofosfamida e doxorubicina e não apresentam diferenças significativas com relação às proteínas séricas totais e de albumina, quando comparados a animais hígidos (controle). Este achado não encontra ressonância naqueles de RODASKI e DE NARDI (2006), segundo os quais há diminuição nas taxas de proteínas séricas totais e albumina com os cães tratados com L-asparaginase.

O antineoplásico doxorubicina causa lesões dos parênquimas hepático e renal, levando a hipoproteinemia, hipoalbuminemia e proteinúria (NAKAGE, 2000). Verificou-se neste, após administração de doxorubicina, diminuição da ceruloplasmina,

haptoglobina, IgGcp e proteína nº 9 (33KD), porém somente esta última apresentou alterações significativas. A haptoglobina pode diminuir na hemólise intravascular, corroborando os achados de DIAS (1998), que demonstrou efeito hemolítico da doxorrubicina. Pode haver a diminuição da IgG em deficiências imunológicas (ECKERSALL, 2008), da ceruloplasmina, ao nascimento, na desnutrição e na nefrose (JAIN, 1993) e da proteína nº 9 (33KD), não há relatos na literatura.

A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, no caso do cão, e mesmo não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) na comparação entre cães sadios e linfomatosos, tratados e não tratados com o protocolo quimioterápico, mostrou-se menor nos cães linfomatosos, corroborando com a literatura (MURATA et al., 2004; CALAZANS, 2006; ECKERSALL, 2008; SEMOLIN, 2008). De acordo com PRICE et al. (1991), a hipoalbuminemia pode indicar prognóstico pobre em cães com linfoma multicêntrico e submetidos ao protocolo de manutenção com doxorrubicina e ciclofosfamida. Segundo SEVELIUS et al. (1995), a diminuição na concentração sérica de albumina ou o aumento nas concentrações de alfa-1-antitripsina e haptoglobina séricas, foi observado em cães com cirrose hepática terminal, indicando comprometimento da massa hepática funcional.

Os valores de referência para concentração de albumina sérica em cães situam-se entre 2,5 a 4 g/dL (BUSH, 2004). Os resultados obtidos para taxas de albumina sérica, neste estudo, se evidenciaram que tanto cães hígidos quanto linfomatosos, situaram-se dentro da normalidade.

Em humanos, há relatos sobre os efeitos de várias doenças e distúrbios nutricionais, na produção de PFAs negativas. Uma hipótese recente é que a resposta de fase aguda tem um efeito mais forte do que a nutrição na regulação da concentração de albumina, transferrina e outras PFAs negativas. Deste modo, se a hipótese em epígrafe é segura, é de se esperar que uma diminuição na concentração das PFAs negativas é melhor indicador de uma resposta de fase aguda do que de uma deficiência nutricional (CERÓN et al., 2005).

Estudos experimentais realizados por SORJONEM (1987), em cães portadores de cinomose, evidenciaram elevação da taxa de albumina, decréscimo das frações alfa

e betaglobulinas e aumento significativo da fração gamaglobulinas. Já os cães linfomatosos neste estudo não apresentaram elevação da concentração sérica de albumina. Apresentaram aumento das concentrações séricas de AGP, betaglobulina, transferrina e gamaglobulina IgG (cadeia pesada). Tais resultados mostram que as proteínas de fase aguda apresentam comportamento distinto nas diferentes espécies animais e frente às diferentes patologias, ou seja, uma proteína que mostra-se elevada no soro sanguíneo de cães com neoplasia, poderá apresentar-se normal em cães com outras enfermidades, ou em outras espécies animais.

Segundo MOORE et al. (1992), a concentração sérica de albumina aumentou levemente (7 a 13%) em cães após a administração de glicocorticosteróides. No caso deste estudo, observou-se também que as concentrações séricas de albumina aumentaram discretamente após a 1ª, 2ª e 4ª administrações de glicocorticosteróides (prednisona), em cães linfomatosos. As proteínas de fase aguda detêm a habilidade de se ligarem à agentes farmacológicos e tem sido reportado que a disposição, distribuição e cinética dos fármacos no organismo animal, são significativamente alteradas durante a fase aguda do processo inflamatório. Assim, a eficácia dos fármacos pode ser alterada (IKENOUE et al., 2000).

Cães linfomatosos incluídos neste ensaio não apresentaram diferenças significativas na concentração sérica de albumina, após a primeira administração de doxorrubicina, corroborando os achados de NAKAGE (2000), que relatou redução significativa na albumina somente após três injeções do supracitado quimioterápico.

Como postulado por COUTO (2001b) e RODASKI e DE NARDI (2006), a hepatotoxicidade decorrente dos agentes antineoplásicos, de modo geral, é diagnosticada por intermédio da elevação das atividades séricas de enzimas como a alanina aminotransferase (ALT) e a fosfatase alcalina (FA), além de bilirrubinemia e hipoalbuminemia. No entanto, neste estudo, não foi verificada diminuição na concentração sérica da albumina, em cães linfomatosos, após o protocolo quimioterápico.

De acordo com RODASKI e DE NARDI (2006), a L-asparaginase inibe a função dos linfócitos T e B, além de levar os cães a hepatotoxicose com conseqüente aumento

das atividades séricas das enzimas alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, bilirrubina e albumina séricas. No caso deste ensaio, verificou-se aumento na concentração sérica de albumina após administração de L-asparaginase, porém sem alterações significativas entre os cães linfomatosos tratados e não tratados.

Os valores de referência para globulinas séricas em cães, situa-se entre 2,5 a 4,5 g/dL (BUSH, 2004). Foi verificado que os cães linfomatosos deste experimento apresentaram hiperglobulinemia ($5,31 \pm 1,68$ g/dL). As globulinas séricas apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre cães sadios e linfomatosos, no momento zero. As frações protéicas AGP, transferrina e IgG (cp), apresentaram concentrações séricas significativamente maiores ($p < 0,05$) nos cães linfomatosos, indicando a importância de tais frações protéicas no aumento das globulinas, diante do quadro linfomatoso.

A hiperglobulinemia tem sido observada em aproximadamente 20% dos cães com linfoma, provavelmente em consequência da hipergamaglobulinemia (CARDOSO et al., 2004). Segundo RAMOS et al. (2008), em um estudo com 14 cães linfomatosos, 71% deles apresentaram hiperglobulinemia. Também, no ensaio em tela, no total de 10 cães linfomatosos, 70% deles apresentaram hiperglobulinemia, no momento zero. Tais cães linfomatosos apresentaram hiperglobulinemia durante as nove semanas do protocolo quimioterápico. Mais uma vez, a hiperglobulinemia observada nos cães linfomatosos deste protocolo experimental, em todos os momentos, corrobora os achados de KANEKO (1997) e ECKERSALL (2008), que sugerem aumento na produção de globulinas em doenças inflamatórias e neoplásicas.

Os valores de referência para relação A:G em cães é de 0,5 a 1,3 (BUSH, 2004). No presente estudo, foram encontrados quocientes iguais a $0,98 \pm 0,15$ e $0,78 \pm 0,3$, para cães sadios e linfomatosos, respectivamente. Tais valores encontram-se dentro da normalidade (KANEKO, 1997). Os valores da relação A:G não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) quando foram confrontados cães sadios e linfomatosos e entre cães linfomatosos durante a quimioterapia, porém apresentaram-se menores nos cães linfomatosos, sugerindo uma diminuição da concentração de albumina ou uma maior produção de globulinas, como foi observado por ECKERSALL

(2008). Neste estudo, os cães linfomatosos apresentaram menores concentrações séricas de albumina e maiores de globulinas, se comparados aos cães saudáveis, porém esses achados foram insuficientes para diferir a relação A:G entre eles. Todos os valores encontrados para a relação A:G nos cães linfomatosos, ao longo das sessões de quimioterapia, apresentaram-se dentro da normalidade, discordando de FINCO et al. (1973), que relataram que a alteração na relação A:G é, geralmente, o primeiro sinal de distúrbio protéico. Segundo SCHALL (1976), a obtenção e estudo eletroforético, dos valores absolutos de cada fração protéica e da determinação da relação A:G, fornecem excelentes bases para elucidação diagnóstica.

A AAT é considerada uma proteína de fase aguda positiva, no caso do cão, porém suas concentrações séricas apresentaram-se significativamente menores ($p < 0,05$) nos cães linfomatosos, comportando-se como uma proteína de fase aguda negativa, contrariando inclusive THOMAS (2000), que relata elevados picos de alfa-globulina em cães com diversas neoplasias. De acordo com CARAPETO et al. (2006), as proteínas que migram na região das alfa-globulinas são as proteínas de fase aguda que aumentam imediatamente após inflamação ou infecção, fato que discorda dos achados do atual estudo, com relação à AAT. Ademais, a AAT também pode diminuir suas concentrações séricas na doença hepática e na doença pulmonar crônica (ECKERSALL et al., 2008).

Também, segundo MURATA et al. (1995), valores mais baixos de AAT estão relacionados à menor intensidade da inflamação, o que contradiz os achados deste ensaio. De acordo com HUGHES et al. (1995), a AAT difunde-se facilmente no intestino devido ao seu baixo peso molecular, sendo que funcionalmente ela requer um efluxo substancial para alcançar seu local de ação extravascular. Assim, a discrepância dos resultados dos estudos com AAT pode ser atribuída a diferentes graus de extravasamento, também relacionado à concentração de albumina.

As alfa-1-globulinas (antitripsina e glicoproteína ácida) são induzidas principalmente pela citocina interleucina 1 (IL-1) e caracterizam-se por elevarem-se precocemente após infecção ou lesão tecidual e normalizarem-se rapidamente após o término do estímulo. Por sua vez, as alfa-2-globulinas (ceruloplasmina e haptoglobina)

induzidas pela IL-6, elevam-se mais tardiamente e, segundo MURATA et al. (2004) e CÉRON et al. (2005), assim permanecem por várias semanas.

Todas as frações protéicas estudadas neste ensaio, com exceção da proteína nº 9 (33KD), não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na comparação entre cães linfomatosos após a primeira administração de doxorubicina, corroborando os achados de NAKAGE (2000), que relatou aumento nas alfa-1-globulinas e diminuição nas alfa-2-globulinas séricas, porém com diferença estatística.

A AGP, considerada uma proteína de fase aguda positiva, no caso do cão, apresentou-se significativamente elevada ($p < 0,05$) em cães linfomatosos, no momento zero deste ensaio, corroborando achados de literatura, reportados por vários autores (GRUYS et al., 1994; GODSON et al., 1996; HAHN et al., 1999; CALAZANS, 2006; ECKERSALL, 2008). OGILVIE et al. (1993) relataram que a determinação das concentrações de AGP pode ser útil em estimar a carga tumoral, comparando cães linfomatosos tratados ou não com doxorubicina. A determinação sérica da AGP revelou-se útil no monitoramento de cães linfomatosos, tratados com doxorubicina, porque a concentração de AGP diminuiu significativamente em animais com remissão completa e aumentou novamente, três semanas antes da recidiva do linfoma (CERÓN et al., 2005).

Cães com tumores mamários e várias outras neoplasias não apresentam concentrações séricas elevadas de AGP, comparados a cães saudáveis, embora tem sido postulado que a molécula de alfa-1-glicoproteína ácida possa aumentar a concentração do ácido siálico em estados neoplásicos. Elevações na concentração sérica dessa proteína tem sido descritas em cães linfomatosos, carcinomas (exceto carcinoma mamário) e sarcomas (CÉRON et al., 2005).

Em princípio, as PFAs são biossintetizadas nos hepatócitos, porém há evidências que elas também possam ser produzidas por outros tecidos. Os linfócitos podem produzir a AGP, o que poderia explicar o seu nível sérico alto em cães e gatos linfomatosos. A produção extra-hepática de PFAs também tem sido descrita em outros órgãos em humanos, tais como rins, intestino e coração, e em diferentes tipos de leucócitos. Adicionalmente, a AGP pode originar-se da glândula prostática e aparecer

no líquido seminal. Ademais, pulmão, tecido adiposo, baço e rins podem produzir haptoglobina (CERÓN et al., 2005).

Algumas proteínas, tais como a AGP e a albumina, podem se ligar à fármacos. Isto pode ser importante como implicação farmacocinética na terapia clínica, porque a variação nos níveis plasmáticos das PFAs durante a inflamação pode alterar a concentração plasmática livre dos fármacos (CERÓN et al., 2005).

A AGP é um agente antiinflamatório natural, que inibe a ativação dos neutrófilos e aumenta a secreção do receptor antagonista de interleucina-1 através dos macrófagos (FOURNIER et al., 2000). Segundo HUGHES et al. (1995), a concentração sérica da AGP em cães hospitalizados não diferiu dos sadios (cães não hospitalizados).

Segundo OGILVIE et al. (1993) e DALECK et al., (2008), as concentrações séricas de AGP é capaz de estimar a carga tumoral e suas alterações permitiram prever a recidiva do linfoma semanas antes de sua manifestação clínica em cães linfomatosos tratados com doxorrubicina. Neste estudo, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$) nas concentrações séricas de AGP, entre cães linfomatosos, após a primeira administração de doxorrubicina, porém houve diferença entre cães sadios e linfomatosos, discordando dos achados de HAHN et al. (1999).

A ceruloplasmina é considerada uma proteína de fase aguda positiva, no caso do cão, e mesmo não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre cães sadios e linfomatosos, neste estudo, apresentou-se menor nos cães linfomatosos, discordando os achados de CALAZANS (2006) e ECKERSALL (2008). Segundo SOLTER et al. (1991), algumas proteínas de fase aguda, tais como a ceruloplasmina e haptoglobina, são úteis em indicar a intensidade da reação inflamatória, porém este relato não foi confirmado neste estudo.

Estudos realizados em cães linfomatosos revelaram que as proteínas ceruloplasmina e haptoglobina apresentaram concentrações séricas mais altas em relação aos animais sadios (DALECK et al., 2008), confrontando com os achados deste estudo. Segundo CALAZANS (2006), a ceruloplasmina apresentou diferenças significativas quando compararam-se cães linfomatosos, no sétimo dia de quimioterapia, achado que não encontrou redundância nos dados obtidos no presente

ensaio. Segundo MARTÍNEZ-SUBIELA et al., (2004), a ceruloplasmina não apresentou diferenças significativas após o uso de glicocorticóides em cães saudáveis, corroborando os achados dos cães linfomatosos deste ensaio.

A haptoglobina é considerada uma proteína de fase aguda moderadamente positiva em cães, e aumenta na fase aguda da inflamação. Neste estudo, mesmo não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$), revelou concentrações maiores no soro de cães linfomatosos, corroborando os dados da literatura (SKINNER, 1999; MISCHKE & ECKERSALL, 2005; CALAZANS, 2006). Embora a haptoglobina em cães seja reconhecida como uma proteína integrante das proteínas de fase aguda, moderada (CONNER et al., 1988a), muitos estudos tem demonstrado mudanças na concentração da haptoglobina, como uma indicação prognóstica e diagnóstica nas inflamações (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002).

As médias das concentrações séricas (g/dL) da haptoglobina em cães linfomatosos durante as sessões semanais de quimioterapia, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), corroborando os achados de CALAZANS (2006).

A haptoglobina canina é particularmente sensível a glicocorticosteróides, e apresenta elevação na sua concentração sérica após a administração de prednisona na dose de 2 mg/kg, via oral, por três dias consecutivos. O glicocorticosteróide prednisona está incluído no rol de fármacos utilizados no protocolo quimioterápico, do experimento em tela, sendo administrado nas quatro primeiras sessões de quimioterapia. Verificou-se que após as duas primeiras sessões houve aumento na haptoglobina, porém sem ultrapassar os limites de normalidade, corroborando os dados de literatura (HARVEY and WEST, 1987; MARTINEZ-SUBIELA et al., 2004; McGROTTY et al., 2005).

O perfil de fase aguda da haptoglobina se difere entre as espécies. Em caninos, felinos, eqüinos e suínos, os valores de referência situam-se entre 0,1 a 0,2 g/dL, entretanto, no decurso de doenças inflamatórias e infecciosas ela pode aumentar para 0,5 g/dL ou mais (ECKERSALL, 2008). Nesse ensaio, as concentrações séricas médias de haptoglobina obtidas para cães saudáveis e linfomatosos foram de 0,013 e 0,022 g/dL, respectivamente, ambos abaixo dos valores de normalidade.

Em cães, a transferrina é considerada uma proteína de fase aguda negativa. No entanto, neste ensaio, comportou-se como uma proteína de fase aguda positiva, apresentando concentrações significativamente maiores ($p < 0,05$) nos cães linfomatosos, e discordando frontalmente dos achados de literatura (KANEKO, 2007; ECKERSALL, 2008). Segundo XIE et al. (2002b), a concentração sérica de transferrina apresentou-se elevada em frangos com doenças inflamatórias e infecciosas, sugerindo que em aves domésticas a transferrina apresenta-se como uma proteína de fase aguda positiva.

Segundo THOMAS (2000), a transferrina tem a função de se ligar ao ferro para transportá-lo aos tecidos, e concentrações elevadas podem estar relacionadas com deficiência de ferro. Além disso, a transferrina pode aumentar na doença hepática e síndrome nefrótica e diminuir na doença de armazenamento do ferro (ECKERSALL et al., 2008). Quando os níveis de ferro sérico estão elevados, como nas anemias hemolíticas, os animais devem-se tornar mais suscetíveis à infecção bacteriana, pois muitas bactérias necessitam do ferro para crescimento (TIZARD, 2008).

Nos resultados encontrados no ensaio atual, verificou-se que as concentrações séricas médias de IgA não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) na comparação entre cães saudáveis e linfomatosos, concordando com MADEWELL et al. (1979). Já ECKERSALL et al., (2008), relataram aumento de imunoglobulinas em doenças infecciosas, doença hepática, mielomas e outros tumores linfóides, e diminuição em fetos, recém-nascidos antes da ingestão do colostro e em deficiências imunológicas.

Os valores de referência para a concentração sérica de IGA, em caninos, situa-se entre 0,02-0,15 g/dL (TAKEDA e AKIRA, 2005), portanto, neste estudo, os valores de IgA de cães saudáveis e linfomatosos apresentaram-se dentro da normalidade. A IgA compõe secreções externas (JAIN, 1993), porém neste ensaio, sua mensuração foi conduzida no soro sanguíneo, o que pode ter contribuído para os achados normais.

A síntese extra-hepática das PFAs ocorre especialmente nas células endoteliais e no epitélio de órgãos que se comunicam com o meio externo, tais como a glândula mamária, o sistema respiratório e o trato gastrintestinal (JACOBSEN, 2007). O mesmo

autor, relatou que a determinação dos níveis locais das proteínas de fase aguda, pode fornecer informações sobre o *status* inflamatório/infeccioso de um órgão, de particular interesse, aumentando a precisão na arquitetura do diagnóstico.

As concentrações séricas médias da IgG (cadeia pesada), em cães linfomatosos, apresentaram-se significativamente maiores ($p < 0,05$) em relação aos cães saudáveis. Provavelmente, devido a uma maior produção de globulinas em doenças inflamatórias e neoplásicas (JAIN, 1993; CALAZANS, 2006; ECKERSALL, 2008). O mesmo não foi encontrado por MADEWELL et al., (1979), que relatou não haver diferenças significativas nas concentrações séricas de IgG, quando foram comparados cães saudáveis e linfomatosos.

Os valores de referência para a concentração sérica de IgG, em caninos, situa-se entre 1 e 2 g/dL (TAKEDA e AKIRA, 2005). Neste ensaio, o valor total de IgG encontrado para cães linfomatosos foi de 2,66 g/dL, e para cães saudáveis foi de 1,47 g/dL. Portanto, cães linfomatosos apresentaram valor de IgG acima daqueles de referência e maior do que aqueles obtidos para cães saudáveis, demonstrando uma maior produção de globulinas nos cães doentes.

Gamopatias monoclonais, comuns nos cães e raras nos gatos, constituem síndromes paraneoplásicas e estão frequentemente associadas a doenças linfoproliferativas, especialmente os linfomas de células B (DORFMAN e DIMSKI, 1992; GIRAUDEL et al., 2002), que resultam em síntese excessiva de uma imunoglobulina monoclonal (MACEWEN e HURVITZ, 1977), representada pelo aumento na fração gama no proteinograma (DALECK et al., 2008). Isto porque o aumento da produção de IL-6, entre outras interleucinas pode causar uma ativação policlonal inespecífica das células B resultando na produção de anticorpos contra os imunógenos contidos nos bancos de memória individuais, como descrito por FLYNN et al. (1994). Em um estudo, 6% dos cães linfomatosos e acima de 50% dos cães com leucemia linfocítica crônica exibiram gamopatia monoclonal (DORFMAN e DIMSKI, 1992). O aumento da IgG de cadeia pesada no presente estudo, confirma a ocorrência de gamopatia monoclonal, em cães linfomatosos, podendo estar associada à síndrome paraneoplásica que constitui

uma das principais alterações bioquímicas em cães portadores de linfoma (DHALIAWAL et al., 2003a; CARDOSO et al., 2004).

As principais alterações clínicas e clínico-patológicas associadas à síndrome paraneoplásica são anorexia, caquexia, anemia ou eritrocitose, leucocitose, trombocitopenia, hiper ou hipocalcemia, osteopatia hipertrófica, febre de origem desconhecida, hipoglicemia, hiperistaminemia e hipergamaglobulinemia (YOUNG, 1997; MARCHETTI et al., 2005).

Segundo ALEXANIAN (1975), picos mais baixos de IgG estão relacionados com a diminuição da carga tumoral pela quimioterapia antineoplásica em pacientes humanos. Portanto, também é possível que os achados de IgG no presente estudo, em cães linfomatosos, sugiram uma grande carga tumoral em tais pacientes. Ademais, a hipergamaglobulinemia provoca hiperviscosidade sanguínea, sendo comum no mieloma múltiplo, plasmocitoma, linfoma, leucemia linfocítica e macroglobulinemia primária (THOMPSON, 1997).

As concentrações séricas médias de IgG (cadeia leve) não variaram significativamente ($p > 0,05$) na comparação entre cães sadios e linfomatosos, porém apresentou-se maior nos cães linfomatosos. A IgG de cadeia leve é também conhecida como IgG colostrar, sendo transferida através da imunidade passiva pelo aleitamento materno (RADOSTITS et al., 1994). Esta imunoglobulina apresenta-se aumentada somente em animais jovens, sugerindo sua concentração basal em cães linfomatosos, com idade adulta à senil.

As concentrações séricas médias da proteína nº 9 (33KD) não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre cães sadios e linfomatosos, porém mostrou-se maior nos cães linfomatosos. Segundo CALAZANS (2006), a proteína correspondente de peso molecular 32 KD, diferiu significativamente entre cães sadios e linfomatosos, discordando dos achados aqui encontrados.

As concentrações séricas médias da proteína nº 9 (33 KD) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre cães linfomatosos durante o protocolo quimioterápico. Portanto, os agentes antineoplásicos somente intervêm na

concentração sérica da proteína nº 9 (33KD) e essa alteração pode estar relacionada à resposta ao tratamento.

Com o início do protocolo quimioterápico, a proteína nº 9 (33KD) elevou sua concentração após a 1ª e 2ª sessões de quimioterapia, e à partir da 3ª sessão, diminuiu sua concentração até a 8ª sessão (9ª semana). Portanto, sugere-se que os fármacos administrados na 1ª sessão, vincristina, L-asparaginase e prednisona, e os da 2ª sessão, ciclofosfamida e prednisona, possam interferir no aumento da proteína nº 9 (33KD).

As concentrações séricas médias da proteína nº 11 (23KD), não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre cães saudáveis e linfomatosos, bem como entre cães linfomatosos durante a quimioterapia. Segundo CALAZANS (2006), uma fração protéica similar e nominalmente não identificada, de 24 KD, apresentou concentrações significativamente maiores em cães linfomatosos, e mostrou-se ausente no soro de cães saudáveis, discordando dos achados do estudo em questão.

7. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais testadas, pôde-se concluir que:

- As alterações eletroforéticas foram inespecíficas para o diagnóstico definitivo, porém podem dar suporte ao diagnóstico, prognóstico, monitoramento e tratamento do linfoma canino.
- Os cães sadios apresentaram concentrações séricas elevadas da fração protéica alfa-1-antitripsina.
- Os cães linfomatosos apresentaram concentrações séricas elevadas das frações protéicas alfa-1-glicoproteína ácida, transferrina, IgG (cadeia pesada) e globulinas, quando comparados aos cães sadios.
- Na comparação entre cães linfomatosos, durante o protocolo quimioterápico, a proteína nº 9 (33KD) apresentou concentrações séricas elevadas.
- Nos cães linfomatosos, a albumina não se apresentou como PFA negativa e a transferrina apresentou-se como PFA positiva.
- Os cães linfomatosos apresentaram hiperglobulinemia e gamopatia monoclonal em todas as semanas de quimioterapia.

8. REFERÊNCIAS ¹

ALEXANIAN, R. Monoclonal Gammopathy in Lymphoma. **Archives of Internal Medicine**, v. 135, p. 62-66, 1975.

ANDERSON, N. L.; ANDERSON, N. G. The human plasma proteome. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, n. 1, p. 845-867, 2002.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JR, W. **Agroestat**, versão 1.0. Jaboticabal: FCAV, UNESP. 2008.

BARGER, A. M.; GRINDEM, C. B. Hematologic abnormalities associated with câncer therapy. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed. Canada: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. p. 676-681.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, Cambridge, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BOWMAN, B. H. **Hepatic plasma proteins**. San Diego: Academic Press, 1992, p. 141-212.

BRAUND, K. G.; EVERETT, R. M.; ALBERT, R. A. Neurologic manifestations of monoclonal igm gammopathy associated with lymphocytic-leukemia in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, p. 1407-1410, 1978.

BREITSCHWERDT, E. B.; WOODY, B. J.; ZERBE, C. A.; DEBUYSSCHER, E. V.; BARTA, O. Monoclonal gammopathy associated with naturally-occurring canine ehrlichiosis. **Journal of veterinary internal medicine**, Lakewood, v. 1, p. 2-9, 1987.

¹ Associação Brasileira de Normas Técnicas NRB 6023

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

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

CARAPETO, M. V.; BARRERA, R.; MAÑE, M. C.; outros autores. Serum α -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

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

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

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J.; DOUGLAS, T. A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 45, n. 1, p. 107-110, 1988.

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

CORNELIUS, C. E. Liver function. In: KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 4th ed. Londres: Academic Press, 1989. p. 381-390.

COUTO, C. G. Linfoma no cão e no gato. In: NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001a. p. 882–889.

COUTO, C. G. Quimioterapia prática. In: _____ NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001b. p. 867-870.

CHUN, J. K.; FAN, T. M.; LORIMIER, L. Treating lymphoma in dogs and cats. **Veterinary Medicine**, p. 285-294, 2000.

DALECK, C. R.; CALAZANS, S. G.; DE NARDI, A. B. Linfomas. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B.; RODASKI, S. **Oncologia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, 2008, p. 482-499.

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

DHALIWAL, R. S.; KITCHELL, B. E.; MESSICK, J. B. Canine lymphosarcoma: diagnosis and treatment. **The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v. 25, n. 8, p. 584-599, 2003b.

DIAS, M. A. Estudo de um modelo animal de hipoplasia sanguínea induzida pelo agente antineoplásico doxorubicina (Adriplastina). 1998. 76 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – área Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

DOBSON, C. Serum protein changes associated with *Oesophagostomum columbianum* infections in sheep. **Nature**, London, v. 207, n. 5003, p. 1304-1305, 1965.

DOBSON, J. Classification of canine lymphoma: a step forward. **The Veterinary Journal**, London, v. 167, n. 2, p. 125-126, 2004.

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

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

ECKERSALL, P. D.; HARVEY, M. J. J.; RENTON, J. P.; NICKSON, D.; BOYD, J. Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, suppl 47, p. 159-164, 1993.

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

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

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

ETTINGER, S. N. Principles of treatment for canine lymphoma. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, Philadelphia, v.18, n.2, p. 92-102, 2003.

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

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p.559-567, 2002.

FAGLIARI J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Changes in plasma protein concentration in ponies with experimentally induced alimentay laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, Illinois, v. 59, n. 10, p. 1234-1237, 1998.

FAGLIARI, J. J.; WEISS, D. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n. 4, p. 383-387, 2003.

FAN, T. M.; KITCHELL, B. E. An update on diagnosing and treating canine lymphosarcoma. **The Veterinary Medicine**, p. 58-67, 2002.

FAN, T. M. Lymphoma updates. **The Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 33, n. 3, p. 455-471, 2003.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th. ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FINCO, D. R. et al. Chronic enteric disease and hypoproteinemia in nine dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 163, n. 3, p. 262-271, 1973.

FLYNN, J. N.; CANNON, C. A.; LAWRENCE, C. E.; outros autores. Polyclonal B-cell activation in cats infected with feline immunodeficiency virus. **Immunology**, London, v. 81, n. 4, p.626-630, 1994.

FOURNIER, T.; MEDJOUBI-N. N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1482, n. 1-2, p. 157-171, 2000.

GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **The New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 340, n. 6, p. 448-454, 1999.

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

GIRAUDEL, J. M.; PAGES, J. P.; GUELFI, J. F. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. **Journal of American Animal Hospital Association**, Lakewood, v. 38, n. 2, p. 135-147, 2002.

GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S. K.; REDMOND, M. J.; CORDEIRO, D. M.; SETHI, M. S.; HARLAND, R. J. e BABIUK, L. A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immuno-pathology**, Amsterdam, v. 51, n. 3-4, p. 277-292, 1996.

GORDON, A. H. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. New York: Elsevier, 1995. 213 p.

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

GRAUER, G. F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 469-478, 2005.

GREENLEE, P. G.; QUIMBY, F. W.; CALVANO, S. E.; KIMMEL, M.; LIEBERMAN, P. H. Lymphomas in dogs. **Cancer**, Philadelphia, v. 66, n. 3, 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. **Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.

HAHN, K. A.; FREEMAN, K. P.; BARNHILL, M. A.; STEPHEN, E. L. Serum α_1 acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 7, p. 1023-1025, 1999.

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

HEINDRICH, P. C., CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemistry Journal**, London, v. 265, p. 621-636, 1990.

HORADAGODA, N. U.; KNOX, K. M. G.; GIBBS, H. A.; REID, S. W. J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S. E. R.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, London, v. 144, p. 434-441, 1999.

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

IKENOUE, N.; SAITSU, Y.; SHIMODA, M.; KOKUE, E. Disease-induced alterations in plasma drug-binding proteins and their influence on drug binding percentages in dogs. **Veterinary Quarterly**, Dordrecht, v. 22, n. 1, p. 43-49, 2000.

ISAACSON, P.G. The current status of lymphoma classification. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 109, n. 2, p. 258-266, 2000.

ISRAILI, Z. H.; DAYTON, P. G. Human alpha-1-glicoprotein and its interactions with drugs. **Drug Metabolism Reviews**, New York, v. 33, n. 2, p. 161-235, 2001.

JACOBS, R. M.; COUTO, C. G.; WELLMAN, M. L. Bioclonal gammopathy in a dog with myeloma and cutaneous lymphoma. **Veterinary Pathology**, Washington, v. 23, n. 2, p. 211-213, 1986.

JACOBSEN, S. Review of equine acute-phase proteins. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 53., 2007, Orlando, Flórida. **Proceedings**... Orlando: University of Florida, 2007. p.230-235.

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

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

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed., Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155, 157-172.

KANEKO, J. J.; MOULTON, J. E.; BRODEY, R. S.; PERRYMAN, V. D. Malabsorption syndrome resembling nontropical sprue in dogs. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 146, p. 463, 1965.

KITCHELL, B. E.; DHALIWAL, R. S. Hematology. Oncology, Immunology: CVT update: anticancer drugs and protocols using traditional drugs. In: KIRK, R. W.; BONAGURA, J. D., **Current veterinary therapy XIII – small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 2000. p. 465-473.

KOCHEVAR D. T.; MEALEY K. Principles of cancer chemotherapy. **Veterinary Medicine**, Chicago, v. 92, n. 4, p. 336-349, 1997.

KOGIKA, M. M.; et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e alfa-1-glicoproteína ácida em cães com gastroenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 3, p. 35-42, 2003.

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

LANORE, D.; DELPRAT, C. **Quimioterapia anticancerígena**. São Paulo: Roca, 2004. 191 p.

MacEWEN, E.G.; HURVITZ, A. I. Diagnosis and management of monoclonal gamopathies. **Veterinary Clinics of North America - Symposium on Clinical Veterinary Oncology**, Philadelphia, v. 7, n. 1, p. 119-132, 1977.

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

MacEWEN, E. G.; HURVITZ, A. I.; HAYES, A. Hyperviscosity syndrome associated with lymphocytic-leukemia in 3 dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 170, n. 11, p. 1309-1312, 1977.

MADEWELL, B. R.; HILLS, D. L.; FRANTI, C. E. Serum concentrations of immunoglobulins G, A and M in dogs with neoplastic disease. **American Journal of Veterinary Research**, California, v. 41, n. 5, p. 720-722, 1979.

MARCHETTI, V.; BENETTI, C.; CITI, S.; TACCINI, V. Paraneoplastic hypereosinophilia in a dog with intestinal T-cell lymphoma. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 259-263, 2005.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CERON, J. J. Serum concentrations of acute phase proteinin dogs with leishmaniasis. **Veterinary Record**, London, v. 150, n. 8, p. 241-244, 2002.

MARTINEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P. J.; CERON, J. J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record**, London, v. 154, n. 26, p. 814-817, 2004.

McGROTTY, Y. L.; ARTEAGA, A.; KNOTTENBELT, C. M.; RAMSEY, I. K.; ECKERSALL, P. D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 3, p. 255-258, 2005.

MEUTEN, D. J.; BUTLER, D. G.; THOMSON, G. W.; LUMSDEN, J. H. Chronic enteritis associated with malabsorption and protein-losing enteropathy in horse. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 172, p. 326-333, 1978.

MISCHKE, R.; ECKERSALL, P. D. Changes in c-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. In: **International Colloquium on Animal Acute Phase Protein**, 5th ed. 2005, p.35.

MYERS, N. C.; MOORE, A. S.; RAND, W. M.; GLIATTO, J.; COTTER, S. M. Evaluation of a multidrug protocol (ACOPA II) in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 11, n. 6, p. 333-339, 1997.

MOORE, G. E.; MAHAFFEY, E. A. e HOENIG, M. Hematologic and serum biochemical effects of long-term administration of anti-inflammatory doses of prednisone in dogs, **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 53, p. 1033-1037, 1992.

MORRISON, W. B. **Lymphoma in dogs and cats**. Jackson Hole, WY: Teton Newmedia, London, p. 124, 2004.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

NAKAGE, A. P. M. Estudo do quadro hematológico e das alterações bioquímicas, eletroforéticas e histopatológicas hepática e renal de cães submetidos ao tratamento com o agente antineoplásico doxorrubicina (adriplastina®). 2000. 99 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

NAOUM, P. C.; CERON, C. R.; DOMINGOS, C. R. B. Conhecimentos Básicos de Eletroforese. In: NAOUM, P. C. **Eletroforese – técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, 1999. p. 1-38.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3th ed. New York: Worth, 2000. 1152p.

OGILVIE, G. K.; WALTERS, L. M.; GREELEY, S. G.; HENKEL, S. E.; SALMAN, M. D. Concentration of α 1-acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 203, n. 8, p. 1144-1146, 1993.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Management of specific diseases: clinical briefing: lymphoma. In:_____ **Managing the Veterinar Cancer Patient**. Trenton: Veterinary Learning Systems, 1995. p. 228-259.

PONCE, F.; MAGNOL, J.; LEDIEU, D.; MARCHAL, T.; TURINELLI, V.; CHALVET-MONFRAY, K.; FOURNEL-FLEURY, C. Prognostic significance of morfological subtypes in canine malignant lymphomas during chemotherapy. **The Veterinary Journal**, London, v. 167, n. 2, p. 158-166, 2004.

PRICE, G. S.; PAGE, R. L.; FISCHER, B. M.; LEVINE, J. F.; GERIG, T. M. Efficacy and toxicity of doxorubicin/cyclophosphamide maintenance therapy in dogs with multicentric lymphosarcoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, n. 5, p. 259-262, 1991.

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

RADOSTITS, O. M., LESLIE, K. E., FTROW, J. **Heard health: food animal production medicine** 2th ed. Philadelphia : Saunders, 1994. 631p.

RAMOS, R. S. et al. Estudo da prevalência das principais síndromes paraneoplásicas de 14 cães com linfoma – relato de casos. **Veterinária e Zootecnia**. v. 15, n. 3, p. 38-39, 2008.

RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. 2ª ed. Curitiba: Maio, 2006. p. 40-180.

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

ROSENTHAL, C. R.; MACEWEN, E. G. Treatment of lymphoma in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 196, n. 5, p. 774-781, 1990.

SCHALL, W. D. Laboratory diagnosis of hepatic disease. **The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia, v. 6, n. 4, p. 679-686, 1976.

SCHWARTZMAN, R. M. Cutaneous amyloidosis associated with monoclonal gammopathy in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 185, n. 1, p. 102-104, 1984.

SELLON, D. C. Secondary immunodeficiencies of horses. **Veterinary Clinics North America-Equine Practice**, Philadelphia, v. 16, p. 117, 2000.

SEMOLIN, L. M. S. Relatório Final do Estágio Curricular do Curso de Medicina Veterinária – Caso de Interesse: Avaliação do perfil hepático de cães acometidos por linfoma e submetidos ao protocolo quimioterápico de Madison-Wisconsin. 2008. 78 f. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SEVELLIUS, E.; ANDERSSON, M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. **The Veterinary Record**, London, v. 137, n. 26, p. 663-667, 1995.

SILVA, M. C. V. Efeitos hematológicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos de dois diferentes protocolos antineoplásicos à base de lomustina, vincristina e prednisona em cães (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758). 2005. 105 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SKINNER, J. G. International standardization of acute phase proteins. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 30, n. 1, p. 1-7, 1999.

SOLTER, P. F.; WALTER, E. H.; HUNGERFORD, L. L.; SIEGEL, J. P.; DENIS, S. H.; DORNER, J. L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 52, p. 1738-1742, 1991.

SORJONEM, D. C. Total protein, albumin quota, and electrophoretic patterns in cerebrospinal fluid of dogs with central nervous system disorders. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 301-305, 1987.

TAKEDA, K. e AKIRA, S. Toll-Like receptors in innate immunity. **Immunology** 17(1), p. 1-14, 2005.

TESKE, E. Canine malignant lymphoma: a review and comparison with human non-Hodgkin's lymphoma. **Veterinary Quarterly**, Utrecht, v. 16, n. 4, p. 209-219, 1994.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5th ed.: Lippincott Williams & Wilkins, 2000, p. 891-898.

THOMPSON, J. P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. p. 2616-2666.

TIZARD, I. R. **Veterinary Immunology**: An Introduction. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. P. 147.

TRUMEL, C.; SCHELCHER, F.; BRAUN, J. P.; GUELFI, J. F. Serum protein electrophoresis: guidelines for diagnosis evaluation in the dog, cat, and horse. **Revue Medicine Veterinaire**, Toulouse, v. 147, n. 2, p. 123-130, 1996.

VAIL, D.M. Lymphoma. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2003. cap. 4, p. 79-112.

XIE, H.; NEWBERRY, L.; CLARK, F. D.; HUFF, W. E.; BALOG, J. M.; RATH, N. C. Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally induced inflammation and diseases. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 46, n. 1, p. 122-131, 2002.

WEAVER, D. M.; TYLER, J. W.; VanMETRE, D. C.; HOSTETLER, D. E.; BARRINGTON, G. M. Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Lawrence, v. 14, n. 6, p. 569-577, 2000.

YANG, F. M.; HAILE, D. J.; BERGER, F. G.; HERBERT, D. C.; Van BEVEREN, E.; GHIO, A. J. Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. **American Journal of Physiology-Lung Cell Molecular Physiology**, Bethesda, v. 284, n. 2, L402-L409, 2003.

YOUNG, K. M. Hemolymphatic system: Introduction. In: MORGAN, R.V. **Handbook of small animal practice**. 3th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. p. 653-655.

APÉNDICE

SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

GEL DE SEPARAÇÃO (50mL a 10%)

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

GEL DE EMPILHAMENTO (10 mL a 4%)

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

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

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

Completar para 250 mL com água deionizada;

Acertar para pH 8,9:

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

TRIS HCl 0,1617M (GEL EMPILHADOR)

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

Completar para 100 mL com água deionizada;

Acertar para pH 6,8;

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

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

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08).....73,00 g

N,N-metileno-bis-acrilamida para eletroforese Sigma.....2,00 g

Completar para 250 mL com água deionizada;

Aquecer se necessário.

EDTA 0,5M

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrasódico (PM: 380,20).....9,50 g

Completar para 50 mL com água deionizada;

Acertar para pH 8,3. 52

LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 20%

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4).....20,00 g

Completar para 100 mL com água deionizada.

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

Metanol.....500 mL

Ácido acético.....100 mL

Água bidestilada.....400 mL

Coomassie Blues (Brilliant blue R).....2 g

Deixar em repouso durante duas horas e filtrar.

GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)

Lauril sulfato de sódio 20%.....5,0 mL

EDTA 0,5 M.....4,0 mL

Tris-fosfato 0,617 M, pH 6,8.....5,0 mL
Mercaptoetanol.....2,5 mL
Glicerol.....10,0 mL
Água deionizada.....23,5 mL
Azul de bromofenol (Bromophenol Blue).....5,0 mg
Separar em frações de 1 mL – manter no freezer até o momento do uso. 53
PERSULFATO DE AMÔNIA 10%
Persulfato de amônia.....0,1 g
Água deionizada.....1,0 mL
(Preparar no momento da confecção do gel)

DESCORANTE

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

Completar para 1000 mL com água destilada;

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

TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10X)

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

Completar para 1000 mL com água destilada.

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

TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (Tampão de uso na cuba)

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