DILAYLA KELLY DE ABREU

Padronização do perfil hematológico, bioquímico,
proteínograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de
cães da raça Golden Retriever saudáveis e afetados
pela distrofia muscular

São Paulo
2010

DILAYLA KELLY DE ABREU

**Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma
sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden
Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Animais Domésticos e Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2378
FMVZ

Abreu, Dilayla Kelly de

Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular / Dilayla Kelly de Abreu. -- 2010.
158 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2010.

Programa de Pós-Graduação: Animais Domésticos e Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Animais Domésticos e Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio.

1. Golden Retriever (GRMD). 2. Proteinograma sérico. 3. Imunofenotipagem de linfócitos. 3. Resposta inflamatória. 4. Sistema imune. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular”, utilizando 30 (trinta) cães, protocolado sob o nº1640/2009, sob a responsabilidade do Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/04/09.

We certify that the Research “Standardization of blood and biochemical profiles, serum protein and immunophenotyping of lymphocytes in Golden Retriever healthy and affected by muscular dystrophy”, utilizing 30 (thirty) dogs, protocol number 1640/2009, under the responsibility Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ABREU, Dilayla Kelly de

Título: Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*“Quando uma criatura humana desperta
para um grande sonho e sobre ele lança
toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.”*

(Goethe)

Dedico,

Aos meus pais,

Marlene de Abreu e Carlos Alberto de Abreu,

Dedico essa dissertação a vocês por estarem sempre do meu lado em todos os momentos. Por acreditarem em meus sonhos e sempre me encherem de força e determinação. Vocês são a minha luz.

Nunca desistir, sempre lutar!!!

Mãe, obrigada por me ensinar os verdadeiros princípios da vida, o valor de um estudo, a importância de trabalhar com competência e ser sempre fiel à ética e a moral.

Meu amado pai, obrigada por sempre acreditar em meus sonhos, por me levantar nas horas em que o cansaço foi maior e nas situações mais difíceis. Obrigada por estar sempre disposto a me ouvir e a me aconselhar. Você, sem saber, muitas vezes me deu força e coragem com apenas com uma palavra

Muito obrigada por serem os meus melhores Amigos!

Ao meu irmão Sandro Rogério de Abreu,

Você me faz falta, mas com certeza a sua luz me ilumina me dando forças para continuar. Te amo e penso em você todos os dias da minha vida. Muito obrigada pelos bons ensinamentos que você me deixou ...

“Olhos fechados

Pra te encontrar

Não estou ao seu lado

Mas posso sonhar

Aonde quer que eu vá

Levo você no olhar...”

(Paulo Sérgio Valle e Hbert Vianna)

Ao meu amor, Carlos Sarmiento,

Dedico essa dissertação a você por toda força, companheirismo e compreensão (e por todos os chocolates semanais rsrsrs). Por estar sempre do meu lado. Muito obrigada por ser um amigo tão fiel e um namorado tão especial...

Amor, não se esqueça: tudo o que é seu, é meu! E tudo que é meu, é meu! rsrs

Eu te amo.

“E quem irá dizer que não existe razão nas coisas feitas pelo coração ...”

(Renato Russo)

*Aos meus amados Sálvia Sarmiento e Carlos Sarmiento
que me receberam com muito amor.*

Muito obrigada por tanto carinho e admiração.

Amo vocês.

A minha amiga e fiel escudeira, Aline ...

Japa teria tanta coisa para falar de você que com certeza teria mais páginas do que a dissertação. Mas resumindo, dedico essa dissertação a você por que, fora todas as outras lutas que passamos juntas, eu só tenho a dizer uma coisa: eu não teria conseguido sem você....

Obrigada pela oportunidade que você me proporcionou em realizar um sonho...

Estaremos sempre juntas.

te amo amiga ... ontem, hoje e sempre!

“A amizade... nem mesmo a força do tempo irá destruir ... somos verdade...”

(Cleber Augusto)

*Aos meus filhos e afilhados “peludos” por me ensinarem todos os dias
a importância de um sorriso e de um afago.*

*E como é simples ser feliz!
Vocês me fazem muito bem*

*Dedico a todos os pacientes com Distrofia Muscular.
Eles são um exemplo de vida e de força.*

*Dedico essa dissertação aos amados cães GRMD,
Com vocês eu aprendi que não há limitações físicas para ser feliz.
Amo todos vocês, cada dia mais.....*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos. Por colocar em meu caminho pessoas maravilhosas que acreditaram em mim e me deram auxílio durante esta jornada. Obrigada Pai.

*À FAPESP por todo apoio financeiro e científico que me foi dado.
(FAPESP n° 2009/02958-1).*

Ao meu orientador, professor e amigo Dr. Carlos Eduardo Ambrósio. Muito obrigada por toda confiança depositada em mim, por sempre me apoiar e aceitar minhas idéias, por todos os ensinamentos e dedicação. Obrigada por ser fraterno e amigo sempre que preciso e por me mostrar os melhores caminhos, me dando a oportunidade de crescer cada vez mais.

A professora Dra. Maria Angélica Miglino por ter me recebido em seu departamento. Muito obrigada pela confiança e oportunidade.

Ao meu querido professor e amigo Dr. Aureo Evangelista Santana (UNESP-Jaboticabal), que me mostrou a “beleza” da pesquisa e a importância da ética na profissão. Carrego seus ensinamentos sempre comigo: “Nunca passe por um lugar sem que as pessoas te percebam”.

Ao meu querido professor e amigo Dr. José Jurandir Fagliari (UNESP-Jaboticabal), que me ensinou o sentido de se trabalhar com amor e dedicação, da importância da determinação, contribuindo diretamente na minha formação profissional e pessoal. Obrigada por auxílio prestado durante esse projeto.

Ao professor Dr. José Roberto Kfoury Jr, por disponibilizar o seu laboratório para a realização desse trabalho.

Ao queridíssimo professor Dr. David Feder, sempre tão presente em nosso canal. Muito obrigada professor por todo apoio!

À professora Dr. Daniele Martins dos Santos, por todo o auxílio prestado durante as coletas. Longas noites!

Aos professores Dr. Felipe Perecin, Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga, Dr. Flavio Vieira Meirelles, Dra. Paula de Carvalho Papa, Dr. Pedro Primo Bombonato.

À Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal, por me proporcionar a oportunidade de realizar parte da minha pesquisa em seu laboratório, com o auxílio de profissionais extremamente competentes.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, por me proporcionar o melhor aprendizado durante o mestrado e a oportunidade da realização desta pesquisa, sempre amparada por excelentes profissionais.

*“Amigo é coisa para se guardar
Debaixo de sete chaves
Dentro do coração...”*

(Fernado Brant e Milton Nascimento)

À minha querida amiga Janaina Monteiro que com sua vontade e seu conhecimento teve fundamental importância na realização deste projeto. Uma pessoa ímpar mostrando-se amiga para uma vida toda. Muito obrigada por me ensinar com tanta paciência e vontade. Parabéns pela profissional competente e esforçada que você é!

Te admiro muito amiga!

Às minhas queridas “irmãs”

Carol, Fabiele e Renata. Com certeza vocês estarão na minha vida sempre.

Amigas como vocês são para uma vida toda.

Obrigada por sempre estarem ao meu lado, na minha vida pessoal e profissional, me ajudando e me fazendo acreditar que tudo vai dar certo.

Amo muito vocês....

A minha amada Tia Léo! Muito obrigada tia pelas palavras de força e luz!

Tia Miriam e Paulinha, vocês são muito especiais. Amo vocês! Tia muito obrigada por suas palavras de paz!

A minha “mãe de coração” Rosa Helena, uma pessoa fantástica que Deus colocou em meu caminho. Te amo querida. Obrigada Fê, Flavia e Ana. E Fê, não se esqueça: o Dodo gosta mais de mim!!!

À toda minha família, que está sempre torcendo para o meu sucesso.

Meus “irmãos” de coração, Vinícius e Rick,

Muito obrigada pela amizade maravilhosa e tão verdadeira!

Amo vocês!

Aos meus amigos Thiago e Evander!!! Vocês são maravilhosos, parceiros e divertidíssimos! Muito obrigada por tudo “meninos”. Com vocês me sinto em casa, mas nada de cobrar aluguel! Sambinha???? rrsrrsrrs

Aos meus queridos amigos da pós-graduação: Elaine (ainda vamos gravar um CD amiga! KKKKKK), Marininha, André, Letícia, Rafael Agopian, Rafael Senos, Joãozinho, Matheus, Luiz, Valdir, Marcão (amigo, só uma observação: cuidado com pão de queijo quente, afinal coisas estranhas podem acontecer!), Márcio, Thaís, Amanda, Cristiane, Graciela, Isabela, Rodrigo, Caio, Rose, Patrícia, Michelle, Sônia, Phelipe, Greyson, Juliana Passos, Karla, Adriana Morini, Joana, Juliana Casals, Aninha, Érika, Paula, Cris Wenceslau e Lislely.

Aos técnicos Ronaldo Agostino, Ednaldo Farias (Índio) e Diogo Palermo, que sempre se mostraram dispostos a me auxiliar.

Ao nosso querido Augusto por cuidar dos nossos cães com tanto carinho e atenção.

Ao meu querido amigo e técnico Paulo Cesar (UNESP- Jaboticabal) que desde a graduação me auxilia com muita dedicação.

Ao meu amigo Maicon e minhas queridas Jaqueline Martins, Fabiana, Cláudia (pós-graduação) e Elza Faquim (biblioteca) por me socorrerem nas horas de desespero.

À querida Fátima e tia Bernardete sempre tão animadas e prestativas!

Amiga Marina Moreira, você me ajudou a dar o meu “primeiro” passo. Muito obrigada!

As minhas queridas amigas Lana e Cláudia, muito obrigada pela força e pelas palavras de incentivo!

A equipe Vivaz: Dra. Cláudia, Dr. Wagner Sanches, Dra. Eliana Fleury, Dra. Patrícia, Dra. Angélica, Dra. Pamela, Dra. Luciana, Dr. Érick, Sandra, Claudinha e Ana.

*A todos que participaram direta ou indiretamente desse trabalho e da minha formação, talvez aqui não citados, mas não esquecidos.
Muito obrigada!*

RESUMO

ABREU, D. K. de. **Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular.** [Standardization of hematological, biochemical, serum protein concentrations and lymphocyte immunophenotyping of Golden Retriever dogs healthy and affected by muscular dystrophy]. 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Idealizou-se o presente ensaio com o objetivo de padronizar o perfil hematológico, bioquímico, eletroforético (proteinograma sérico) e quantificação das células linfocitárias CD4, CD5, CD8 por citometria de fluxo de cães da raça *Golden Retriever* normais (grupos GR) e de cães distróficos (grupos GRMD). Para tanto, considerou-se a divisão dos grupos de acordo com a idade dos animais, desde o nascimento até a idade adulta, compondo assim seis grupos, sendo eles GR I, II, III e GRMD I, II, III. No presente projeto realizamos os estudos eletroforéticos de cães pertencentes a todos os grupos, estudos hematológicos e bioquímicos dos cães pertencentes aos grupos GR II, III, GRMD II e III, imunofenotipagem linfocitária dos grupos GR III e GRMD III. Os resultados eritroleucométricos e trombométricos obtidos para os cães pertencentes aos grupos GR II e GR III apresentaram valores médios dentro normalidade. Com relação aos cães pertencentes aos grupos GRMD III, observamos que o eritrograma se encontra dentro dos valores de referência. Contudo, considerando o leucograma, os valores médios (3,79/ mm³) referentes à mensuração de basófilos apresentaram-se acima dos valores de normalidade, variando de 0 a 159/mm³. Ademais, considerando os valores máximos, alguns animais pertencentes ao grupo em questão, apresentaram leucocitose com neutrofilia sem desvio à esquerda, além de trombocitose, monocitose e linfopenia, no momento das coletas. As dosagens bioquímicas séricas de todos os cães afetados apresentaram valores médios acima dos valores de normalidade para a dosagem de AST, ALT e CK. Para o estudo das proteínas séricas, a técnica SDS-PAGE permitiu o fracionamento de vinte e duas proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 16.000 a 260.000 daltons em todos os grupos estudados. Destas, foi possível identificar nominalmente doze frações protéicas: IgA (PM 142.000 Da), proteína C-reativa (PM 122.000 Da), ceruloplasmina (PM 110.000 Da), fosforilase (PM 95.000 Da), transferrina (PM 82.000 Da), hemopexina (PM 78.000 Da), albumina (PM 66.000 Da), alfa1 antitripsina (PM 62.000 Da), IgG de cadeia pesada (PM 55.000 Da), haptoglobina (PM 45.000 Da), glicoproteína ácida (PM 40.000 Da)

e IgG de cadeia leve (PM 23.000 Da). As demais proteínas foram identificadas pelos respectivos pesos moleculares. Não foi possível identificar nominalmente as frações protéicas de pesos moleculares 260.000 Da, 230.000 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, 158.000 Da, 91.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 28.000 Da e 16.000 Da. Dentre essas proteínas foi possível observar que a proteína de peso molecular 91.000 Da foi encontrada apenas nos grupos GR I e GRMD I não sendo identificada nos outros grupos estudados. Considerando as alterações encontradas com relação às proteínas de fase aguda, evidenciamos as respostas de fase aguda frente às lesões musculares que ocorrem progressivamente em cães distróficos, principalmente em animais distróficos jovens, podendo inferir que os mesmos apresentaram alterações protéicas perante a injúria tecidual como é relatado em vários processos inflamatórios relacionados com outras patologias. Da mesma forma, os animais afetados pela distrofia, possuem alterações imunoglobulínicas quando comparados a animais normais. Com relação à imunofenotipagem linfocitária foi confeccionado um histograma das populações de linfócitos $CD4^+$, $CD5^+$ e $CD8^+$ a partir da região do *gate* de linfócitos. Todos os animais afetados pela distrofia apresentaram porcentagem significativamente maior com relação à população linfocitária $CD4^+$ e $CD5^+$ quando comparados aos cães normais. Desta forma, podemos inferir que o processo progressivo da distrofia, esta relacionado com alterações nas populações celulares que compõe o sistema imune dos pacientes, pois devido a ausência de distrofina o músculo fica mais susceptível a lesões, sendo que na sua ocorrência, há liberação de citocinas que estimulam as células hepáticas a secretarem as proteínas de fase aguda e a promoverem uma co-estimulação de linfócitos T. Assim, podemos sugerir que os resultados encontrados em nosso trabalho são conseqüências da resposta inflamatória gerada pela lesão muscular. Esperamos com esse estudo, fornecer mais informações sobre a fisiopatogenia da doença, bem como promover um maior entendimento sobre a avaliação imunológica e resposta inflamatória neste modelo de estudo. Ademais, que os valores de base encontrados possam auxiliar na avaliação de possíveis reações nos testes pré-clínicos, facilitando assim, o entendimento das reações benéficas ou adversas para validar e explicar o mecanismo de ação de uma terapia celular, gênica ou mesmo medicamentosa.

Palavras-chave: Golden Retriever (GRMD). Proteinograma sérico. Imunofenotipagem de linfócitos. Resposta inflamatória. Sistema imune.

ABSTRACT

ABREU, D. K. de. **Standardization of hematological, biochemical, serum protein concentrations and lymphocyte immunophenotyping of Golden Retriever dogs healthy and affected by muscular dystrophy.** [Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular]. 2010. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Devised to test this in order to standardize the hematological, biochemical, electrophoretic (Serum protein) and quantification of CD4 lymphocyte cells, CD5, CD8 by flow cytometry of Golden Retriever dogs normal (group GR) and dogs dystrophic (GRMD groups). To this end, we considered the division of groups according to age of animals, from birth to adulthood, thus composing six groups, as Gr I, II, III and GRMD I, II, III. In this project we performed electrophoretic studies of dogs belonging to all groups, haematological and biochemical studies of dogs belonging to the groups GR II, III, II and III GRMD, lymphocyte immunophenotyping in groups III and GR GRMD III. The results obtained for trombometric, erythometric and dogs belonging to the groups and GR II GR III showed mean values within normal limits. With respect to dogs belonging to groups III GRMD, we observed that the erythrocyte is within the reference values. However, considering the WBC, the mean (3.79 / mm³) relating to the measurement of basophils were above normal values, ranging from 0 to 159/mm³. Moreover, considering the maximum, some animals belonging to the group in question had leukocytosis with neutrophilia without left shift, and thrombocytosis, monocytosis and lymphopenia at the time of collection. The biochemical serum of all affected dogs had mean values above the normal range for the determination of AST, ALT and CK. For the study of proteins, SDS-PAGE technique allowed the fractionation of twenty-two proteins whose molecular weights ranged from 16,000 to 260,000 daltons in all groups. These could be identified by name twelve fractions: IgA (PM 142,000 Da), C-reactive protein (PM122.000 Da), ceruloplasmin (PM 110,000 Da), phosphorylase (95,000 Da PM), transferrin (82,000 Da PM), hemopexin (PM 78 000 Da), albumin (66,000 Da PM), alpha1 antitrypsin (PM 62,000 Da), IgG heavy chain (55,000 Da PM), haptoglobin (PM 45,000 Da),

glycoprotein (PM 40,000 Da) and IgG light chain (PM 23 000 Da). The other proteins were identified by their molecular weights. We could not identify by name the protein fractions of molecular weight 260,000 Da, 230,000 Da, 180,000 Da, 165,000 Da, 158,000 Da, 91,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 28,000 Da and 16,000 Da. Among these proteins was observed that the protein molecular weight of 91,000 Da was found only in groups GR I and GRMD I was not identified in other groups. Considering the changes found with relation to acute phase proteins, we noted the acute phase response in the face of muscle injuries that occur gradually in dystrophic dogs, especially in young dystrophic animals, which may infer that they had abnormal protein before tissue injury as reported in many inflammatory-related pathologies. Likewise, animals affected by muscular dystrophy, alterations immunoglobulin when compared to normal animals. With respect to lymphocyte immunophenotyping was made a histogram of the populations of CD4, CD5 and CD8 from the region of the gate of lymphocytes. All animals affected by muscular dystrophy showed significantly higher percentage with respect to CD4 and CD5 lymphocyte population compared to normal dogs. Thus, we can infer that the process of progressive muscular dystrophy, is associated with changes in cell populations that make up the immune system of patients, because due to the absence of dystrophin, the muscle is more susceptible to damage, and its occurrence , a release of cytokines that stimulate liver cells to secrete acute phase proteins and promote a co-stimulation of T lymphocytes Thus, we suggest that the findings in our study are consequences of the inflammatory response generated by muscle injury. We hope that this study, provide more information about the pathophysiology of the disease, and promote a greater understanding of the immune and inflammatory response assessment in this study model. Moreover, the base values found could help in assessing possible responses in preclinical testing, aiding the understanding of the beneficial or adverse reactions to validate and explain the mechanism of action of a cell therapy, gene or drug treatments.

Keywords: Golden Retriever (GRMD). Serum protein concentrations. Lymphocyte immunophenotyping. Inflammatory response. Immune system.

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), teor de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média(HCM), concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), leucócitos (Le), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmenados (NS), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas), linfócitos típicos (LT), linfócitos atípicos (LA), monócitos (Mon), plaquetas (Plaq) e proteína total (PT) dos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2009	67
Tabela 2 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à dosagem sérica de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase (ALP), gama glutamil transferase (GGT), triglicérides, colesterol, creatina quinase (CK) dos animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2009.....	72
Tabela 3 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) referentes às concentrações (%) das subpopulações linfocitárias mediante a realização da imunofenotipagem de linfócitos pela técnica de citometria de fluxo com anticorpos CD4, CD8 e CD5 dos animais pertencentes aos grupos GR III e GRMD III - São Paulo - 2010	77
Tabela 4 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 260.000 Da e 165.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010	87
Tabela 5 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 158.000 Da e 110.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010	88
Tabela 6 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 95.000 Da e 78.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil	

sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR V e GRMD III - São Paulo - 2010	89
---	----

Tabela 7 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 66.000 Da e 45.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010	90
--	----

Tabela 8 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 40.000 Da e 28.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010	91
--	----

Tabela 9 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso 23.000 Da e 16.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010.....	92
--	----

Quadro 1 - Análises realizadas nos grupos estudados - São Paulo – 2009 a 2010	58
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Confecção dos géis para a eletroforese: em A podemos observar o preenchimento das placas com os géis, em B os géis em processo de endurecimento, em C os géis sendo corados e em D, a seqüência dos produtos químicos utilizados durante a confecção dos géis.....62
- Figura 2 – Fotografias evidenciando em A e B, o sangue periférico canino diluído em PBS colocado sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paque®. Em C e D, formação do anel de células mononucleares (entre o PBS e o gradiente de densidade). Nota-se abaixo um botão vermelho, referente às hemácias.....75
- Figura 3 – O gráfico de Dot plot (A) demonstra o *gate* de monócitos (círculo vermelho) e o *gate* de linfócitos (círculo preto) do sangue periférico canino pela técnica de citometria de fluxo selecionado para a imunofenotipagem linfocitária. Em B podemos observar a curva referente à presença das células linfocitárias não marcadas.....76
- Figura 4 – Em A e B, subpopulação linfocitária CD4⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histograma respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo78
- Figura 5 – Em A e B, subpopulação linfocitária CD8⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histograma respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo79
- Figura 6 – Em A e B, subpopulação linfocitária CD5⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histograma respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo80
- Figura 7 – Podemos observar em A, o gráfico representativo das concentrações médias das subpopulações linfocitárias CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺ dos cães pertencentes ao grupo GR III e GRMD III. Em B, C e D notamos a representação gráfica dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentisde 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da porcentagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺ respectivamente, nos GR III e GRMD III81

Figura 8 –	Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando marcado padrão de pesos moleculares com bandas entre 16.000 e 260.000 Da.....	86
------------	--	----

Figura 9 –	Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	93
------------	--	----

Figura 10 –	Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 230.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 230.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	94
-------------	--	----

Figura 11 –	Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 180.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 180.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	95
-------------	--	----

Figura 12 –	Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 165.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 165.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	96
-------------	--	----

Figura 13 –	Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 158.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 158.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	97
-------------	--	----

Figura 14 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgA, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína IgA dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....98

Figura 15 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína C-reativa, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína C-reativa dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....99

Figura 16 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da ceruloplasmina nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da ceruloplasmina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....100

Figura 17 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da fosforilase, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da fosforilase dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....101

Figura 18 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína desconhecida de peso molecular 91.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína desconhecida de peso molecular 91.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)102

Figura 19 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína transferrina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína transferrina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....103

Figura 20 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína hemopexina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras

verticais) da concentração sérica da proteína hemopexina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....104

Figura 21 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína albumina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína albumina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B).....105

Figura 22 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína alfa-1-antitripsina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína alfa-1-antitripsina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)106

Figura 23 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgG de cadeia pesada, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína IgG de cadeia pesada dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)107

Figura 24 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína haptoglobina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína haptoglobina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)108

Figura 25 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína glicoproteína ácida, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína glicoproteína ácida dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)109

Figura 26 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 35.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 35.000

Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	110
---	-----

Figura 27 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 30.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 30.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	111
--	-----

Figura 28 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 28.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 28.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	112
--	-----

Figura 29 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgG de cadeia leve, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína IgG de cadeia leve dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	113
--	-----

Figura 30 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 16.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 16.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)	114
--	-----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Concentrações médias de ALT e AST (U/L) dos cães pertencentes aos grupos dos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III74
- Gráfico 2 – Concentrações médias de CK (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III74
- Gráfico 3 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue de cordão umbilical de cão da raça Golden Retriever normal – GR I (A) e afetado pela distrofia muscular – GRMD I (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (25). Em B, a albumina (14), IgG de cadeia pesada (16), IgG de cadeia leve (24)115
- Gráfico 4 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue periférico de cão da raça Golden Retriever normal, com idade variando entre 2 e 3 meses – GR II (A) e afetado pela distrofia muscular, com a mesma faixa etária – GRMD II (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (26). Em B, a albumina (10), IgG de cadeia pesada (12), IgG de cadeia leve (24)116
- Gráfico 5 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue periférico de cão da raça Golden Retriever normal, com mais de um ano de idade – GR III (A) e afetado pela distrofia muscular, com a mesma faixa etária – GRMD III (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (23). Em B, a albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (23)117

LISTA DE ABREVIATURAS

DMD	Distrofia muscular de Duchenne
GRMD	Golden Retriever Muscular Dystrophy
CK	Creatina quinase
GR	Golden Retriever
SCU	Sangue de cordão umbilical
NK	Células <i>Natural killer</i>
PFA	Proteína de fase aguda
APC	<i>Antigen Present Cells</i> - Células apresentadoras de antígenos
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> - Molécula de histocompatibilidade principal
Th	Linfócitos T helper ou T auxiliares
FIV	Imunodeficiência viral felina
Th1	Linfócitos T helper tipo 1
Th2	Linfócitos T helper tipo 2
Treg	Linfócito T reguladores
IL	Interleucinas
IGF-1	Fator de crescimento insulina-like
TGF-beta	Fator de crescimento tumoral beta
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CD	Cluster of Designation
IgA	Imunoglobulina classe A
IgE	Imunoglobulina classe E
IgD	Imunoglobulina classe D
IgG	Imunoglobulina classe G
IgM	Imunoglobulina classe M

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	30
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivos gerais	33
2.2	Objetivos específicos	33
3	REVISÃO DE LITERATURA	35
3.1	Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	35
3.2	Modelos animais de estudo das distrofias musculares	36
3.3	Sistema imune	39
3.4	Aplicação da citometria de fluxo na imunofenotipagem e quantificação de linfócitos	46
3.5	Proteínas séricas	47
3.6	Perfil eletroforético das proteínas séricas	53
4	MATERIAL E MÉTODO	56
4.1	Grupos experimentais	56
4.2.1	Coleta de amostras	57
4.2.2	Exames laboratoriais	58
4.2.2.1	Hemograma	58
4.2.2.2	Bioquímicos séricos	59
4.2.2.3	Citometria de fluxo – imunofetipagem e quantificação de linfócitos	59
4.2.2.4	Eletroforese das proteínas séricas	61
4.2.2.5	Análise dos resultados	63
5	RESULTADOS	65
5.1	Hemograma dos animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III	65
5.2	Bioquímicos séricos dos animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III	70
5.3	Imunofenotipagem e quantificação de linfócitos	74
5.4	Proteinograma sérico	82
6	DISCUSSÃO	119

7	CONCLUSÕES	137
	REFERÊNCIAS	141

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma alteração neuromuscular, podendo ser hereditária em humanos com herança ligada ao cromossomo X, que afeta, aproximadamente, um em cada 3.500 indivíduos do sexo masculino. É de caráter recessivo, sendo causada pela ausência ou disfunção da distrofina, proteína encontrada numa variedade de tecidos, principalmente nas musculaturas esquelética e cardíaca, nervos e regiões específicas do sistema nervoso central (HOWELL et al., 1997).

O modelo canino *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD) é o modelo animal mais similar a DMD humana. Por ser geneticamente homólogo a ela, compartilha seu quadro de miopatia severa e desenvolvimento clínico letal. Clinicamente, caracteriza-se por severa alteração na musculatura esquelética, resultando em morte precoce do indivíduo acometido, sendo considerado modelo experimental para estudos de novas propostas terapêuticas e melhor entendimento da fisiopatogenia da doença (HAINSEY et al., 2003; VAINZOF et al., 2008, AMBRÓSIO et al., 2009).

A ausência de distrofina desencadeia a ruptura da membrana sarcoplasmática, causando o influxo de cálcio e posterior ativação de protease endógena com a ativação da cascata inflamatória (COLLINS; MORGAN, 2003). Conseqüentemente, ocorrem necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo (KORNEGAY et al., 2003).

Contudo, existem poucas referências sobre estudos seroproteicos de cães e até mesmo, em humanos, com distrofia muscular, para que se tenha mais informações das alterações das proteínas séricas frente à lesão muscular.

Adicionalmente, esses cães são mais susceptíveis às infecções secundárias e não existem estudos sobre o quadro imunológico dos mesmos, sendo que não há referências bibliográficas sobre a caracterização e quantificação das células do sangue do cordão umbilical e periférico do modelo GRMD para que possam ser estudados os efeitos de doenças e de modificações do sistema imune nas subpopulações de linfócitos.

Pesquisas sobre a avaliação citofluorométrica das células-tronco e subpopulações linfocitárias de cães tem sido desenvolvidas com sucesso por pesquisadores brasileiros na área de hematologia veterinária (NAKAGE et al., 2005; GODOY et al., 2007; NAKAGE et al., 2008; TERWEE et al., 2008; WEBB et al., 2008; WEBB; LEHMAN; MCCORD, 2008; KABEYA et al., 2009; WEGIENKA et al., 2009 ; ESTRELA-LIMA et al., 2010; MARINARO et al., 2010; MIKKELSEN et al., 2010; RECHE et al., 2010).

A literatura referente à utilização das células tronco e terapia medicamentosa nos modelos animais nos permite inferir que os resultados obtidos neste projeto, envolvendo a avaliação imunológica e resposta inflamatória dos cães afetados pela distrofia muscular, poderão construir alicerces para uma melhor avaliação da resposta à terapia celular, gênica e medicamentosa.

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Idealizou-se o presente ensaio com o objetivo de padronizar o perfil hematológico, bioquímico, eletroforético (proteinograma sérico) e quantificação das células linfocitárias $CD4^+$, $CD5^+$ e $CD8^+$ por citometria de fluxo de cães da raça *Golden Retriever* normais (GR) e de cães GRMD. Bem como, comparar os grupos para obter maior conhecimento da fisiopatogenia da doença.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil hematológico e os parâmetros bioquímicos de *Golden Retriever* e *Golden Retriever Muscular Dystrophy* com mais de 2 meses de idade.
- Avaliar e quantificar as proteínas séricas, através da eletroforese em gel de poliacrilamida, destes cães, considerando a resposta de fase aguda e imunológica de cães afetados e normais desde o sangue do cordão umbilical até 5 anos de idade;
- Avaliar e quantificar as células linfocitárias $CD4^+$, $CD5^+$, $CD8^+$ através da citometria de fluxo, considerando a resposta imunológica de cães afetados e normais com mais de 1 ano de idade;

REVISÃO

3.1 Dist

A

genética

sarcos

regener

da cap

neur

uma

respo

Pacien

mem

contr

sem

pulo

inflar

adler

esqui

alg

do h

utiliz

miz

196

clim

cois

o

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

As doenças neuromusculares são um grupo heterogêneo de doenças genéticas causadas por mutações nos genes codificadores de proteínas musculares sarcolemicas, sarcoméricas, e citosólicas, resultando em degeneração progressiva, regeneração limitada, fibrose de miofibrilas e consequentemente perda progressiva da capacidade motora (BERGMAN et al., 2002; VAINZOF et al., 2008).

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a mais comum desordem neuromuscular recessiva em humanos associada ao cromossomo "X". Trata-se de uma enfermidade letal e progressiva, relacionada a uma mutação no gene responsável pela expressão da proteína distrofina (THOR; TERRYBORRY, 2003). Pacientes com DMD apresentam distrofina ausente ou severamente diminuída na membrana sarcoplasmática, tornando-a mais instável, principalmente durante a contração (BEENAKKER, 2005). De acordo com Valentine et al. (1990), o músculo sem a distrofina fica mais susceptível a lesões induzidas pelo exercício, evidenciada pelo rápido influxo de enzimas musculares. Como consequência pode ocorrer inflamação muscular, necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo, resultando em perda muscular progressiva, não apenas da musculatura esquelética, mas também de músculo cardíaco e sistema nervoso (VALENTINE et al., 1990).

Na maioria dos casos de DMD, o diagnóstico pode ser estabelecido através do histórico familiar, de achados clínicos, laboratoriais e genéticos, podendo ser utilizados eventualmente, exames eletrofisiológicos e histológicos. Os níveis enzimáticos, principalmente de creatina quinase (CK), biopsia muscular e análise de DNA são amplamente explorados na caracterização da doença (CAROMANO, 1999).

Muitos estudos vêm sendo realizados com o intuito de buscar melhoras clínicas nos pacientes DMD (REUTENAUER et al., 2008). Embora o defeito na DMD seja conhecido, as funções exatas da distrofina não são totalmente entendidas, e a

seqüência de eventos moleculares que levam a lesão celular ainda não foi completamente elucidada (MARQUES, 2004).

3.2 Modelos animais de estudo das distrofias musculares

As formas de distrofias musculares associadas ao cromossomo X onde há ausência de distrofina foram descritas em humanos e outras espécies como camundongos mdx, cães e gatos (HOFFMAN; GOROSPE, 1991). Além disso, um maior número de organismos geneticamente manipulados de distrofia muscular tem sido gerado. Esses animais geralmente apresentam alterações fisiológicas freqüentemente observadas em pacientes humanos e podem ser usados como instrumentos importantes para a genética, clínica, e os estudos histopatológicos, fornecendo pistas importantes para a compreensão da patogênese desses transtornos (VAINZOF et al., 2008; WILLMANN et al., 2009). Assim, o uso de modelos animais em doenças genéticas constitui um instrumento valioso para a elucidação dos mecanismos de doenças e de tratamentos experimentais.

A deficiência de distrofina nos felinos, que resulta na distrofia hipertrófica muscular felina (HFMD), é semelhante à doença do mdx. O músculo esquelético do HFMD passa por ciclos de degeneração e regeneração, mas não ocorre desenvolvimento da fibrose debilitante característica da DMD. Estes animais são pouco interessantes como modelos para estudo da DMD, pois sua doença assemelha-se de forma limitada a mesma. Além disso, deve-se considerar toda a problemática de se manter colônias de felinos e de trabalhar com animais com esse comportamento, além do nível de estresse (COLLINS; MORGAN, 2003). A HFMD é relatada esporadicamente, com maior incidência em gatos machos, entre três e seis meses de idade, o que sugere que seja outra deficiência de distrofina cuja hereditariedade esteja ligada ao cromossomo X. Os felinos com esta patologia têm uma apresentação clínica única, com hipertrofia da musculatura dos ombros e pescoço, além de considerável hipertrofia da língua. Como sinais clínicos, são citados sialorréia, intolerância ao exercício, rigidez, “andar de coelho”, emese e regurgitação. Há, ainda, calcificação multifocal na língua, miocardiopatia dilatada,

megaesôfago e hepatoesplenomegalia (ENGVALL, 2005). Nos gatos, a DM pode ter conseqüências letais devido à compressão esofagiana por hipertrofia diafragmática ou lingual, que causa diminuição na ingestão de água e síndrome hiperosmolar levando a insuficiência renal aguda (GASCHEN et al., 1998).

Embora, o mdx seja um homólogo da DMD, tanto bioquímica quanto geneticamente, distingue-se com relação ao fenótipo da doença, que é benigno em comparação ao apresentado pelos pacientes com DMD. O músculo esquelético do mdx apresenta propriedades contráteis anormais e exibe características patológicas distróficas, em especial no diafragma (MCCLURE et al., 2007). O mdx vem sendo empregados com sucesso na terapia gênica viral e não viral e mesmo na pesquisa de técnicas que fazem uso de oligonucleotídeos (BOSTICK et al., 2008). Outras terapias vêm sendo propostas empregando o mdx (CALL et al., 2008; JEARAWIRIYAPAISARN et al., 2008; REUTENAUER et al., 2008).

Entretanto, a lenta progressão da doença nesse modelo o torna clinicamente pouco viável para se transpor resultados para humanos portadores de DMD. O quadro clínico do mdx é mantido relativamente normal, já que apresenta uma menor degeneração das fibras musculares, maior regeneração e menos fibrose do que encontrado nos pacientes com DMD (PASTORET; SEBILLE, 1995; WILLMANN et al., 2009).

Destarte, em cães observa-se maior semelhança dos sinais clínicos e da evolução da doença com a DMD (KORNEGAY et al., 2003; COLLINS; MORGAN, 2003), sendo que o modelo canino Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) é considerado mais relevante para diversos estudos que visam à busca de tratamentos para meninos afetados pela doença em questão (MCCLOREY et al., 2006), por ser geneticamente homólogo e por compartilhar o quadro de severa miopatia e desenvolvimento clínico letal. Da mesma forma que nos humanos, ocorrem necrose e regeneração na musculatura esquelética associadas com a proliferação do tecido conjuntivo (COOPER et al., 1988; VALENTINE et al., 1986; VALENTINE et al., 1990).

O GRMD tem sido o modelo animal mais amplamente estudado e o melhor caracterizado. Desde as primeiras descrições, a mutação do gene da distrofina no GRMD tem sido identificada e então, este modelo animal tem sido reconhecido e amplamente utilizado nas avaliações experimentais de novos tratamentos

previamente aos estudos clínicos em humanos (COLLINS; MORGAN, 2003; SHELTON; ENGVALL, 2005; KERKIS et al., 2008).

A obtenção deste modelo experimental é feita mediante o cruzamento de uma fêmea portadora do gene causador da distrofia com um macho afetado (GRMD), gerando machos normais, fêmeas portadoras e machos e fêmeas afetados (NGUYEN et al., 2002). A patogênese do GRMD se manifesta intra – útero e pode ser identificada a partir do nascimento, progredindo rapidamente entre os três e seis meses de idade (KORNEGAY et al., 1994; COLLINS; MORGAN, 2003).

O estágio inicial da doença é caracterizado pela presença de grupos focais de miofibrilas necrosadas, hipertrofia muscular e altos níveis anormais de CK. No primeiro dia de vida, os cães afetados já são diagnosticados através da dosagem de CK, que se encontra acentuadamente elevada na maioria dos casos (VALENTINE et al., 1990; CHILDERS et al., 2001, 2002).

Embora muitos filhotes possam morrer durante o período neonatal, dentre os sobreviventes, ao redor dos dois meses de idade, podem ser constatados sinais de regeneração muscular verificável pela imaturidade do tecido muscular através de imunohistoquímica (NGUYEN et al., 2002). Com a progressão da doença (fase patológica), repetidos ciclos de degeneração diminuem a capacidade de regeneração das células satélites e mecanismos fibróticos causam o progressivo depósito de tecido fibroso e colágeno.

As lesões musculares se caracterizam por necrose maciça, que afeta principalmente músculos da cabeça, pescoço e membros. Os cães machos afetados desenvolvem andadura alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas. Podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos, além de se cansarem facilmente. A maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares e a língua apresentam-se com hipertrofia, justificando o quadro de disfagia, sialorréia e regurgitação (NGUYEN et al., 2002). De acordo com Valentine et al. (1990), as lesões no músculo da língua podem se iniciar ainda na vida intra-uterina.

De forma semelhante aos humanos com DMD, os cães GRMD apresentam comprometimento da função respiratória, resultando em aumento da frequência

respiratória. Frequentemente, esses animais morrem de falência cardio-respiratória, embora possam alcançar muitos anos de vida (BIGGAR et al., 2002; AMBRÓSIO et al., 2009).

Adicionalmente, outros sistemas possuidores de órgãos musculares e não musculares também podem estar alterados em humanos e animais distróficos. Estudos realizados discutiram sobre aumentos de tensão observados na veia porta hepática, bem como flacidez da parede da vesícula biliar ocasionada pela ausência do gene da distrofina em camundongos mdx. Além disso, também relataram síndrome de má absorção e processos diarreicos atribuídos à disfunção pancreática em humanos (NOWAK et al., 1982; BAROHN, 1988; MIYATAKE et al., 1989; BRAZEAU et al., 1992; GRANDO et al., 2009). Gatty (2007) relatou a presença de hepatomegalia, esplenomegalia, nefromegalia, efusão peritoneal, mineralização das glândulas adrenais, espessamento da porção muscular do diafragma, hipocogenicidade do parênquima hepático e hiperecogenicidade da cortical e medular renal em GRMD.

Apesar da importância deste modelo de estudo de distrofia muscular, ainda não existem parâmetros definidos sobre o proteinograma sérico e imunofenotipagem de linfócitos para os GRMD e para cães saudáveis da raça Golden Retriever.

3.3 Sistema imune

A função fisiológica do sistema imunológico é prevenir as infecções e erradicar as infecções já instaladas. Assim, a importância do sistema imunológico para a saúde pode ser ilustrada pela observação de que indivíduos imunologicamente comprometidos são susceptíveis à variadas infecções, que podem colocar em risco a vida do paciente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro são constituídos pela imunidade inata, e pela imunidade adquirida. A imunidade inata ou natural é responsável por bloquear a entrada de agentes infecciosos ou eliminar rapidamente aqueles que conseguem entrar nos tecidos do hospedeiro. Destarte, a imunidade adquirida ou

específica se desenvolve mais lentamente e é responsável pela defesa tardia e mais eficaz contra as infecções, sendo estimulada pelos agentes infecciosos que invadem os tecidos. A imunidade adquirida pode ser humoral ou celular, que são mediadas por células e moléculas diferentes, sendo projetados para fornecer a defesa contra os agentes infecciosos extracelulares e intracelulares, respectivamente. Assim, as propriedades mais importantes da imunidade adquirida, e as que as distinguem da imunidade inata, incluem a especificidade para antígenos estruturalmente distintos e a memória de uma exposição prévia ao antígeno (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008; MIKKELSEN et al., 2010).

As células-tronco hematopoiéticas dão origem a todas as linhagens de células sanguíneas, incluindo as células da linhagem linfocitária. Os linfócitos são células arredondadas com um grande núcleo que desempenham um papel muito importante na defesa do organismo, podendo ser encontrados nos órgãos linfóides, no sangue e espalhados sob as superfícies mucosas. Existem três principais tipos de linfócitos: as células natural killer (NK) que atuam na imunidade inata e representam de 5 a 10% dos linfócitos sanguíneos; os linfócitos B que são responsáveis pela imunidade humoral mediante a produção de anticorpos e representam de 10 a 40% dos linfócitos sanguíneos e os linfócitos T que regulam a imunidade adquirida sendo responsáveis pela imunidade celular e correspondem de 60 a 80% dos linfócitos sanguíneos. Dentro dos principais tipos existem diversas subpopulações celulares com diferentes características e funções. Essas subpopulações podem ser identificadas por meio de suas moléculas de superfície características cujo padrão é denominado imunofenótipo. Normalmente cada molécula apresenta uma denominação, sendo que o sistema de nomenclatura CD (cluster of Designation – denominação de grupamento) fornece números sequenciais para cada molécula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008; MARINARO et al., 2010).

Quando os linfócitos *naïve* (linfócitos virgens) reconhecem os antígenos microbianos e recebem sinais adicionais desencadeados pelos patógenos, os linfócitos específicos para os antígenos proliferam e se diferenciam em células efetoras e células de memória. Os receptores de antígenos dos linfócitos T reconhecem apenas fragmentos peptídicos de proteínas antigênicas que são ligados às moléculas de apresentação especializadas, chamadas de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), na superfície de células especializadas,

conhecidas como células apresentadoras de antígenos (APCs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008,).

Entre os linfócitos T, os linfócitos CD4⁺ mais comumente encontrados são chamados de linfócitos T auxiliares porque produzem citocinas que ativam os linfócitos B a produzirem anticorpos e as células fagocitárias a ingerir os agentes infecciosos. Os linfócitos T CD8⁺ são chamados linfócitos T citotóxicos porque destroem as células infectadas por agentes infecciosos intracelulares, ou seja, causam a lise de outras células (NOKAZI et al., 2006; TIZARD, 2008). Adicionalmente, dentre os linfócitos T CD4⁺ temos os linfócitos que inibem a resposta imune, denominados linfócitos T reguladores (Treg) (WEGIENKA et al., 2009).

O balanço entre imunidade e tolerância é importante para manter a homeostase imune. Diferentes tipos de células reguladoras têm sido descritos, incluindo os linfócitos T CD4⁺ CD25⁺ (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003). Os Treg podem ser ativados por antígenos próprios ou não próprios e, uma vez ativados, podem suprimir linfócitos T de maneira antígeno não-específica. Os efeitos supressivos dessas células não são restritos ao sistema imune adaptativo (linfócitos T e B), mas podem também influenciar a ativação e a função de células do sistema imune inato (monócitos, macrófagos, células dendríticas). Os linfócitos Treg adaptativos são induzidos por antígenos, desenvolvem-se na periferia e exercem sua função através da secreção de citocinas inibitórias (como IL-10 e TGF- β) (MALOY; POWRIE, 2001).

Elas normalmente constituem uma pequena fração das células T CD4⁺ circulantes no humano adulto e são comumente identificadas pela expressão de IL-2Ra (CD25) assim como de Foxp3 (PAPIERNIK et al., 1998; ITOH et al., 1999; STEPHENS et al., 2001). O Foxp3 foi identificado como um marcador molecular específico para células Treg e sua expressão é essencial para o desenvolvimento e a função dessa célula. Aparentemente, o Foxp3 age estabelecendo e mantendo o programa genético do Treg e funciona como um regulador negativo da ativação de linfócitos T e talvez como “efetor” transcricional de programas de citocinas anti-inflamatórias (FONTENOT et al., 2005). A sua expressão não depende da linhagem CD4 ou CD8 (apesar da grande maioria dos timócitos que expressam Foxp3 sejam CD4) e comprova o papel instrutor da sinalização do receptor de células T (TCR)

(FONTENOT et al., 2005). Inicialmente, acreditava-se que as Treg eram específicas para auto-antígenos, explicando sua importância na prevenção de reações autoimunes. Entretanto, existem evidências emergentes da existência de Treg específicas para patógenos, provavelmente como consequência de uma resposta imune prévia (SAKAGUCHI, 2005).

Existem três principais subpopulações de linfócitos T auxiliares. Os linfócitos T auxiliares 1 (Th1), T auxiliares 2 (Th2) e T auxiliares 17 (Th17). Os Th1 são estimulados pela interleucina-12 (IL-12) e secretam IL-2 e interferon-gama, desencadeando geralmente as respostas imunes celulares. Os linfócitos Th2 são estimulados pela IL-4 e secretam IL-4, IL-13 e IL-10, desencadeando principalmente as respostas imunes humorais. A IL-6 estimula os linfócitos Th17, promovendo a secreção de IL-17 e desencadeando a inflamação neutrofílica (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005; TIZARD, 2008).

Vários estudos tem demonstrado que respostas das células T CD4+ e CD8+ melhoraram após a remoção da cultura de linfócitos T reguladoras (AANDAHL et al., 2004; KINTER et al., 2007). Outro estudo mostra uma positiva correlação entre a frequência de linfócitos T reguladores e a não progressão da doença, argumentando que os linfócitos T reguladores suprimem a redução da resposta inflamatória e da replicação e propagação viral (ANDERSSON et al., 2005; APOIL et al., 2005).

Os linfócitos B amadurecem na medula óssea, enquanto que os linfócitos T amadurecem no timo. Assim, o timo é o órgão alvo de várias doenças infecciosas. Infecções por protozoários e fungos podem invadir o timo interferindo com o processo de diferenciação dos linfócitos. Todos esses agentes podem determinar a apoptose dos linfócitos (SAVINO, 2006). Em cães, o timo se diferencia entre o 23º e o 33º dia de gestação (KELLY, 1963). Os primeiros linfócitos foram encontrados no timo e nos linfonodos por volta de 35 a 46 dias de gestação (BRYANT; SHIFRINE, 1972). Adicionalmente, a capacidade de rejeitar alotransplantes se desenvolve ao redor de 45 dias, embora o processo de rejeição seja lento nesse estágio e os cães possam se tornar tolerantes por meio de injeção intrauterina de antígenos antes do 42º dia (TIZARD, 2008). Desta forma, o envio de linfócitos T do timo para os órgãos linfóides secundários e o desenvolvimento de respostas imunes humorais constituem um fenômeno relativamente tardio no cão, quando comparados aos mamíferos domésticos (TIZARD, 2008).

A distribuição das subpopulações linfocitárias caninas varia com a idade, sendo que a porcentagem de linfócitos T aumenta com a mesma (FALDYNA et al., 2003; HOGENESCH et al., 2004; REIS et al., 2005). Byrne et al. (2000), em um estudo realizado com sangue de cordão umbilical (SCU) de cães da raça Beagle com 18 meses de idade, observaram que o valor médio de CD4 (45%) foi maior do que o CD8 (28,8%).

Um estudo de estresse oxidativo durante infecção aguda em gatos (WEBB et al., 2008), sugeriu que infecções agudas com o vírus da imunodeficiência viral felina (FIV) causa estresse oxidativo em gatos e que os linfócitos CD4⁺ apresentam um decréscimo significativo.

Marinero et al. (2010) realizaram um estudo das populações de linfócitos e monócitos circulantes em cães infectados experimentalmente com coronavírus canino, mediante citometria de fluxo. Neste estudo eles notaram que a infecção resultou em depressão profunda dos linfócitos T e ligeira baixa dos linfócitos B na primeira semana pós infecção. Particularmente, enquanto CD8⁺ e linfócitos B retornavam aos níveis basais 7 dias pós infecção, os linfócitos T CD4⁺ mantiveram-se significativamente baixo até 30 dias pós infecção e se recuperaram completamente 60 dias pós infecção.

De fato, linfócitos T CD4⁺ possuem uma função central na proteção imune. Depressão na circulação de linfócitos T CD4⁺, embora transitório, afetam tanto a imunidade humoral como a mediada por células, comprometendo assim a geração ou manutenção da resposta imune efetiva (ZHU; PAUL, 2008; BLUESTONE et al., 2009).

Em um estudo com gatos domésticos, Reche et al. (2010) observaram que a razão entre linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ em gatos portadores da imunodeficiência viral felina (FIV) foi significativamente menor quando comparada com gatos não infectados. Da mesma forma, observaram que nos gatos infectados a mesma razão CD4⁺/CD8⁺ foi significativamente menor quando os mesmos apresentavam infecção fúngica cutânea, concluindo que a deficiência imunológica que apresenta os animais afetados podem apresentar um fator de risco para a colonização fúngica cutânea.

O processo inflamatório também altera populações celulares que atuam no sistema imune, mediante a ativação e a migração direcionada de muitas células

diferentes, principalmente neutrófilos e macrófagos, da corrente sanguínea para os locais lesionados. Desta forma, o processo inflamatório é vital, já que garante que as células e as moléculas defensivas concentrem-se rapidamente na lesão tecidual (TIZARD, 2008). A inflamação é desencadeada quando o organismo percebe que está sendo invadido por um patógeno ou está ocorrendo morte celular devido à lesões teciduais. Assim, o sistema imune inato deve reconhecer não apenas padrões moleculares associados à patógenos, mas também moléculas liberadas de tecidos lesionados, como as citocinas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os macrófagos, quando estimulados por citocinas, controlam a inflamação e contribuem diretamente para a reparação dos tecidos lesionados, removendo as células mortas (CHAZAUD et al., 2003; ARNOLD et al., 2007).

As principais citocinas pró-inflamatórias são o fator de necrose tumoral, a IL-1 e a IL-6, assim como diversas quimiocinas. Algumas dessas moléculas aumentam o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Existem duas populações distintas de macrófagos. Macrófagos ativados classicamente ou do tipo I, que são induzidos por interferon, sozinho ou com estímulo microbial, ou escolhido por citocinas (fator de necrose tumoral). Eles tem função pró-inflamatórias. Macrófagos ativados classicamente produzem moléculas efetoras (reativas com oxigênio e intermediária de nitrogênio) e citocinas inflamatórias (IL-1, TNF, IL-6), participando como células indutoras e efetoras na resposta de Th1. Macrófagos ativos alternativos (ativação alternativa) ou do tipo II, participam das reações de polarização do Th 2 promovendo encapsulação e abate do parasita. Além disso, macrófagos com ativação alternativa estão envolvidos na “cura” e tem funções imunomoduladoras (MANTOVANI; SICA; LOCATI, 2005, 2007). Após o processo de inflamação, a resposta tecidual deve mudar, passando de um processo de eliminação a um processo de reparação, através da conversão dos macrófagos do tipo I em tipo II, desenvolvendo propriedades antiinflamatórias (TIZARD, 2008).

Estudos em ratos mostram que os macrófagos do tipo I estão associados com necrose muscular, enquanto que, macrófagos do tipo II estão associados com regeneração das miofibras (ST PIERRE; TIDBALL, 1994).

Farini et al. (2007) em seu estudo com mdx, conseguiram correlacionar a ausência de linfócitos T e B, com a perda de fibrose e redução de TGF-beta1 (Fator de transformação do crescimento), sugerindo a importância da modulação do sistema imune em DMD. Assim, a observação que as células T se infiltram nos músculos dos pacientes com DMD tem aumentado o interesse sobre o seu papel neste processo (GUSSONI et al., 1994; TIDBALLAND; WEHLING-HENRICKS, 2005).

O IGF-1 (fator de crescimento insulina-like), é um regulador central na regeneração muscular. Ela prolonga o potencial de regeneração músculo esquelético, agindo como um sinal de células precursoras miogênicas. Também suprime a ativação e expressão do fator inibitório da migração de macrófagos, possivelmente regulando diretamente a persistência da resposta inflamatória (MUSARO et al., 2001).

Recentes pesquisas começaram a fornecer discernimento sobre o complexo “células inflamatórias e músculo esquelético” após dano agudo esquelético. Esta bem estabelecido que macrófagos e neutrófilos são inicialmente requeridos para a fagocitose das fibras necróticas em estágios iniciais da injúria e degeneração da fibra. Mais tarde, macrófagos ativos promovem regeneração da fibra através da liberação de fatores de crescimento mitogênico e quimiocinas que possivelmente contribuem para o recrutamento de precursores miogênicos circulantes e locais, levando para a cicatrização do músculo. Antígenos específicos de linfócitos T e B também desempenham um papel crítico nas miopatias inflamatórias progressivas e iniciais. Estudos futuros nas diferentes populações celulares e os fatores que elas produzem, serão cruciais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e aprimoramento dos tratamentos de doenças musculares degenerativas, sozinhas ou em combinação com terapia celular (BRUNELLI; ROVERE-QUERINI, 2008).

Modelos experimentais de estudo da hematopoese em cães tem fornecido informações importantes, permitindo a transposição destes achados experimentais para os seres humanos e sendo considerados modelos de experimentação comparada muito promissores (WAGNER; STORE, 1996). Além disso, os cães apresentam doenças genéticas homólogas àsquelas dos humanos, quando comparados a camundongos (SUTTER; OSTRANDER, 2004). Contudo, é de

extrema importância conhecer a distribuição normal das populações de linfócitos em animais sadios para aplicar a citometria de fluxo e utilizá-la para definir doença, monitorar seu progresso e auxiliar no prognóstico (BYRNE et al., 2000).

Segundo Valentine e Cooper (1991), a alta taxa de mortalidade é observada em GRMD durante as duas primeiras semanas de idade. Os cães GRMD são imunologicamente mais susceptíveis às infecções secundárias, e não existem estudos de como se comporta o sistema imune dos mesmos. Ademais, por serem modelos de estudo para a DMD, é de extrema importância conhecer como o seu sistema imune reage frente às terapias celular, gênica e medicamentosa.

3.4 Aplicação da citometria de fluxo na imunofenotipagem e quantificação de linfócitos

A citometria de fluxo é um método emergente na medicina veterinária que permite uma análise rápida, objetiva e quantitativa de células em suspensão (FALDYNA et al., 2003). A imunofenotipagem de linfócitos é uma aplicação comum da citometria de fluxo em imunohematologia de seres humanos, e tem sido utilizada, também em medicina veterinária para estudar os efeitos de doenças e de modificações do sistema imune nas populações de linfócitos (NAKAGE et al., 2005; NAKAGE; SANTANA, 2006; GODOY et al., 2007; NAKAGE et al., 2008; TERWEE et al., 2008; WEBB et al., 2008; WEBB; LEHMAN; MCCORD, 2008; KABEYA et al., 2009; WEGIENKA et al., 2009; ESTRELA-LIMA et al., 2010; MARINARO et al., 2010; MIKKELSEN et al., 2010; RECHE et al., 2010).

A distribuição das diferentes subpopulações linfocitárias e as características tintoriais dos linfócitos do sangue do cordão umbilical (SCU) diferem daquelas do sangue periférico, em seres humanos (SCHUMACHER; BURKHEAD, 2000). Os valores fisiológicos de subpopulações linfocitárias no SCU humano foram estabelecidos por Szabolcs et al. (2003) e foram comparados com os valores do sangue periférico de adultos. Encontrou-se um percentual maior de células imaturas, não apenas quanto às subpopulações CD4⁺ e CD8⁺, mas também quanto aos linfócitos B.

Na medicina veterinária, essa técnica vem começando a ser utilizada a fim de avaliar a apoptose, a progressão das infecções pelos vírus da imunodeficiência felina e da leucemia felina, a resposta de transplantes de órgãos em modelos caninos, a resposta imunológica frente às infecções (BYRNE et al., 2000; ARAÚJO et al., 2008; GIUNCHETTI et al., 2008) e ao tratamento quimioterápico de animais acometidos por leucemias e linfomas (FLOGIA et al., 2008; USHER et al., 2008).

Durante o “Primeiro Workshop Internacional de Antígeno Leucocitário Canino” (CLAW – First Canine Leukocyte Antigen Workshop), ocorrido em Cambridge (U.K.) em 1993, definiu-se o CD5 como principal marcador de superfície para todos os linfócitos T de cães, o CD4 como marcador de linfócitos T auxiliares e o CD8 como marcador de linfócitos T citotóxicos (COBBOLD; METCALFE, 1994).

A principal expressão celular do CD4 ocorre nos linfócitos T restritos ao MHC da classe II, aos subconjuntos de linfócitos, monócitos e macrófagos. Com relação ao CD5, sua expressão ocorre principalmente em linfócitos T, timócitos e subconjuntos de linfócitos B. Adicionalmente, CD8 ocorre nos linfócitos T restritos aos MHC da classe I e subconjuntos de timócitos (ABBAS; LICHTAMAN; PILLAI, 2008).

3.5 Proteínas séricas

As proteínas séricas são compostos indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. Atuam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica como anticorpos (JAIN, 1993; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). No organismo a proteína total representa um balanço entre anabolismo e catabolismo, de forma que a concentração da proteína plasmática reflete o balanço entre a sua filtração para os tecidos, através dos capilares, e o retorno para o compartimento vascular através da linfa. Este balanço depende da pressão coloidosmótica e da dinâmica da circulação. Além da função de manutenção da pressão coloidosmotica, as proteínas plasmáticas formam a base da estrutura das células, órgão e tecidos, são catalisadoras nas reações bioquímicas,

atuam como tampão para manutenção do equilíbrio ácido-básico, são reguladoras, atuam no transporte de moléculas e íons, mantem a homeostase, regulam a resposta inflamatória, além de participarem da defesa do organismo, sob a forma de anticorpos (JAIN, 1993; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Proteínas séricas totais compreendem a albumina e as globulinas. O que as diferenciam das proteínas plasmáticas totais é a presença do fibrinogênio (BUSH, 2004).

A proteína sérica mais abundante é a albumina, e de acordo com Kaneko, Harvey e Bruss (2008), corresponde a 60% da concentração total de proteínas, sendo que, somente cerca de 30 a 40 % está no sangue. Sua síntese é realizada nos hepatócitos, e a taxa de albumina produzida é controlada pela pressão coloidosmótica apesar de poder ser influenciada por hormônios (EVANS, 2002). Os rins, músculos e fígado são responsáveis pela metabolização de 40 a 60 % da albumina total (PRISEN; SAIN-VAIN DER VELDEN, 2004). Além da manutenção da pressão coloidosmotica, a albumina atua no transporte de muitas substancias como porfirinas, bilirrubina, drogas como pellicilina, barbitúricos, histamina, aspirinas, e também íons como cálcio, ferro e zinco (JAIN, 1993). Devido a sua amplitude estrutural, a albumina normalmente é retida pelos capilares, mas é a primeira proteína a ser perdida pelo sangue durante uma injúria tecidual (JAIN, 1993).

Como consequência a uma injúria, trauma ou infecção de um tecido, desenvolve-se no organismo uma série complexa de reações que tem como finalidade inibir a continuidade do dano tecidual, isolando e destruindo o organismo agressor e ativando o processo de reparação necessária para o retorno do organismo às funções normais (BAUMANN; GAULDIE, 1994). Há liberação de amplo espectro de mediadores por parte dos macrófagos teciduais e monócitos sangüíneos, dos quais as citocinas, principalmente o fator de necrose tumoral (FNT) e as interleucinas IL-1 e IL-6, são as principais mediadoras da síntese das proteínas séricas de fase aguda (PFA) (GRUYS; OBWOLO; TOUSAINT, 1994; ECKERSALL, 2008). Essas proteínas podem ser classificadas em positivas (concentração aumentada no soro ou plasma), representadas pela ceruloplasmina, fibrinogênio, proteína C-reativa, alfa-1-antitripsina alfa-1-glicoproteína ácida e haptoglobina e em negativas, como a pré-albumina, a albumina e a transferrina (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

As PFAs positivas são encontradas no soro em altas concentrações durante a instalação do processo inflamatório (CONNER et al., 1988), podendo ser avaliadas em situações clínicas, pois se acredita que sejam melhores indicadores da resposta sistêmica ao processo inflamatório ou infeccioso do que outras variáveis, tais como febre, aumento no tempo de sedimentação de eritrócitos e leucocitose associada à neutrofilia (JAIN, 1989; SKKINER; ROBERTS, 1994). Desta forma, a dosagem das concentrações séricas destas proteínas de fase aguda pode contribuir no monitoramento de protocolos terapêuticos em cães em variados processos patológicos e inflamatórios (YUKI; ITOH; TAKASE, 2009).

A resposta de fase aguda é rápida, se desenvolvendo antes da estimulação da resposta imune específica e, às vezes, antes do aparecimento dos sintomas clínicos. Desta forma, pode-se considerar essa característica como uma indicação precoce de processos patológicos. Adicionalmente, é uma resposta inespecífica, pois se desenvolve secundariamente a variadas condições que podem produzir injúria tecidual, sendo que sua produção varia entre as espécies (TIZARD, 2008).

A alfa-1-glicoproteína ácida altera-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1988). Em humanos a concentração de glicoproteína ácida aumenta em inflamações associadas com doenças infecciosas, distúrbios imunomediados, destruição tecidual associada com infarto do miocárdio e neoplasias malignas (MOULE et al., 1987). Adicionalmente, esta proteína inibe a fagocitose, a ativação de neutrófilos e a agregação plaquetária, além de possivelmente estar envolvida na maturação de linfócitos T e B. É considerado um importante marcador inflamatório e desempenha uma importante função na reparação tecidual causada pela inflamação (FOURNIER; MEDJOUBI; PORQUET, 2000). Adicionalmente, esta proteína se liga a variados metabólitos endógenos como serotonina, esteróides, catecolaminas e histamina (ISRAILI; DAYTON, 2001). De acordo com Ikenoue et al. (2000), considerando a capacidade de ligação desta proteína, uma resposta de fase aguda pode reduzir a concentração de fármacos livres, afetando a farmacocinética da droga.

A proteína C reativa, uma PFA positiva em cães, pode ser usada como marcador preditivo no risco de doenças e para monitoramento de respostas a tratamentos. Esta proteína tem sido amplamente estudada em cães, associada à

diversos processos inflamatórios e patológicos (GALEZOWSKI et al., 2010; LJUNGVALL et al., 2010).

A haptoglobina é uma glicoproteína responsável pelo transporte de hemoglobina nas células do sistema mononuclear fagocitário para que haja a recuperação do íon ferro durante o processo de hemocaterese e na defesa contra microorganismos. Outros efeitos propostos incluem as habilidades imunomoduladoras na função de linfócitos e macrófagos e a inibição da atividade da catepsina (EBERSOLLE; CAPPELLI, 2000; MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Em cão, é uma PFA positiva que tende a aparecer em injúrias teciduais, processos inflamatórios e infecciosos, apresentando particularmente, sensibilidade a glicocorticoides (MARTINEZ-SUBIELA; GINEL; CERON, 2004).

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva e tem sua concentração alterada significativamente após a indução de processo inflamatório em cães, ao contrário do que se observa em humanos (CONNER et al., 1988). Adicionalmente, de acordo com Ebersolle e Cappelli (2000) e Fournier, Medjoubi e Porquet (2000), a ceruloplasmina auxilia no transporte do cobre necessário para a cicatrização de feridas e formação e maturação de colágeno. Os níveis plasmáticos desta proteína aumentam nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto o decréscimo é observado ao nascimento, desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias hepáticas associadas à intoxicação de cobre (JAIN, 1993).

A alfa-1-antitripsina atua como uma antiprotease. Sua principal função é inibir uma série de enzimas, entre elas a tripsina, a elastase neutrofílica e a protease -3, sendo seu efeito inibitório maior na elastase neutrofílica. Assim, ela neutraliza as atividades das enzimas proteolíticas durante o processo inflamatório agudo, sendo que sua síntese aumenta nessas condições (DEMEIO; SILVERMAN, 2004; STOLLER; ABOUSSOUAN, 2005).

A transferrina é uma proteína plasmática de fase aguda negativa, sendo responsável pelo transporte do íon ferro. Os receptores de transferrina presentes na superfície da célula ligam as moléculas de transferrina e atuam como mediadores da entrada de ferro na célula. Desta forma, a capacidade de ligar o ferro, pode ser mensurada pela concentração de transferrina sérica. Apresenta atividade anti-viral e anti-bacteriana. Sua concentração aumenta em estados de deficiência férrica e

gestacional e diminui em doenças hepáticas, infecções agudas e crônicas, e leucemia (JAIN, 1993).

As imunoglobulinas constituem um grupo de glicoproteínas presentes no soro e fluidos teciduais de mamíferos. Algumas se localizam na superfície dos linfócitos B atuando com receptores e outras estão livres no sangue e linfa (ROITT; BROSTOFF; MALE, 2003; TIZARD, 2008). Elas atuam como anticorpos, sendo produzidas em resposta a antígenos. Os linfócitos B respondem a estímulos de antígenos com a proliferação de plasmócitos e produção de anticorpos específicos contra a estimulação antigênica (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; TIZARD, 2008). Existem cinco classes de imunoglobulinas, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, identificadas em humanos, entretanto, na maioria das espécies domésticas somente a IgG, IgA, IgM e IgE são evidenciadas (GORMAN; HALLIWELL, 1989). Os cães possuem IgA, IgM e IgE e quatro subclasses de IgG, sejam, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (TIZARD, 2008).

IgG e IgM são produzidas e secretadas pelos plasmócitos localizados no baço, linfonodos e medula óssea, sendo que a IgG é a imunoglobulina encontrada em maior concentração no sangue e, por isso, exerce o papel principal nos mecanismos de defesa mediados por anticorpos, sendo responsável pela imunidade humoral do organismo. Possuem várias atividades biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação do complemento, auxiliando na defesa do hospedeiro, pois ela pode estar no sistema vascular e distribuir-se por toda parte do fluido extravascular, onde possui muitas funções de proteção (JAIN, 1993). A IgG tem uma estrutura de cadeia de quatro polipeptídeos. As cadeias pesadas são chamadas de cadeia gama e são únicas para IgG.

O valor reduzido de proteína sérica total no sangue do cordão umbilical (SCU) deve-se principalmente às pequenas quantidades de gamaglobulinas encontradas no sangue de cães ao nascimento, antes da ingestão do colostro. Nos carnívoros domésticos, embora haja uma pequena passagem de IgG (imunoglobulina da classe G) através da placenta, a maior parte é adquirida com a ingestão do colostro (TIZARD, 2008). A passagem transplacentária ocorre devido a placentação endoteliocorial dos cães, na qual o epitélio coriônico fica em contato com o epitélio dos capilares maternos (AMBROSIO; MIGLINO, 2001; MIGLINO et al., 2006).

A IgM é a segunda imunoglobulina, em termos de concentração sérica, na maioria dos mamíferos e é a principal classe imunoglobulínica produzida durante uma resposta imune primária (TIZARD, 2008).

A IgA é, em animais domésticos, um importante secretório do trato intestinal e dos pulmões. É capaz de neutralizar vírus e prevenir a ocorrência de aderências de patógenos bacterianos aos tecidos alvo (TIZARD, 2008). Sua concentração apresenta-se reduzida nos fetos, animais recém nascidos antes da ingestão do colostro, na agamaglobulinemia e nas deficiências imunológicas. Destarte, sua concentração aumenta em doenças infecciosas, do tecido conjuntivo, doenças hepáticas e alguns processos tumorais.

A produção excessiva ou inapropriada de imunoglobulinas pode ensejar condições patológicas (SELL, 1996; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

A análise do quadro seroprotéico é de particular interesse em bioquímica clínica e, particularmente, em função dos importantes progressos acumulados nos últimos anos sobre as características físico-químicas e estruturais das proteínas séricas. Somam-se a esses aspectos as propriedades fisiológicas e o significado clínico das alterações proteicas do soro, cuja adequada interpretação tem permitido estabelecer o diagnóstico e promover um melhor entendimento de várias entidades nosológicas que acometem os animais domésticos (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Tanto em pacientes DMD, como no modelo GRMD, pelo fato da distrofina estar ausente na membrana sarcoplasmática, ocorre ruptura da mesma, causando o influxo de cálcio e posterior ativação de protease endógena com a ativação da cascata inflamatória (COLLINS; MORGAN, 2003). Como consequência dessa inflamação, ocorre necrose e substituição do tecido muscular por tecido fibroso e adiposo (KORNEGAY et al., 2003).

Contudo existem poucas referencias do estudo seroproteico em cães e até mesmo, humanos, com distrofia muscular, tanto para uma avaliação imunológica e sua comparação, já que são animais mais susceptíveis á infecções, como para uma avaliação da resposta inflamatória frente à lesão muscular.

3.6 Perfil eletroforético das proteínas séricas

Pelo significado biológico e múltiplas funções exercidas no sistema orgânico, a avaliação dos níveis séricos das proteínas totais e de suas frações, obtidas por eletroforese, representa um procedimento valioso para o entendimento dos processos fisiopatológicos, além de subsidiar o diagnóstico clínico e trazer informações prognósticas e de monitoramento de doenças (ECKERSALL, 2000; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

O fracionamento eletroforético representa um dos métodos mais confiáveis de identificação e quantificação de proteínas dos fluidos corporais (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Na eletroforese as proteínas são separadas de acordo com suas taxas de migração em um campo elétrico. Essa taxa de migração é dependente da carga e tamanho da proteína, da força do campo elétrico envolvido e do meio (acetato de celulose, gel de agarose, gel de amido e gel de poliacrilamida) que as proteínas migram (NAOUM; CERON; DOMINGOS, 1999; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

O traçado eletroforético de cães saudáveis consiste no pico da albumina, que migra primeiro em direção ao anodo, seguida pela alfa-1 e alfa-2-globulinas, beta-1 e beta-2-globulinas, gama-1 e gama-2-globulinas (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

De todas as globulinas, a fração alfa é a que migra mais rapidamente e na maioria das espécies, com exceção dos ruminantes, desdobra-se em alfa-1 e alfa-2. As proteínas mais importantes que migram como alfa-1 são a alfa-1-antitripsina (90% do pico normal), protrombina, transcortina, globulina ligadora de tiroxina e alfa-fetoproteína. Como alfa-2 temos a haptoglobina, a ceruloplasmina, a alfa-2 macroglobulina, a eritropoetina e a colinesterase (ECKERSALL, 2008; KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

Da mesma forma, com exceção dos ruminantes, a fração beta é fracionada em beta-1 e beta-2. As principais proteínas são componente C3 do sistema complemento, hemopexina, transferrina, ferritina, proteína C-reativa e fibrinogênio, sendo que as imunoglobulinas IgM e IgA se prolongam da região beta-2 para gama-2 (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

As subfrações gama-1 e gama-2 compõem a fração gama. Na região gama-1 encontram-se as imunoglobulinas IgA, IgM e IgE, enquanto que a IgG é encontrada na fração gama-2 (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008).

De acordo com Gordon (1995), a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) permite a detecção de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, utilizando-se diminutas quantidades de amostras.

O emprego da técnica SDS-PAGE em medicina veterinária pode ser útil na avaliação da cinética das proteínas de fase aguda da resposta inflamatória, facilitando a definição do diagnóstico das doenças animais (FAGLIARI et al., 2003; FAGLIARI et al., 2006), o prognóstico em intercorrências no período pós operatório (FAGLIARI; SILVA, 2002), e adicionalmente, permite identificar e quantificar imunoglobulinas, especialmente em recém nascidos, propiciando um método alternativo para o estudo das frações protéicas em neonatos e consequentemente da imunidade passiva dos mesmos (FAGLIARI; SILVA, 2002; FAGLIARI et al., 2003). Desta forma, favorece o diagnóstico precoce e o prognóstico de enfermidades inflamatórias, tão comuns em neonatos (FAGLIARI et al., 2006), além do melhor entendimento da fisiopatogenia de enfermidades.

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto proposto foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), sob nº de processo 1640/2009.

4.1 Grupos experimentais

A proposta consistiu no estudo de cães da raça Golden Retriever normais (grupo GR) e afetados pela distrofia (grupo GRMD). Cada grupo foi composto por três subgrupos de acordo com a idade, sendo: sangue de cordão umbilical de animais neonatos (GR I e GRMD I), animais jovens com idade entre 2 a 3 meses (GR II e GRMD II) e animais adultos (GR III e GRMD III) (Quadro 1). A coleta nos neonatos foi realizada no momento do nascimento, através do sangue do cordão umbilical, enquanto que para os animais com idade entre 2 e 3 meses e animais adultos, a coleta foi feita através de venipunção da veia cefálica. Desta forma, temos dois grupos, animais saudáveis e afetados, e seis subgrupos de acordo com a idade:

- Grupo GRMD:

GRMD I – neonatos afetados, a termo, onde foi utilizado sangue do cordão umbilical (n=4).

GRMD II – cães afetados com idade entre 2 a 3 meses (n=4).

GRMD III – cães afetados com idade entre 1 a 5 anos (n= 14 cães).

- Grupo GR:

GR I – neonatos controle, a termo, onde foi utilizado sangue do cordão umbilical (n= 7 cães).

GR II – cães controle com idade entre 2 a 3 meses (n=7 cães).

GR V – cães controle com idade entre 1 a 5 anos (n=14 cães).

Os cães da raça Golden Retriever afetados pela distrofia muscular (GRMD), são pertencentes ao grupo de animais do canil GRMD Brasil localizado no Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria Angélica Miglino. Os diagnósticos de distrofia muscular, foram realizados pelas

equipes do Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo – (IB-USP) e do Canil GRMD Brasil do Departamento de Cirurgia da FMVZ – USP, através da genotipagem de acordo com protocolo estabelecido por Bartlett et al. (1996).

No dia 06 de abril de 2009, nasceram no Canil GRMD Brasil, treze cães, no qual todos os animais tiveram sangue de cordão umbilical coletado, para posteriormente serem analisados quanto à presença ou não do gene da Distrofina. Após essa análise foi constatado que: 4 eram afetados pela distrofia, 7 portadoras do gene causador da doença e 2 normais.

Os cães adultos normais são pertencentes ao Canil Encrenquinhas, situado na Estrada da Sardinha número dez, Bairro Portão, Atibaia/SP. Para o estudo das outras faixas etárias, foi acompanhado o parto da canina Sheron, Golden Retriever com 3 anos de idade, que no dia 13 de dezembro pariu sete filhotes da raça. Vale ressaltar que o macho utilizado no cruzamento pertence ao mesmo proprietário, sendo denominado Lyon, é um cão Golden Retriever e possuía 5 anos de idade na época do cruzamento. A proprietária dos cães é Tânia Mara da Silva, residente à Rua Enéas Marques, 22 - Vila Rosália – Guarulhos - SP. Os cães foram acompanhados até os quatro meses de idade.

Todos os animais envolvidos no experimento foram, semanalmente, avaliados para garantir que estes se encontravam dentro dos parâmetros de saúde, bem como assegurar que não ocorresse nenhum distúrbio que pudesse interferir no estudo. Estes animais foram mantidos sob condições adequadas de cuidados médicos veterinários, alimentação e higiene.

4.2.1 Coleta de amostras

Para os grupos GR I e GRMD I, foi realizada a coleta de SCU, a termo, por intermédio da punção de vasos sangüíneos da porção justaplacentária do cordão umbilical. Resumidamente, após o nascimento foi realizada a liberação do neonato dos seus respectivos envoltórios placentários, seguido do clampeamento do cordão umbilical na porção justafetal com o auxílio de duas pinças hemostáticas e,

finalmente, realizou-se a secção do cordão umbilical e a separação do neonato da placenta. Em seguida, a placenta e o cordão de cada neonato foram posicionados em plano elevado para que o SCU fluí-se e fosse coletado por venipunção umbilical com uma seringa estéril de 5 mL. O volume total foi injetado em um tubo sem anticoagulante.

Para os outros grupos, a coleta foi realizada por meio de punção da veia cefálica ou jugular de cada animal.

4.2.2 Exames laboratoriais

O quadro 1 representa as análises realizadas em cada grupo.

GRUPOS	N	Eletroforese	Citometria	Hemograma	Bioquímicos
GR I	7	X	-	-	-
GR II	7	X	-	X	X
GR III	14	X	X	X	X
GRMD I	4	X	-	-	-
GRMD II	4	X	-	X	X
GRMD III	14	X	X	X	X

Quadro 1 – Análises realizadas nos grupos estudados - São Paulo – 2009 a 2010

4.2.2.1 Hemograma

Para realização de hemograma, foi utilizado o ácido etileno diaminotetracético (EDTA) a 10% como anticoagulante.

As amostras de sangue foram avaliadas pelo método de diluição e contagem manual em câmara de Neubauer (Câmara de Neubauer Impruved Bright Line) que foi examinada à luz da microscopia óptica, utilizando-se microscópio (Nikon Eclipse E-200) com aumento de 400x para contagem de hemácias e com aumento de 100x para contagem de leucócitos. Esfregaços de sangue foram preparados e corados pelo corante Wright, para estudo dos elementos figurados do sangue. Em seguida,

as preparações citoscópicas foram examinadas à luz da microscopia óptica, utilizando-se microscópio com aumento 1000x (imersor) para diferenciação e contagem dos leucócitos. O volume globular foi avaliado pela técnica do microhematócrito.

4.2.2.2 Bioquímicos séricos

As análises bioquímicas séricas foram feitas em amostras do soro obtidas após sinérese de sangue coletado.

Utilizando o sistema Labtest (LABTEST Diagnostica S.A. – Lagoa Santa) para diagnóstico, alíquotas das amostras de soro foram processadas para determinação de creatinina (método de Jaffé modificado- Método do picrato alcalino); uréia (UV-cinética – pelo método do diacetil modificado); proteína total (Biureto); albumina (Verde de Bromocresol); fosfatase alcalina (Roy modificado); alaninaminotransferase (UV – cinético); cálcio (Labtest); fósforo (Daly e Ertingshausen); bilirrubina (Sins-hom); colesterol (Labtest); e creatinina quinase (UV-cinético).

4.2.2.3 Citometria de fluxo - Imunofenotipagem e quantificação de linfócitos

A técnica de citometria de fluxo foi realizada no Laboratório de Técnicas Imunológicas Aplicadas a Morfofisiologia da FMVZ - USP.

Para a realização da imunofenotipagem de linfócitos, foi coletado da veia cefálica, 2 mL de sangue, em tubos estéreis contendo heparina. O sangue coletado foi diluído na proporção 1:1 em *PBS* (*phosphate buffer solution*-solução de tampão fosfato). Em outro tubo falcon de 15 mL foi colocado 2 mL do gradiente de densidade, Ficoll-Paque® e delicadamente sobre esse gradiente foi adicionado 4 mL do sangue diluído. Esse tubo foi centrifugado a 400G por 20 minutos a 20°C para a separação de células mononucleares da interface 1077. Estas foram lavadas em *PBS* por duas vezes e posteriormente foi feita a viabilidade e concentração celular utilizando *Trypan Blue*. As células foram então ajustadas para 1×10^6 células por mL e adicionadas 1µL dos anticorpos monoclonais primários anti-CD4 (Novus

Biologicals®), anti-CD5 (Novus Biologicals®) e anti-CD8 (Novus Biologicals®), durante 30 minutos. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas em *PBS* por duas vezes e incubadas com anticorpo monoclonal secundário conjugado com FITC anti-IgG1 e anti-IgG2a (BioLegend®) durante 30 minutos abrigados da luz. Após esse período, as células foram novamente lavadas com *PBS* duas vezes adquiridas no citômetro de fluxo (FacsCalibur – BD®). Para esse ensaio, foram adquiridos 50 mil eventos e a análise foi realizada no programa FlowJo®.

Para o controle negativo não foi feita incubação com anticorpos monoclonais primários e nem secundários.

Para a realização da imunofenotipagem de linfócitos, o sangue foi coletado e as análises processadas em no máximo 24 horas. As amostras foram submetidas a estudos eritroleucométricos com o auxílio do contador automático de células ACT Coulter e de esfregaços sanguíneos.

Foi realizada a identificação de quatro tubos estéreis para cada amostra. Em cada tubo foram acondicionados 100uL de sangue total e 10uL dos respectivos reagentes: controle negativo no primeiro tubo; anticorpo monoclonal canino anti-CD4⁺ no segundo tubo; anticorpo monoclonal canino anti-CD5⁺ no terceiro tubo; e anticorpo monoclonal canino anti-CD8⁺ no quarto tubo. Os tubos foram incubados por 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro.

Foi adicionado 1mL de tampão de lise de hemácias (ACS Lysing solution, Bencton Dickinson) em cada tubo, seguido de homogeneização. Os tubos foram então incubados por 10 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. A suspensão de células foi centrifugada (IEC Centra CL2 Centrifuge, Thermo Electron Corporation) a 1800rpm, por 3 minutos. O sobrenadante foi destacado e adicionado 2 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01M e pH entre 7,4 e 7,6 (*PBS*). Essa lavagem de suspensão de células foi repetida duas vezes.

Após a segunda lavagem das células, foi adicionado 5 uL do anticorpo secundário (F(ab')₂ rabbit anti-mouse IgG:RPE) conjugado ao fluorocromo RPE (R ficoeritrina) (STAR12A, Serotec). Novamente, os tubos foram incubados, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, no escuro. Foram então, adicionados 2mL de *PBS*

e foi feita a lavagem novamente. Após o descarte do sobrenadante da última lavagem, as células foram ressuspensas com 400uL de PBS.

Finalmente, as amostras foram submetidas à análise no citofluorômetro (FACS Calibur, Becton Dickinson) para identificação e contagem das subpopulações linfocitárias.

Os dados analisados no citômetro de fluxo foram avaliados por um programa de computador (Cells Quest Pro Software, Becton Dickinson), que forneceu o histograma e a tabela com a quantidade de células detectadas pela imunofenotipagem.

4.2.2.4 Eletroforese das proteínas séricas

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, Campus Jaboticabal.

O eletroforetograma foi obtido em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O gel de poliacrilamida necessário ao fracionamento eletroforético pela técnica SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) foi preparado a partir da mistura de 15mL de água destilada; 3,0mL de tris-base 2M/glicina 1M, pH 9,0; 7,5mL de poliacrilamida 40%; 1,5mL de bis-acrilamida 2%; 1,5mL de glicerol; 0,6mL de ácido etilendiaminotetraacético 0,5M, pH 8,3 e 0,6mL de duodecil sulfato de sódio (SDS). A polimerização do gel foi possível pela adição de 15,0uL de tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 0,3mL de persulfato de amônia 10%.

A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão com pH 8,5, constituída de 36,30g de tris-base, 112,50g de glicina; 10,00g de SDS e água destilada em quantidade suficiente para completar 1 litro de solução. A parte superior da cuba ficou em contato com uma cuba contendo solução tampão com pH 8,5, constituída de 18,15g de tris-base, 46,25g de glicina, 10,00g de SDS, em 1 litro de água destilada.

A amostra para o fracionamento das proteínas foi preparada diluindo-se 10 uL de soro sanguíneo em 40uL de tampão fosfato (PBS) e 10uL de gel mix. Uma

alíquota de 5uL desta amostra foi depositada no gel e submetida à corrente elétrica de 50mA, em fonte apropriada. Terminada a separação a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel retirado e corado durante 10 minutos em 200mL de solução de azul de comassie, consistindo de álcool metílico (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de comassie (0,25%). Em seguida, o gel foi descorado em solução de ácido acético glacial a 7% até que as frações se apresentem nítidas (Figura 1).

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria (densitômetro Shimadzu CS-9301). Para perfeita identificação das frações proteicas do soro sanguíneo foi utilizado, em cada corrida de eletroforese, um marcador padrão de pesos moleculares com bandas entre 14.000 e 260.000 Da, 14.000 daltons (Da), 20.000 Da, 24.000 Da, 29.000 Da, 36.000 Da, 45.000 Da, 55.000 Da, 66.000 Da, 97.000 Da, 116.000 Da e 200.000 Da) e proteínas purificadas (haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, antitripsina e confeccionadas curvas de referência a partir do marcador padrão da marca Sigma.

A partir deste ponto, foi realizado a conversão dos valores em porcentagem de cada proteína, de acordo com o valor da proteína total de cada cão, para mg/dL.

Figura 1 - Confeção dos géis para a eletroforese: em A podemos observar o preenchimento das placas com os géis, em B os géis em processo de endurecimento, em C os géis sendo corados e em D, a seqüência dos produtos químicos utilizados durante a confecção dos géis

4.2.2.5 Análise dos resultados

Os resultados obtidos foram analisados pelo método da análise de variância e por comparação de médias através do teste t de *student*, e um esquema de variância de medidas repetidas, cujos resultados, nos casos de diferença significativa, foram submetidos ao Teste de Tukey de comparação de médias, ao nível de probabilidade de 5% (ZAR, 1999). O sistema utilizado foi o Statistical Analysis System (SAS).

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Hemograma dos animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III

Em relação aos achados do hemograma, a tabela 1 expressa os resultados eritroleucométricos e trombométricos obtidos para os grupos estudados. Ainda que não indicado nas tabelas, não foram encontrados hemoparasitas em nenhum dos animais avaliados. Verifica-se, pelos valores explicitados, que as médias acham-se dentro dos valores de normalidade para todos os grupos, com exceção da contagem de hemácias que apresentou valor médio menor para o grupo GR II, a contagem de linfócitos típicos que foi maior para os cães pertencentes ao grupo GR III e a presença de basófilos no grupo GRMD III.

Comparando as médias podemos observar, ainda na tabela 1, que não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas com relação ao hematócrito, teor de hemoglobina, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média, contagens totais de leucócitos, contagem de basófilos, linfócitos atípicos e dosagem de proteína total.

Os valores médios obtidos para a contagem de hemácias foi significativamente maior nos animais pertencentes ao grupo GR III. Os grupos GRMD II e GRMD III apresentaram estatisticamente os mesmos valores médios, enquanto que os animais que compõe o grupo GR II apresentaram valor médio significativamente menor quando comparado aos demais grupos (Tabela 1).

Considerando a hemoglobina corpuscular média, todos os grupos apresentaram valores médios significativamente distintos entre si. Contudo, todas as médias apresentaram-se dentro dos valores de normalidade. A ordem decrescente dos grupos em relação aos seus valores médios foram GR II, GRMD II, GRMD III e, por último, GR III (Tabela 1).

Com relação à contagem de neutrófilos bastonetes, todos os animais estudados apresentaram valores dentro dos limites de normalidade. Entretanto, os

grupos GRMD II, GRMD III e GR III, não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram significativamente do grupo GR II (Tabela 1).

Os menores valores médios encontrados para a contagem de neutrófilos segmentados foram dos grupos GRMD II e GR II, não sendo encontrada diferença estatística entre eles. Adicionalmente, o grupo GRMD III foi significativamente o grupo com a maior contagem de neutrófilos segmentados, sendo estatisticamente distinto do grupo GR III.

Considerando a contagem de eosinófilos, podemos observar que o grupo GRMD III apresentou o maior valor médio, sendo significantemente distinto dos grupos GRMD II, GR II e GR III, que não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 1).

Com relação à contagem de linfócitos típicos, apenas o grupo GR III apresentou valor médio maior que os limites de normalidade. Entretanto, todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si, sendo que a menor média foi encontrada nos animais pertencentes ao grupo GR II, seguido pelos grupos GRMD II, GRMD III e GR III, respectivamente (Tabela 1).

Os valores médios obtidos para a contagem de monócitos, revelaram que os animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II e GR III, não apresentaram diferença significativa entre si, mas diferiram significativamente do grupo GRMD III. Entretanto, podemos observar a formação de dois conjuntos de grupos, onde não encontramos diferenças significativas entre grupos de uma mesma formação, mas valores médios distintos entre as formações, pois os grupos GRMD III e GR III apresentaram valores médios altos, quando comparados aos grupos GR II e GRMD II. Essa estatística se explica pelo alto valor de desvio padrão apresentado pelo grupo GRMD III quando comparado aos demais grupos (Tabela 1).

Com relação à contagem plaquetária, o grupo GRMD III apresentou valor médio significativamente maior que os grupos GRMD II, GR II e GR III, sendo que estes três últimos grupos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si (Tabela 1).

Com relação aos parâmetros eritroleucométricos do SCU, não foi possível a realização dos mesmos devido ao pequeno volume de sangue obtido durante a coleta.

Tabela 1 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à contagem de hemácias (He), hematócrito (Ht), teor de hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM), leucócitos (Le), neutrófilos bastonetes (NB), neutrófilos segmenados (NS), eosinófilos (Eos), basófilos (Bas), linfócitos típicos (LT), linfócitos atípicos (LA), monócitos (Mon), plaquetas (Plaq) e proteína total (PT) dos grupos GRMD II, GR II, GRMD III e GR III - São Paulo - 2009

PARAMETRO	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
He (milh/mm³) (5,0 – 8,0)	GRMD II	5,33	0,75	4,60	6,10	b
	GR II	4,77	1,26	3,60	6,10	c
	GRMD III	5,50	0,46	4,60	6,60	b
	GR III	6,00	1,03	5,30	7,30	a
Ht (%) (37 – 54)	GRMD II	40,33	10,07	31,00	51,00	NS*
	GR II	41,67	11,85	28,00	49,00	
	GRMD III	38,21	2,70	33,00	44,00	
	GR III	38,50	7,55	34,00	49,00	
Hb (%) (12 -18)	GRMD II	12,90	13,90	9,10	16,90	NS*
	GR II	12,73	4,08	9,20	17,20	
	GRMD III	13,01	0,92	10,90	15,40	
	GR III	13,10	2,18	11,70	16,00	
VCM (Fl) (60 – 77)	GRMD II	73,30	5,51	68,00	79,00	NS*
	GR II	70,00	7,55	63,00	78,00	
	GRMD III	69,87	1,62	65,15	73,08	
	GR III	69,84	1,84	68,00	71,67	
HCM (Pg) (22 – 27)	GRMD II	25,00	2,00	23,00	27,00	a
	GR II	27,00	2,00	25,00	29,00	b
	GRMD III	23,82	1,06	21,82	25,88	c
	GR III	22,67	0,67	22,00	23,33	d

PARAMETRO	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY*
CHCM (%) (31 – 36)	GRMD II	33,33	2,52	31,00	36,00	NS*
	GR II	33,67	2,08	32,00	36,00	
	GRMD III	34,04	1,22	31,82	35,81	
	GR III	32,46	0,15	32,35	32,65	
Le (/mm3) (6000 – 17000)	GRMD II	15.500,33	74.565,07	6.900,00	20.145,00	NS*
	GR II	16.340,67	6.654,46	8.700,00	20.866,00	
	GRMD III	14.883,33	4.298,83	9.100,00	27.800,00	
	GR III	14.150,00	3.501,90	9.000,00	16.000,00	
NB (/mm3) (0 – 300)	GRMD II	-	-	-	-	a
	GR II	10,00	17,32	-	30,00	b
	GRMD III	-	-	-	-	a
	GR III	-	-	-	-	a
NS (/mm3) (3000 – 11800)	GRMD II	5.140,00	1.960,89	3.890,00	7.400,00	a
	GR II	4.923,67	1.297,20	3.756,00	6.230,00	a
	GRMD III	10.265,57	4.097,05	5.024,00	23.352,00	c
	GR III	7.911,50	1.757,94	4.950,00	8.320,00	b
Eos (/mm3) (150 – 1350)	GRMD II	93,33	83,27	-	160,00	a
	GR II	128,00	118,54	-	234,00	a
	GRMD III	1.072,20	741,48	-	3.102,00	b
	GR III	141,50	230,82	123,00	540,00	a
Bas (/mm3) (Raros)	GRMD II	-	-	-	-	NS*
	GR II	-	-	-	-	
	GRMD III	3,79	24,24	-	159,00	
	GR III	-	-	-	-	
LT (/mm3) (1000 – 4800)	GRMD II	2.967,67	1.514,73	1.220,00	3.902,00	a
	GR II	2.327,00	846,20	1.456,00	3.146,00	b
	GRMD III	3.943,48	1.968,44	1.656,00	11.058,00	c
	GR III	5.432,50	1.695,17	3.240,00	6.560,00	d

PARAMETROS	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY*
LA (/mm3) (Raros)	GRMD II	0	0	0	0	NS*
	GR II	0	0	0	0	
	GRMD III	0	0	0	0	
	GR III	0	0	0	0	
Mon (/mm3) (150 -1350)	GRMD II	173,33	37,86	130	200	a
	GR II	183,33	41,63	150	230	a
	GRMD III	595,36	701,87	-	3330	b
	GR III	664,5	373,09	270	960	b
Plaq (/mm3) (200 – 500)	GRMD II	266670	49330	210000	300000	a
	GR II	307000	71,04	230000	370000	a
	GRMD III	478880,95	73319,65	325000	644000	b
	GR III	358500	133831,98	229000	488000	b
PT (g/dL) (5,5 – 8,5)	GRMD II	7,201	0,212	6,900	7,500	NS*
	GR II	7,139	0,346	6,700	7,700	
	GRMD III	7,457	0,172	7,100	7,600	
	GR III	7,414	0,212	7,200	7,800	

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$); NS – não significativo.

5.2 Bioquímicos séricos dos animais pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III

A tabela 2 expressa os resultados das dosagens dos bioquímicos séricos obtidos para os grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III. Verifica-se, pelos valores médios explicitados, que as concentrações séricas de uréia, creatinina, gama glutamil transferase (GGT) e colesterol, apresentaram-se dentro dos limites de normalidade para todos os grupos estudados. Entretanto, houve diferenças significativas entre os grupos em todos os parâmetros avaliados.

Com relação à concentração sérica média de uréia, os grupos GR II e GRMD III não diferiram significativamente entre si, mas diferiram significativamente dos grupos GRMD II e GR III, que por sua vez diferiram entre si. Dos grupos estudados, a maior concentração sérica média de uréia foi encontrada nos animais pertencentes ao grupo GRMD II. Destarte, a menor concentração média foi verificada no grupo GR II (Tabela 2).

Considerando a concentração sérica média da creatinina, observamos que a maior concentração foi encontrada no grupo GR III, não existindo grupo com valor médio significantemente semelhante a esse. A menor concentração foi observada no grupo GRMD III, valor médio semelhante ao do grupo GRMD II. GR II apresentou valor intermediário, distinto do GRMD III, mas semelhante ao GRMD II (Tabela 2).

Os valores médios da concentração sérica da aspartato aminotransferase (AST) foram significativamente distintos para todos os grupos estudados. A maior concentração média foi observada no grupo GRMD III, seguido pelo grupo GRMD II. Destarte, os animais pertencentes ao grupo GR III apresentaram a menor média, seguido pelo grupo GR II. Todos os animais pertencentes aos grupos GRMD II e GRMD III apresentaram suas concentrações séricas acima dos parâmetros de normalidade (Tabela 2).

Com relação à concentração sérica da alanina aminotransferase (ALT), todos os grupos estudados apresentaram diferença estatística significativa entre si, sendo que a maior média foi encontrada no grupo GRMD III e a menor média no grupo GR III. Os valores médios dos grupos GRMD II e GR II foi de $257,20 \text{ U/L} \pm 77,60$ e $52,75 \text{ U/L} \pm 9,32$, respectivamente. É importante ressaltar que todos os animais pertencentes aos grupos GRMD II e GRMD III apresentaram dosagem sérica acima

da normalidade (Tabela 2). No gráfico 1 podemos observar as variações médias das concentrações de ALT e AST nos grupos estudados.

Comparando os valores médios das concentrações de fosfatase alcalina (ALP), observamos que todos os grupos foram distintos estatisticamente. O maior valor médio foi encontrado para o grupo GRMD II, seguido por GR II, GR III e GRMD III. Contudo, nenhum dos animais estudados apresentou valores fora dos parâmetros de normalidade (Tabela 2).

Todos os grupos estudados apresentaram concentrações séricas médias de gama glutamil transferase (GGT) dentro dos valores de normalidade. Os grupos GR II e GRMD III apresentaram semelhanças significativas entre os seus valores médios e diferiram significativamente dos demais grupos, que por sua vez, também diferiram entre si. O grupo GRMD III apresentou a menor média, enquanto a maior média foi encontrada para o grupo GR III (Tabela 2).

Os valores médios para a concentração sérica de triglicérides foi maior para o grupo GR II, não existindo outro grupo com valor significativamente semelhante. Os grupos GRMD II e GRMD III não diferiram significativamente entre si. Já o grupo GR III apresentou-se diferente significativamente de todos os outros grupos, com valor médio menor (Tabela 2).

A concentração sérica média de colesterol se apresentou dentro dos valores de normalidade para todos os grupos estudados. Entretanto, todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si. A ordem decrescente dos valores médios para os grupos foi de: GRMD III, GRMD II, GR II e GR III (Tabela 2).

Os animais pertencentes aos grupos GR II e GR III apresentaram concentração sérica de creatinina quinase (CK) dentro dos parâmetros de normalidade e não diferiram significativamente entre si, mas diferiram dos outros grupos estudados. Os grupos GRMD II e GRMD III apresentaram valores médios acima da normalidade e apresentaram diferença estatística significativa entre si, sendo que o grupo GRMD III apresentou os maiores valores médios (Tabela 2). No gráfico 2, podemos observar as variações médias da concentração de CK nos grupos estudados.

Com relação aos parâmetros bioquímicos do SCU, não foi possível a realização dos mesmos devido ao pequeno volume de sangue obtido durante a coleta.

Tabela 2 - Médias, desvios-padrão (DP), valores máximos (VMAX) e valores mínimos (VMIN) referentes à dosagem sérica de uréia, creatinina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP), gama glutamil transferase (GGT), triglicérides, colesterol e creatina quinase (CK) dos animais pertencentes ao grupo GRMD II, GR II, GRMD III, GR III - São Paulo - 2009

PARAMETROS	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
Uréia (mg/dL) (10 – 60)	GRMD II	49,50	6,45	45,00	59,00	a
	GR II	34,00	9,83	21,00	43,00	b
	GRMD III	35,67	8,10	23,00	59,70	b
	GR III	45,25	10,31	30,20	50,80	c
Creatinina (md/dL) (0,5 – 1,6)	GRMD II	0,78	0,31	0,50	1,20	a, b
	GR II	0,83	0,30	0,50	1,20	b
	GRMD III	0,71	0,12	0,43	0,94	a
	GR III	1,10	0,25	0,84	1,30	c
AST (U/L) (10 - 88)	GRMD II	205,40	63,62	125,00	294,00	a
	GR II	45,00	19,20	24,00	65,00	b
	GRMD III	269,25	67,46	196,00	372,00	c
	GR III	14,25	1,21	13,20	15,30	d
ALT (U/L) (7 – 92)	GRMD II	257,20	77,60	201,00	321,00	a
	GR II	52,75	9,32	43,00	63,00	b
	GRMD III	342,25	105,22	257,00	581,00	c
	GR III	19,00	5,34	14,40	23,70	d
ALP (U/L)	GRMD II	51,75	15,86	31,00	68,00	a
	GR II	46,25	9,29	38,00	59,00	b
	GRMD III	9,37	3,66	4,00	21,20	c
	GR III	31,25	9,78	14,40	32,30	d

PARAMETROS	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
GGT (U/L) (1,2 – 6,4)	GRMD II	3,20	1,08	1,60	3,90	a
	GR II	2,60	1,22	1,50	3,80	b
	GRMD III	2,27	1,74	-	7,73	b
	GR III	3,65	0,40	3,40	4,20	c
Triclicérides (mg/dL) (50 – 100)	GRMD II	84,25	18,73	60,00	100,00	a
	GR II	111,75	42,48	69,00	170,00	b
	GRMD III	77,06	35,00	35,50	174,00	a
	GR III	60,50	12,01	54,00	78,00	c
Coolesterol (mg/dL) (100 – 300)	GRMD II	169,75	20,16	145,00	194,00	a
	GR II	153,50	34,58	120,00	194,00	b
	GRMD III	204,76	31,88	136,50	256,90	c
	GR III	133,50	22,50	122,00	167,00	d
CK (U/L) (20 -220)	GRMD II	4.014,62	2.133,25	1.821,00	6.871,00	a
	GR II	65,00	0,95	30,00	93,00	b
	GRMD III	5.714,11	3.570,45	885,00	13.015,80	d
	GR III	40,15	6,89	38,40	51,70	b

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$).

AST e ALT (U/L)

Gráfico 1 – Concentrações médias de ALT e AST (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III

CK (U/L)

Gráfico 2 – Concentrações médias de CK (U/L) dos cães pertencentes aos grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III

5.3 Imunofenotipagem e quantificação de linfócitos

A imunofenotipagem e quantificação linfocitária foram realizadas para seis cães Golden Retriever adultos normais e seis cães Golden Retriever adultos

afetados pela distrofia muscular (grupos GR III e GRMD III, respectivamente). A padronização para a separação de células mononucleadas do sangue periférico foi feita pelo gradiente de densidade Ficoll-Paque®. Estabeleceu-se uma associação entre a quantidade de leucócitos presentes no sangue periférico canino e a técnica utilizada para a separação por gradiente de densidade pelo Ficoll-Paque utilizado para a separação de células mononucleadas em humanos. Os resultados obtidos podem ser visualizados pela formação de um anel de células mononucleares, apresentados na figura 2.

Todos os cães estudados apresentaram concentração linfocitária dentro dos limites de normalidade de acordo com o leucograma.

Figura 2 – Fotografias evidenciando em A e B, o sangue periférico canino diluído em PBS colocado sobre o gradiente de densidade Ficoll-Paque®. Em C e D, formação do anel de células mononucleares (entre o PBS e o gradiente de densidade). Nota-se abaixo um botão vermelho, referente às hemácias

Na figura 3 de *Dot plot*, demonstramos o “gate” referente à população de linfócitos do sangue periférico de cães pela técnica de citometria de fluxo selecionados para a imunofenotipagem e quantificação linfocitária.

Figura 3 – O gráfico de Dot plot (A) demonstra o *gate* de monócitos (círculo vermelho) e o *gate* de linfócitos (círculo preto) do sangue periférico canino pela técnica de citometria de fluxo selecionado para a imunofenotipagem linfocitária. Em B podemos observar a curva referente à presença das células linfocitárias não marcadas

A tabela 3 expressa os resultados da imunofenotipagem das populações linfocitárias CD4⁺, CD5⁺ e CD8⁺ para os animais estudados. Comparando as médias, observamos que não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas com relação à subpopulação linfocitária CD8⁺ entre os grupos estudados (GR III - 15,078% ± 6,413 e GRMD III - 18,342% ± 5,187). Destarte, com relação à subpopulação linfocitária CD4⁺ notamos que a sua concentração foi significativamente maior no grupo GRMD III (40,153% ± 3,393), quando comparado ao grupo GR III (25,902% ± 8,531). Adicionalmente, podemos observar que os grupos GR III (51,53% ± 15,267) e GRMD III (67,432% ± 6,713) foram significativamente diferentes para a subpopulação linfocitária CD5⁺, sendo que a maior média foi encontrada no grupo GRMD III (Gráfico 3).

A razão CD4⁺:CD8⁺ para o grupo GRMD III foi maior do que a mesma razão para o grupo GR III, sendo 2,189 e 1,717 respectivamente.

Nas figuras 4, 5 e 6, notam-se os gráficos representativos da subpopulação linfocitária CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺, respectivamente, bem como o histograma destacando o pico das células marcadas. Na figura 7, podemos observar o gráfico representativo das concentrações médias e a representação gráfica dos valores da mediana, percentis de 25% e 75% e valores máximo e mínimo da porcentagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺ respectivamente, nos GR III e GRMD III

Tabela 3 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMIN) e máximos (VMAX) referentes as concentrações (%) das subpopulações linfocitárias mediante a realização da imunofenotipagem de linfócitos com anticorpos CD4, CD5 e CD8 dos animais pertencentes aos grupos GR III e GRMD III - São Paulo - 2010

Subpopulação Linfocitária	GRUPOS	MÉDIA (%) ± DP	VMIN (%)	VMAX (%)	teste t
Linfócito CD4+	GR III	25,901 ± 8,531	14,92	36,56	t=-3.80226
	GRMD III	40,153 ± 3,393	34,38	44,01	p<0.0015
Linfócito CD8+	GR III	15,078 ± 6,413	7,68	23,35	t=-0.96913
	GRMD III	18,341 ± 5,187	13,1	27,72	p=0.1766
Linfócito CD5+	GR III	51,530 ± 15,267	31,42	70,6	t=-2.33547
	GRMD III	67,431 ± 6,713	58,58	75,79	p=0.0197

Figura 4 - Em A e B, subpopulação linfocitária CD4⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histogramas respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo

Figura 5 - Em A e B, subpopulação linfocitária CD8⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histogramas respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo

Figura 6 - Em A e B, subpopulação linfocitária CD5⁺ dos grupos GR III e GRMD III, respectivamente. Em A' e B', os histogramas respectivos aos gráficos, representando a especificidade do anticorpo

Figura 7 – Podemos observar em A, o gráfico representativo das concentrações médias das subpopulações linfocitárias CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺ dos cães pertencentes ao grupo GR III e GRMD III. Em B, C e D notamos a representação gráfica dos valores da mediana (linha horizontal dentro do quadrilátero), percentis de 25% e 75% (delimitação do quadrilátero) e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da porcentagem de linfócitos CD4⁺, CD8⁺ e CD5⁺ respectivamente, nos GR III e GRMD III

5.4 Proteinograma sérico

As tabelas 4, 5, 6, 7, 8 e 9 expressam os valores das proteínas séricas obtidas através do estudo eletroforético dos cães pertencentes aos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III. A técnica SDS-PAGE permitiu o fracionamento de vinte e duas proteínas, cujos pesos moleculares variaram de 16.000 a 260.000 daltons em todos os grupos estudados (Figura 8).

Das vinte e duas proteínas estudadas foi possível identificar nominalmente doze frações proteicas: IgA (PM 142.000 Da), proteína C-reativa (PM 122.000 Da), ceruloplasmina (PM 110.000 Da), fosforilase (PM 95.000 Da), transferrina (PM 82.000 Da), hemopexina (PM 78.000 Da), albumina (PM 66.000 Da), alfa1 antitripsina (PM 62.000 Da), IgG de cadeia pesada (PM 55.000 Da), haptoglobina (PM 45.000 Da), glicoproteína ácida (PM 40.000 Da) e IgG de cadeia leve (PM 23.000 Da). As demais proteínas foram identificadas pelos respectivos pesos moleculares. Não foi possível identificar nominalmente as frações proteicas de pesos moleculares 260.000 Da, 230.00 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, 158.000 Da, 91.000 Da, 35.000 Da, 30.000 Da, 28.000 Da e 16.000 Da. Dentre essas proteínas foi possível observar que a proteína de peso molecular 91.000 Da foi encontrada apenas nos grupos GR I e GRMD I não sendo identificada nos outros grupos estudados.

Todas as proteínas encontradas nos grupos GR I e GRMD I, apresentaram concentrações significativamente menores quando comparadas aos animais pertencentes aos demais grupos.

Com relação à proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da, podemos observar na tabela 4, que o grupo GR II e GRMD II apresentaram as maiores concentrações séricas, sendo significativamente diferentes dos grupos GR III e GRMD III, que por sua vez, não diferiram estatisticamente entre si. Como já foi mencionado anteriormente, os grupos GR I e GRMD I, que apresentaram a menor concentração sérica média de todos os grupos estudados, não apresentaram diferença significativa entre si. A figura 9 ilustra as médias das concentrações séricas desta proteína nos grupos estudados.

Considerando às proteínas de pesos moleculares 230.000 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, 30.000 Da e 16.000 Da, estatisticamente, não houve diferença significativa entre os grupos GR I e GRMD I. O mesmo foi observado entre os grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (Tabelas 4, 8 e 9 e Figuras 10,11, 12, 27 e 30, respectivamente).

Considerando a proteína sérica com peso molecular de 158.000 Da, podemos observar que maiores teores séricos foram encontrados nos grupos GR II e GR III, que diferiram significativamente dos demais grupos. Da mesma forma, os grupos GRMD II e GRMD III não diferiram significativamente entre si. As menores concentrações séricas, significativamente semelhantes, foram encontradas nos grupos GR I e GRMD I (Tabela 5). A figura 13 ilustra as médias encontradas para os grupos citados.

Considerando a concentração sérica de IgA (PM 142.000 Da), observamos na tabela 5 que os animais pertencentes aos grupos GR I e GRMD I foram semelhantes entre si. A maior concentração sérica média foi encontrada nos animais pertencentes ao grupo GR III, porém apesar desse grupo diferir significativamente dos grupos GR II e GRMD II, ele não difere estatisticamente do grupo GRMD III. Da mesma forma, o grupo GRMD III é semelhante estatisticamente aos grupos GR II e GRMD II (Figura 14).

A concentração média sérica da proteína C reativa diferiu significativamente entre os grupos GR I e GRMD I, sendo que a maior concentração foi evidenciada no grupo GRMD I. Com relação aos grupos GRMD II e GRMD III, não houve diferença significativa entre eles. Entretanto, o grupo GRMD III, também foi estatisticamente semelhante aos grupos GR II e GRMD II (Tabela 5 e Figura 15).

Considerando a concentração sérica média da ceruloplasmina, podemos observar na tabela 5 que as maiores médias, significativamente semelhantes, foram evidenciadas nos grupos GRMD II e GRMD III. Os grupos GR II e GR III não diferiram significativamente entre si. O mesmo foi observado entre os grupos GR I e GRMD I. A figura 16 ilustra as médias de ceruloplasmina encontradas para os grupos citados.

De acordo com a tabela 6, os teores séricos da fosforilase foram significativamente maiores nos animais pertencentes ao grupo GRMD II, que

apresentaram diferença significativa em relação aos demais grupos estudados. Os grupos GR II, GR III e GRMD III, não diferiram significativamente entre si. Destarte, o grupo GRMD I apresentou concentração sérica significativamente maior quando comparado ao grupo GR I (Figura 17).

A proteína sérica de peso molecular 91.000 Da foi encontrada apenas nos grupos GR I e GRMD I, não havendo diferença significativa entre eles (Tabela 6 e Figura 18).

A concentração sérica de transferrina nos grupos GR I e GRMD I foram significativamente distintas, sendo que a maior concentração média foi evidenciada no grupo GR I (Tabela 6). Considerando os demais grupos estudados, não ocorreu diferença significativa entre os mesmos (Figura 19).

As maiores concentrações séricas da hemopexina foram encontradas nos grupos GR II e GRMD II, que diferiram significativamente dos demais grupos. Os grupos GR III e GRMD III não apresentaram diferença significativa entre si. O mesmo foi observado entre os grupos GR I e GRMD I (Tabela 6 e Figura 20).

Com relação ao teor sérico de albumina, os grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III não diferiram significativamente entre si, mas apresentaram valores médios maiores quando comparados aos grupos GR I e GRMD I, significativamente semelhantes entre si (Tabela 7 e Figura 21).

Conforme tabela 7, os teores séricos médio da alfa-1-antitripsina foram significativamente semelhantes entre os grupos GR I e GRMD I. Os grupos GR II e GR III, não diferiram significativamente entre si, mas diferiram dos grupos GRMD II e GRMD II que evidenciaram as maiores concentrações séricas desta proteína (Figura 22).

Considerando a concentração sérica média da IgG de cadeia pesada entre os grupos GR I e GRMD I, observamos que o grupo GRMD I apresentou a menor concentração sérica, porém os grupos são significativamente semelhantes. Adicionalmente, os grupos GR II e GRMD II foram significativamente semelhantes entre si apresentando concentrações séricas estatisticamente menores que os grupos GR III e GRMD III (Tabela 7). Podemos observar que a maior concentração sérica é encontrada nos animais GRMD III. A figura 23 ilustra as médias encontradas para os grupos.

De acordo com a tabela 7, o maior valor médio encontrado para haptoglobina foi expressa pelo grupo GRMD II, que diferiu significativamente dos demais grupos. Os grupos GR I e GRMD I, não apresentaram diferenças significativas quando comparados. Da mesma forma, os grupos GR II, GR III e GRMD III foram semelhantes estatisticamente (Figura 24).

Da mesma forma que a haptoglobina, a maior concentração sérica da alfa-1-glicoproteína ácida foi encontrada nos grupos GRMD II, diferindo significativamente dos demais grupos. GR I e GRMD I foram semelhantes estatisticamente entre si. O mesmo foi observado entre os grupos GR II, GR III. Entretanto, o GRMD III diferiu dos demais, pois apresentou concentração sérica significativamente menor quando comparado aos grupos GR II, GRMD II e GR III (Tabela 8 e Figura 25).

Com relação à proteína de peso molecular 35.000 Da, podemos observar na tabela 8 que os maiores valores médios semelhantes foram encontrados nos grupos GR III e GRMD III. O grupo GR II e GRMD II diferiram entre si e de todos os outros grupos estudados. Os grupos GR I e GRMD I se assemelharam significativamente (Figura 26).

De acordo com a tabela 8, a proteína desconhecida de peso molecular 30.000 Da apresentou concentrações séricas significativamente semelhantes entre os grupos GR II, GRMD II, GR III e GRMD III. Adicionalmente, os grupos GR I e GRMD I não diferiram entre si (Figura 27).

Na tabela 8, observamos que a proteína de peso molecular 28.000 Da apresentou maiores concentrações séricas, significativamente semelhantes, nos grupo GR III e GRMD III. Os grupos GR II e GRMD II não diferiram entre si. O mesmo foi observado entre os grupos GR I e GRMD I (Figura 28).

Com relação à concentração média de imunoglobulina IgG de cadeia leve, não houve diferença significativa entre os grupos GR I e GRMD I. Semelhança significativa entre as médias também foi observada entre os grupos GR III e GRMD III. Destarte, os grupos GR II e GRMD II diferiram entre si e dos demais grupos, de forma que, o grupo GRMD II apresentou concentração sérica da IgG de cadeia leve significativamente menor quando comparada aos animais pertencentes ao grupo GR II (Tabela 9). A figura 29 ilustra as médias encontradas para os grupos.

Nos gráficos 3, 4 e 5 podemos observar as formações dos picos de proteínas após a leitura do densitômetro, sendo que os picos mais acentuados são correspondentes à albumina. É nítida as diferenças entre os picos de IgG de cadeia pesada e leve entre os grupos GR II, GRMD II e GR III e GRMD III.

Figura 8 – Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando marcado padrão de pesos moleculares com bandas entre 16.000 e 260.000 Da

Tabela 4 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMi) e máximos (VMa) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 260.000 Da à 165.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR V e GRMD V - São Paulo - 2010

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
NI (PM 260.000 Da; mg/dl)	GR I	4,016	1,565	1,406	6,390	a
	GRMD I	3,365	1,309	1,856	5,874	a
	GR II	62,651	11,606	43,600	81,870	b
	GRMD II	51,190	8,192	40,760	60,981	b
	GR III	16,173	6,555	4,884	26,837	c
	GRMD III	14,449	4,557	4,898	18,467	c
NI PM 230.000 Da; mg/dl)	GR I	7,940	3,437	3,990	13,987	a
	GRMD I	6,898	2,406	2,820	9,750	a
	GR II	53,018	27,406	18,080	88,765	b
	GRMD II	57,200	19,661	18,450	77,360	b
	GR III	62,767	18,241	37,480	96,985	b
	GRMD III	67,590	17,825	29,730	81,938	b
NI (PM 180.000 Da; mg/dl)	GR I	9,065	4,216	5,847	15,470	a
	GRMD I	7,260	4,267	-	12,913	a
	GR II	58,414	42,125	2,640	136,640	b
	GRMD II	64,295	30,757	-	97,398	b
	GR III	48,420	27,429	17,960	98,980	b
	GRMD III	54,867	20,389	23,980	78,090	b
NI (PM 165.000 Da; mg/dl)	GR I	3,157	1,664	0,750	6,090	a
	GRMD I	2,490	1,843	-	5,472	a
	GR II	17,880	9,821	6,875	34,650	b
	GRMD II	30,980	15,000	9,860	55,430	b
	GR III	33,871	17,187	14,670	65,430	b
	GRMD III	42,621	21,276	23,150	87,550	b

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Tabela 5 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 158.000 Da e 110.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
NI (PM 158.000 Da; mg/dl)	GR I	1,344	0,663	-	1,980	a
	GRMD I	1,023	0,893	0,460	2,980	a
	GR II	38,005	15,860	21,010	66,958	b
	GRMD II	10,426	11,058	-	26,000	c
	GR III	36,933	8,701	31,450	56,120	b
	GRMD III	6,011	4,835	-	12,870	c
IgA (PM 142.000 Da; mg/dl)	GR I	1,101	0,426	0,425	1,627	a
	GRMD I	0,547	0,097	0,354	0,673	a
	GR II	20,151	3,279	17,267	27,145	b
	GRMD II	22,553	4,110	21,000	31,874	b
	GR III	37,616	6,029	31,870	47,938	c
	GRMD III	33,756	7,889	24,000	44,837	b,c
Proteína C-reativa (PM 122.000 Da; mg/dl)	GR I	0,229	0,129	0,123	0,456	a
	GRMD I	0,925	0,545	0,120	1,738	b
	GR II	22,153	2,410	17,267	24,378	c
	GRMD II	34,874	5,143	26,234	43,289	d
	GR III	25,398	0,995	24,000	27,070	c
	GRMD III	29,582	7,336	22,784	43,010	c,d
Ceruloplasmina (PM 110.000 Da; mg/dL)	GR I	14,562	1,545	12,827	17,000	a
	GRMD I	13,243	2,164	10,882	17,000	a
	GR II	34,992	11,960	18,987	57,463	b
	GRMD II	71,660	18,488	46,893	89,938	c
	GR III	40,070	8,124	27,367	51,378	b
	GRMD III	65,399	13,550	43,829	80,398	c

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Tabela 6 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 95.000 Da e 78.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliácridamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR III e GRMD III - São Paulo – 2010.

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
Fosforilase (PM 95.000 Da; mg/dL)	GR I	1,359	0,448	0,827	1,879	a
	GRMD I	4,802	1,116	3,389	6,594	b
	GR II	25,554	3,313	23,893	32,987	c
	GRMD II	59,250	11,833	33,278	69,485	d
	GR III	23,286	5,326	12,340	29,897	c
	GRMD III	29,604	2,924	25,004	33,289	c
NI (PM 91.000 Da; mg/dL)	GR I	30,130	20,270	12,750	54,930	a
	GRMD I	31,216	13,917	12,760	43,785	a
	GR II	-	-	-	-	b
	GRMD II	-	-	-	-	b
	GR III	-	-	-	-	b
	GRMD III	-	-	-	-	b
Transferrina (PM 82.000 Da; mg/dL)	GR I	21,193	4,557	12,893	26,300	a
	GRMD I	13,464	1,092	11,289	14,389	b
	GR II	70,156	12,144	44,123	78,983	c
	GRMD II	65,242	11,194	51,378	77,389	c
	GR III	83,848	8,227	73,489	98,378	c
	GRMD III	90,669	10,428	75,389	108,978	c
Hemopexina (PM 78.000 Da; mg/dL)	GR I	26,059	6,323	18,267	33,289	a
	GRMD I	21,904	6,789	16,837	36,489	a
	GR II	334,571	51,771	231,738	401,378	b
	GRMD II	318,049	61,914	240,280	418,060	b
	GR III	131,181	74,747	-	253,490	c
	GRMD III	173,484	28,502	134,890	200,298	c

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Tabela 7 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 66.000 Da e 45.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
Albumina (PM 66.000 Da; mg/dL)	GR I	1.542,436	121,262	1.405,650	1.764,400	a
	GRMD I	1.486,540	203,016	1.254,890	1.876,890	a
	GR II	3.633,027	350,876	3.129,190	3.796,230	b
	GRMD II	3.793,030	156,246	3.562,000	3.998,980	b
	GR III	3.546,809	241,266	3.325,430	3.982,000	b
	GRMD III	3.591,907	292,653	3.219,320	3.928,800	b
Alfa-1-antitripsina (PM 62.000 Da; mg/dL)	GR I	1,842	1,573	-	3,780	a
	GRMD I	2,901	1,777	0,873	5,489	a
	GR II	17,762	3,749	13,289	22,000	b
	GRMD II	36,962	13,066	12,657	54,189	c
	GR III	20,705	2,097	17,389	24,289	b
	GRMD III	33,571	7,678	23,000	44,000	c
IgG cadeia pesada (PM 55.000 Da; mg/dL)	GR I	12,804	2,805	8,873	17,278	a
	GRMD I	9,169	3,508	3,298	12,738	a
	GR II	451,327	80,376	350,000	567,850	b
	GRMD II	454,160	39,667	412,120	534,000	b
	GR III	1.006,226	378,231	234,000	1.324,330	c
	GRMD III	1.648,051	162,630	1.287,930	1.784,000	d
Haptoglobina (PM 45.000 Da; mg/dL)	GR I	12,473	2,747	8,978	16,487	a
	GRMD I	15,586	2,375	12,340	18,764	a
	GR II	28,022	2,712	24,000	31,982	b
	GRMD II	47,267	6,753	34,983	57,900	c
	GR III	31,140	1,680	28,982	33,001	b
	GRMD III	32,544	2,910	29,378	37,268	b

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p>0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Tabela 8 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso variando entre 40.000 Da e 28.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poli(acrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
Glicoproteína ácida (PM 40.000 Da/ mg/dL)	GR I	3,297	1,440	1,298	5,489	a
	GRMD I	4,125	1,186	3,100	6,389	a
	GR II	27,832	6,134	19,278	35,849	b
	GRMD II	66,291	8,164	55,478	81,378	c
	GR III	34,779	6,972	21,389	41,890	b
	GRMD III	12,507	2,414	9,000	15,400	d
NI (PM 35.000 Da; mg/dL)	GR I	10,573	5,520	3,498	18,387	a
	GRMD I	12,825	2,181	9,387	15,389	a
	GR II	47,634	11,020	36,289	60,983	b
	GRMD II	23,153	3,203	20,398	29,378	c
	GR III	137,710	37,175	100,230	209,980	d
	GRMD III	165,150	37,546	122,000	230,190	d
NI (PM 30.000 Da; mg/dL)	GR I	6,118	5,025	-	11,930	a
	GRMD I	7,901	8,256	-	23,389	a
	GR II	34,667	6,770	30,290	47,698	b
	GRMD II	35,536	8,999	23,400	49,311	b
	GR III	59,410	23,344	31,980	99,100	b
	GRMD III	57,865	24,410	39,280	109,280	b
NI (PM 28.000 Da; mg/dL)	GR I	12,635	3,516	9,287	19,872	a
	GRMD I	10,839	7,213	-	20,981	a
	GR II	43,397	9,436	23,489	51,289	b
	GRMD II	36,982	13,617	13,389	60,189	b
	GR III	335,701	92,957	133,298	408,390	c
	GRMD III	366,714	78,731	234,000	468,000	c

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Tabela 9 - Médias, desvios-padrão (DP) e valores mínimos (VMI) e máximos (VMA) dos teores séricos das frações protéicas com peso 23.000 e 16.000 Da, obtidas por fracionamento em gel de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) dos grupos GR I, GRMD I, GRMD II, GR II, GR III e GRMD III - São Paulo - 2010

PROTEÍNA SÉRICA	GRUPOS	MÉDIA	DP	VMIN	VMAX	TUKEY *
IgG de cadeia leve (PM 23.000 Da; mg/dL)	GR I	8,977	2,371	4,871	11,200	a
	GRMD I	2,961	1,433	1,560	5,489	a
	GR II	888,186	144,093	673,000	1.022,000	b
	GRMD II	545,106	28,140	502,980	580,000	c
	GR III	434,426	21,830	397,980	464,000	d
	GRMD III	452,939	37,735	423,850	534,870	d
NI (PM 16.000 Da; mg/dL)	GR I	18,415	13,754	-	35,489	a
	GRMD I	28,380	19,072	-	54,389	a
	GR II	88,391	46,804	6,398	167,340	b
	GRMD II	86,511	45,785	53,290	188,290	b
	GR III	97,150	22,471	78,090	145,980	b
	GRMD III	92,044	17,419	64,980	123,345	b

*Teste de Tukey – médias com as mesmas letras não diferem entre si ($p > 0,05$); NI – não identificada; PM – peso molecular

Figura 9 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

NI (PM 230.00 Da; mg/dL)

■ GR I ■ GRMD I ■ GR II ■ GRMD II ■ GR III ■ GRMD III

Figura 10 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 230.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 230.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 11 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 180.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 180.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 12 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 165.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 165.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 13 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 158.000 Da, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína não identificada de peso molecular 158.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 14 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgA , nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína IgA dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 15 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína C-reativa, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína C-reativa dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Ceruloplasmina (mg/dL)

Figura 16 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína ceruloplasmina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína ceruloplasmina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 17 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína fosforilase, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína fosforilase dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 18 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína desconhecida de peso molecular 91.000 Da , nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína de peso molecular desconhecido 91.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 19 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína transferrina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína transferrina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Hemopexina (mg/dL)

Figura 20 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína hemopexina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína hemopexina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 21 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína albumina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína albumina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Alfa-antitripsina (mg/dL)

Figura 22 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína alfa-antitripsina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína alfa-antitripsina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

IgG de cadeia pesada (mg/dL)

Figura 23 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgG de cadeia pesada , nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína IgG de cadeia pesada dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Haptoglobina (mg/dL)

Figura 24 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína haptoglobina, nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína haptoglobina dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 25 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína glicoproteína ácida nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica da proteína glicoproteína ácida dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

NI (PM 35.000 Da; mg/dL)

Figura 26 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 35.000 Da nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica não identificada de peso molecular 35.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

NI (PM 30.000 Da; mg/dL)

Figura 27 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 30.000 Da nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica não identificada de peso molecular 30.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

NI (PM 27.000 Da; mg/dL)

Figura 28 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 28.000 Da nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica não identificada de peso molecular 28.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

IgG de cadeia leve (mg/dL)

Figura 29 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína IgG de cadeia leve nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica IgG de cadeia leve dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Figura 30 – Representação gráfica das concentrações séricas médias (mg/dL) da proteína não identificada de peso molecular 16.000 Da nos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (A). Representação dos valores médios, e máximo e mínimo (extremidade das barras verticais) da concentração sérica não identificada de peso molecular 16.000 Da dos grupos GR I, GRMD I, GR II, GRMD II, GR III e GRMD III (B)

Gráfico 3 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue de cordão umbilical de cão da raça Golden Retriever normal – GR I (A) e afetado pela distrofia muscular – GRMD I (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (25). Em B, a albumina (14), IgG de cadeia pesada (16), IgG de cadeia leve (24)

Gráfico 4 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue periférico de cão da raça Golden Retriever normal, com idade variando entre 2 e 3 meses - GR II (A) e afetado pela distrofia muscular, com a mesma faixa etária - GRMD II (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (26). Em B, a albumina (10), IgG de cadeia pesada (11), IgG de cadeia leve (24).

Gráfico 5 - Representação gráfica da leitura densitométrica de corrida eletroforética de proteínas séricas de sangue periférico de cão da raça Golden Retriever normal, com mais de um ano de idade – GR III (A) e afetado pela distrofia muscular, com a mesma faixa etária – GRMD III (B). Em A, podemos notar o pico de albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (23). Em B, a albumina (12), IgG de cadeia pesada (14), IgG de cadeia leve (23)

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que os valores do eritrograma e leucograma de cães pertencentes ao grupo GR II, GR III, GRMD II encontram-se dentro dos valores de normalidade. Entretanto, com relação ao leucograma do grupo GRMD III, os valores médios referentes à mensuração de basófilos ($3,79/\text{mm}^3$) apresentaram-se acima dos valores de normalidade. Ademais, considerando os valores máximos, alguns animais pertencentes ao grupo em questão, apresentaram leucocitose com neutrofilia sem desvio à esquerda, além de trombocitose, monocitose e linfopenia, no momento das coletas.

Os basófilos estão normalmente ausentes na circulação sanguínea de cães e gatos, de forma que o achado de qualquer basófilo deve ser considerado significativo. Estão envolvidos nas reações de hipersensibilidade imediata mediante a liberação de alguns mediadores, incluindo histamina, heparina e serotonina, além da síntese e liberação de leucotrienos e fator de ativação de plaquetas. A imunoglobulina IgE se liga aos basófilos liberando algum dos mediadores citados. (NELSON; COUTO, 2006). Ademais, a basinofilia ocorre em distúrbios inflamatórios purulentos localizados e hiperlipoproteinemia (BUSH, 2004; TILLEY; SMITH, 2008).

Considerando nossos resultados e as condições clínicas dos animais afetados estudados, podemos inferir que a presença de basófilos possa estar relacionada com processos alérgicos, visto que quatro dos quatorze cães (28,58%) estudados apresentaram esporadicamente, durante as coletas, processos atópicos de alergia tanto em reação medicamentosa como dermatite atópica. É importante ressaltar que a herdabilidade da dermatite atópica em Labrador e Golden Retriever é relativamente alta (GOUGH; THOMAS, 2006; TIZARD, 2008). Ademais podemos sugerir que a presença de trombocitose em alguns animais afetados possa estar relacionada com a basinofilia, pois os basófilos, durante a estimulação, sintetizam e liberam o fator ativador de plaquetas, o que poderia resultar em um aumento na concentração sanguínea das mesmas. O aumento de IgE também pode ocorrer em situações de endoparasitas e ectoparasitas, entretanto, considerando que nossos animais eram devidamente vermifugados, e o tratamento preventivo para

ectoparasitas realizado, descartamos que a basinofilia esteja relacionada com esses fatores.

A presença de leucocitose sem desvio a esquerda e linfopenia e monocitose pode ocorrer, por exemplo, em processos inflamatórios (SOLTER et al., 1991; MEYER; COLES; RICH, 1995; NELSON; COUTO, 2006), inclusive em GRMD (KERKIS et al., 2008).

Adicionalmente, para os exames bioquímicos, a dosagem de CK, AST e ALT para os grupos GRMD II e GRMD III apresentaram-se acima dos valores de normalidade em todos os animais. Desta forma, observamos que todos os animais afetados pela distrofia muscular apresentaram aumento da concentração sérica das enzimas ALT, AST e CK.

O aumento da concentração sérica de ALT é indicativo de danos nos hepatócitos resultando na sua liberação para a circulação (BUSH, 2004). O citoplasma do hepatócito é rico em ALT em cães, gatos e primatas (MEYER; COLES; RICH, 1995). As mais altas concentrações de AST estão localizadas principalmente nas células musculares esqueléticas e nos hepatócitos. Baseado nos estudos em humanos, aproximadamente 60 a 80% do AST do interior do hepatócito está associado às mitocôndrias e o restante apresenta-se de forma solúvel no citossol. Embora de difícil determinação de sua exata percentagem, entendemos que ambas as formas existam no cão. Estudos têm demonstrado que é necessário um insulto mais severo do que aquele que altera a permeabilidade da membrana celular para provocar a liberação da forma mitocondrial de AST. Conseqüentemente a ATL sérica aumentará mais rapidamente (BUSH, 2004).

Assim, uma vez que a ALT pode estar aumentada pela presença de lesão muscular esquelética, é prudente o uso em conjunto da determinação de ALT e AST como forma diagnóstica. Uma lesão muscular esquelética coexistente deve ser descartada pela mensuração da enzima muscular esquelética específica CK. Desta forma, uma severa lesão muscular pode resultar em um suave aumento de ALT, entretanto, o AST e CK estarão severamente aumentados (MEYER; COLES; RICH, 1995).

A creatina quinase (CK) está localizada em músculo esquelético, músculo cardíaco e cérebro. Sua dosagem contribui primariamente para diagnóstico de

lesões do tecido muscular esquelético (BUSH, 2004). Ao primeiro dia de vida, os cães distróficos podem ser diagnosticados através da análise desta enzima. O mesmo ocorre com os humanos portadores da doença (KORNEGAY et al., 1988; VALENTINE et al., 1990).

Os resultados encontrados corroboram com Valentine et al. (1990) e Bergman et al. (2002), que afirmam que, cães distróficos de qualquer idade, apresentam aumento de CK, AST e ALT. Adicionalmente, apesar do alto nível sérico de ALT ser indicativo de dano hepático, exames de imagem não evidenciam degeneração no tecido hepático de cães distróficos. Assim, é provável que o aumento sérico da ALT em nossos cães afetados relaciona-se com o dano muscular esquelético decorrente da doença, visto que não foram evidenciadas alterações clínicas compatíveis com doenças hepáticas.

Com relação ao proteinograma sérico realizado em nosso estudo, foram identificadas 21 proteínas em cães pertencentes aos grupos de cães normais e afetados com idade entre 2 e 3 meses e com mais de 1 ano de idade, e 22 proteínas no sangue de cordão umbilical de cães normais e afetados, visto que a proteína de peso molecular 91.000 Da, foi evidenciada apenas no sangue de cordão umbilical. A comparação dessas bandas com os pesos moleculares das proteínas de referência permitiu a identificação nominal de 12 delas, sendo que as demais foram classificadas de acordo com os respectivos pesos moleculares. De acordo com Fagliari e Silva (2002), a atual indisponibilidade de outras proteínas específicas purificadas limitam, como nesse caso, a identificação nominal de todas as frações presentes no traçado eletroforético, no entanto não inviabiliza essa técnica como método auxiliar de estudo.

Considerando a análise proteica do sangue do cordão umbilical de animais afetados e normais, podemos observar que as proteínas que diferiram significativamente entre esses grupos foram a proteína-C reativa, fosforilase e transferrina. Os valores médios absolutos obtidos para as proteínas séricas ao nascimento apresentaram-se abaixo dos níveis relatados em animais adultos, corroborando com dados relatados por Barsanti, Kristensen e Drumheller (1977); Keay e Doxey (1982) e Harrus et al. (1996). Nossos resultados se encontram em conformidade com os achados de Khul et al. (2000), que avaliaram o sangue periférico de cães do nascimento até os dois meses de

idade. Este fato ocorre por que ao nascimento, os animais exibem baixos teores protéicos, que aumentam após receberem o colostro (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Os valores de proteínas totais, albumina, alfa, beta e gamaglobulinas já estão bem caracterizados (HARRUS et al., 1996), entretanto, poucas são as citações referentes aos valores de proteínas séricas em cães neonatos, antes da ingestão do colostro. Godoy et al. (2007) em um estudo com eletroferese em gel de agarose de sangue de cordão umbilical de cão, relataram concentração média de proteínas totais de 3,09 g/dL e 1,51 g/dL para albumina. Os nossos valores se aproximaram aos deste estudo, sendo que encontramos concentração média de 3,25 g/dL e 1,54 g/dL para proteína total e albumina respectivamente para animais normais e 3,37 g/dL e 1,48 g/dL no sangue do cordão umbilical de animais afetados.

O valor reduzido de proteína sérica total de sangue do cordão umbilical deve-se principalmente as pequenas quantidades de gamaglobulina encontradas no sangue de cães ao nascimento. Nos carnívoros domésticos, embora haja uma pequena passagem de IgG através da placenta, a maior parte é adquirida com a ingestão do colostro. A passagem transplacentária ocorre devido à placentação endoteliocoreal dos cães, na qual o epitélio coriônico fica em contato com o endotélio dos capilares maternos (TIZARD, 1998; AMBROSIO et al., 2002; CHUCRI et al., 2010). Os valores encontrados em nosso estudo, confirmam os relatos de Feldman, Zinkl e Jain (2000) e Godoy et al. (2007), que referem a existência de baixos teores de gamaglobulinas nos animais domésticos ao nascimento.

Em seu trabalho, Godoy et al. (2007), observou uma pequena curva entre alfa2 e beta2, não classificada devido ao gel de agarose ser um material que permite a identificação de apenas 5 a 7 frações proteicas. Em nosso estudo, identificamos uma proteína de peso molecular 91.000 Da, tanto em sangue de cordão umbilical de animais afetados com em sadios, não sendo encontrada nos outros animais. Tendo em vista que a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida usada em nosso estudo nos permite identificar com maior precisão uma ampla variedade de frações proteicas, quando comparada com a técnica de eletroforese em gel de agarose, é possível que a fração protéica identificada de forma não precisa por Godoy et al. (2007), corresponda à proteína de peso molecular 91.000 Da encontrada em nosso estudo.

Considerando os animais com idade entre dois e três meses de idade, normais e afetados pela distrofia, nota-se que as proteínas que diferem significativamente entre eles são a proteína desconhecida de peso molecular 158.000 Da, proteína C reativa, ceruloplasmina, fosforilase, alfa-1-antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida, 35.000 Da e IgG leve. Adicionalmente, com relação aos animais adultos, afetados e normais, podemos observar que as proteínas que diferiram significativamente foram a proteína de peso molecular 158.000 Da, ceruloplasmina, alfa-1-antitripsina, IgG pesada e glicoproteína ácida.

Considerando as diferenças estatísticas estudadas e os grupos compostos, levamos em consideração as diferenças apresentadas com relação à idade (entre os grupos I, II e III) e em relação à doença, afetados e normais (GR e GRMD), para identificar se as diferenças encontradas podem estar relacionadas com a distrofia, com a idade dos animais ou ambos.

As alterações proteicas que foram estatisticamente diferentes em relação à idade foram: a proteína não identificada de peso molecular 260.000 Da, 230.000 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, IgA, 91.000 Da, hemopexina, albumina, 30.000 Da, 28.000 Da, e proteína não identificada com peso molecular de 16.000 Da. Com relação aos fatores relacionados com a doença, podemos inferir que as proteínas que mostraram ter alterações foram a proteína não identificada com peso molecular 158.000, proteína C reativa, ceruloplasmina, fosforilase, transferrina, alfa-antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida. Destarte, IgG de cadeia pesada e leve e a proteína não identificada de peso molecular 35.000 Da mostraram estar relacionadas, possivelmente, com a distrofia e com a idade.

O grupo de animais afetados com idade variando entre 2 a 3 meses, apresentaram aumento significativo de fosforilase. Da mesma forma, o SCU dos animais afetados, apresentou concentração sérica superior quando comparado ao SCU dos animais normais estudados. Na literatura consultada, não foi possível identificar a função desta proteína frente a qualquer tipo de injúria. Essa mesma observação foi relatada por Patelli et al. (2008), que observou o aparecimento desta proteína apenas na fase aguda da infecção de ratos infectados com *T. evansi*. Desta forma, podemos inferir que sua alteração possa estar relacionada, de alguma forma, com a progressão da doença, visto que sua concentração foi maior na faixa etária

onde os cães afetados começam a evidenciar as alterações clínicas mais acentuadamente. Os valores encontrados para a concentração média de fosforilase em cães normais não corroboram com os valores relatados por Pereira et al. (2010).

As proteínas de fase aguda haptoglobina e glicoproteína ácida apresentaram médias significativamente aumentadas em todos os animais afetados com idade entre 2 a 3 meses. O aumento da concentração da proteína C-reativa, ceruloplasmina e alfa-1-antitripsina foram evidenciadas nos grupos dos animais afetados adultos e com 2 a 3 meses de idade, sem diferenças estatísticas entre eles.

Aumento das concentrações das proteínas de fase aguda tem sido relatadas em vários estudos relacionados com diversos processos infecciosos e inflamatórios em humanos e em animais (FAGLIARI et al., 2003; KURABAYASHI et al., 2003; SILVA et al., 2005; FAGLIARI et al., 2006; BÚRIGO et al., 2007; HILL et al., 2007; PATELLI et al., 2008; SAQUETTI et al., 2008; SAUT et al., 2009; ARTEAGA et al., 2010).

A haptoglobina é uma proteína de fase aguda moderadamente positiva em cães (CONNER et al., 1988). Entretanto, muitos estudos demonstram que mudanças na concentração de haptoglobina, podem atuar como um parâmetro diagnóstico e prognóstico nos processos inflamatórios (MARTINEZ-SUBIELA et al., 2002).

De acordo com Harvey e West (1987), a concentração média de haptoglobina em cães saudáveis é de 104 mg/dL, sendo que Solter et al. (1991) obtiveram o valor de 56 mg/dL. Para Eckersall et al. (1999) a concentração de haptoglobina em cães saudáveis situa-se entre 0 e 3 g/L e para Martinez-Subiela, Ginel e Ceron (2004) de 0,3 a 1,8 g/L. Os nossos dados corroboram com os autores supracitados e com os achados de Pereira et al. (2010) que relataram concentração sérica média de haptoglobina em cães saudáveis por volta de 28,72 mg/dL, sendo que, nossa concentração media foi de 31,14 mg/dL para cães saudáveis, não diferindo dos cães afetados que foram estudados. Esses autores ainda relataram um aumento da concentração dessa proteína em cães portadores de anemia hemolítica imunomediada de causa primária e secundária. Da mesma forma, nossos cães afetados com idade variando entre 2 a 3 meses, apresentaram concentração de 47,267 mg/dL. Nossos resultados corroboram com John e Purdom (1989), que

relataram o aumento da haptoglobina sérica em pacientes DMD, quando comparados a garotos normais.

Em nosso ensaio, os resultados para cães adultos normais, não corroboram com os dados relatados por Eckersall (2008) que evidencia teores séricos de haptoglobina entre 0,1 g/dL a 0,2 g/dL para caninos, eqüinos e suínos, podendo aumentar para 0,5 g/dL no decorrer de doenças inflamatórias e infecciosas (ECKERSALL, 2008).

A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda positiva no cão (JAIN, 1993). Jain (1989), refere valores normais para a ceruloplasmina entre 15-60 mg/dL e Pereira et al. (2010) relataram valor médio de 45,16 mg/dL. Esses dados corroboraram com nossos resultados que foram de 40,07 mg/dL para cães adultos saudáveis. Para os cães afetados a concentração foi aproximadamente 65,39 mg/dL, chegando a 71,66 mg/dL para os cães afetados com 2 a 3 meses de idade, que diferiram significativamente de todos os grupos estudados.

Sugere-se que as determinações de haptoglobina e ceruloplasmina oxidase possam auxiliar na avaliação da inflamação em cães. Estas proteínas são consideradas seis vezes mais sensíveis na detecção da inflamação do que a determinação de fibrinogênio, a contagem de leucócitos totais e a contagem de neutrófilos segmentados e bastonetes (SOLTER et al., 1991). Desta forma, de acordo com os nossos achados referentes às concentrações séricas de haptoglobina e ceruloplasmina, podemos inferir que as mesmas se comportam como proteínas de fase aguda positiva em cães afetados pela distrofia muscular, estando envolvidas no processo inflamatório devido à injúria tecidual.

A glicoproteína ácida é uma proteína de fase aguda positiva. É sabido que em humanos a farmacocinética, a eficácia e a toxicologia de drogas básicas é influenciada pela variação da glicoproteína ácida (MATSUSHIMA; WATANABE; HIGUCHI, 2000). Em estudos realizados por Ganrot (1973), nos quais avaliou-se a alfa-1-glicoproteína ácida em cães normais, observaram-se níveis séricos de 0,5 a 0,6 g/L e, ao se induzir o processo inflamatório, esta PFA apresentou rápido e significativo aumento, com vida média de aproximadamente 5,5 dias. À semelhança de Ganrot (1973), Dello et al. (1988) verificaram valores de $0,47 \pm 0,09$ g/L em cães normais e $2,85 \pm 0,51$ g/L em animais com doença inflamatória. Nossos dados para cães normais não corroboram com os resultados citados, já que nossa concentração média foi de

34,77 mg/dL para cães normais. Com relação aos animais afetados, os animais com idade de 2 a 3 meses, apresentaram concentração sérica aumentada em comparação com os animais normais de mesma idade ou adultos. Destarte, os animais adultos afetados pela distrofia apresentaram concentração sérica de glicoproteína sérica reduzidos.

Kurabayashi et al. (2003), avaliaram os níveis séricos da glicoproteína ácida, em cães da raça Beagle saudáveis, machos e fêmeas em idades variando de 3 a 72 meses de idade. Adicionalmente, avaliaram as concentrações séricas desta proteína em fêmeas prenhe com diferentes estágios gestacionais. Em seu trabalho não observaram alterações relacionadas com o sexo ou a idade, da mesma forma, nosso estudo não mostrou alteração relacionada com a idade, com exceção do sangue do cordão umbilical. Os valores encontrados para os autores supracitados variaram de 4,00 mg/dL a 83,30 mg/dL, enquanto que em nosso estudo os teores séricos variaram, para os animais normais com mais de 2 meses de idade, de 19,27 mg/dL a 41,890 mg/dL. Para o sangue de cordão umbilical, Kurabayashi et al. (2003), relataram a presença de glicoproteína ácida em teor inferior a 4,00 mg/dL, corroborando com nossos resultados, onde encontramos valores séricos médios em sangue de cordão umbilical de 3,29 mg/dL para cães normais e 4,12 mg/dL para afetados. Nas fêmeas prenhes estudadas pelos autores supracitados, podemos observar que os níveis séricos da glicoproteína ácida aumentaram (média de 63,40 mg/dL) no meio da gestação, provavelmente relacionado com alterações hormonais.

Itoh et al. (1993) relataram respectivamente, que a concentração da glicoproteína ácida é alta em neonatos e decresce com o crescimento em bovino e porco. Yuki, Itoh e Takage (2010), em um estudo para avaliar a concentração sérica de cães filhotes e adultos clinicamente saudáveis, evidenciaram que cães neonatos apresentam em torno de 30 % da glicoproteína de um cão adulto. Em nosso trabalho, com exceção do sangue do cordão umbilical, que foi aproximadamente 10 % da concentração média dos cães adultos normais, não houve diferença significativa quando comparados animais jovens e adultos normais. Nossos dados corroboram com Hayashi et al. (2001) que evidenciaram que cães saudáveis com 3 meses de idade não apresentaram concentrações séricas superiores quando comparados com animais adultos. Entretanto, considerando os animais afetados do nosso estudo,

esse fato não foi observado. Os autores ainda relatam que os cães sem raça definida (SRD), que tem acesso à rua, apresentam concentração diferenciada quando comparado a cães da raça Beagle que vivem domiciliados, sendo de 36,40 mg/dL e 28,60 mg/dL. Os autores sugerem que as alterações encontradas, podem estar relacionadas com o fato de os cães SRD não serem domiciliados. Comparando com nossos dados, os cães da raça Golden Retriever normais avaliados apresentaram concentração sérica superior, sendo de 38,52 mg/dL.

Como relatado anteriormente, em nosso estudo, os animais com idade entre 2 e 3 meses, afetados pela distrofia, apresentaram concentrações séricas da glicoproteína ácida acima dos valores encontrados para os animais normais, evidenciando que o quadro progressivo da distrofia, altera a concentração sérica desta proteína. Por ser considerado uma importante marcador inflamatório, e desempenhar uma importante função na reparação tecidual causada pela inflamação (FOURNIER; MEDJOUBI; PORQUET, 2000), é uma proteína importante de ser avaliada em animais afetados pela distrofia, já que com a ausência de distrofina na membrana sarcoplasmática, o músculo fica mais susceptível á lesões, resultando em ativação de protease endógena e ativação da cascata inflamatória.

A alfa-1-antitripsina tem como principal função, inibir principalmente a elastase neutrofílica, impedindo a ocorrência de dano tecidual (DEMEO; SILVERMAN, 2004; STOLLER; ABOUSSOUAN, 2005). Em nosso trabalho esta proteína apresentou-se aumentada em animais afetados com idade variando entre 2 e 3 meses e adultos. A alfa-1-antitripsina aumenta logo após infecção ou inflamação (CARAPETO et al., 2006), informação esta que não corrobora com nossos resultados, já que foi evidenciado aumento desta proteína em animais afetados adultos, ou seja, o processo inflamatório não está mais acontecendo de forma aguda, apesar da doença ser progressiva.

As proteínas séricas alfa-1-antitripsina e glicoproteína ácida, são induzidas principalmente pela interleucina 1 (IL-1) e caracterizam-se por elevarem-se precocemente após a infecção ou lesão tecidual, normalizando rapidamente após o término do estímulo. Por sua vez, a ceruloplasmina e a haptoglobina, são induzidas pela IL-6, elevando-se mais tardiamente e, segundo Murata, Shimada e Yoshioka (2004) e Cerón, Eckersall e Martínez-Subiela (2005), assim permanecem por várias semanas.

A proteína C reativa, tem sido amplamente estudada em cães, associada a diversos processos inflamatórios e patológicos (GALEZOWSKI et al., 2010; LJUNGVALL et al., 2010). De acordo com Martinez-Subiela, Ginel e Ceron (2004), as concentrações séricas desta proteína variou de 0,22 a 4,04 mg/L e de em torno de 8,4 mg/L para Otabe et al. (1998). Pereira et al. (2010) relataram concentração média para cães normais de 25,52 mg/dL, corroborando com os nossos resultados que foi de 25,39 para cães normais. Destarte, para os afetados com 2 a 3 meses de idade a concentração sérica desta proteína apresentou-se significativamente elevada quando comparados aos cães normais da mesma idade e adultos, sendo de 34,87 mg/dL, 22,15 mg/dL e 25,39 mg/dL respectivamente. Adicionalmente, é importante ressaltar que já no SCU ocorreu alteração significativa entre a concentração da proteína C-reativa entre os animais afetados e normais, podendo inferir que esta proteína esteja relacionada com a doença antes mesmo do nascimento.

Como postulado por Jain (1993), a transferrina se liga ao ferro para transportá-lo aos tecidos, de forma que elevadas concentrações podem estar relacionadas com deficiência de ferro. São proteínas de fase aguda negativas, e em nosso estudo, diferiram apenas no SCU, sendo que a concentração sérica da transferrina foi significativamente menor no SCU dos animais afetados. Cães adultos normais evidenciaram concentração sérica média de 83,84 mg/dL, discordando frontalmente de Pereira et al. (2010), que relataram concentração sérica média de cães adultos normais de 51,60 mg/dL. Em nosso estudo a concentração sérica desta proteína não variou com a idade. Eckersall (2008) relata redução da concentração sérica da transferrina em doenças de armazenamento de ferro, enquanto que Jain (1993), relata reduções em processos infecciosos agudas e crônicas, doenças hepáticas e leucemias. Podemos inferir que SCU de neonatos afetados pode sofrer alguma interferência com relação ao transporte de ferro para os tecidos, porém, são necessários mais estudos para elucidar o que realmente ocorre.

Outras proteínas que evidenciaram correlação com a faixa etária estudada e não sofreram alteração pelo processo progressivo da distrofia, são a hemopexina e a albumina.

Em nosso estudo, foram evidenciados valores séricos médios de hemopexina de 131,18 mg/dL em cães adultos normais, corroborando com os achados de

Pereira et al. (2010), que relataram teor médio de 127,60 mg/dL em cães saudáveis. A hemopexina é sintetizada no fígado em resposta à ação de citocinas inflamatórias de origem leucocitária (GRUYS; OBWOLO; TOUSAINT, 1994).

A albumina é uma proteína de fase aguda negativa em cães. Em nosso estudo, a albumina não se mostrou significativamente alterada com a distrofia, independente da idade. Como postulado por Bush (2004), a concentração sérica da albumina, em animais saudáveis, varia de 2,5 a 4 g/dL, corroborando com os nossos achados, visto que para todos os animais estudados, com exceção do SCU, já discutido anteriormente, a concentração sérica variou de 3.129,19 mg/dL a 3.998,98 mg/dL. Em humanos, há relatos sobre os efeitos de varias doenças e distúrbios nutricionais na produção das proteínas de fase aguda negativas. Recentemente foi proposto a hipótese de que a resposta de fase aguda tem um efeito mais forte do que a nutrição na regulação da concentração de albumina e transferrina dentre outras PFAs negativas (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005)

De acordo com Moore, Mahaffey e Hoenig (1992), a concentração sérica da albumina aumentou discretamente após a administração de glicocorticóides. As PFAs possuem a habilidade de se ligarem a agentes farmacológicos e tem sido relatado que a disposição, distribuição e cinética dos fármacos no organismo animal, são significativamente alteradas durante a fase aguda do processo inflamatório (IKENOUE et al., 2000).

A via através da qual os anticorpos maternos alcançam o feto é determinada pela estrutura da placenta. Nos humanos e em outros primatas, a placenta é hemocorial, ou seja, o sangue materno fica em contato direto com o trofoblasto. Esse tipo de placenta permite que a IgG materna, mas não a IgM, IgA ou a IgE, seja transferida para o feto. Assim, nessas espécies, a IgG materna entra na corrente sanguínea fetal e o recém nascido humanos pode apresentar níveis circulantes de IgG comparáveis aos da sua mãe. Destarte, cães e gatos possuem uma placenta endoteliocorial, na qual o epitélio coriônico fica em contato com o endotélio dos capilares maternos. Nessas espécies, 5% a 10% da IgG pode se transferir da mãe para os filhotes. Ademais, animais com a placenta sindesmocorial, como os ruminantes, onde o epitélio coriônico fica em contato direto com os tecidos uterinos e animais com a placenta epiteliocorial, como os eqüinos e suínos, onde o epitélio coriônico fetal fica em contato com o epitélio uterino intacto, ocorre o bloqueio total

da passagem transplacentária das moléculas de imunoglobulinas (AMBRÓSIO et al., 2002; TIZARD, 2008).

Em cães, os valores de referencia para a concentração sérica de imunoglobulinas IgG, situa-se entre 1 e 2 g/dL (TAKEDA; AKIRA, 2005). Em nosso estudo evidenciamos, para cães com idade entre 2 e 3 meses e adultos normais, 1226,20 mg/dL e 1698,59 mg/dL respectivamente, corroborando com os valores citados pelos autores. Destarte, para animais com idade entre 2 e 3 meses de idade e adultos afetados, os valores médios situaram entre 978,036 mg/dL e 2.102,21, respectivamente. Considerando o SCU, a concentração sérica foi significativamente menor, sendo a soma da IgG de cadeia pesada e leve igual a 21,78 mg/dL e 15,13 mg/dL para animais normais e afetados respectivamente. De acordo com Godoy et al. (2007), a concentração sérica de total das gamaglobulinas em SCU de animais normais por volta de 30 mg/dL.

A passagem transplacentária ocorre devido a placentação endotélicorial dos cães, na qual o endotélio coriônico fica em contato com o endotélio materno (AMBROSIO et al., 2002; TIZARD, 2008; CHUCRI et al., 2010). Assim, os anticorpos maternos são ativamente transportados pela placenta para o feto e através do epitélio intestinal dos neonatos. Os mamíferos neonatos apresentam sistema imune com desenvolvimento incompleto, e não são capazes de preparar respostas imunes adequadas contra diversos microorganismos. A IgG de cadeia leve é também conhecida como IgG colostral, sendo transferida através da imunidade passiva pelo aleitamento materno (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2008). Assim esta imunoglobulina apresenta-se aumentada somente em animais jovens, sugerindo sua concentração basal em outras faixas etárias (RADOSTITS; LESLIE; FTROW, 1994). Esta informação corrobora com nossos achados, onde os cães com idade variando entre 2 a 3 meses, afetados e normais, apresentaram concentração sérica estatisticamente superior aos animais adultos. Entretanto, observamos em nosso estudo que a concentração desta imunoglobulina foi significativamente inferior nos animais afetados. Assim, podemos inferir que a absorção intestinal dessa imunoglobulina possa ser diferenciada nos cães afetados, proporcionando uma redução no teor sérico da mesma. Para confirmarmos tal hipótese, se faz necessário a realização de mais estudos relacionados com as resposta imunológica e absorção de nutrientes dos mesmos.

A imunoglobulina IgG de cadeia pesada, foi encontrada em maior concentração nos animais adultos, entretanto os cães afetados apresentaram medias significativamente maiores do que os cães normais. A IgG é a imunoglobulina predominante no soro sendo em grande parte, responsável pela defesa sistêmica. Sua síntese e secreção ocorre por plasmócitos localizados no baço, nos linfonodos e na medula óssea (TIZARD, 2008). O aumento da produção de globulinas é observado em doenças inflamatórias e neoplasicas (ECKERSALL, 2008).

Destarte, a concentração da imunoglobulina IgA evidenciou alterações com a idade, sendo que cães com idade entre 2 e 3 meses apresentaram concentração sérica significativamente menor quando comparado aos cães adultos. Entretanto, apesar das diferenças significativas encontradas em nosso estudo, todos os grupos dos animais com mais de 2 meses de idade, apresentaram concentração média dentro dos valores de referencia, sendo que Takeda e Akira (2005) relatam valores de normalidade para cães entre 20 e 150 mg/dL e os nossos valores médios variaram de 20,15 mg/dL a 37,61 mg/dL. A IgA é produzida nos tecidos linfóides mucosos e é ativamente transportado através dos epitélios, ligando-se a ele e neutralizando os microorganismo que entram pelos órgãos mucosos (ABBAS; LITCHMAN; PILLAI, 2008). Com base nos resultados encontrados, podemos inferir que como os animais adultos possuem um sistema imune maduro e já foram expostos a um maior número de patógenos, apresentam consequentemente, uma maior concentração desta imunoglobulina.

De acordo com Eckersall (2008), aumento de imunoglobulinas séricas podem ocorrer em processos infecciosos, doença hepática, tumores linfóides, deficiências imunológicas, além de redução em fetos e recém nascidos antes da ingestão do colostro, corroborando com os nossos achados para o sangue do cordão umbilical.

As proteínas desconhecidas, com pesos moleculares de 230.000 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, 30.000 Da e 16.000 Da, não diferiram entre os grupos de animais com idade variando entre 2 a 3 meses e adultos estudados, sem evidenciarem alterações relacionadas com a distrofia. Como já citado, as concentrações no SCU foram significativamente reduzidas, porém sem distinção com relação à doença. Com relação à proteína sérica de peso molecular 260.000 Da foi significativamente maior nos animais com idade variando entre 2 a 3 meses, e a proteína de peso

molecular 28.000 Da significativamente maior nos grupos de animais adultos, independentemente se afetados ou não, mostrando que as mesmas estão relacionadas com a idade dos animais. Já a proteína sérica não identificada com peso molecular de 158.000 Da, apresentaram-se alteradas nos grupos de animais afetados mostrando estarem relacionadas com a fisiopatogenia da distrofia.

Considerando as alterações encontradas com relação às PFAs, evidenciando as respostas de fase aguda frente às lesões musculares que ocorrem progressivamente em cães distróficos, principalmente em animais distróficos jovens, podemos inferir que os mesmos apresentaram alterações protéicas perante a injúria tecidual como é relatado em vários processos inflamatórios relacionados com outras patologias. Da mesma forma que, os animais afetados pela distrofia, possuem alterações imunoglobulínicas quando comparados a animais normais, mostrando que diferem quanto à resposta imunológica frente a estímulos de patógenos.

A frequência de linfócitos e subpopulação linfocitárias são cruciais para a manutenção do sistema imune. Normalmente infecções virais, doenças imunodeficientes e outras doenças infecciosas determinam mudanças anormais nos níveis de linfócitos (DUNNE et al., 2002; CUI et al., 2003; VEAZEY et al., 2003). Adicionalmente, o processo inflamatório também altera populações celulares que atuam no sistema imune, mediante a ativação e a migração direcionada de muitas células diferentes, principalmente neutrófilos e macrófagos, da corrente sanguínea para os locais lesionados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2010; AHMAD et al., 2010; ICHIM et al., 2010).

Muitos estudos vêm sendo realizados correlacionando as subpopulações linfocitárias com várias patologias (PALTRINIERI et al., 2003; WEBB et al., 2008a; WEBB, LEHMAN; MCCORD, 2008; ZHU; PAUL, 2008; BLUESTONE et al., 2009; KABEYA et al., 2009; RECHE et al., 2010). De fato, linfócitos T CD4⁺ possuem uma função central na proteção imune. Em humanos e camundongos, várias subpopulações de linfócitos CD4⁺ - Th e CD4⁺ - Treg tem sido descritas e fornecem suporte para a resposta imune (MARINARO et al., 2010).

Nas formas mais severas, como a DMD, a proliferação e ativação das células que atuam na inflamação é acentuada, porém o pool das células responsáveis pela

regeneração é logo exaurido e o músculo esquelético lesado é progressivamente substituído por gordura e tecido fibroso (EMERY, 2002).

Em nosso estudo, os animais adultos afetados pela distrofia muscular apresentaram porcentagens linfocitárias de CD4⁺ e CD5⁺ significativamente maiores quando comparados aos animais normais, sendo que a razão CD4:CD8 foi menor para os cães normais.

O anticorpo CD4 se expressa nas células T restritas pelo MHC classe II, monócitos e macrófagos. Já os anticorpos CD5, são expressos nos linfócitos T e linfócitos B, enquanto que os anticorpos CD8, só marcam os linfócitos T restritos pelo MHC classe I (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Desta forma, podemos inferir que o aumento da população CD5⁺ possa ocorrer como consequência do aumento da subpopulação CD4⁺.

Através da técnica de citometria de fluxo, Byrne et al. (2000) avaliou os valores médios mediante o uso de marcadores de superfície celular CD5, CD3, CD4, CD8, MHC II e linfócitos B, destas populações celulares em cães e gatos saudáveis. Para cães, relataram porcentagem de CD5 canino 83,3%, CD4 canino 45,0%, CD8 canino 28,8%, MHC II canino 98,0%, linfócito B canino 12,9% e CD4/CD8 canino 1,87. Nosso estudo evidenciou, para cães normais, valores médios de CD5 51,53 %, CD4 25,90 % e CD8 15,07%, todos abaixo dos valores citados por Byrne et al. (2000), entretanto a proporção CD4/CD8 foi de 1,71, corroborando com os autores. A proporção CD4/CD8 também corroborou com os dados de Rivas et al. (1995), que relatam proporção de 1,7. Adicionalmente, para os valores de CD4⁺ e CD8⁺ em cães normais, evidenciaram valores acima dos nossos, sendo de 27 a 33% e 17 a 18 % respectivamente.

De acordo com Greeley et al. (1996), cães senis apresentam uma menor porcentagem de CD4⁺ quando comparados com cães jovens, relatando valores de 30,9% e 45,1% respectivamente. A redução na porcentagem de CD8 também aumenta a média na taxa de CD4:CD8 de 3,17 para cães jovens e 2,21 para cães adultos. Em comparação, com relação à taxa do grupo de cães sem raça definida, a proporção CD4/CD8 foi de 1,74, corroborando com nossos resultados em cães da raça Golden Retriever.

Pinto-Mariz et al. (2010), avaliaram as subpopulações linfocitárias $CD3^+CD4^+$ e $CD3^+CD8^+$ presentes no sangue de pacientes DMD e humanos normais, observando que as duas subpopulações apresentaram-se significativamente aumentadas nos paciente DMD, corroborando com nossos resultados em relação à subpopulação $CD4^+$, mostrando que a migração dos linfócitos T para os tecidos, contribuem para os danos teciduais e fibroses nestes pacientes.

Adbel-Salam, Abdel-Meguid e Korraa (2009), avaliaram os marcadores envolvidos com a degeneração e regeneração no sangue de DMD, e observaram que uma dos fatores avaliados (FasL mRNA) encontra-se expresso nos linfócitos circulantes, e estas substâncias foram encontradas significativamente aumentadas em pacientes DMD quando comparados aos humanos normais, consequente do aumento de linfócitos.

De acordo com Jakubzick et al. (2004), a subpopulação Th2, citocinas IL-4 e IL-3, são potentes fatores fibrogenicos, sendo que a subpopulação linfocitária Th, pode estar envolvida nos estágios tardios do DMD, em que a fibrose é destaque . Adicionalmente, linfócitos T reguladores incluem células que produzem ativamente TGF-beta, outra molécula com ação fibrótica, que é também conhecida por limitar o recrutamento de células precursoras miogênicas, podendo dificultar a reparação do dano muscular (FILVAROFF; EBNER; DERYNCK, 1994). A subpopulação de células T $CD4^+$ que produzem IL-17 (Th17) também estão envolvidas em lesões musculares (HARRINGTON; MANGAN; WEAVER, 2006).

Os linfócitos B podem reconhecer a maioria dos antígenos sem que estes sejam previamente processados. Porém, a resposta dos linfócitos B geralmente requer a estimulação destas células por linfócitos Th ($CD4^+$), mediante uma coestimulação, onde os linfócitos B podem se tornar células de memória ou plasmócitos secretores de anticorpos (TIZARD 2008). Desta forma, é provável que o aumento da subpopulação linfocitária $CD4^+$ encontrado nos animais afetados tenha correlação com o aumento da concentração das imunoglobulinas de cadeia pesada (IgG) evidenciada nos mesmos animais.

Adicionalmente, estudo recente mostrou que o tratamento com L-arginina, decresce a expressão de sinais estimulantes da inflamação, tais como citocinas proinflamatórias IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral, aumentando a regeneração muscular em ratos mdx (HNIA et al., 2007). Sabe-se que as proteínas de fase

aguda, sob a influencia de IL-1 e do fator de necrose tumoral, tem sua síntese aumentada pelas células hepáticas. Nossos achados reforçam essa informação, evidenciando o aumento das PFAs no modelo estudado.

Desta forma, podemos inferir que o processo progressivo da distrofia está relacionado com alterações nas populações celulares que compõe o sistema imune dos pacientes, pois, devido à ausência de distrofina o músculo fica mais susceptível a lesões, sendo que na sua ocorrência, há liberação de citocinas que estimulam as células hepáticas a secretarem as proteínas de fase aguda e a promoverem uma co-estimulação de linfócitos T. Assim, podemos sugerir que os resultados encontrados em nosso trabalho são conseqüências da resposta inflamatória gerada pela lesão muscular no GRMD.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que:

- Foi constatada a presença de basinofilia em cães adultos afetados pela distrofia.
- Cães afetados pela distrofia podem apresentar leucocitose neutrofílica sem desvio a esquerda.
- A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença de 22 proteínas séricas em cães da raça Golden Retriever normais e afetados pela distrofia, com mais de 2 meses de idade.
- A eletroforese em gel de poliacrilamida revelou a presença de 23 proteínas séricas em sangue de cordão umbilical de cães da raça Golden Retriever normais e afetados pela distrofia.
- O sangue de cordão umbilical de cães afetados e normais, apresentou uma proteína sérica de peso molecular 91.000 Da, que não foi evidenciada em animais com mais de 2 meses de idade.
- Sangue de cordão umbilical de cães afetados e normais apresentou baixa concentração de proteínas séricas.
- As alterações seroproteicas das proteínas não identificadas de pesos moleculares 260.000 Da, 230.000 Da, 180.000 Da, 165.000 Da, IgA, 91.000 Da, hemopexina, albumina, 30.000 Da, 28.000 Da e 16.000 Da, mostraram estar correlacionadas com a idade.
- As alterações seroproteicas da proteína não identificada de peso molecular 158.000, proteína C reativa, ceruloplasmina, fosforilase, transferrina, alfa-1-antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida, mostraram estar correlacionadas com a distrofia.

- As proteínas IgG de cadeia pesada, IgG de cadeia leve e a proteína não identificada de peso molecular 35.000 Da mostraram estar relacionadas com a distrofia e com a idade.
- A concentração sérica da fosforilase apresentou-se aumentada nos cães afetados com idade entre 2 e 3 meses.
- As proteínas de fase aguda haptoglobina e glicoproteína ácida apresentaram-se aumentadas em todos os animais afetados com idade entre 2 e 3 meses.
- As proteínas ceruloplasmina, proteína-C reativa e alfa-1-antitripsina foram evidenciadas em maior concentração nos grupos dos animais afetados adultos e com 2 a 3 meses de idade.
- Cães adultos distróficos apresentaram concentração reduzida de glicoproteína ácida.
- SCU de cães afetados apresentaram concentração reduzida de transferrina quando comparado ao SCU de cães normais.
- Cães com idade entre 2 a 3 meses, apresentaram maior concentração de imunoglobulina IgG de cadeia leve quando comparados à cães adultos.
- A concentração sérica da imunoglobulina IgG de cadeia leve apresentou-se reduzida em cães afetados com idade entre 2 e 3 meses, quando comparados a cães normais com a mesma idade.
- Cães adultos apresentaram maiores concentrações de IgG de cadeia pesada.
- Cães adultos afetados apresentaram maior concentração sérica da imunoglobulina IgG de cadeia pesada quando comparado à cães adultos normais.
- Cães jovens apresentaram menor concentração sérica da imunoglobulina IgA quando comparados à cães adultos.

- A proteína sérica de peso molecular 260.000 Da encontrou-se em maior concentração nos cães com idade variando entre 2 a 3 meses.
- Os animais adultos apresentaram concentração sérica da proteína de peso molecular 28.000 Da aumentada quando comparada aos animais jovens;
- A proteína sérica não identificadas com peso molecular de 158.000 Da, apresentou-se em menor concentração nos grupos de animais afetados quando comparados aos normais, independente da idade.
- Com exceção da concentração sérica da glicoproteína ácida em cães afetados adultos, as outras proteínas de fase aguda positivas apresentaram-se aumentadas em cães afetados, em pelo menos uma das idades estudadas.
- Cães afetados apresentaram maiores porcentagens de linfócito T $CD4^+$ e $CD5^+$.

REFERENCIAS

AANDAH, E. M.; MICHAELSSON, J.; MORETTO, W. J.; HECHT, F. M.; NIXON, D. F. Human CD4+CD25+regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. **Journal Virology**, v. 78, n. 5, p. 2454–2459, 2004.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 207-234.

ACKLEY, C. D.; YAMAMOTO, J. K.; LEVY, N.; PEDERSEN, N. C.; COOPER, M. D. Immunologic abnormalities in pathogen-free cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Journal Virology**, v. 64, p. 5652-5655, 1990.

ADBEL-SALAM, E.; ADBEL-MEGUID, I.; KORRAA, S. S. Markers of degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Acta Myologica**, v. 28, n. 3, p. 94-100, 2009.

AHMAD, N.; BYGRAVE, M.; DE ZORDO, T.; FENSTER, A.; LEE, T. Y. Detecting degenerative changes in myotonic murine models of Duchenne muscular dystrophy using high-frequency ultrasound. **Journal Ultrasound Medicine**, v. 29, n. 3, p. 367-375, 2010.

AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P.; MARTINS, D. S.; ARAUJO, K. P.; ZUCCONI, E.; BROPLIO, M. P.; GIGLIO, R. F.; MORINI, A. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R.; FEITOSA, M. L.; VALADARES, M. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C.; MEIRELLES, F. V.; MIGLINO, M. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389-396, 2009.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A. Morfofisiologia da placenta canina, *Canis familiaris*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 164-167, 2001.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; BONATELLI, M.; SILVA, W. M. Estudo anatômico das artérias e veias do funículo umbilical, sua ramificação e disposição na placenta de gatos (*Felis catus*, Linnaeus, 1758). **Brazilian Journal of Research and Animal Science**, v. 37, n. 5, p. 372-376, 2000.

AMBRÓSIO, C. E.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, A.; MARTINS, J. F. P.; OLIVEIRA, M. F.; MARTINS, D. S.; FERREIRA, G. J. B. C. Estrutura funicular, vascularização e morfologia placentária em cães e gatos (*Canis familiaris* e *Felis catus* Linnaeus, 1758). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, São Paulo, v. 26, n. 2, p. 99-101, 2002.

AMBROSIO, C.; VALADARES, M.; ZUCCONI, E.; CABRAL, R.; PEARSON, P.; GAIAD, T.; CANOVAS, M.; VAINZOF, M.; MIGLINO, M.; ZATZ, M.; RINGO, A. Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. **Neuromuscular Disorders**, v. 18, p. 892-893, 2008.

ANDERSSON, J.; BOASSO, A.; NILSSON, J.; ZHANG, R.; SHIRE, N. J.; LINDBACK, S.; SHEARER, G. M.; CHOUGNET, C. A. The prevalence of

regulatory T cells in lymphoid tissue is correlated with viral load in HIV-infected patients. **Journal Immunology**, v.174 n. 6, p. 3143–3147, 2005.

APOIL, P. A.; PUISSANT, B.; ROUBINET, F.; ABBAL, M.; MASSIP, P.; BLANCHER, A. FOXP3mRNA levels are decreased in peripheral blood CD4+ lymphocytes from HIV-positive patients. **Journal Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v. 39, n. 4, p. 381-385, 2005.

ARAÚJO, M.S.; DE ANDRADE, R. A.; VIANNA, L. R.; MAYRINK, W.; REIS, A. B.; SATHLER-AVELAR, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ANDRADE, M. C.; MELLO, M. N.; MARTINS-FILHO, O. A. Despite Leishvaccine and Leishmune trigger distinct immune profiles, their ability to activate phagocytes and CD8+ T-cells support their high-quality immunogenic potencial against canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 26, n. 18, p. 2211-2224, 2008.

ARNOLD, L.; HENRY, A.; PORON, F.; BABA-AMER, Y.; VAN ROOIJEN, N.; PLONQUER, A.; GHERARDI, R. K.; CHAZAUD, B. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. **Journal Experimental Medicine**, v. 204, p. 1057-1069, 2007.

ARTEAGA, A.; DHAND, N. K.; MCCANN, T.; KNOTTENBELT, C. M.; TEBB, A. J.; EVANS, H.; ECKERSALL, P. D.; RAMSEY, I. K. Monitoring the response of canine hyperadrenocorticism to trilostane treatment by assessment of acute phase protein concentrations. **Journal Small Animal Practice**, v. 51, n. 4, p. 204-209, 2010.

BAROHN, R. J.; Levine EJ, Olson JO, Mendell JR. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 15-18, 1988.

BARSANTI, J. A.; KRISTENSEN, F.; DRUMHELLER, F. B. Analysis of serum proteins, using agarose electrophoresis in normal dogs and in dogs infected with *Dirofilaria immitis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 7, p.1055-1058, 1977.

BARTLETT, R. J.; SECORE, S. L.; SINGER, J. T.; BODO, M.; SHARMA, K.; RICORDI, C. Long-term expression of a fluorescent reporter gene via direct injection of plasmid vector into mouse skeletal muscle: comparison of human creatine kinase and CMV promoter expression levels in vivo. **Cell Transplantation**, v. 5, n. 3, p. 411-419, 1996.

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

BEENAKKER, E. A. C.; FOCK, J. M.; VAN TOL, M. J.; MAURITS, N. M.; KOOPMAN, H. M.; BROUWER, O. F.; VAN DER HOEVEN, J. H. Intermittent Prednisone Therapy in Duchenne Muscular Dystrophy. **Archivies Neuronal**, v. 62, p. 128-132, 2005.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a

- Labrador Retriever. **Journal American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.
- BIGGAR, W. D.; KLAMUT, H. J.; DEMACIO, P. C.; STEVENS, D. J.; RAY, P. N. Duchenne Muscular Dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 401, p. 88-106, 2002.
- BLUESTONE, J. A.; MACKAY, C. R.; O'SHEA, J. J.; STOCKINGER, B. The functional plasticity of T cell subsets. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 11, p. 811-816, 2009.
- BOSTICK, B.; YUE Y, LAI Y, LONG C, LI D, DUAN D. Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. **Human Gene Therapy**, v. 19, n. 8, p. 851-856, 2008.
- BRAZEAU, G. A.; MATHEW M, ENTRIKIN RK. Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. **Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, v. 77, n. 2, p. 179-189, 1992.
- BRUNELLI, S.; ROVERE-QUERINI, P. The immune system and the repair of skeletal muscle. **Pharmacological Research**, v. 58, p. 117-121, 2008.
- BRYANT, B. J.; SHIFRINE, M. Histogenesis of lymph nodes during development of the dog. **Journal Reticuloendothel**, v. 12, p. 96-107, 1972.
- BUCCI, J. B.; GEBHARD, D. H.; CHILDERS, T. A.; ENGLISH, R. V.; TOMPKINS, W. A. F. The CD8⁺ cell phenotype mediating antiviral activity in feline immunodeficiency virus-infected cats is characterized by reduced surface expression of the CD8 α chain. **Journal Infectious Disease**, v. 178, p. 968-977, 1998.
- BÚRIGO, T.; FAGUNDES, E. L. M.; TRINDADE, E. B. S.; VASCONCELOS, H. C. F. F.; MASSAUT, I. H. B.; ROTOLO, M. A. S. Ação da prebiótico sobre as proteínas de fase aguda de pacientes com neoplasia hematológica. **Revista Brasileira de Hematologia. Hemoter**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 2007.
- BUSH, B. M. **Interpretação de resultados laboratoriais para clínico de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004. p. 368-372.
- BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167-182, 2000.
- CALL, J. A.; VOELKER, K. A.; WOLFF, A. V.; MCMILLAN, R. P.; EVANS, N. P.; HULVER, M. W.; TALMADGE, R. J.; GRANGE, R. W. Endurance capacity in maturing mdx mice is markedly enhanced by combined voluntary wheel running and green tea extract. **Journal Applied Physiology**, v. 105, n. 3, p. 923-932, 2008.

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

CAROMANO, F. A. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (DMD)- **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 3, p. 211-218, 1999.

CASWELL, J. L.; YAGER, J. A.; PARKER, W. M.; MOORE, P. F. A prospective study of the immunophenotype and temporal changes in the histologic lesions of canine demodicosis. **Veterinary Pathology**, v. 34, p. 279-287, 1997.

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.

CHAZAUD, B.; SONNET, C.; LAFUSTE, P.; BASSEZ, G.; RIMANIOL, A. C.; PORON, F.; AUTHIER, F. J.; DREYFUS, P. A.; GHERARDI, R. K. Satellite cells attract monocytes and use macrophages as a support to escape apoptosis and enhance muscle growth. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, p. 1133-1143, 2003.

CHILDERS M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; PETROSKI, G. F.; MCDONALD, K.; KORNEGAY, J. N. Eccentric contractin injury in dystrophic canine muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 83, p. 1572-1578, 2002.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA, C. S.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY, J. N. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 80, p. 175-181, 2001.

CHUCRI, T. M.; MONTEIRO, J. M.; LIMA, A. R.; LIMA, M. L. B.; SALVADORI, J. R.; KFOURY JUNIOR, J. R.; MIGLINO, M. A. A review of immune transfer by the placenta. **Journal of Reproductive Immunology**, 2010. [Epub ahead of print].

COBBOLD, S.; METCALFE, S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of humam CD antigens: summary of First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 43, n. 3, p. 137-154, 1994.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165-172, 2003.

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.

COOPER, B. J.; WINAND N. J.; STEDMAN, H.; VALENTINE, B. A.; HOFFMAN, E. P.; KUNKEL, L. M.; SCOTT, M. O.; FISCHBECK, K. H.; KORNEGAY, J. N.; AVERY, R. The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.

CUI, W.; FAN, Y.; WU, W.; WANG, J.; NI, A. Expression of lymphocytes and lymphocyte subsets in patients with severe acute respiratory syndrome. **Clinical Infectious Disease**, v. 37, p. 857-859, 2003.

DELLO, C. P.; BELPAIRE, F. M.; DE RICK, A.; FRAEYMAN, N. H. Influence of inflammation on serum concentration molecular heterogeneity and drug binding properties of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Journal of Veterinary Pharmacology. Therapy**, v. 11, p. 71-76, 1988.

DEMEO, D. L.; SILVERMAN, E. K. Alpha-1-antitrypsin deficiency. 2: genetic aspects of alpha(1)-antitrypsin deficiency: phenotypes and genetic modifiers of emphysema risk. **Thorax**, v. 59, n. 3, p. 259-264, 2004.

DUNNE, P. J.; FAINT, J. M.; GUDGEON, N. H.; FLETCHER, J. M.; SOARES, M. V.; HISLOP, A. D.; ANNELS, N. E.; RICKINSON, A. B.; SALMON, M.; AKBAR, A. N. Epstein-Barr virus specific CD8+ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. **Blood**, v. 100, p. 933-940, 2002.

EBERSOLLE, J.; CAPPELLI, D. Acute phase reactants in infectious and inflammatory diseases. **Periodontology**, v. 23, p. 19-49, 2000.

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.

ECKERSALL, P. D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v.151, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P. D.; DUTHIE, S.; TOUSSAINT, M.J.; Gruys E, Heegaard P, Alava M, Lipperheide C, Madec F. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. **Advanced Veterinary Medicine**, v. 41, p. 643-655, 1999.

EMERY, A. E. The muscular dystrophies. **Lancet**, v. 359, p. 687-695, 2002.

ENGVAL, E. Perspective on the historical note on EIA/ELISA by Dr. R. M. Lequin. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 2225, 2005.

ESTRELA-LIMA, A.; ARAUJO, M. S. S.; COSTA-NETO, J. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; BARROUIN-MELO, S. M.; CARDOSO, S. V.; MARTINS-FILHO, O. A.; SERAKIDES, R.; CASSALI, D. G. Immunophenotypic features of tumor infiltrating lymphocytes from mammary carcinomas in female dogs associated with prognostic factors and survival rates. **BiomedCentral**, v. 10, p. 256-270, 2010.

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.; RIZOLLI, F. W.; SILVA, S. L.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 450-453, 2006.

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

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

FALDYNA, M.; SINKORA, J.; KNOTIGOVA, P.; REHAKOVA, Z.; MORAVKOVA, A.; TOMAN, M. Flow cytometric analysis of bone marrow leukocytes in neonatal dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 95, n. 3-4, p.165-176, 2003.

FARINI, A.; MEREGALLI, M.; BELICCHI, M.; BATTISTELLI, M.; PAROLINI, D.; D'ANTONA, G.; GAVINA, M.; OTTOBONI, L.; CONSTANTIN, G.; BOTTINELLI, R.; TORRENTE, Y. T and B lymphocyte depletion has a marked effect on the fibrosis of dystrophic skeletal muscles in the scid/mdx mouse. **Journal of Pathology**, v. 213, p. 229-238, 2007.

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

FILVAROFF, E. H.; EBNER, R.; DERYNCK, R. Inhibition of myogenic differentiation in myoblasts expressing a truncated type II TGF-beta receptor. **Development**, v. 120, p. 1085-1095, 1994.

FLOGIA M. V.; PAGANO, A.; GUGLIELMINO, R.; GRADONI, L.; RESTUCCI, B.; OLIVA, G. Extranodal gammadelta-T-cell lymphoma in a dog with leishmaniasis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 3, p. 298-301, 2008.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v. 4, p. 330-336, 2003.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. M.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G.; RUDENSKY, A. Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. **Immunity**, v. 22, p. 329-341, 2005.

FOURNIER, T.; NAJET MEDJOUBI, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein: review. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1482, p. 157-171, 2000.

GALEZOWSKI, A. M.; SNEAD, E. C.; KIDNEY, B. A.; JACKSON, M. L. C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v. 22, n. 3, p. 395-401, 2010.

GANROT, K. Plasma protein response in experimental inflammation in the dog.

Research Experimental Medicine, v.161, n.4, p.251-261, 1973.

GASCHEN, E.; GASCHEN, L.; SEILER, G.; WELLE, M.; JAUNIN, V. B.; JMAA, D. G.; NEIGER-AESCHBACHER, G.; ADÉ-DAMILANO, M. Lethal peracute rhabdomyolysis associated with stress and general anesthesia in three dystrophin-deficient cats. **Veterinary Pathology**, v. 35, p. 117-123, 1998.

GATTI, A. **Estudo da função glomerular em Golden Retriever normais, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva (GRMD)**. 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

GIUNCHETTI, R. C.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; ROATT, B. M.; DE OLIVEIRA AGUIAR-SOARES, R. D.; COURA-VITAL, W.; DE ABREU, R. T.; MALAQUIAS, L. C.; GONTIJO, N. F.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; COSTA, D. J.; DE LANA, M.; REIS, A. B. A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. **Vaccine**, v. 26, n. 5, p. 623-638, 2008.

GODOY, A. V.; SANTANA, A. E.; NAKAGE, A. P. M.; CÁPUA, M. L. B.; ALMEIDA, T. L. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 531-535, 2006.

GODOY, R. F.; SANTANA, A. E.; PALMA, P. B.; ROSSETO, F.; OLIVEIRA, J. V. Quantificação de subpopulações linfocitárias no sangue do cordão umbilical de eqüinos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 734-739, 2007.

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

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

GOUGH, A.; THOMAS, A. **Predisposição a doenças de acordo com as diferentes raças de cães e gatos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 67-71.

GRANDO, A. P.; MARIANA A.N.B.; MIGLINO M.A.; STREMAN F. A. ;ZATZ M.;KANAYAMA L. M.; FEITOSA M. L. Y.; MARTINS D. S.; MORINI A. C.; SANTOS J.P.A.;FADEL L.;ALVES F. R.;AMBROSIO C. Ultra-sonografia abdominal e pélvica em cães da raça golden retriever sadios, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 123-128, 2009.

GREELEY, E. H.; KEALY, R. D.; BALLAM, J. M.; LAWLER, D. F.; SEGRE, M. The influence of age on the canine immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 1-10, 1996.

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.

GUSSONI, E.; PAVLATH, G. K.; MILLER, R. G.; PANZARA, M. A.; POWELL, M.; BLAU, H. M.; STEINMAN, L. Specific T cell receptor gene rearrangements at the site of muscle degeneration in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Immunology**, v. 153, p. 4798-4805, 1994.

HAINSEY, T. A.; SENAPATI, S.; KUHN, D. E.; RAFAEL, J. A. Cardio-myopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 294-302, 2003.

HANSEY, T. A.; SENAPATI, S.; KUHN, D. E.; RAFAEL, J. A. Cardiomyopathic features associated with muscular dystrophy are independent of dystrophin absence in cardiovascular. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 294-302, 2003.

HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; WEAVER, C. T. Expanding the effector CD T-cell repertoire: the Th17 lineage. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 349-356, 2006.

HARRUS S, WANER T, AVIDAR Y, BOGIN E, PEH H, BARK H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 66, p. 241-249, 1996.

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.

HAYASHI, S.; JINBO, T.; IGUCHI, K.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; NOMURA, M.; ISHIDA, Y.; YAMAMOTO, S. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein in the serum from dogs with acute inflammation. **Veterinary Research Communications**, v. 25, p. 117-126, 2001.

HILL, J. A. G.; COSTA, D. W.; CASTRO, M. E. F.; HARTMANN, W.; BENESI, F. J. Proteína total, proteinograma eletroforético egamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de Campo Largo, Paraná. **Revista Academica** v. 5, n. 3, p. 295-301, 2007.

HNIA, K.; HUGON, G.; RIVIER, F.; MASMOUDI, A.; MERCIER, J.; MORNET, D. Modulation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade and metalloproteinase activity in diaphragm muscle in response to free radical scavenger administration in dystrophin-deficient mdx mice. **American Journal Pathology**, v. 170, n. 2, p. 633-643, 2007.

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: Windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topical Membrane**, v. 38, p. 113-154, 1991.

HOFFMANN-FEZER, G.; MORTELBAUER, W.; HARTMANN, K.; MYSLIWETZ, J.; THEFELD, S.; BEER, B.; THUM, I.; KRAFT, W. Comparison of T-cell subpopulations in cats naturally infected with feline leukaemia virus or feline immunodeficiency virus. **Research in Veterinary Science**, v. 61, p. 222-226, 1996.

HOFFMANN-FEZER, G.; THUM, J.; ACKLEY, C.; HERBOLD, M.; MYSLIWETZ, J.; THEFELD, S.; HARTMANN, K.; KRAFT, W. Decline in CD4⁺ cell numbers in cats with naturally acquired feline immunodeficiency virus infection. **Journal of Virology**, v. 66, p. 1484-1488, 1992.

HOGENESCH, H.; THOMPSON, S.; DUNHAM, A.; CEDDIA, M.; HAYEK, M. Effect of age on immune parameters and the immune response of dogs to vaccines: a cross-sectional study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 94, n. 1-2, p. 77-85, 2004.

HOWELL, J. M.; FLETCHER S, KAKULAS BA, O'HARA M, LOCHMULLER H, KARPATI G. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**, v. 7, p. 325-328, 1997.

ICHIM, T. E.; ALEXANDRESCU, D. T.; SOLANO, F.; LARA, F.; CAMPION, R. N.; PARIS, E.; WOODS, E. J.; MURPHY, M. P.; DASANU, C. A.; PATEL, A. N.; MARLEAU, A. M.; LEAL, A.; RIORDAN, N. H. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cell Immunology**, v. 260, n. 2, p. 75-82, 2010.

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.

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

ITOH, H.; TAMURA, K.; MOTOI, Y.; FUNAYAMA, Y. Characterization of serum alpha 1-acid glycoprotein in fetal and newborn calves during development. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 591-595, 1993.

ITOH, M.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, N.; KUNIYASU, Y.; SHIMIZU, J.; OTSUKA, F.; SAHAGUCHI, S. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. **Journal Immunology**, v. 162, p. 5317-5326, 1999.

JAIN, N. C. Acute phase proteins. In: KIRK, R. W. (Ed.). **Current veterinary therapy X small animal practice**. Philadelphia: W.B. Saunders p. 468-471. 1989

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 349-380.

JAKUBZICK, C.; KUNKEL, S. L.; PURI, R. K.; HOGABOAM, C. M. Therapeutic targeting of IL-4 and IL-13-responsive cells in pulmonary fibrosis. **Immunology Research** v. 30, p. 339-349, 2004.

JEARAWIRIYAPASARN, N.; MOULTON, H. M.; BUCKLEY, B.; ROBERTS, J.; SAZANI, P.; FUCHAROEN, S.; IVERSEN, P. L.; KOLE, R. Sustained dystrophy expression induced by peptide-conjugated morpholino oligomers in the muscles of mdx mice. **Molecular Therapy**, v. 16, n. 9, p. 1624-1629, 2008.

JOHN, H. A.; PURDOM, I. F. Elevated plasma levels of haptoglobin in Duchenne muscular dystrophy: electrophoretic variants in patients with a severe form of the disease. **Electrophoresis**, v. 10, n. 7, p. 489-493, 1989.

KABEYA, H.; UMEHARA, T.; OKANISHI, H.; TASAKI, I.; KAMIYA, M.; MISAWA, A.; MIKAMI, T.; MARUYAMA, S. Experimental infection of cats with *Bartonella henselae* resulted in rapid clearance associated with T helper 1 immune responses. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 716-720, 2009.

KANEKO, J. J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. New York: Academic, 1997.

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

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.

KEAY, G.; DOXEY, D. L. Species characteristics of serum proteins demonstrated after agarose gel electrophoresis. **Veterinary Research Communication**, v.3 p. 263-270, 1982.

KELLY, W. D. The thymus and lymphoid morphogenesis in the dog. **Federation Proceedings**. v. 20, p. 600, 1963.

KERKIS, I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D.S.; ZUCONI, E.; FONSECA, S.A.S.; CABRAL, R. M.; MARANDUCA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: local or systemic? **Journal of Translational Medicine**, v. 3, n. 6, p. 35, 2008.

KHUL, S.; MISCHKE, R.; LUND, C.; GÜNZEL-APEL, A. R. Reference values of chemical blood parameters in puppies during the first eight weeks of life. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, Hannover*, v. 107, n. 11, p. 438-443, 2000.

KINTER, A.; MCNALLY, J.; RIGGIN, L.; JACKSON, R.; ROBY, G.; FAUCI, A. S. Suppression of HIVspecific T cell activity by lymph node CD25+ regulatory T cells from HIV-infected individuals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 9, p. 3390-3395, 2007.

KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C. S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 493-500, 2003.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J.; SCHUELER, R. O.; BETTS, C. W. Tarsal joint contracture in dogs with Golden Retriever muscular dystrophy. **Laboratory Animal Science**, v. 44, p. 331-333, 1994.

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden Retriever dogs. **Muscle Nerve**, v. 8, p. 1042-1052, 1988.

KURABAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; HONJYO, T.; YAMAMOTO, Y.; KUBA, K.; YAMAMOTO, S. Alpha 1-acid Glycoprotein (AAG) Levels in Healthy and Pregnant Beagles Dogs. **Experimental Animal**, v. 52, n. 5, p. 377-381, 2003.

LAEMMLI, U. K. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. Doi:10.1038/227680a0.

LEHMANN, R.; VON BEUST, B.; NIEDERER, E.; CONDRAU, M. A.; FIERZ, W.; AUBERT, A.; ACKLEY, C. D.; COOPER, M. D.; TOMPKINS, M. B.; LUTZ, H. Immunization-induced decrease of the CD4 : CD8. ratio in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 35, p. 199-214, 1992.

LJUNGVALL, I.; HÖGLUND, K.; TIDHOLM, A.; OLSEN, L. H.; BORGARELLI, M.; VENGE, P.; HÄGGSTRÖM, J. Cardiac troponin I is associated with severity of myxomatous mitral valve disease, age, and C-reactive protein in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, n. 1, p. 153-159, 2010.

MALLOY, K. J.; POWRIE, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. **Nature Immunology**, v. 2, n. 9, p. 816-822, 2001.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage polarization comes of age. **Immunity**, v. 23, p. 344-346, 2005.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; LOCATI, M. New vistas on macrophage differentiation and activation. **European Journal of Immunology**, v. 37, p. 14-16, 2007.

MARINARO, M.; MARI, V.; BELLACICCO, A. L.; TARSITANO, E.; ELIA, G.; LOSURDO, M.; REZZA, G.; BUONAVOGLIA, C.; DECARO, N. Prolonged depletion of circulating CD4+ T lymphocytes and acute monocytosis after

pantropic canine coronavirus infection in dogs. **Virus Research**, v. 152, p. 73-78, 2010.

MARQUES, M. J. Structural biology of the dystrophin-deficient muscle fiber. **Brazilian Journal of Morphology and Science**, v. 21, p. 145-152, 2004.

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.

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

MATSUSHIMA, W.; WATANABE, T.; HIGUCHI, S. Effect of alpha (1)-acid glycoprotein on the pharmacokinetics of tamoxifen in rats treated with turpentine oil. **Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 89, n. 4, p. 490-498, 2000.

McCLOREY, G.; MOULTON, H. M.; IVERSEN, P. L.; FLETCHER, S.; WILTON, S. D. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. **Gene Therapy**, v. 13, p. 1373-1381, 2006.

McCLURE, W. C.; RABON, R. E.; OGAWA, H.; TSENG, B. S. Upregulation of the creatine synthetic pathway in skeletal muscles of mature mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 17, p. 639-650, 2007.

MEYER, D. J.; COLES, E. H.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária – Interpretação e diagnóstico**. 1. ed. São Paulo: Roca, 1995.

MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E.; MARTINS, D. S.; WENCESLAU, C. V.; PFARRER, C.; LEISER, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 6-7, p. 1699-1702, 2006.

MIKKELSEN, S. R.; RECKLING, S. K.; EGAN, E. A.; DEAN, G. A. In vivo depletion of CD4⁺CD25^{hi} regulatory T cells is associated with improved antiviral response in cats chronically infected with feline immunodeficiency virus. **Virology**, v. 403, p. 163-172, 2010.

MIYATAKE, M.; MIKE, T.; ZHAO, J.; YOSHIOKA, K.; UCHINO, M.; USUKU, G. Possible systemic smooth muscle layer dysfunction due to a deficiency of dystrophin in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 93, p. 11-17, 1989.

MOORE, G. E.; MAHAFFEY, E. A.; 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.

MOULE, S. K.; PEAK, M.; THOMPSON, S.; TURNER, G. A. Studies of the sialylation and microheterogeneity of human serum alpha 1-acid glycoprotein in health and disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 166, p. 177-185, 1987.

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.

MUSARO, A.; MCCULLAGH, K.; PAUL, A.; HOUGHTON, L.; DOBROWOLNY, G.; MOLINARO, M.; BARTON ER, SWEENEY HL, ROSENTHAL N. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. **Nature Genetics**, v. 27, p. 195-200, 2001.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E. Células-tronco hematopoiéticas em cães. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 325-329, 2006.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; COELHO, P. S. Metodologia e aplicação da citometria de fluxo na hematologia veterinária. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 4, p. 966-973, 2005.

NAKAGE, A. P. M.; SANTANA, A. E.; CÁPUA, M. L. B.; GODOY, A. V. Quantificação de células CD34+ do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 2, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782008005000057&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 Feb. 2009.

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

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3. ed. São Paulo: Elsevier, 2006.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal Golden Retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, p. 100-108, 2002.

NOKAZI, S.; SASAKI, K.; ANDO, M.; KADOTA, K. Natural killer-like T-cell lymphoma in a calf. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 46-51, 2006.

NOWAK, T. V.; IONASESCU, V.; ANURAS, S. Gastrointestinal manifestations of the muscular dystrophies. **Gastroenterology**, v. 82, p. 800-810, 1982.

OTABE, K.; SUGIMOTO, T.; JINBO, T.; HONDA, M.; KITAO, S.; HAYASHI, S.; SHIMIZU, M.; YAMAMOTO, S. Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. **Veterinary Research Communications**, v. 22, p. 77-85, 1998.

PALTRINIERI, S.; PONTI, W.; COMAZI, S.; GIORDANO, A.; POLI, G. Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with feline infectious peritonitis (FIP):

pathogenic role and diagnostic relevance. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 96, p. 141-148, 2003.

PAPIERNIK, M.; DE MORAES, M. L.; PONTOUX, C.; VASSEUR, F.; PENIT, C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R α -chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. **Internacional Immunology**, v. 10, p. 371-378, 1998.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. A mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of Neurological Sciences**, v. 129, p. 97-105, 1995.

PATELLI, T. H. C.; MARQUES, L. C.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, P. C. Perfil eletroforético das proteínas de fase aguda em caprinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma evansi*. **Brazilian Journal of Research and Animal Science**, v. 45, p. 481-487, 2008.

PEREIRA, P. M.; ABREU, D. K.; PINCELLI, V. A.; BOCHIO, M. M.; SANTANA, A. E. Quadro seroproteico como auxílio diagnóstico na anemia hemolítica imunomediada em cães. **Ciência Rural**, v. 40, n. 4, p. 880-887, 2010.

PETROF, B. J.; SHRAGER, J. B.; STEDMAN, H. H.; KELLY, A. M.; SWEENEY, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 8, p. 3710-3714, 1993.

PINTO-MARIZ, F.; CARVALHO, L. R.; MELLO, W.; ARAUJO, A. Q. C.; RIBEIRO, M. G. R.; CUNHA, M. C. S. A.; Differential integrin expression by T lymphocytes: Potential role in DMD muscle damage **Journal of Neuroimmunology**, v. 223, p. 128-130, 2010

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, n.1/2, p. 1-14, 2004.

QUACKENBUSH, S. L.; DONAHUE, P. R.; DEAN, G. A.; MYLES, M. H.; ACKLEY, C. D.; COOPER, M. D.; MULLINS, J. I.; HOOVER, E. A. Lymphocyte subset alterations and viral determinants of immunodeficiency disease induction by the feline leukemia virus FeLV-FAIDS. **Journal of Virology**, v. 64, p. 5465-5474, 1990.

QUACKENBUSH, S. L.; MULLINS, J. I.; HOOVER, E. A. Replication kinetics and cell tropism of an immunosuppressive feline leukaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 77, p. 1411-1420, 1996.

RADOSTITS, O. M.; LESLIE, K. E.; FETROW, J. **Handbook of veterinary clinical medicine**. 2 th ed. Philadelphia: Saunders, 1994. 631p.

RAFFAELLA, W.; STEFANIE, P.; JUDITH, D.; THOMAS, M.; MARKUS, A. Rugg Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> Acesso em: 22 Feb. 2009.

RECHE, A.; DANIEL, A. G. T.; STRAUSS, T. C. P. L.; TABORDA, C. P.; MARQUES, S. A. V.; HAIPEK, K.; OLIVEIRA, L. J. MONTEIRO, J. M.; KFOURY, J. R. Cutaneous mycoflora and CD4:CD8 ratio of cats infected with feline immunodeficiency virus. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 12, n. 4, p. 355-358, 2010. doi:10.1016/j.jfms.2009.

REIS A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v. 103, n. 3-4, p. 173 -185, 2005.

REUTENAUER, J.; DORCHIES, O. M.; PATTHEY-VUADENS, O.; VUAGNIAUX, G.; RUEGG, U. T. Investigation of Debio 025, a cyclophilin inhibitor, in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. **British Journal Pharmacology**, v. 155, n. 4, p. 574-584, 2008.

RIVAS, A. L.; KIMBALL, E. S.; QUIMBY, F. W.; GEBHARD, D. Functional and phenotypic analysis of in vitro stimulated canine peripheral blood mononuclear cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 45, p. 55-71, 1995.

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

SAKAGUCHI, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. **Nature Immunology**, v. 6, n. 4, p. 345-352, 2005.

SAQUETTI, C. H. C.; FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G.; FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 794-799, 2008.

SARNAT, H. B. Neuromuscular disorder. In: KLIEGMAN R. (Ed.). **Nelson textbook of pediatrics**. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 1680-1696.

SAUT, J. P. E.; MIYASHIRO, S. I.; FRAGA, R.; RAIMONDO, S.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influencia do período pós-parto no proteinograma de vacas holandesas, obtido através da técnica de eletroforese em gel de poliácridamida. **Ciencia Animal Brasileira**, v. 10, p. 244- 249, 2009. Trabalho apresentado no VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, 2009.

SAVINO, W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. **PLoS Pathogens**, v. 2, n. 6, p. e62, 2006.

SCHUMACHER, M. J.; BURKHEAD, T. Stability of fresh and preserved fetal and adult lymphocyte cell surface markers. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 14, n. 6, p. 320-326, 2000.

SELL, S. **Immunology, immunopathology and immunity**. 5. ed. Stamford, CT: Appleton & Lange, 1996.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorders**, v. 15, p. 127-138, 2005.

SILVA, D. G. K. C.; TEODORO, G. M.; SENA, L. V.; SOUSA, Z. M.; REZENDE, A. A. Perfil eletroforético de proteínas plasmáticas: estudo em crianças atendidas no Hospital de Pediatria – Hosped / UFRN da Cidade de Natal-RN. **RBAC**, v. 37, n. 34, p. 239-242, 2005.

SINGH, S. V.; PACHAURI, S. P. Acute phase proteins in bovine mastitis. **Indian Journal Animal Sciences**, v. 72, n. 1, p. 20-22, 2002.

SKKINER, J.G.; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. **The Veterinary Record**, v.134, p.33-36, 1994.

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.

ST PIERRE, B. A.; TIDBALL, J. G. Differential response of macrophage subpopulations to soleus reloading after rat hindlimb suspension. **Journal of Applied Physiology**, v.77, p. 290-297, 1994.

STEPHENS, L. A.; MOTTET, C.; MASON, D.; POWRIE, F. Human CD4+CD25+ thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity *in vitro*. **European Journal Immunology**, v. 31, p. 1247-1254, 2001.

STOLLER, J. K.; ABOUSSOUAN, L. S. Alpha1-antitrypsin deficiency. **Lancet**, v. 365, n. 9478, p. 2225-2236, 2005.

SUTTER, N. B.; OSTRANDER, E. A. Dog star rising: the canine genetic system. **Nature Reviews Genetics**, v.5, :p. 900-910, 2004.

SUTTER, S. E.; GOUTHRO, T. A.; MCSWEENEY, P. A.; NASH, R. A.; HASKINS, M. E.; FELSBURG, P. J.; HENTHORN, P. S. Isolation and characterization of pediatric canine bone marrow CD34⁺ cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 101, n. 1-2, p. 311-313, 1997.

SZABOLCS, P.; PARK, K. D.; REESE, M.; MARTI, L.; BROADWATER, G. KURTZBERG, J. Coexistent naive phenotype and higher cycling rate of cord blood T-cells as compared to adult peripheral blood. **Experimental Hematology**, v. 31, p. 708-714, 2003.

TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-Like receptors in innate immunity. **Immunology**, v. 17, n. 1, p.1-14, 2005.

TERWEE, J. A.; CARLSON, J. K.; SPREGUE, W. S.; SONDERGROTH, K. S.; SHROPSHIRE, S. B.; TROYLER, J. L.; VANDEWOUDE, S. Prevention of immunodeficiency virus induced CD4⁺ T-cell depletion by prior infection with a non-pathogenic virus. **Virology**, v. 377, p. 63-70, 2008.

THOR, G.; TERRYBORRY, J. MUSULAR Dystrophy: recent milestones. **Drug & Market Developmet**, v. 14, n. 4, p. 115-123, 2003.

TIDBALLAND, J. G.; WEHLING-HENRICKS, M. Damage and inflammation in muscular dystrophy: potential implications and relationships with autoimmune myositis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 17, p. 707-720, 2005.

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos. Espécies canina e felina**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. p. 654-661.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo: ROCA, 1998. p. 244-258.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 147.

TKACHENKO, A. V.; PIÉTU, G.; CROS, N.; GANNOUN-ZAKI, L.; AUFRAY, C.; LÉGER, J. J.; DECHESNE, C. A. Identification of altered gene expression in skeletal muscle from Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular Disorder**, v. 11, p. 269-277, 2001.

USHER, S. G.; RADFORD, A. D.; VILLIERS, E. J.; BLACKWOOD, L. FLT3, and C-KIT mutations in immunophenotyped canine leukemias. **Experimental Hematology**, v. 37, n. 1, p. 65-77, 2008.

VAINZOF, M.; AYUB-GUERRIERI, D.; ONOFRE, P. C. G.; MARTINS, P. C. M.; LOPES, V. F.; ZILBERZTAJN, D.; MAIA, L. S.; SELL, K.; YAMAMOTO, L. U. Animals models for genetic neuromuscular diseases. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, p. 241-248, 2008.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective involvement of muscle in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorders**, v. 1, p. 31-38, 1991.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A. Progressive muscular dystrophy in a Golden Retriever dog: light microscopy and ultrastructural features at 4 and 8 months. **Acta Neuropathologica**, Berlin, v. 71, p. 301-310, 1986.

VALENTINE, B. A.; WINAND, N. J.; PRADHAN, D.; MOISE, N. S.; DE LAHUNTA, A.; KORNEGAY, J. N.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. **American Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 3, p. 352-356, 1992.

VALENTINE, B. A.; BLUE, J. T.; SHELLEY, S. M.; COOPER, B. J. Increase Serum Alanine Aminotransferase Activity Associated with Muscle Necrosis in the Dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 4, p. 140-143, 1990.

VEAZEY, R.; LING, B.; PANDREA, I.; MCCLURE, H.; LACKNER, A.; MARX, P. Decreased CCR5 expression on CD4+ T cells of SIV-infected sooty mangabays. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v.19, n. 3, p. 227-233, 2003.

WAGNER, J. L.; STORB, R. Preclinical large animal models for hematopoietic stem cell transplantation. **Current Opinion in Hematology**, v. 3, n. 6, p. 410-415, 1996.

WEBB, C. B.; LEHMAN, T. L.; MCCORD, K. W. Effects of an oral superoxide dismutase enzyme supplementation on indices of oxidative stress, proviral load, and CD4:CD8 ratios in asymptomatic FIV-infected cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 10, p. 423-230, 2008a.

WEBB, C.; LEHMAN, T.; MCCORD, K.; AVERY, P.; DOW, S. Oxidative stress during acute FIV infection in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 122, p. 16-24, 2008b.

WEGIENKA, G.; HAVSTAD, S.; ZORATTI, E. M.; WOODCROFT, K. J.; BOBBIT, K. R.; OWNBY, D. R.; JOHNSON, C. C. Regulatory T cells in prenatal blood samples: variability with pet exposure and sensitization. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 81, p. 74-81, 2009.

WEHLING, M.; SPENCER, M. J.; TIDBALL, J. G. A nitric oxide synthase transgene ameliorates muscular dystrophy in mdx mice. **Journal of Cell Biology**, v. 155, p. 123-131, 2001.

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

YUKI, M.; ITOH, H.; TAKASE, K. Serum α -1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, n. 1, p. 65-71, 2009.

ZAR, J. H. **Bioestatistical analisis**. 4. ed. New Jersey: Practice Hal, 1999. p. 289.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557-1568, 2008.