CAMILA FERREIRO PINTO

**Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa
eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma**

São Paulo

2010

CAMILA FERREIRO PINTO

**Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa eritrocitária antioxidante
em felinos com linfoma**

Dissertação Apresentada ao Programa
Pós-graduação em Clínica Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:

Clínica Médica

Área de Concentração:

Clínica Veterinária

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas

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.2305
FMVZ

Pinto, Camila Ferreiro

Avaliação do estado oxidante/antioxidante e da defesa eritrocitária
antioxidante em felinos com linfoma / Camila Ferreiro Pinto. -- 2010.
103 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof^a. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas.

1. Gatos. 2. Linfoma. 3. Oxidante. 4. Antioxidante. I. Título.

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado: Avaliação do estresse oxidativo eritrocitário em gatos com linfoma", protocolado sob o nº1850/2009, utilizando 50 (cinquenta) gatos, sob a responsabilidade da Profa Dra Silvia Regina Ricci Lucas, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 09/12/2009.

We certify that the Research "Evaluation of erythrocyte oxidative stress in cats with lymphoma", protocol number 1850/2009, utilizing 50 (fifty) cats, under the responsibility Profa Dra Silvia Regina Ricci Lucas, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 12/09/2009.

São Paulo, 10 de dezembro de 2009

Denise Fantoni
Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PINTO, Camila Ferreiro

Título: **Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/2010

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Dedico

A Deus, pela minha existência e pela minha alma que vive em busca de crescimento pessoal e espiritual. Que o senhor permita que eu caminhe cada vez mais.

Aos Meus pais, Rosa e Wolney, meus maiores exemplos de força, dedicação e amor. Jamais conseguirei expressar o quanto sou feliz e grata por ter sido escolhida por Deus para ser a sua filha. Amo vocês!!

A minha avó Aparecida, sempre rezando por mim, sempre firme nos momentos mais difíceis e grande incentivadora dos meus sonhos.

Ao Fabrício Lorenzini, por estar sempre ao meu lado e acima de tudo pela sua imensa PACIÊNCIA! Com você descobri o verdadeiro significado do amor, a doação.

Ao meu irmão Gustavo e minha prima-irmã Juliana, os laços de sangue reforçam ainda mais os nossos sentimentos, obrigado pelo apoio de vocês, desde sempre!

A minha orientadora Profa. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas não só por ter me orientado, mas também por ter me acolhido de forma carinhosa e paciente durante todo esse período.

Agradeço por tudo!!

Agradecimentos

À todos os professores do Departamento de Clínica Médica de FMVZ-USP, pelo convívio agradável e ensinamentos. Obrigado à Profa. Dra. **Sílvia Regina Ricci Lucas**, Profa. Dra. **Mitika Kuribayashi Hagiwara**, Prof. Dr. **Archivaldo Reche Junior**, Prof. Dr. **Carlos Eduardo Larsson**, Profa. Dra. **Maria Helena Larsson**, Profa. Dra. **Marcia Mery Kogika**, Profa. Dra. **Denise Saretta Schwartz**, Prof. Dr. **Enrico Lippi Ortolani** e Prof. Dr. **Fernando José Benesi**.

Às médicas veterinárias do Hospital Veterinário da FMVZ-USP **Vera A. B. Fortunato**, **Bruna Maria Pereira Coelho**, **Paula Romy Monteiro**, **Denise Maria Nunes Simões**, e **Khadine K. Kanayama**, pela ajuda na triagem dos casos clínicos.

Aos funcionários enfermeiros do Hospital Veterinário da FMVZ-USP, particularmente **Carlito dos Santos Belau** e **Milton Gregório dos Santos** pela colaboração nas colheitas.

Às funcionárias dos diferentes laboratórios do Departamento de Clínica Médica **Maria Luíza Franchini**, **Maria Helena da Silva Pelissari**, **Marli Elisabete Ferreira de Castro**, **Cláudia Regina Stricagnolo** e **Samantha Iye Myashiro** pela ajuda durante a realização deste trabalho. E à **Creide Donizete Costa** por nos aturar durante a solicitação dos exames.

Em especial à **Clara S. Mori**, por sua imensa paciência e sua dedicação aos pós-graduandos durante a realização das provas laboratoriais. O que seria de nós sem você??

À todos os funcionários da **FMVZ** pela dedicação em manter esta instituição.

Aos colegas de Pós-graduação: **Lucas Campos Sá** e **Rodrigo Ubukata** meu obrigado pela ajuda durante o projeto, coletas e muitas risadas.

À minha colega e Amiga **Thaís Macedo**, companheira de centrífuga e coletas, e muitas e muitas risadas, né? Obrigado pelos conselhos e pela ajuda profissional e pessoal.

Aos Professores da Universidade Santo Amaro (UNISA) e em especial ao Prof. **Wagner Sato**, Profa. **Sandra Oliveira**, Dra. **Simone Gonçalves**, Profa. Dra. **Andrea Barbosa**, Profa. **Claudia Brito**, que sempre me incentivaram e me apoiaram nesta caminhada. Agradeço a oportunidade de ter vivenciado toda a experiência deste corpo clínico.

Aos Funcionários da UNISA em especial ao **Chiquinho** pela dedicação aos animais e ao HV da Universidade Santo Amaro. Valeu por tudo. Agradeço também a ex-coordenadora do hospital, **Mary** e a atual **Fabiana** pela ajuda durante esse período.

Aos Professores e amigos da Anembí-Morumbi Prof. Dr. **Ronaldo Lucas**, Profa. Dra. **Márcia Marques Jericó** e Prof. **Flávio Augusto dos Santos** pelos conselhos durante toda a minha vida profissional e pessoal.

Ao meu professor e amigo **Ricardo Duarte**, obrigado por ter me ensinado o verdadeiro significado de ser veterinária e pelo incentivo durante toda a graduação e pós-graduação.

Às minhas ex-companheiras de rotina, **Juliana Frígnani, Cíntia B. Ferreira e Gisele Veiga** pelo apoio durante esse período, além da alegria de dividir a rotina com pessoas competentes e acima de tudo profissionais exemplares, mantivemos um ambiente harmonioso que nunca sairá do meu coração. Não era trabalho, era lazer! E viva as carolinas!!

Ao Meu grande amigo de faculdade, de residência, da vida, **Fernando Felipe de Carvalho**. Fê dá certo, a gente chega lá!! Te adoro!

Aos meus amigos **Igor e Carol Quirico, Carolína Quirele, Carine Brunato, Mariana Capelanes, Daniel Calvo, Brenda Navarro e Rafael Magdanelo**. Agora Boituva nos espera, sem computador!!

Minhas resientes fofézimas **Natalia Lunardi e Vanessa Guedes**, fofis e queridas demais!

Ao Meu amigo **Maurício Flocke** por me ajudar nas coletas, pela minha ausência na rotina durante as disciplinas, pela dedicação comigo, pela sua amizade.

Aos meus **Famíliares**, por entenderem muitas as ausências em festinhas de final de semana, por sempre me apoiarem e torcerem por mim, amo todos vocês.

À minha cunhada **Paty** e nosso **bebê** Lindo que vai nascer!!

À minha **Vó Walkíria**. Acho que agora já posso jogar o arroz!!

Em especial a minha prima **Paula**, somos como irmãs e você está sempre em meu coração.

À Família do Fabrício: **Adriana, Yann, Maria Clara, Celso, Pompeu, Solange e Fê**. Vocês me aceitaram como da sua família, muito obrigado.

À minha cunhada **Gabriela**, eu sei que você está olhando por todos nós, obrigado por ter permitido que eu convivesse com alguém tão especial. Você sabe que minduim está em boas mãos e o camundongo vai cuidar dele. A gente se esbarra, te amo!

À **Maria do Carmo e Joselita** que me criaram enquanto minha mãe trilhava seus passos, assim como eu, na carreira acadêmica. Obrigado.

Aos colegas, funcionários e proprietários do **Hospital Veterinário Rebouças**, em especial aos colegas **Fábio Navarro e Rafael Rolan** que fazem do meu trabalho uma diversão.

Ao **Dr. Eduardo Fava Schimidt** pelo apoio durante todo esse período e conselhos valiosos.

Ao meu cão **Sablon**, foi um pequeno teckel que me mostrou o que é o amor incondicional de um cão e me fez veterinária.

À **Lana, Rock, Agata, Cadelinha, Yuri e Bob**, galerinha querida demais.

Enfim...

À minha gata **Tea** que me mostrou a grande superioridade da espécie felina!

RESUMO

PINTO, C. F. **Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma.** [Evaluation of oxidant/antioxidant total status and erythrocyte antioxidant defense in cats with lymphoma]. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Os linfomas constituem um grupo de neoplasias que têm origem nas células linforreticulares e acomete tecidos linfóides primários, secundários como o baço e linfonodos e demais tecidos onde há presença de linfócitos circulantes, comumente descritos em cães, gatos e humanos. As síndromes paraneoplásicas são definidas como alterações sistêmicas não relacionadas com lesões metastáticas de forma direta ou indireta no hospedeiro. Dentre as alterações descritas como síndrome paraneoplásica, as alterações hematológicas constituem as mais freqüentes, apresentando destaque para os processos anêmicos. A anemia presente pode ser decorrente de alterações do metabolismo do ferro, perda sanguínea, distúrbios hemolíticos, infiltrado medular e hiperesplenismo. Atualmente tem se associado a redução da vida média das hemácias frente a presença do estresse oxidativo, que gera um desequilíbrio entre a excessiva produção de espécies reativas ao oxigênio e/ou a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante das hemácias. Esse processo pode ocasionar a peroxidação de lipídios da membrana eritrocitária, gerando hemólise e assim resultando em anemia e/ou exacerbando a mesma. Com o objetivo de avaliar a existência do estresse oxidativo e a presença de anemia assim como, a sua correlação com o estado redox, foram avaliadas as concentrações eritrocitárias de glutathiona reduzida, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e superóxido redutase em 23 gatos sadios e 17 felinos com linfoma. Também foram determinadas as concentrações plasmáticas de malonaldeído como indicador da presença de peroxidação lipídica em ambos os grupos. Para avaliar o estado redox foi mensurada a concentração plasmática do estado antioxidante total para o grupo experimental e grupo controle. Não foram observadas diferenças significantes para as enzimas eritrocitárias glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase, assim como para a mensuração plasmática de malonaldeído. Entretanto, foram observados valores significativamente menores

($p=0,018$) de glutathione reduzida nos felinos com linfoma quando comparados ao grupo controle. O mesmo pôde ser observado em relação à mensuração do estado antioxidante total ($p=0,003$). Os resultados obtidos indicam a presença de estresse oxidativo em felinos com linfoma, porém, não houve evidências da relação entre a presença de estresse oxidativo e a presença de anemia.

Palavras-chave: Gatos. Linfoma. Oxidante. Antioxidante.

ABSTRACT

PINTO, C. F. **Evaluation of oxidant/antioxidant total status and erythrocyte antioxidant defense in cats with lymphoma.** [Avaliação do estado oxidante/antioxidante e defesa eritrocitária antioxidante em felinos com linfoma]. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Lymphomas are a group of cancers that originate in cells and lymphoreticular affects lymphoid tissues in primary, secondary as the spleen and lymph nodes and other tissues where there is presence of circulating lymphocytes, commonly described in dogs, cats and humans. Paraneoplastic syndromes are defined as systemic changes unrelated metastatic lesions either directly or indirectly in the host. Among the changes described as a paraneoplastic syndrome, hematological changes are the most frequent, with emphasis on the processes anemic. This anemia may be due to changes in iron metabolism, blood loss, hemolytic disorders, bone marrow infiltration and hypersplenism. Today has been associated with reduced average life span of red cells before the presence of oxidative stress, which creates an imbalance between excessive production of reactive oxygen species and / or decreased antioxidant defense mechanisms of red blood cells. This process can lead to lipid peroxidation of the membrane, causing hemolysis and thus resulting in anemia and / or exacerbating it. Aiming to evaluate the existence of oxidative stress and anemia as well as its correlation with redox state, were evaluated erythrocyte concentrations of reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and superoxide reductase in 23 healthy cats and 17 cats with lymphoma. We also determined plasma concentrations of malondialdehyde as an indicator of the presence of lipid peroxidation in both groups. To assess the redox state was measured plasma concentration of total antioxidant status for the experimental group and control group. No significant differences were observed for enzymes erythrocyte glutathione reductase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, as well as for measurement of plasma malondialdehyde. However, observed values were significantly lower ($p = 0.018$) reduced glutathione in cats with lymphoma when compared to the control group. The same could be observed in relation to the

measurement of total antioxidant status ($p=0,003$). The results indicate the presence of oxidative stress in cats with lymphoma, however, no evidence of the relationship between oxidative stress and anemia.

Keywords: Cats. Lymphoma. Oxidant. Antioxidant.

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A -	Dados individuais referentes à idade, sexo, raça dos gatos clinicamente normais (grupo controle) - São Paulo – 2008 - 2010.....	94
Apêndice B -	Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 - 2010.....	95
Apêndice C -	Valores relativos aos exames bioquímicos dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008 – 2010.....	97
Apêndice D -	Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo linfoma, no momento do diagnóstico - São Paulo – 2008 - 2010.....	99
Apêndice E -	Valores relativos aos exames bioquímicos dos animais do grupo linfoma, no momento do diagnóstico - São Paulo – 2008 - 2010.....	101
Apêndice F-	Tabela representando os animais apresentando sorologia positiva para FIV - São Paulo – 2008 – 2010.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de média, desvio padrão, mediana, primeiro e terceiro quartis, nível de significância (<i>p</i>) e de referência das variáveis do eritrograma dos animais com linfoma e do grupo controle - São Paulo – 2008 - 2010.....	58
Tabela 2 -	Valores individuais, média e desvio padrão do hematócrito (Ht), das concentrações eritrocitárias de glutathione reduzida (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), das concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e concentrações do estado antioxidante total (TAS) de Felinos do grupo controle - São Paulo – 2008 – 2010.....	59
Tabela 3 -	Valores individuais, média e desvio padrão do hematócrito (Ht), das concentrações eritrocitárias de glutathione reduzida (GSH), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), das concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e concentrações do estado antioxidante total (TAS) de Felinos com linfoma - São Paulo – 2008 – 2010.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) do hematócrito (%) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,226) - São Paulo – 2008 - 2010.....	61
Gráfico 2 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de hemoglobina (g/dL) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,011) - São Paulo – 2009 – 2010.....	61
Gráfico 3 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes ao número total de hemácias (milhões/mm ³) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,017) - São Paulo – 2008 - 2010.....	62
Gráfico 4 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes ao volume corpuscular médio (VCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,003) – São Paulo – 2008 – 2010.....	62
Gráfico 5 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes à hemoglobina corpuscular média (HCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,776) – São Paulo – 2008 – 2010.....	63
Gráfico 6 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,0001) – São Paulo – 2008 – 2010.....	63

Gráfico 7 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de glutathiona reduzida (GSH) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,018$) - São Paulo- 2008 - 2010.....	64
Gráfico 8 -	Curva de regressão entre os valores de hematócrito (volume globular) e valores de glutathiona reduzida (GSH) dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma – São Paulo 2008 – 2010.....	64
Gráfico 9 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores glutathiona peroxidase (GPX) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,945$) – São Paulo – 2008 – 2010.....	65
Gráfico 10 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de glutathiona redutase (GR) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,239$) – São Paulo – 2008 – 2010.....	65
Gráfico 11 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de superóxido dismutase (SOD) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,476$) – São Paulo – 2008 – 2010.....	66
Gráfico 12 -	Curva de regressão entre os valores de hematócrito e valores de superóxido dismutase (SOD) dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma – São Paulo – 2008 – 2010.....	66
Gráfico 13 -	Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de malonaldeído (MDA) em μM dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,511$) – São Paulo – 2008 – 2010.....	67

- Gráfico 14 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,003$) – São Paulo – 2008 – 2010..... 67
- Gráfico 15 - Curva de regressão entre os valores de hematócrito e valores do estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma – São Paulo – 2008 – 2010..... 68
- Gráfico 16 - Curva de regressão entre os valores de glutathiona reduzida e valores do estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma – São Paulo – 2008 – 2010..... 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Mecanismo de ação dos antioxidantes.....	37
Figura 2 -	Resultado sorológico de um dos animais (Gordinho) do grupo experimental no teste Elisa® para detecção de retrovírus (FIV/ FeLV). Fonte: arquivo pessoal – São Paulo – 2009.....	53
Figura 3 -	Resultado sorológico dos animais do grupo controle no teste Elisa® para detecção de retrovírus (FIV/FeLV). Fonte: arquivo pessoal – São Paulo – 2009.....	55

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Identificação, classificação anatômica do linfoma e resultado dos testes sorológicos para detecção de infecção por retrovírus, no grupo experimental – São Paulo – 2008 - 2010.....	54
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Viral Felina
RNA	Ácido Ribonucleico
DNA	Ácido Desoxidorribonucleico
OMS	Organização Mundial da saúde
NK	Natural killer
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RL	Radicais Livres
ERO (s)	Espécies Reativas ao Oxigênio
O₂	Oxigênio
NO	Óxido Nítrico
H₂O₂	Água
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida
O₂⁻	Superóxido
OH⁻	Hidróxido
CAT	Catalase
SOD	Superóxido Dismutase
GSH	Glutathiona reduzida
GSSG	Glutathiona oxidada
GPX	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
MDA	Malonaldeído
TAS	Estado Total Antioxidante
CH	Corpúsculo de Heinz
TBARs	Substâncias Reativas ao ácido tiobarbitúrico
DRC	Doença Renal Crônica
CuZnSOD	SOD cobre e zinco
Mn-SOD	SOD manganês
DM	Diabetes Mellitus
8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
DTNB	Ácido ditionitrobenzóico
ABTS	Ácido 2.2' azino dietil-benzotiazolínico
NaCL	Cloridrato de sódio
VCM	Volume corpuscular Médio
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
Ht	Hematócrito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1	ANIMAIS.....	42
3.1.1	Grupo Experimental.....	42
3.1.2	Grupo Controle.....	43
3.2	AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS.....	43
3.3	EXAMES COMPLEMENTARES.....	45
3.3.1	Hemograma.....	45
3.3.2	Bioquímica Sérica.....	45
3.3.3	Análise Sorológica para retrovíroses.....	46
3.3.4	Exames de Imagem.....	46
3.3.5	Citologia Aspirativa.....	46
3.3.6	Análise Histopatológica.....	47
3.4	DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	47
3.5	DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX).....	48
3.6	DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	48
3.7	DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).....	48

3.8	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (MDA).....	49
3.9	AVALIAÇÃO DO ESTADO ANTIOXIDANTE TOTAL (TAS).....	51
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
4	RESULTADOS.....	53
5	DISCUSSÃO.....	69
6	CONCLUSÕES.....	81
	REFERÊNCIAS.....	82
	APÊNDICES.....	94

1 INTRODUÇÃO

Os linfomas constituem um grupo de neoplasias que têm origem nas células linforreticulares. Usualmente acometem tecidos linfóides primários como o timo e medula óssea e tecidos secundários como baço e linfonodos. Porém, podem acometer outros tecidos como resultado da presença de linfócitos no local (COUTO; HAMMER, 1994; VAIL et al., 1998; FAN, 2003; VAIL; YOUNG, 2007; VAIL, 2007). São as neoplasias mais comumente descritas tanto em cães quanto em gatos e humanos (FAN, 2003; VAIL, 2007).

A etiologia é ainda desconhecida, acredita-se que seja multifatorial. Varias hipóteses já foram investigadas como infecções por retrovírus, intoxicações por herbicidas, condições ambientais, anormalidades cromossômicas e disfunção imunológica. No homem e nos gatos associa-se a neoplasia à presença de infecção por retrovírus, o que não foi identificado em cães (COUTO; HAMMER, 1994; FAN, 2003; VAIL, 2007).

Os retrovírus de forma geral são considerados oncogenes. A presença destes vírus no hospedeiro promove ativação celular de oncogenes por meio da integração do seu material genético ao genoma do hospedeiro. Neste momento a proximidade de um vírus a um oncogene pode gerar superexpressão deste, levando a proliferação celular descontrolada. O gene *c-myc*, associado com a progressão e proliferação durante o ciclo celular, é freqüentemente ativado pelo vírus da Leucemia Felina (FeLV) em tumores de células T (ARGYLE; BLACKING, 2008; FUGINO; OHNO; TSUJIMOTO, 2008).

Em gatos, o FeLV foi identificado como um carcinógeno biológico, que leva à transformação das células normais em linfócitos malignos (FAN, 2003). O FeLV é um gamaretrovírus envelopado, RNA, com subtipos descritos como A, B, C e T, que apresentam diferentes aspectos em relação a sua antigenicidade (LUTZ et al., 2009). O vírus pode gerar alterações hematopoiéticas como atrofia tímica, linfopenia, neutropenia, anormalidades da função neutrofílica, diminuição de linfócitos CD4 e CD8 e alterações malignas como a indução de linfomas e doenças mieloproliferativas como as leucemias (LEVY et al., 2009; LUTZ et al., 2009).

A infecção dos gatos com FeLV, relaciona-se com a forma de apresentação anatômica da neoplasia (MORRIS; DOBSON, 2001; ARGYLE; BLACKING, 2008). Em um estudo de Vail (1998) cerca de 80% dos felinos com linfoma na forma mediastinal apresentavam infecção por FeLV, enquanto na forma alimentar cerca de 30 a 60%. Em estudos de levantamento de casos sobre linfoma na medula espinhal, houve uma prevalência de 80 a 90% de positividade a este retrovírus (SPODNICK et al., 1992; LANE et al., 1994). No Brasil a prevalência foi em torno de 8% de animais positivos para FeLV sendo destes 20% apresentando linfoma (RECHE; HAGIWARA; LUCAS, 1997).

Os testes sorológicos são os mais utilizados na rotina clínica para diagnóstica da infecção, entretanto, devido às novas técnicas de diagnóstico, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), o DNA pró viral tem sido detectado em pacientes com linfoma e sorologicamente negativos. A partir desse achado é possível supor que esses felinos conseguiram debelar a infecção inicial, mas não a transformação maligna nas células linfóides (TWOMEY; ALLEMAN, 2005; FUGINO; OHNO; TSUJIMOTO, 2008).

Existem também evidências de que outro retrovírus, o vírus da imunodeficiência felina (FIV) pode aumentar a ocorrência desse tipo de tumor, agindo de forma indireta na gênese tumoral. O FIV é um lentivirus que gera disfunção imune progressiva em felinos e seres humanos (BEATTY et al., 1998), além disso, a coinfeção com FeLV pode potencializar o desenvolvimento de alterações linfoproliferativas (VAIL, 2007).

Estudos experimentais em gatos infectados por FIV mostraram que os animais desenvolveram várias formas anatômicas de linfomas (BEATTY et al., 1998). Estudos em pacientes humanos com imunossupressão em decorrência da infecção pelo vírus da imunodeficiência (HIV) e pacientes transplantados apresentam resultados semelhantes (BEATTY et al., 1998; LIM; LEVINE, 2005). Segundo Lim e Levine (2005), a estimulação crônica de linfócitos B pela ação do vírus durante a infecção inicial, em humanos, acarreta a liberação de citocinas e, em decorrência deste processo, aumenta o risco de gerar mutações genéticas, envolvendo transformações malignas nas células. Há descrições de alterações genéticas em diversos oncogenes como *c-myc* e BCL-6.

Além das retrovíroses, os processos inflamatórios também podem estar envolvidos na ocorrência do linfoma. Várias hipóteses já foram descritas associando o processo inflamatório crônico ao desenvolvimento de tumores malignos. Em seres humanos infecções crônicas por *Helicobacter pylori* podem desencadear gastrite crônica e câncer gástrico, Bridgeford et al. (2008) descrevem a associação da infecção crônica por *H. heilmannii* com gastrite crônica e linfoma em gatos.

Assim como a presença de processo inflamatório crônico, a dieta também já foi apontada como um dos fatores relacionados ao desenvolvimento do linfoma, no caso, na forma alimentar. Esta associação surgiu devido ao aumento da incidência desse tipo de tumor ao longo dos anos, mesmo com o advento do uso de vacinas (LOUWERENS et al., 2005) para prevenção contra o FeLV.

Considerando as alterações genéticas, gatos de raças orientais como siameses e birmaneses apresentam maior predisposição para o desenvolvimento de linfomas, o que sugeriria uma predisposição genética (COURT; WATSON; PEASTON, 1997). Estudos recentes não corroboraram tais informações, sendo grande o número de raças acometidas e de animais provenientes de diversos cruzamentos, sem definição racial (CARRERAS et al., 2003; LINGARD et al., 2009).

Com relação às condições ambientais, estudos sugerem que gatos expostos a fumaça de cigarro apresentam aumento significativo na probabilidade de desenvolvimento de linfomas, assim como tumores nasais e pulmonares (BERTONE; SNYDER; MOORE, 2002; FAN, 2003; VAIL, 2007).

De modo geral, não existe predileção sexual e a faixa etária varia entre um a 14 anos de idade, com média de seis anos e está na dependência da apresentação anatômica da doença (WALTON; HENDRICK, 2001; TESKE et al., 2002).

O linfoma felino pode ser classificado de acordo com sua localização anatômica e características histológicas, porém, diferente do que se observa na espécie canina, a classificação ainda não está totalmente estabelecida, uma vez que o gato apresenta maior variabilidade de tecidos e órgãos acometidos. Assim, os linfomas podem ser divididos em vários grupos: alimentar, mediastinal ou torácico, multicêntrico, extranodal, nodal e leucêmico. Há ainda outras formas de classificação quanto à anatomia como esplênico, hepático, misto (na presença de diferentes

locais acometidos) e ainda, atípico (VAIL, 2007). Assim como em cães, ocorre a subdivisão em estágios segundo a gravidade, de acordo com a apresentação da doença e a apresentação de sintomas clínicos (VAIL; YOUNG, 2007).

A extensão da doença pode ser determinada por meio do estadiamento clínico estabelecido com base no estadiamento do linfoma em seres humanos da Organização Mundial da Saúde (OMS), com o intuito de gerar informações prognósticas relevantes e facilitar a avaliação de protocolos de tratamento. O estadiamento do linfoma felino é dividido em cinco estágios de acordo com a disseminação da doença e acometimento da medula óssea (VAIL, 2007).

Histologicamente essa neoplasia é classificada de acordo com o tipo celular, arquitetura e morfologia das células afetadas (linfocítico, de células pequenas, linfoblástico, de células gigantes) (RICHTER, 2003). A classificação por imunofenótipo utilizada em humanos e em cães, embora também possa ser aplicada aos felinos, não parece apresentar valor prognóstico, pois o linfoma em felinos está relacionado à distribuição geográfica, influências genéticas e associação aos retrovírus (VAIL, 2007).

De qualquer modo, na espécie felina parecem predominar os linfomas de linfócitos B (cerca de 70%), no entanto, a forma mediastinal, formas leucêmicas e hepáticas são, em sua maioria, derivadas de células T (VAIL; MOORE; OGILVIE; VOLK, 1998; ETTINGER, 2003; SMITH, 2006; VAIL, 2007). Em um estudo de casos de Vezzali et al. (2010), com classificação histológica de 48 casos de linfomas em felinos, houve predomínio de linfoma de linfócitos T. Há também, descrições sobre a presença de linfomas de células NK e linfomas do tipo Hodgkin, com a descrição de células similares às de Reed Sternberg (WALTON; HENDRICK, 2001).

Segundo a classificação anatômica, o linfoma mediastinal envolve o timo, mediastino e linfonodos esternais e hilares (SEO et al., 2006; SMITH, 2006). Esse tipo de tumor geralmente está associado ao FeLV, possui alta prevalência em animais da raça siamesa e outras raças orientais. Acomete felinos jovens com idade média inferior a cinco anos e tem como sintomas distrição respiratória aguda, tosse, disfagia, anorexia, perda de peso, ptialismo, êmese e/ou regurgitação. Os sintomas estão associados ao acúmulo de líquido no espaço pleural, com características de pseudoquilo e/ou hemorrágico (SMITH, 2006). Linfonodomegalia periférica, quando

presente, está normalmente associada aos linfonodos submandibulares, axilares e cervicais superficiais (ETTINGER, 2003; SMITH, 2006; VAIL, 2007).

O linfoma alimentar é considerado a forma mais comum de linfoma em felinos. Acomete animais idosos, com idade média de 10 a 12 anos e pode comprometer todo o trato gastrointestinal incluindo o fígado (RICHTER, 2003; SMITH, 2006; VAIL, 2007; LINGARD et al., 2009; POHLMAN et al., 2009). Pode ser observado na cavidade oral (incluindo mucosa gengival e tonsilas), esôfago, estômago, duodeno, intestino grosso, linfonodos mesentéricos e pâncreas, ocorrendo na forma de massa focal ou infiltrado difuso, podendo também atingir rins e baço (ZWAHLEN et al., 1998; HAYES, 2006; SMITH, 2006; WILSON, 2008; VAIL, 2009). Segundo a literatura 50 a 80% desses linfomas acometem o duodeno, aproximadamente 25% o estômago, junção íleocecóclica e cólon (SMITH, 2006; VAIL, 2007; WILSON, 2009; POHLMAN et al., 2009). Os sintomas associados ao linfoma alimentar incluem anorexia, perda de peso, êmese, diarreia, letargia, poliúria e polidipsia. Ao exame físico pode ser evidente a presença de massa abdominal, espessamento intestinal e linfonodomegalia mesentérica. Geralmente os animais acometidos são sorologicamente negativos para FeLV, entretanto, alguns animais sorologicamente negativos, podem ser positivos quando submetidos a técnicas de PCR, sugerindo uma possível infecção inicialmente debelada, mas com transformação maligna das células linfóides (TWOMEY; ALLEMAN, 2005). Alguns trabalhos sugerem a associação do vírus FIV com o desenvolvimento do linfoma alimentar (WILSON, 2008). Ressalta-se que o linfoma alimentar tem como diagnóstico diferencial a doença intestinal inflamatória e intolerâncias alimentares, sendo necessários biópsia intestinal e exame histopatológico para um diagnóstico definitivo (SMITH, 2006; VAIL, 2007).

O linfoma multicêntrico ou atualmente também denominado nodal envolve principalmente, linfonodos periféricos, podendo acometer também órgãos abdominais como o fígado e o baço e a medula óssea. Os sintomas ocorrem de forma variável, desde animais assintomáticos a gatos apresentando anorexia, perda de peso, linfonodomegalia generalizada e hepatoesplenomegalia (SMITH, 2006). O acometimento de linfonodos periféricos ou de uma única cadeia de linfonodos é considerada infreqüente, manifestando-se em cerca de 4 a 10 % dos casos (SMITH, 2006; VAIL, 2007). Walton e Hendrick (2001) descrevem a presença de forma

denominada *hodgkin's like* em felinos. Essa apresentação semelhante ao linfoma de Hodgkin em seres humanos acomete linfonodos isoladamente ou cadeia de linfonodos, como submandibulares e cervicais, com semelhanças quanto à apresentação histopatológica, onde há presença de uma população heterogênea de linfócitos, células inflamatórias e células denominadas Reed Sternberg (células gigantes e multinucleadas) sem associação com a presença de retrovírus.

A forma extranodal compreende os linfomas ocular, renal, nasal, cutâneo e de sistema nervoso central. Há relatos de linfomas envolvendo laringe, mucosa gengival, traquéia e musculatura. O desenvolvimento dessas outras formas de ocorre devido ao estímulo oncogênico do tecido linfóide, que pode desenvolver-se a partir de um único linfócito e afetar qualquer órgão ou tecido (COUTO; HAMMER, 1994; SMITH, 2006; TAYLOR et al., 2009).

Dos tumores nasais, o linfoma é considerado o mais freqüente em felinos, acometendo animais entre 9 a 12 anos geralmente é localizado, em 10% dos casos está confinado a nasofaringe, enquanto 8% envolvem a cavidade nasal e orofaringe (LITTLE; PATEL; GOLDSCHMIDT, 2007; VAIL, 2007; HANEY et al., 2009).

Nódulos solitários e eritematosos ou em distribuição generalizada podem ser observados em linfomas cutâneos, que acometem felinos idosos (10 a 12 anos) e FeLV negativos (SMITH, 2006; VAIL, 2007). Existem duas formas distintas tanto histológica quanto imunohistologicamente. No gato, como na maioria das espécies, a forma epiteliotrópica é derivada de linfócitos T, enquanto a não epiteliotrópica, de linfócitos B (LORIMIER, 2006; SMITH, 2006; VAIL, 2007).

O linfoma de sistema nervoso central pode ser intracranial e espinhal. O intracranial está associado à presença de convulsões, alterações de nervos cranianos, ataxia, andar em círculos, amaurose, tremor de intenção, anorexia, letargia, agressividade e hiperestesia. Quando na presença de linfoma espinhal ocorre paresia e paralisia de membros com ou sem assimetria e, nestes casos, cerca de 80 a 90% estão associados à presença de FeLV (SMITH, 2006; VAIL, 2007).

Na presença de acometimento renal, é comum o encontro de aumento de volume do órgão acometido e manifestam-se os sintomas decorrentes de doença

renal crônica como poliúria, polidipsia, perda de peso e anorexia (COUTO; HAMMER, 1994; SMITH, 2006; VAIL, 2007). Em aproximadamente 33% dos casos encontram-se também sinais de envolvimento sistêmico (SMITH, 2006; VAIL, 2007).

O prognóstico da doença está relacionado à idade, estadiamento do tumor, classificação morfológica, imunofenótipo, índice de proliferação celular, índice mitótico (MOONEY et al., 1989; VAIL, 2007). Segundo Richter (2003), o fator prognóstico mais importante é a resposta inicial à quimioterapia. Sabe-se, entretanto, que o prognóstico e o tratamento podem ser complicados pela presença de síndromes paraneoplásicas.

Síndromes paraneoplásicas são definidas como alterações sistêmicas diretas e indiretas do tumor em seu hospedeiro, não relacionadas com lesões metastáticas, algumas vezes reconhecidas antes da evidência clínica da doença neoplásica (OGILVIE, 1992; COUTO; HAMMER, 1994; FINORA, 2003; BERGMAN, 2007). A presença dessas síndromes pode ser reconhecida como um dos primeiros sinais de malignidade. As alterações orgânicas são causadas por pequenas moléculas liberadas na circulação pelas células tumorais, causando efeito em locais distantes do foco principal do tumor, sendo estas responsáveis pelo aumento da morbidade e levando a intercorrências durante o tratamento (BERGMAN, 2007). As principais síndromes descritas em felinos são as alterações hematológicas, caquexia, hipercalcemia, gamopatia monoclonal ou síndrome de hiperviscosidade, hipoglicemia, osteopatia hipertrófica e polimiosite (FINORA, 2003; SMITH, 2006, BERGMAN, 2007).

Dentre as alterações hematológicas descritas, a presença de trombocitopatias e anemias constituem as mais freqüentes, além de leucocitose neutrofílica e coagulopatias (BERGMAN, 2007). A anemia corresponde à síndrome mais descrita em oncologia veterinária e em medicina humana, sendo sua incidência de até 25%. Há numerosas causas possíveis para o desenvolvimento de anemia em pacientes oncológicos: perda sanguínea, anemia hemolítica imunomediada, anemia hemolítica microangiopática, infiltração neoplásica em medula óssea, hiperesplenismo e anemias associadas à doença crônica (FINORA, 2003).

A anemia da doença crônica é caracterizada pela redução na vida média das hemácias circulantes, distúrbios do metabolismo do ferro e depressão da resposta

medular (OGILVIE, 1992). Esses mecanismos atuam de forma isolada ou em associação (FINORA, 2003; BERGMAN, 2007). A anemia da doença crônica é considerada a mais freqüente na presença de neoplasias, pois com a progressão tumoral ocorrem alterações do metabolismo de ferro, isto em associação a diminuição da vida média das hemácias, além do decréscimo da resposta medular à menor concentração de eritrócitos (hipoproliferação). Neste caso é característica a presença de anemia normocítica normocrômica (FINORA, 2003).

Em determinados tipos de tumores, a perda de sangue gera diminuição das concentrações de hemoglobina, caracterizando uma anemia do tipo microcítica e hipocrômica. A trombocitopenia pode manifestar-se secundariamente devido a perda crônica de sangue aliada a diminuição das concentrações de ferro, que é gerada pelo seqüestro deste por macrófagos circulantes (GABOR; CANFIELD; MALIK, 2000; BERGMAN, 2007). Em um recente estudo de Leal (2009) houve diferenças estatísticas significantes entre felinos com linfoma e animais considerados clinicamente normais, em relação à contagem global de eritrócitos, volume globular e hemoglobina. Em um estudo similar de Krick et al. (2008) com 45 gatos apresentando linfoma, 26 destes apresentavam anemia.

Considera-se também que, em felinos com linfoma, a anemia pode estar presente como resultado da associação desta enfermidade aos retrovírus felinos (FIV e FeLV). Esses vírus agem de forma direta produzindo citotoxicidade ou indiretamente por meio da produção de moléculas que inibem a proliferação celular, gerando anemia não regenerativa e processos hemolíticos secundários. A anemia decorrente de infecção por FeLV é caracterizada pela presença de macrocitose (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002).

A anemia hemolítica imunomediada (AHIM) é descrita em animais e humanos, gerando destruição das células por meio da ação do sistema imunológico (FINORA, 2003; BERGMAN, 2007). Esse tipo de anemia pode estar associado à presença de retrovírus, como já descrito ou devido a reações imunológicas contra eritrócitos na presença de processos neoplásicos ou agentes infecciosos como micoplasmas hemotrópicos (KOHN et al., 2006).

Além disso, com a progressão tumoral, alterações metabólicas levam à perda da diferenciação celular e, um exemplo significativo dessas alterações é o efeito do

estresse oxidativo, a partir da produção de radicais livres (VALDIVIA et al., 2009; VIVIANO et al., 2009).

Radicais livres (RL) são estruturas químicas que possuem elétrons desemparelhados, tornando-os instáveis e altamente reativos, combinando-se a diversas moléculas integrantes da estrutura celular em busca de um estado de equilíbrio. O elétron livre, que caracteriza os RL, pode estar em um átomo de hidrogênio, oxigênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Existem duas importantes substâncias que podem gerar RL, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; JÚNIOR et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

As moléculas de O_2 são consideradas bi-radicais e reagem preferencialmente com moléculas de configuração semelhante. A maioria das biomoléculas não são consideradas bi-radicais, possuindo grande número de ligações covalentes, impedindo o oxigênio de reagir com as mesmas, evitando que alvos importantes sejam lesados. No entanto, o O_2 pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons (JÚNIOR et al., 2001)

Espécies reativas de oxigênio (ERO) representam um termo utilizado não apenas para a presença de radicais livres de oxigênio, mas também para alguns derivados do oxigênio capazes de gerar RL, como o peróxido de hidrogênio. As ERO são formadas de forma endógena, durante o metabolismo celular ou de forma exógena por meio de exposição ao álcool, tabaco, drogas e radiação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, inclusive podendo resultar na morte celular. Esse tipo de lesão oxidativa é definido como estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JÚNIOR et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007).

Em sistemas biológicos a membrana celular constitui um dos focos de ação das ERO. Além das membranas celulares, as membranas das organelas

intracelulares, tais como mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo também são afetadas (VALKO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007). Os peroxissomos são ricos em enzimas, como a xantina oxidase, que geram peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PERON et al., 2001). As enzimas envolvidas na via de produção de prostaglandinas e tromboxanos e a NADPH-oxidase da membrana plasmática de macrófagos produzem grande quantidade de ERO em resposta ao estímulo fagocitário (JÚNIOR et al., 2001).

Dentre as principais espécies reativas ao oxigênio destacam-se o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o mais comum e abundante nas células e formado por ação das células fagocitárias como neutrófilos, monócitos e macrófagos. As células fagocíticas produzem quantidades significantes de radical superóxido durante a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH-oxidase presente na membrana dessas células. Dentre as substâncias de interesse biológico que sofrem oxidação gerando o radical superóxido incluem-se a hemoglobina, a mioglobina e as catecolaminas (VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2007; BARELLI et al., 2008; CIMEM, 2008).

Ainda destaca-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), devido à sua capacidade de gerar o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$). O H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron origina o radical hidroxila, que é extremamente reativo e com alta capacidade de gerar danos celulares, já que o organismo não apresenta sistema enzimático de defesa para este radical (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000; VASCONCELOS et al., 2007). O radical hidroxila pode ocasionar modificações em bases purínicas e pirimidínicas gerando mutações de DNA, inativação de proteínas celulares, oxidação de ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, culminando com o processo de lipoperoxidação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SHACTER et al., 2000; DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004).

As células normais são protegidas do efeito tóxico das altas concentrações de oxigênio reativo, gerado durante o metabolismo celular, por meio de defesas antioxidantes (OBERLEY; OBERLEY, 1997). As enzimas antioxidantes são consideradas como a primeira linha de defesa celular e incluem superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPX) e catalase (CAT). As catalases,

localizadas predominantemente nos peroxissomos, fazem a conversão do peróxido de hidrogênio em água. A superóxido dismutase faz a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (CENTER, 2004). Além disso, são descritos como antioxidantes não enzimáticos o ácido ascórbico (vitamina C), o α tocoferol (vitamina E), a glutathione oxidase (GSSG), carotenóides, flavonóides dentre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALKO et al., 2006; VASCONCELOS et al., 2007; VALKO et al., 2007; CIMEM, 2008).

As enzimas antioxidantes participam de uma série de eventos celulares como comunicação intercelular, regulação de sistemas mensageiros secundários, modulação de agentes inflamatórios e principalmente, a regulação da apoptose celular (HAYEK, 2005; KARIHTALA; SOINI, 2007).

A peroxidação lipídica é um processo complexo, que ocorre em múltiplos estágios e poderia ser utilizada, junto a outras reações, para avaliação do estado oxidativo (DOTAN et al., 2004). Os produtos da lipoperoxidação são aldeídos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), derivado da ruptura de ácidos graxos polinsaturados, tais como o ácido linoléico, araquidônico e docosaexanóico (VASCONCELOS et al., 2007). A peroxidação dos ácidos graxos da membrana celular pelos radicais livres leva a um aumento de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) expressas pelo ácido malondialdeído (MDA), que é um indicativo de presença de estresse oxidativo (VANDOVICH et al., 2006). O MDA formado durante a peroxidação lipídica reage com o TBARS gerando um composto detectado por espectrofotometria (DUMONT et al., 1992). O MDA é conhecido como mutagênico em células de mamíferos e carcinogênico em ratos, podendo reagir também em bases de DNA por meio da peroxidação lipídica (JÚNIOR et al., 2001; VALKO et al., 2006; VALKO et al., 2007). Embora níveis elevados de peroxidação lipídica tenham sido relatados em pacientes com diferentes tipos de neoplasias, até o momento ainda não existem evidências suficientes de que danos oxidativos possam ser considerados como marcadores tumorais, mas é possível que o dano gerado ao DNA possa induzir a mutagênese (GUVEN et al., 2000; KAYA et al., 2005; KARITHHTALA; SOINI, 2006; VALKO et al., 2006).

A membrana celular dos eritrócitos felinos contém grande número de grupos sulfidrilas e os oxidantes convertem estes grupos tióis a componentes de dissulfeto,

levando à desnaturação as proteínas de membrana da célula. Na presença de lesão intracelular ocorre oxidação de hemoglobina à metahemoglobina, que precipita e forma corpúsculos de Heinz (CH). A associação entre a lipoperoxidação, a formação de corpúsculos de Heinz e a oxidação dos grupos sulfidrilas podem promover a lesão da membrana eritrocitária (CHRISTOPHER, 1989; MATSUBARA; FERREIRA, 1997; GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000).

Os danos cumulativos resultantes da ação oxidante endógena parecem ter importância na remoção dos eritrócitos da circulação por células fagocitárias mononucleares, diminuindo a vida média dos eritrócitos circulantes (HARVEY, 2006; CIMEN, 2008).

A morte celular ocorre por vias distintas como necrose ou apoptose, quando na presença de ERO, ocorre perda da integridade da membrana e perda da homeostase celular (CIMEN, 2008).

A hemoglobina felina é mais susceptível a processos oxidativos do que outras espécies devido à presença de 8 a 10 radicais sulfidrilas, enquanto a dos cães, por exemplo, apresenta quatro radicais (WEBB et al., 2006). Portanto, reduções intracelulares de enzimas antioxidantes podem gerar hemólise ou seqüestro destes eritrócitos. Portanto, os eritrócitos felinos são mais susceptíveis ao estresse oxidativo (ALLISON et al., 2000; CENTER et al., 2005). Em um trabalho de Christopher (1989) com felinos apresentando anemia por corpúsculos de Heinz em decorrência de diversas doenças (linfoma, doença renal crônica e diabetes mellitus e hipertiroidismo), a concentração média de GSH foi significativamente inferior em gatos com corpúsculo de Heinz em comparação ao grupo controle. No mesmo estudo houve correlação significativa entre a formação de corpúsculos de Heinz em animais com linfoma.

Segundo Center et al. (2005) felinos apresentam menor atividade hepática da enzima glucuronil-transferase, o que resulta em uma inabilidade em conjugar metabólitos oxidantes. Os autores demonstraram ainda, diminuição das concentrações de GSH em tecido hepático e intraeritrocitário em gatos com hepatopatia crônica.

Os eritrócitos, de modo geral, apresentam a capacidade de sintetizar grandes quantidades de GSH a partir dos aminoácidos precursores, para manutenção do estado redox. Os gatos necessitam de maiores quantidades de aminoácidos como metionina e cisteína em comparação a outras espécies, e apresentam uma relativa inabilidade em regular seu metabolismo de aminoácidos (CENTER et al., 2005; DENZOIN et al., 2008). Allison et al. (2000) e Webb et al. (2003) demonstraram essa inabilidade e a fragilidade eritrocitária em modelos de lesão oxidativa por meio da administração de acetaminofeno e mensurações da GSH sanguínea e também nos tecidos hepáticos.

A glutathione é o antioxidante de maior concentração e de maior importância no ciclo redox. Essa molécula possui várias funções vitais como a detoxificação eletrofílica, manutenção do equilíbrio tiólico, prevenção da oxidação de grupos sulfidrilas, varredura de RL, reservatório de cisteína, modulação do processo celular da síntese de DNA e a função imune. A maior parte da glutathione está presente no citosol e menores quantidades são encontradas nas mitocôndrias e no retículo endoplasmático (LU, 1999).

A GSH é um antioxidante não enzimático, um tripeptídeo de baixo peso molecular existente nas células hepáticas, eritrócitos, epitélio intestinal e células renais (MEYER et al., 1998, CENTER, 2004; 2005). O fígado é o local de maior concentração de glutathione, e é o órgão responsável pela biossíntese desta molécula, gerada pela conversão da metionina em cisteína, portanto, para que ocorra a sua síntese se faz necessária a disponibilidade desse aminoácido, que é proveniente da dieta e da sua adequada metabolização hepática (DROGE, 2002; WEBB et al., 2003; CENTER, 2004; CENTER, 2005; VIVIANO et al., 2009; WEBB; FALKOWISK, 2009).

Center et al. (2005) descrevem que, em condições normais, a GSH é encontrada em altas concentrações no sangue, e mais de 98% está localizada nos eritrócitos devido às altas concentrações de oxigênio, presença de grupos sulfidrilas na hemoglobina e grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados. Ainda, segundo os mesmos autores, os eritrócitos possuem capacidade de sintetizar a GSH a partir de seus aminoácidos precursores como o glutamato, cisteína e glicina.

(Fonte: WEBB; TWEDT, 2008).

No metabolismo da glutathione, ocorre doação de elétrons gerando outras formas deste antioxidante, presente no tecido e plasma sob a forma reduzida, oxidada, como a glutathione peroxidase (GPX) e glutathione-redutase (GR) (CENTER 2004; MANDELKER, 2008). O ciclo redox da glutathione pode ser ativado pelo peróxido de hidrogênio e outros peróxidos. Este ciclo tem a capacidade de promover constante suprimento de glutathione reduzida por meio da redução de dissulfídicos pela glutathione redutase, promovendo a eliminação dos radicais peróxido. Por fim, a glutathione-S-transferase catalisa a conjugação de glutathione na forma reduzida com compostos tóxicos e xenobióticos. Para manter o ciclo redox, a glutathione oxidada é reduzida novamente para glutathione por meio da glutathione redutase (GR) com gasto de energia (MEYER et al., 1998; DICKINSON; FORMAN, 2002; CENTER, 2004; MANDELKER, 2008).

A GR é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e dependente também da via das pentoses, ou seja, sob condições de deficiência de glicose há prejuízo da sua função. Esta enzima recupera a GSH após a sua oxidação, mantendo íntegro o sistema de proteção celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A GR não age diretamente na remoção de espécies reativas ao oxigênio, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) e tem como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutathione (JÚNIOR et al., 2001). A razão entre a glutathione reduzida e oxidada em células normais é alta, pois existe mecanismo para reduzir a glutathione oxidada à glutathione pela ação da GR. Sob intenso estresse oxidativo, a habilidade da célula de reduzir a glutathione oxidada para glutathione pode ser excedida, levando ao acúmulo de glutathione oxidada no citosol (CENTER 2004; MANDELKER, 2008).

Peróxidos orgânicos são reduzidos pela GPX ou pela glutathione-S-transferase (MEYER et al., 1998; DICKINSON; FORMAN, 2002; CENTER, 2004; MANDELKER, 2008). A GPX é considerada um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres. A principal ação da GPX é controlar os níveis de

peróxido de hidrogênio e hidrogênios lipídicos, oriundos do ataque de ERO. Essa enzima antioxidante é denominada selenoenzima, ou seja, utiliza o selênio como cofator, oxidando a glutathione ao seu dissulfeto correspondente denominado glutathione oxidada (GSSH). A deficiência de selênio no organismo gera diminuição da atividade desta enzima em sua forma reduzida e tem sido associada com alterações no metabolismo celular (JÚNIOR et al., 2001).

Uma das principais funções da glutathione peroxidase nos eritrócitos é de eliminar o H_2O_2 e outros hidroperóxidos que podem danificar a hemoglobina e gerar quebra de fosfolipídios de membrana celular (WINTER et al., 2009).

Na figura abaixo (figura 1) é possível observar as diversas vias de formação de ERO, assim como o processo de peroxidação lipídica, a via redox da glutathione e a presença dos demais antioxidantes (vitamina E, vitamina C) durante o processo de estresse oxidativo.

Fonte: Valko et al., 2007.

Figura 1 - Mecanismo de ação dos antioxidantes. Na primeira reação ocorre a formação do radical superóxido por meio da redução do oxigênio molecular mediado por NADPH e xantina oxidase. Na segunda reação o radical superóxido é dismutado pela SOD em peróxido de hidrogênio. Na terceira reação o peróxido de hidrogênio sofre ação da GPX. Na quarta reação a glutathiona oxidada (GSSG) é reduzida a GSH pela ação da GR. Na quinta reação os metais podem gerar quebra do peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxil (reação de Fenton). Na sexta reação, o radical hidroxil abstrai elétrons dos ácidos graxos poliinsaturados. Na sétima reação os radicais lipídicos sofrem o processo de peroxidação (reações 18-23 e 15-17). Na oitava reação o radical lipídico é reduzido entre a membrana pela forma reduzida da vitamina E, resultando na formação de hidroperóxidos. Na nona reação ocorre a regeneração da vitamina E pela vitamina C. Na décima reação ocorre regeneração da vitamina E pela ação da GSH. Na décima primeira reação a GSSG e o radical ascorbil são reduzidos a GSH. Na décima segunda reação ocorre regeneração do ácido dihidroxilipólico. Na décima terceira reação os hidroperóxidos são reduzidos a alcoóis pela ação da GPX usando a GSH como doadora de elétrons. O processo de peroxidação lipídica ocorre nas reações 13 a 19. A vigésima reação demonstra a formação de componentes intermediários do MDA. Nas reações de 21 a 23 o MDA reage com o DNA.

A SOD corresponde a uma família de enzimas denominadas metaloenzimas, presentes no citosol na forma de SOD-cobre-zinco (Cu/ZnSOD) enquanto na mitocôndria como SOD-manganês (MnSOD) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Esta enzima cataliza a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 , radical menos reativo que será degradado por outras enzimas como a glutathiona peroxidase e catalase até gerar O_2 (VALDIVIA et al., 2009). A Mn-SOD é considerada um dos principais antioxidantes com ação antitumoral. Estudos experimentais indicaram que

anormalidades na atividade desta enzima aumenta o potencial invasivo das células cancerosas (VALKO et al., 2006).

A maioria das análises de SOD é realizada de forma indireta. A atividade da enzima é mensurada a partir do grau de inibição da reação a que o eritrócito foi submetido (VASCONCELOS et al., 2007). A expressão de SOD encontra-se diminuída em diversas condições que geram estresse oxidativo como doenças crônicas e no câncer (VALDVIA et al., 2009). Em estudos de felinos apresentando doença renal crônica (DRC) e diabetes mellitus (DM) houve diminuição dos níveis de SOD em relação ao grupo controle (SANTOS, 2005; WEBB; FALKOWSKI, 2009), assim como a atividade desta enzima encontra-se também alterada durante a infecção aguda pelo vírus da imunodeficiência felina (WEBB et al., 2008). Alterações nos níveis de SOD foram descritas em cães e humanos com linfoma (GONZALES et al., 1984; BEWICK et al., 1987; GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000; KAYA et al., 2005; VAJDOVICH et al., 2005). Em outros estudos usando camundongos *knockout* com deficiência de SOD, houve anemia decorrente de maior vulnerabilidade dos eritrócitos devido tal deficiência, uma vez que há incapacidade de reduzir o dano gerado por ERO às proteínas celulares, diminuindo a vida média das hemácias circulantes (IUCHI et al., 2007; GRZELAK et al., 2008).

As alterações do estado redox também podem ser estimadas a partir da avaliação do estado antioxidante total (TAS). O TAS reflete a capacidade global do plasma para prevenir o dano celular por meio dos radicais livres, gerando informação sobre todos os antioxidantes do organismo, incluindo enzimáticos e não enzimáticos (ANDRESSEN; REGUEIRA; LEIGHTON, 2006; TORUN, et al., 2009; KEEGAN; WEBB, 2010). Em recente estudo em cães apresentando linfoma multicêntrico foi possível observar alterações no estado redox constatada por meio da diminuição dos valores de TAS (UBUKATA, 2010).

Com a progressão tumoral, as células passam a sofrer estresse oxidativo, decorrente de alterações intrínsecas nos níveis de antioxidantes como a glutathiona e a associação com as outras enzimas citadas. O estresse oxidativo leva a um aumento significativo de resistência aos radicais peróxidos induzindo a morte celular precoce. As células tumorais são responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo por gerarem radicais livres e levar à diminuição das enzimas antioxidantes

(OBERLEY; OBERLEY, 1997; MEYER et al., 1998; LADAS et al., 2004). Diversos autores relatam que os RL participam de processos de iniciação ou progressão tumoral, devido aos danos que causam ao DNA celular. Com já descrito, o radical hidroxila pode gerar alterações como a quebra de cadeias e induzir mutações ou alteração da apoptose celular (BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004; VALKO et al., 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007; VALKO et al., 2007; BARELLI et al., 2008).

Além dos danos diretos ao DNA, os produtos resultantes da peroxidação lipídica e protéica também apresentam caráter mutagênico e podem colaborar com a progressão em processos carcinogênicos (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990; BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004; VALKO et al., 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007; BARELLI et al., 2008).

Atualmente têm-se relatado a presença de produtos mutagênicos de DNA celular induzidos pela presença de ERO, com destaque para a 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG), comprovadamente descrito em associação ao desenvolvimento de câncer em fumantes (BARELLI et al., 2008). Aumentos dos níveis de 8-OHdG são descritos em processos inflamatórios crônicos em fígado e intestino, no câncer de colón e mama, pacientes com artrite reumatóide e diabetes tipo 2 em seres humanos (HALLIWELL, 2002; BARELLI et al., 2008). Essas alterações podem não ser só decorrentes de danos ao DNA, mas também uma diminuição na eficiência dos sistemas de reparo celular e dos danos que podem ocorrer em genes que codificam proteínas funcionais como o p53 (HALLIWELL, 2002).

O estresse oxidativo pode se manifestar por alterações do estado redox da glutathiona, aumento da peroxidação lipídica, ou na diminuição das enzimas antioxidantes. Um aumento da peroxidação lipídica eritrocitária pode gerar uma destruição precoce dos eritrócitos e reduzir a atividade de neutrófilos, diminuindo sua habilidade em combater patógenos bacterianos, resultando em infecções crônicas e de repetição (GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000; TREITINGER et al., 2000; GIL et al., 2003; WEBB et al., 2006; VALKO et al., 2007; WEBB; FALKOWISK, 2008).

Com a redução nos eritrócitos circulantes, a hipóxia gera alterações no metabolismo celular, aumenta o fluxo de catecolaminas e gera excessiva e

constante ativação de leucócitos. A liberação de mediadores inflamatórios e a ativação de leucócitos promovem a formação de radicais livres, esses mecanismos são confrontados frente a um mecanismo antioxidante enfraquecido devido à anemia. Os eritrócitos, que representam o maior componente de capacidade antioxidante do sangue, a partir das suas enzimas intracelulares, não conseguem manter o ciclo redox diante do consumo constante e cada vez mais deficiente (GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000).

Ainda não está completamente esclarecido se o estresse oxidativo verificado em células tumorais resulta de um aumento na produção de oxidantes ou de falhas nos mecanismos de defesa e parece não haver um comportamento padrão das defesas antioxidantes que seja característico do câncer (TOYOKUNI et al., 1995). As células tumorais estão freqüentemente em hipóxia, o que pode alterar as defesas antioxidantes (KARIHTALA; SOINI, 2007), assim, é possível que alterações relacionadas aos mecanismos oxidantes e antioxidantes possam, potencialmente, induzir a redução da vida média dos eritrócitos e representar um dos fatores envolvidos no desencadeamento da anemia como síndrome paraneoplásica.

2 OBJETIVOS

Devido a não existência de estudos sobre o estresse oxidativo eritrocitário em gatos apresentando linfoma, o presente estudo teve como objetivos determinar as concentrações eritrocitárias de glutathione reduzida; as atividades das enzimas antioxidantes eritrocitárias glutathione redutase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase; além da avaliação da presença de peroxidação lipídica por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico obtida pela concentração plasmática de malondialdeído e mensuração do estado antioxidante total em gatos hígidos e gatos com linfoma.

3 MATERIAL E METODOS

3.1 ANIMAIS

Os animais utilizados neste estudo foram divididos em dois grupos distintos.

3.1.1 Grupo de Experimental (grupo de estudo)

Foram avaliados 17 animais da espécie felina, de idades variadas, machos ou fêmeas, com ou sem definição racial, provenientes do atendimento do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina e Zootecnia da Universidade de São Paulo e demais centros particulares de atendimento, com diagnóstico de linfoma de qualquer natureza, sem ter recebido qualquer tratamento antiinflamatório e/ou quimioterápico prévios. Foram excluídos os animais que apresentassem afecções não neoplásicas concomitantes.

O projeto em questão esteve de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para inclusão dos pacientes no grupo de animais com linfoma foram considerados dados de anamnese e exame físico, de acordo com o protocolo de atendimento do Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais, além de análise citológica ou exame histopatológico, nos casos em que a citologia não foi conclusiva.

3.1.2 Grupo Controle (gatos clinicamente normais)

Foram obtidas amostras de 23 animais da espécie felina, com ou sem definição racial, machos ou fêmeas, domiciliados ou provenientes do gatil do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, cuja anamnese, exame físico e parâmetros hematológicos e bioquímicos atestaram a higidez. As amostras de sangue obtidas foram direcionadas aos mesmos exames realizados para o grupo experimental.

3.2 AVALIAÇÃO DOS ANIMAIS

De cada animal, foram colhidos 8,0 mL de sangue por punção venosa jugular, sendo 0,5 mL de sangue acondicionado em dois microfrascos (Microtainer BD[®]) contendo Na₂EDTA, sendo um deles destinado a execução do hemograma e contagem de plaquetas, e outro para a separação de hemácias para a determinação de glutathiona reduzida (GSH). No momento da colheita foi realizada a confecção de esfregaço sanguíneo para a realização de contagem diferencial de leucócitos e contagem de plaquetas.

Para preparo da amostra de glutathiona reduzida (GSH), 200 µL de sangue contendo Na₂EDTA foi homogeneizado com 1,8 mL de água ultra pura (MiliQ-System[®]), obtendo o hemolisado. Imediatamente foram adicionados 3,0 mL da solução precipitante (1,67g de ácido metafosfórico glacial; 0,20g de EDTA; 30,0 g de NaCl; em 100 mL de água purificada) e o material foi mantido em repouso por 5 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado a 1900G a 4°C durante 5 minutos. O sobrenadante foi acondicionado em microtubos foscos e armazenado em freezer a – 70°C em um período máximo de 90 dias, até o momento da determinação da glutathiona reduzida (GSH).

Outros 4,0 mL foram acondicionados em tubo contendo heparina sódica (Vacutainer BD[®]), para a separação de eritrócitos do plasma para a determinação da atividade das enzimas eritrocitárias glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase

(GR) e superóxido dismutase (SOD), além das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA).

Os 3,0 mL restantes foram mantidos em frasco siliconizado, sem anticoagulante (Vacutainer BD[®]), que foi centrifugado 1900 G durante 10 minutos para obtenção de soro sanguíneo e aliquoteado para a realização de testes sorológicos para retrovírus e análises bioquímicas. O plasma restante foi acondicionado em microtubos foscos e armazenado em freezer a – 70°C em um período máximo de 120 dias para realização da determinação do estado antioxidante total (TAS).

O sangue heparinizado foi centrifugado a 4°C, em 1900 G durante 15 minutos, o plasma separado foi acondicionado em microtubos foscos, identificado e armazenado em freezer a – 70°C em um período máximo de 90 dias para a realização da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA).

Na papa de eritrócitos proveniente da centrifugação, foi adicionada solução salina tamponada e em seguida realizada a homogeneização para nova centrifugação por 15 minutos a 1900 G em 4°C. O procedimento, denominado lavagem das hemácias, foi efetuado por mais três vezes até que fosse retirada toda a capa leucocitária. A papa de eritrócitos foi acondicionada em microtubos foscos, em alíquotas de 500 µL, e armazenado em freezer a –70°C em um período máximo de 30 dias para a realização das mensurações de glutathione peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD).

O restante da papa de hemácias foi homogenizada com água ultra pura (MiliQ-System[®]) a 4°C e deixado em repouso durante 10 minutos. Em seguida, foi realizada nova centrifugação em 1900 G, durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, cerca de 600µL, foi acondicionado em microtubos foscos e mantido em freezer a –70°C em um período máximo de 30 dias para a realização da mensuração da glutathione reductase (GR).

Todas as amostras foram preparadas dentro de 4 a 5 horas após a colheita do material.

3.3 EXAMES COMPLEMENTARES

Para ambos os grupos, foram realizados exames complementares no intuito de avaliar higidez do grupo controle e presença de demais doenças concomitantes, além de avaliar alterações relacionadas ao linfoma, no grupo experimental.

3.3.1 Hemograma

As contagens de células sanguíneas e plaquetas foram determinadas em contador automático ABCVet[®] Horiba, de uso veterinário. A contagem diferencial dos leucócitos e a avaliação morfológica de hemácias e leucócitos foram realizadas em esfregaço sanguíneo corado pelo corante de Rosenfeld. O hemograma foi realizado após o diagnóstico e antes do início do tratamento quimioterápico.

3.3.2 Bioquímica sérica

As provas bioquímicas laboratoriais referentes à avaliação hepática e renal foram realizadas utilizando-se kits comerciais, em analisador bioquímico automático (Lyasis-Roche[®] ou Labmax 240). As análises envolveram avaliação renal por meio de dosagem sérica de uréia e creatinina, e a avaliação hepática por meio de dosagem sérica de proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (FA).

3.3.3 Análise sorológica para pesquisa de retrovíroses

Como parte da avaliação geral, os animais foram submetidos aos testes de Leucemia Viral Felina (FeLV) e Imunodeficiência Viral Felina (FIV) pela técnica ELISA, utilizando-se kits comerciais Idexx[®].

3.3.4 Exames de Imagem

Foram realizadas radiografias torácicas nas posições látero-lateral e ventro dorsal, de acordo com os métodos utilizados na rotina do Serviço de Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário e Zootecnia da Universidade de São Paulo e ultrassonografia abdominal, utilizando-se transdutores de 5,0 e 7,5 MHZ, de acordo com porte e peso dos animais para fins de diagnóstico, para proporcionar o estadiamento da doença em questão, além da necessidade de exclusão de outras afecções associadas.

3.3.5 Citologia Aspirativa

Os animais do grupo de estudo foram submetidos à análise citológica por meio de punção aspirativa com uso de agulha fina, de linfonodos periféricos, quando da presença de aumento destes. Nos pacientes que apresentavam organomegalia ou presença de aumento de linfonodos abdominais foi necessária a realização de punção guiada por ultrassom. Nos casos em que a doença apresentou quadros efusivos foi possível realizar a análise citológica dos fluidos para estabelecer diagnóstico.

O material colhido foi corado pela técnica de Rosenfeld e analisado em microscópio óptico.

3.3.5 Análise Histopatológica

Nos gatos em que o diagnóstico citológico não foi conclusivo, ou ainda em que não houve possibilidade de realização deste, foi necessária a realização de biópsia e análise histopatológica. Os animais foram encaminhados para o Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo ou às demais clínicas particulares onde esses animais foram atendidos. O material coletado foi fixado em formol a 10% e enviado ao Serviço de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo ou centros particulares especializados em análise histopatológica, sendo processado de forma habitual.

3.4 DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A determinação de glutathione reduzida no sangue foi realizada pelo método do ácido ditionitrobenzóico (DTNB), descrito por Beutler et al. (1963).

Em 200 µL do sobrenadante que fora estocado, foram adicionados 0,8mL de solução de tampão fosfato (42,6 g de NaHPO em 1000 mL de água purificada). Esta solução foi transferida para cubetas de leitura no espectrofotômetro, onde foram acrescentados 100 µL de ácido ditionitrobenzóico (1,0 g de citrato de sódio; 40,0 mg de DTNB em 100 mL de água purificada) e a leitura efetuada em até 30 segundos. A absorbância foi mensurada por espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm, e posteriormente calculada a concentração de glutathione reduzida.

Os padrões de glutathione reduzida utilizados para a confecção da curva de calibração apresentaram concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 50 mg/dL.

A concentração de glutathiona reduzida foi calculada com base na equação de reta obtida por meio da curva das soluções padrões e das leituras de densidade óptica das mesmas.

3.5 DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A atividade da glutathiona peroxidase foi determinada utilizando-se kits comerciais (Ransel 505-Randox Laboratories[®]) adequados para uso em analisador bioquímico automático (Liasys[®] ou Labmax 240). O método baseia-se na reação em que a glutathiona peroxidase catalisa a oxidação da glutathiona reduzida por um hidroperóxido. Na presença de glutathiona redutase e NADPH, a glutathiona oxidada é imediatamente convertida à forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH em NADPH⁺, a diminuição da concentração do NADPH é mensurada pela absorbância em comprimento de onda de 340nm (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

Para a determinação desta enzima, a papa de hemácias previamente armazenada em microtubos foscos foi descongelada em banho de água a 30°C. Em seguida, adicionaram-se 400 µL de água ultra pura (MiliQ-System[®]) a 4°C. Após agitação no vórtex, os microtubos foram mantidos em geladeira durante 10 minutos e em seguida, centrifugados a 1200 G durante 2 minutos. O sobrenadante foi diluído 20 vezes em diluente fornecido pelo fabricante do kit. Foram determinadas as concentrações de hemoglobina do hemolisado, com o resultado final expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

Todas as amostras de glutathiona peroxidase foram realizadas em um período máximo de 30 dias após a colheita da amostra.

3.6 DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE GLUTATINA REDUTASE (GR)

A atividade da glutathione redutase foi determinada utilizando-se kits comerciais (GR 2368 – RANDOX Laboratories®) adaptados para uso em analisador bioquímico automático (Liasys® ou Labmax 240). O método se baseia na reação em que a glutathione redutase catalisa a redução da glutathione oxidada em presença de NADPH, que é oxidado. A diminuição da concentração de NADPH foi mensurada pela absorbância em comprimento de onda de 340nm (MELISSIMOS et al., 1981).

Para a determinação da glutathione redutase, o hemolisado previamente estocado em microtubos, foi descongelado em banho de água a 30°C e centrifugado em centrífuga para microtubos a 1200 G durante 2 minutos. O sobrenadante foi então diluído 20 vezes em solução salina antes da análise. Foram determinadas as concentrações de hemoglobina do hemolisado, com o resultado final expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

Todas as amostras de glutathione redutase foram realizadas em um período máximo de 30 dias após a colheita da amostra.

3.7 DETERMINAÇÃO INTRAERITROCITÁRIA DE SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A determinação da atividade da superóxido dismutase foi realizada utilizando-se kits comerciais (SD 125 - RANDOX Laboratories®) adaptados para uso em analisador bioquímico automático (Liasys® ou Labmax 240). O método é baseado na inibição da reação entre o composto 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-feniltetrazolio cloreto e o radical superóxido que originam um composto de coloração avermelhada. Nesse método se utiliza xantina e xantina oxidase como geradores de radicais superóxido. A atividade da enzima foi mensurada pelo grau de inibição da reação em comprimento de onda de 505 nm (WOOLLIAMS; WIENER, 1983).

Para a determinação da superóxido dismutase, a papa de hemácias previamente armazenada em microtubos foscos foi descongelada em banho de água a 30°C. Em seguida, foram adicionados 400 µL de água ultra pura a 4 °C. O material foi mantido em geladeira durante 10 minutos e centrifugado em centrífuga para microtubos a 1200 G durante 2 minutos. O sobrenadante foi diluído 200 vezes em tampão fosfato 0,01 molar; pH 7,0, antes da análise. Foram determinadas as concentrações de hemoglobina do hemolisado, com o resultado final expresso em unidades de enzima por grama de hemoglobina.

Todas as amostras foram realizadas em um período máximo de 30 dias após a colheita da amostra.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DAS SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (MDA)

A determinação das concentrações plasmáticas das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico foi realizada pelo método do ácido tiobarbitúrico conforme descrito por Estebauer e Cheeseman (1990), em que se promove a reação do malondialdeído e outros aldeídos com o ácido tiobarbitúrico em meio aquecido, submetendo-se, após, ao resfriamento rápido e à mensuração da absorbância, realizada em comprimento de onda de 535nm.

Primeiramente, acrescentaram-se 500 µL de plasma da amostra padrão a 1000 µL de ácido tricloroacético a 10%; em seguida a amostra foi homogeneizada no vortéx e a mistura centrifugada a 1900 G durante 15 minutos. Após a centrifugação foram pipetados 750 µL do sobrenadante que foram adicionados a 750 µL de ácido tiobarbitúrico 1%, dissolvido em solução de hidróxido de sódio a 0,05 M. O mesmo procedimento foi realizado para os padrões e para o branco de reação que utiliza água ultra pura (MiliQ-system®). Em seguida, todos os tubos foram colocados em banho de água fervente (100°C) durante 10 minutos e resfriados em água gelada durante 5 minutos. A leitura da densidade óptica foi realizada em comprimento de onda de 532nm.

Os padrões de malondialdeído bisdimetil utilizados para a confecção da curva de calibração apresentaram concentrações de 1,5 e 10 μ molar.

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico das amostras foi calculada com base na equação de reta obtida da curva das soluções padrão e das leituras de densidade óptica das mesmas.

3.9 AVALIAÇÃO DO ESTADO OXIDANTE TOTAL (TAS)

A avaliação do estado oxidante total possibilita a avaliação do sistema antioxidante integrado que cerca todos os componentes biológicos com atividade antioxidante.

O estado antioxidante foi avaliado no plasma sanguíneo dos animais, utilizando-se o kit comercial Randox total antioxidant status-NX2332[®]. O ácido 2,2'azino dietil-benzotiazolínico (ABTS) é incubado com a peroxidase (metamioglobina) e peróxido de hidrogênio para produzir o cátion ABTS reduzido. Este é relativamente estável e apresenta coloração azul-esverdeada, a qual é mensurada a 600nm. As substâncias antioxidantes presentes na amostra impedem a reação, gerando uma redução na intensidade de cor proporcional à concentração de antioxidantes totais.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi efetuada com o auxílio de um programa estatístico computadorizado MiniTab[®] Release 15.

Os dados foram avaliados de acordo com sua distribuição e utilizados testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos para verificar a existência de diferença significativa entre os gatos clinicamente normais (grupo controle) e os gatos com linfoma (grupo experimental).

Os valores de eritrograma dos animais foram analisados descritivamente obtendo-se a média, desvio padrão e os quartis. Analisou-se a distribuição dos dados pelo teste de normalidade de Anderson-Darling. Os parâmetros que apresentaram uma distribuição normal foram comparados utilizando o teste t de student para as amostras.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para analisar os valores de glutathione reduzida, glutathione redutase, glutathione peroxidase, superóxido dismutase, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e estado antioxidante total.

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi utilizado para avaliar se existiu correlação entre as variáveis estudadas.

Foram consideradas significantes as diferenças cujo valor de " p " foi igual ou inferior a 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

A identificação dos animais do grupo experimental, constituído por 17 animais adultos, encontra-se descrita no quadro 1. Considerou-se a classificação anatômica do linfoma e o “status” com relação à infecção por retrovírus.

Com relação às raças acometidas o grupo experimental foi composto por dois siameses e 15 animais sem raça definida, sendo nove fêmeas e oito machos. A média etária do grupo foi de 10,9 anos com desvio padrão de $\pm 3,9$ anos. A frequência de infecção por retrovírus foi de 35,29% (6/17), sendo positivos para FeLV 17,64% (3/6) e positivos para FIV 17,64% (3/6) (figura 2). A idade média dos animais acometidos por FeLV foi de 4,6 anos, enquanto os animais acometidos pelo FIV apresentaram idade média de 14,3 anos.

Considerando a classificação anatômica do linfoma no grupo experimental, a frequência de apresentação foi de 58,82% (10/17) para a forma alimentar, 29,41% para a forma nodal (5/17) e 11,76% (2/17) para as formas extranodais (cutâneo) e mediastinal.

Fonte: (PINTO, C. F. 2009)

Figura 2 - Resultado de teste sorológico positivo para FIV de um dos animais (Gordinho) do grupo experimental no teste imunoenzimático para detecção de retrovírus (FeLV/FIV)

Nome	Idade	Sexo	Raça	Classificação	FeLV	FIV
Minie	11a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Bankushinza	8a	Fêmea	SRD	Nodal	Positivo	Negativo
Miu	15a	Fêmea	Siamês	Nodal	Negativo	Negativo
Kika	14a	Fêmea	SRD	Cutâneo	Negativo	Negativo
Oliver	8a	Macho	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Tininha	12a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Mustafá	3a	Macho	Siamês	Mediastinal	Positivo	Negativo
Gordinho	13a	Macho	SRD	Nodal	Negativo	Positivo
Henrique	3a	Macho	SRD	Nodal	Positivo	Negativo
Nenê	12a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Mona	13a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Felipe	19a	Macho	SRD	Nodal	Negativo	Positivo
Ritinha	11a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Positivo
Shana	11a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Bichano	12a	Macho	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
Shiro	11a	Macho	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo
PUP	10a	Fêmea	SRD	Alimentar	Negativo	Negativo

a: ano(s); SRD: sem raça definida.

Quadro 1 - Identificação, classificação anatômica do linfoma e resultados dos testes sorológicos para detecção de infecção por retrovírus, no grupo experimental - São Paulo – 2008 - 2010

O grupo controle foi constituído por 23 felinos adultos, sendo um siamês, um maine coon e 21 animais sem raça definida, 12 machos e 11 fêmeas, com idade média de 3,3 anos e com desvio padrão de $\pm 2,3$ anos. Todos os animais foram negativos no teste sorológico para detecção de retrovírus (100%) (figura 3). A identificação do grupo controle encontra-se no apêndice A.

Fonte: (PINTO, C. F. 2009)

Figura 3 - Resultado de teste sorológico dos animais do grupo controle no teste Elisa® para detecção de retrovírus (FIV/FeLV).

Os valores obtidos no hemograma dos animais do grupo experimental e grupo controle encontram-se arrolados nos apêndices B e C, respectivamente, enquanto os dados referentes às análises bioquímicas séricas estão dispostos nos apêndices D e F. Os valores considerados de referência para o hemograma foram aqueles descritos por Jain (1993), e para as análises bioquímicas séricas, os descritos por Kaneko et al. (1997).

Dos 17 animais que fizeram parte do grupo experimental apenas dois gatos apresentaram anemia no momento do diagnóstico de linfoma (11,7%). A média do hematócrito (volume globular) dos animais deste grupo foi de 33% com desvio padrão de $\pm 7,2$ e mediana de 35%. Para a contagem do número de eritrócitos e concentração de hemoglobina, os valores de média, desvio padrão e mediana foram respectivamente de $7,2 \pm 1,8$ milhões/mm³ (mediana 7,3) e $10,6 \pm 2,21$ g/dL (mediana 10,7 g/dL). No mesmo grupo foram obtidos valores de média do VCM (volume corpuscular médio) de 47,02 fL com desvio padrão de $\pm 4,9$ e mediana de 47,61, enquanto no caso do HCM (hemoglobina corpuscular média), obteve-se valores de 14,8 pg, com desvio padrão de $\pm 1,7$ e mediana de 15 pg. Por fim, para os valores de CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) foram obtidos média de 31,64 % com desvio padrão de $\pm 1,8$ e mediana de 31,8%.

No caso dos animais pertencentes ao grupo controle, a média do hematócrito (volume globular) foi de 36,2% com desvio padrão de $\pm 5,9\%$ e mediana de 36%, a

média do número de eritrócitos foi de 8,4 milhões/mm³, com desvio padrão de $\pm 1,4$ e mediana de 8,5 milhões/mm³. Para a concentração de hemoglobina do grupo controle a média foi de 12,3 g/dL com desvio padrão de $\pm 2,0$ e mediana de 12,5 g/dL. Ainda no grupo controle foram obtidos valores de média do VCM (volume corpuscular médio) de 42,70 fL, com desvio padrão de $\pm 3,3$ e mediana de 43,14 fL; enquanto no caso do HCM (hemoglobina corpuscular média), obteve-se valores de 14,7 pg de média, com desvio padrão de $\pm 1,2$ e mediana de 14,9 pg. Por fim, para os valores de CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) a média foi de 34,52% com desvio padrão de $\pm 1,6$ e mediana de 34,76%.

As descrições estatísticas acima relacionadas, além do primeiro e terceiro quartis dos valores do eritrograma de ambos os grupos encontram-se dispostos na tabela 1, assim como o valor de *p* obtido na comparação entre os mesmos.

Observaram-se diferenças estatísticas significantes entre os grupos em relação à contagem global de eritrócitos, concentração de hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os valores de hematócrito (volume globular) e hemoglobina corpuscular média (HCM), apresentando-se dentro dos valores da normalidade.

Não foram observadas diferenças significantes entre o grupo experimental e os gatos clinicamente normais quanto à análise das concentrações eritrocitárias de glutathione peroxidase, glutathione redutase e superóxido dismutase. No entanto, quanto aos valores de glutathione reduzida houve diferença significativa entre os grupos (*p*=0,0186).

Os gatos clinicamente normais apresentaram maiores concentrações eritrocitárias de glutathione reduzida quando comparados ao grupo de animais com linfoma, obtendo médias, respectivamente de 31,02 U/g Hb e 24,06 U/g Hb.

Com relação à determinação plasmática de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) não houve diferença significativa entre os grupos.

No caso da avaliação sérica do estado antioxidante total (TAS) houve diferença significativa entre os grupos analisados com *p*=0,0039. Os gatos com linfoma apresentaram média de 1,39 μ mol/L enquanto os gatos clinicamente normais

apresentaram média de 1,61 $\mu\text{mol/L}$, assim, nos animais com linfoma houve diminuição da concentração do TAS em relação aos animais normais.

Embora não apresentem diferenças estatísticas significantes, as enzimas GPX e SOD do grupo linfoma apresentaram valores médios menores em relação ao grupo controle. Para os valores de GPX foram observados 15,91U/g Hb para o grupo experimental e 17,60U/g Hb para os controles. No caso da enzima SOD pôde-se observar valores de 3857,2 U/g de Hb para o grupo experimental e 4212,00 U/g de Hb.

Quanto aos valores de GR e MDA houve diferença nos valores médios em relação ao grupo experimental e o grupo controle, embora não apresentem diferenças estatísticas significantes, observaram-se valores maiores destas enzimas nos animais com linfoma em comparação ao grupo controle. Os valores médios de GR para o grupo experimental foram de 16,86 U/g de Hb e 12,21U/g de Hb para o grupo controle. Em relação aos valores de MDA foram obtidos 0,6579 μM para o grupo experimental e 0,5658 μM para o grupo controle.

Nas tabelas 2 e 3 descrevem-se os valores de glutathiona reduzida, glutathiona peroxidase, glutathiona redutase, superóxido dismutase, MDA e TAS com valores encontrados nos dois grupos analisados, além de valores de média e desvio padrão.

O estudo da relação entre o hematócrito e glutathiona reduzida foi realizado pelo método de correlação de Pearson e observou-se correlação positiva significativa entre esses valores. O valor de p para correlação entre os valores do hematócrito dos animais com linfoma e a concentração de glutathiona reduzida foi de 0,0001. O mesmo estudo foi realizado com relação à enzima superóxido dismutase, onde houve correlação positiva significativa com $p=0,010$.

O estudo da relação entre estado antioxidante total dos animais com linfoma e os valores de hematócrito dos mesmos, analisado também pelo método de correlação de Pearson, mostrou diferença estatística significativa entre os dados analisados, apresentando $p=0,029$.

Para o estudo da relação entre as concentrações de glutathiona reduzida e estado antioxidante total houve diferença estatística significativa entre os dados analisados, com $p=0,023$.

Tabela 1: valores de média, desvio padrão, mediana, primeiro e terceiro quartil, nível de significância (p) e de referência das variáveis do eritrograma dos animais com linfoma e do grupo controle – São Paulo – 2010.

Variável	Grupo Linfoma		Grupo Controle		Valor de p	Referência*
	Média $\pm$ DP	Mediana (Q ₁ -Q ₃)	Média $\pm$ DP	Mediana (Q ₁ -Q ₃)		
Eritrócitos(X10⁶/mm³)	7,2 $\pm$ 1,8	7,3 (5,9- 8,5)	8,5 $\pm$ 1,4	8,5 (7,5 – 9,4)	0,017	5,0 – 10,0
Ht (%)	33 $\pm$ 7,2	35 (28,5 – 39,0)	36,2 $\pm$ 5,9	36 (32,4 – 40,3)	0,226	24 – 45
Hemoglobina (g/dL)	10,6 $\pm$ 2,21	10,7 (9,1 – 12,2)	12,3 $\pm$ 2,0	12,5 (11,0 – 13,8)	0,011	8,0 – 15,0
V.C.M (fL)	47,02 $\pm$ 4,9	47,61 (44 – 50,5)	42,7 $\pm$ 3,3	43,1 (40,8 – 45)	0,003	39,0 – 55,0
H.C.M (pg)	14,8 $\pm$ 1,7	15 (13,8 – 16,1)	14,7 $\pm$ 1,2	14,9 (14 – 15,66)	0,776	12,5 – 17,5
C.H.C.M (%)	31,64 $\pm$ 1,8	31,8 (30,5 – 32,9)	34,52 $\pm$ 1,6	34,7 (33,6 – 35,7)	0,000	30,0 – 36,0

Números em negrito indicam resultados com diferenças significativas ($p < 0,05$) em cada grupo.

Ht= Hematócrito (volume globular), V.C.M= Volume corpuscular médio, H.C.M= Hemoglobina corpuscular média, C.H.C.M= Concentração de hemoglobina corpuscular média.

DP= Desvio padrão, Q1= Primeiro quartil, Q3= Terceiro quartil.

* Jain, 1993.

Animal	Ht (%)	GSH (mg/dL)	GR (U/g Hb)	GPX (U/g Hb)	SOD (U/g Hb)	MDA (µM)	TAS (µM)
Safira	42	34,57	8,23	16,14	5882,71	0,470	1,70
Fred	27	19,90	7,45	16,13	2910,88	0,237	1,21
Mel	36	17,90	18,4	16,38	2859,41	0,460	1,23
Ônix	33	27,00	6,71	24,23	7465,65	0,536	1,57
Lion	27	25,78	10,03	5,05	12098,66	0,996	1,75
Kiara	35	29,12	13,34	17,13	2529,23	0,690	1,75
Lilica	31	27,00	8,78	9,41	4634,96	0,498	1,63
Marrie	32	28,21	8,88	54,04	3313,07	0,421	1,57
Lina	33	29,72	10,35	21,59	4603,89	0,575	1,54
Gato	27	15,18	26,38	12,32	6001,58	0,536	2,16
Chico	30	12,15	9,36	31,09	3850,31	0,468	1,46
Azul	40	24,87	7,97	17,16	3392,30	0,575	1,45
Dourado	44	44,87	10,36	15,86	3104,34	0,536	1,57
Vermelha	42	36,69	12,96	11,79	3392,85	0,498	1,71
Lilás	29	39,72	12,90	17,60	3883,01	0,383	1,54
Rosa	37	33,97	12,47	14,29	3770,97	1,226	1,50
Pelada	43	34,87	9,74	13,71	3642,10	0,383	1,46
Lince	41	41,24	13,25	18,72	2963,73	0,498	1,60
Tuco	38	28,21	11,27	16,50	3240,00	0,307	1,97
Tuca	43	36,69	28,44	9,65	2256,52	0,345	2,20
Teo	45	45,78	11,22	13,07	5201,01	1,724	2,50
Milu	36	30,03	9,13	18,01	2954,05	0,345	0,61
Zequinha	42	50,03	13,41	14,92	2923,68	0,307	1,50
Média	36,2	31,02	12,21	17,60	4212,00	0,5658	1,61
DP ±	5,9	9,70	5,45	9,49	2133,6	0,3338	0,37

Tabela 2 - Valores individuais, média e desvio padrão do hematócrito (Ht), das concentrações eritrocitárias de glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), das concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e concentrações do estado antioxidante total (TAS) de felinos do grupo controle – São Paulo – 2008 - 2010.

Animal	Ht (%)	GSH (mg/dL)	GR (U/g Hb)	GPX (U/g Hb)	SOD (U/g Hb)	MDA (µM)	TAS (µM)
Minie	34	26,90	7,36	18,44	2869,60	0,301	1,45
Bankushinza	37	40,57	4,02	19,60	3766,80	0,852	0,63
Miu	30	13,23	12,08	19,29	4297,34	0,470	1,13
Kika	39	35,73	5,16	20,62	2465,23	0,364	1,30
Oliver	35	25,07	19,10	21,85	2295,07	0,234	1,09
Tininha	26	18,81	4,96	7,29	2397,91	1,264	2,27
Mustafá	39	17,90	11,59	9,92	3826,20	0,421	1,34
Gordinho	22	13,06	9,69	12,94	7007,59	0,843	1,09
Henrique	34	29,12	21,60	23,28	2731,95	0,575	1,62
Nenê	25	22,15	9,90	20,89	3661,39	0,996	0,96
Mona	36	22,45	19,19	21,91	4288,69	0,613	1,34
Felipe	19	22,75	31,66	15,72	7161,50	1,226	1,03
Ritinha	37	26,39	45,69	9,24	2221,29	0,230	1,29
Shana	34	16,39	15,80	9,91	5954,83	0,766	1,30
Bichano	36	10,93	30,35	12,32	2838,39	0,421	1,27
Shiro	47	48,81	13,79	14,83	3251,88	0,383	3,12
Pup	42	18,81	24,69	12,46	4536,53	1,226	1,41
Média	33	24,06	16,86	15,91	3857,2	0,6579	1,39
Desvio padrão ±	7,2	10,09	11,23	5,18	1560,5	0,3553	0,55

Tabela 3 - Valores individuais, média e desvio padrão do hematócrito (Ht), das concentrações eritrocitárias de glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPX) e superóxido dismutase (SOD), das concentrações plasmáticas de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA) e concentrações do estado antioxidante total (TAS) de felinos com linfoma – São Paulo – 2008 – 2010

Gráfico 1 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) do hematócrito (%) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,226$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 2 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de hemoglobina (g/dL) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,011$) - São Paulo – 2008 - 2010.

Gráfico 3 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes ao número total de hemácias (milhões/mm³) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,017) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 4 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes ao volume corpuscular médio (VCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma (p=0,003) - São Paulo – 2008 - 2010.

Gráfico 5 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes à hemoglobina corpuscular média (HCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,776$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 6 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores referentes à concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,0001$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 7 – Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de glutathiona reduzida (GSH) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,018$) - São Paulo – 2008 - 2010.

Gráfico 8 - Curva de regressão entre os valores de hematócrito (volume globular) e valores de glutathiona reduzida (GSH) dos gatos clinicamente normais (controle) e com linfoma - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 9 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores glutatona peroxidase (GPX) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,945$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 10 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de glutatona redutase (GR) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,239$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 11 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de superóxido dismutase (SOD) dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,476$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 12 - Curva de regressão entre os valores de hematócrito e de superóxido dismutase (SOD) dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 13 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de malonaldeído (MDA) em μM dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,511$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 14 - Representação dos valores de mediana (linha central) e percentis de 25 e 75% (delimitação de quadriláteros) dos valores de estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos do grupo controle e do grupo linfoma ($p=0,003$) - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 15 - Curva de regressão entre os valores de hematócrito e do estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma - São Paulo – 2008 - 2010

Gráfico 16 - Curva de regressão entre os valores de glutathiona reduzida e valores do estado antioxidante total (TAS) em μM dos gatos clinicamente normais (controle) e dos gatos com linfoma - São Paulo – 2008 - 2010

5 DISCUSSÃO

No presente estudo a idade média dos animais com linfoma foi de 10,9 anos, achados compatíveis com os dados de Vail et al. (1998), com 9,5 anos e Lingard et al. (2009), em cujo estudo a média de idade relatada foi de 13 anos (9 a 18 anos), e muito próxima aos achados de Krick et al. (2008), com média de idade de 10,8 anos. Esses achados foram superiores aos encontrados por Walton e Hendrick (2001) e Teske et al. (2002) onde foram obtidas média de 6 anos de idade. Quanto à predisposição racial o grupo estudado apresentou dois animais da raça siamês e 15 animais sem raça definida. De acordo com alguns autores, a predisposição para o linfoma é maior em animais de raças orientais (COURT; WATSON; PEASTON, 1997; RICHTER, 2003), entretanto, em um estudo sobre linfoma alimentar realizado por Carreras et al. (2003) e outro de Lingard et al. (2009) houve grande acometimento de animais sem raça definida. Esse perfil, de fato, é o mais esperado em nosso meio, devido a alta frequência de cruzamentos raciais e grande número de animais sem definição racial. Não houve predileção sexual no presente estudo, achados semelhantes aos trabalhos acima citados, assim como em revisões de literatura por Smith (2006); Hayes (2006); Vail e Young (2007) e Vail (2007).

Com relação à infecção por retrovírus, no presente estudo observou-se a frequência de 35,29% (6/17), achados inferiores aos de Taylor et al. (2009) que encontraram frequência de 7,3% (10/149) de animais acometidos por retrovíruses em linfomas extranodais, porém com número notavelmente superior de animais avaliados. A infecção pelo FIV foi de 17,64% (3/17) e assim como nos estudos de Beatty et al. (1998), os animais infectados pelo vírus FIV apresentavam as formas nodais e alimentar. Esse resultado foi superior ao encontrado por Leal (2009), em um estudo com 14 animais em São Paulo (7,14%), e inferior àqueles encontrados no estudo australiano de Court, Watson e Peaston (1997) com achados de 36 a 46% de infecção por retrovírus nos animais acometidos por linfoma. As diferenças encontradas podem ser reflexos de diferentes prevalências deste vírus na população felina, de acordo com sua distribuição geográfica e, em nosso caso, também da amostragem.

A frequência de infecção por FeLV foi similar a de FIV com valor de 17,64% (3/17), sendo inferior aos valores encontrados por Lane et al. (1994), com 80% de frequência de infecção por FeLV. Vail et al. (1998) observou 25,5% de positividade em 110 animais estudados. No estudo de Reche, Hagiwara e Lucas (1997) onde foram analisados 401 animais em São Paulo, observou-se 8% de animais positivos para FeLV, sendo que destes, 20% de animais com linfoma. Resultados semelhantes também foram observados em um estudo de Court, Watson e Peaston (1997) com frequência de 9%. Sabe-se que a frequência de infecção pelo FeLV varia em decorrência do tipo de vida dos animais e da condição vacinal. Nos Estados Unidos, a frequência de gatos com linfoma positivos ao FeLV vem diminuindo após a introdução da vacina, assim como vêm ocorrendo mudanças na forma anatômica predominante da neoplasia.

Neste estudo, a forma de apresentação mais freqüente foi a alimentar com 58,82%, seguida da forma nodal, com 29,41% e 5,88% para as formas mediastinal e extranodais (cutâneo). As freqüências foram diferentes daquelas observadas por Leal (2009), em São Paulo, que constatou que 50% dos 14 animais estudados apresentavam a forma nodal. Segundo a maioria dos autores citados a forma alimentar é considerada atualmente a mais freqüente dentre os tipos de linfoma (JACOBS; MESSICK; VALLI, 2002; CARRERAS et al., 2003; ETTINGER, 2003; FAN, 2003; RITCHER, 2003; VAIL; YOUNG, 2007; VAIL, 2007; WILSON, 2008; POHLMAN et al., 2009).

No estudo de Vail et al. (1998) com 145 felinos com linfoma, 20% dos animais apresentavam a forma extranodal e 18,8% a forma nodal, No estudo de Court; Watson e Pearson, 26,6% dos animais apresentavam a forma extranodal e 30% a forma nodal. Assim, os resultados encontrados, embora muito próximos da literatura citada quanto à frequência de apresentação anatômica dos linfomas em felinos, pode ter sofrido influência da metodologia do estudo, no qual foram excluídos animais com tratamento prévio e doenças concomitantes, bem como o tamanho da amostragem, relativamente menores quando comparadas aos trabalhos citados.

Com relação à análise do eritrograma observou-se que, em média, ocorreu uma redução nos valores da contagem global de eritrócitos, valores de hemoglobina, volume corpuscular médio e concentração de hemoglobina corpuscular média em

relação aos animais do grupo controle. A presença de anemia foi encontrada em 11,7% dos animais com linfoma, e os gatos apresentaram média de hematócrito de 33%. No estudo de Leal (2009) pôde-se observar diferença significativa entre os animais do grupo controle (média de hematócrito de $36,4\% \pm 6$) e os felinos com linfoma ($29,2\% \pm 7,8$) e ocorrência de 28,6% de animais apresentando anemia, assim como no estudo de Krick et al. (2008) com 45 felinos apresentando linfoma, dos quais 26 animais (57,7%) apresentavam-se anêmicos, com média de hematócrito de 24,5% (14,1-30,9%). Embora a frequência de anemia não seja semelhante, é importante lembrar que não existem trabalhos para efeito de comparação em relação à presença de anemia. Como descrito por vários autores, para seres humanos e cães, a anemia é considerada uma das principais síndromes paraneoplásicas descritas e sua presença tem valor prognóstico nos pacientes acometidos (OGILVIE, 1992; COUTO; HAMMER, 1994; FINORA, 2003; SMITH, 2006; BERGMAN, 2007), entretanto, não existem muitos estudos a esse respeito na espécie felina.

Dos dois animais considerados anêmicos (hematócrito inferior a 24%) ambos apresentaram a forma nodal e eram positivos para FIV. Um deles apresentou anemia macrocítica normocrômica, de caráter não regenerativo. De acordo com Jacobs, Messick e Valli (2002), a anemia macrocítica pode ser causada pela infecção por FeLV, o que não ocorreu neste caso. A presença de macrocitose também pode estar associada à infecção concomitante com micoplasmas hemotrópicos, porém a pesquisa desse agente não foi objeto de estudo neste trabalho (KOHN et al., 2006). O outro animal apresentou anemia do tipo microcítica hipocrômica, neste caso, alterações do metabolismo do ferro, seqüestro do ferro circulante, além da perda de sangue de forma crônica podem explicar a presença deste tipo de anemia, ou ainda, como o felino em questão era positivo para FIV, a associação ao vírus caracteriza a presença de anemia não regenerativa e pode agravar a resposta medular, pois sabe-se que a infecção por retrovírus inibe a proliferação celular e promove citotoxicidade (GABOR; CANFIELD; MALIK, 2000; FINORA, 2003; BERGMAN, 2007; ARGYLE; BLACKING, 2008).

Quanto à substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, que foram avaliadas pela mensuração do malondialdeído (MDA), não houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados, entretanto, a média dos valores de MDA dos

animais do grupo experimental foi superior aos valores encontrados no grupo controle.

O MDA é o produto final da peroxidação lipídica por meio da ação de radicais livres. A peroxidação lipídica ocorre por ação de RL sobre os ácidos graxos poliinsaturados, que são conjugados a hidroperóxidos diênicos e no final desta reação há formação de malondialdeído e isoprostanos (DUMONT et al., 1992; DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; VANCOSCELOS et al., 2007; WEBB; FALKOWSKI, 2009; WINTER et al., 2009). O MDA pode lesar proteínas, DNA, RNA e outras biomoléculas. Além disso, também produz produtos citotóxicos, hepatotóxicos, mutagênicos e genotóxicos. Os produtos da formação da peroxidação lipídica também são metabolizados por meio da conjugação com a glutatona (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990).

Em felinos com DRC e anemia, a presença de peroxidação lipídica foi confirmada indiretamente, pelo aumento dos valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SANTOS, 2005). Resultados contrastantes quanto à mensuração de MDA foram descritos por Webb e Falkoski (2009) em felinos com diabetes mellitus, não apresentando diferenças estatísticas significantes entre os grupos.

Em cães apresentando linfoma foi observado aumento dos níveis plasmáticos de MDA e isoprostanos, achados consistentes da presença de peroxidação lipídica (WINTER et al., 2009); os cães com linfoma apresentaram valores médios de 1,57 μM (0,91 - 3,96) enquanto o grupo controle apresentou valores médios de 1,36 μM (1,00 - 1,77). Em estudos em humanos com linfoma de Hodgkin houve resultados semelhantes sendo observados maiores valores de MDA nos pacientes com linfoma quando comparado ao grupo controle (GUVEN et al., 2000; KAYA et al., 2005). Não há trabalhos de avaliação dos valores de MDA em felinos com linfoma.

No caso, neste estudo analisaram-se as concentrações de MDA plasmático, porém, se tivesse sido realizada a mensuração de MDA do hemolisado, frente aos observado, poderiam ter sido encontrados resultados diferentes. O MDA formado pode acumular-se dentro do eritrócito, pois, por ser um aldeído, atravessa a membrana de fosfolípide da hemácia facilmente (CIMEN, 2008).

Foi observada diferença significativa na determinação do estado antioxidante total quando comparado ao grupo controle. O estado antioxidante total (TAS) permite informação sobre todos os antioxidantes do organismo (TORUN et al., 2009). Assim, o aumento do MDA, mesmo que sem diferença significativa, associado à diminuição do TAS caracteriza o estresse oxidativo nos gatos com linfoma.

A avaliação do estado antioxidante total é pouco descrita em medicina veterinária. Os diversos autores avaliam a defesa antioxidante por meio de várias técnicas, sem uma padronização. No recente estudo de Ubukata (2010), utilizando a mesma técnica aqui empregada, houve diferença estatística significativa entre cães com linfoma multicêntrico e anemia quando comparados aos animais com linfoma e sem anemia. Embora não tenha sido utilizada a mesma técnica, Keegan e Webb (2010) observaram decréscimo significativo da capacidade antioxidante total em felinos com DRC.

Quanto à análise de Pearson, houve correlação significativa entre os valores de GSH e os valores de TAS, achados estes que podem corroborar com a presença de estresse oxidativo, uma vez que as concentrações de TAS refletem uma grande variedade de enzimas plasmáticas e eritrocitárias, sendo muitas delas não avaliadas individualmente neste estudo. Por sua vez, as menores concentrações de GSH estão relacionadas às alterações do estado redox da glutathione dentro do eritrócito, não é possível afirmar que o estado antioxidante está alterado pela deficiência desta enzima, mas sim que o linfoma é capaz de alterar o estado redox como um todo.

No presente estudo foram observadas diferenças significantes entre as concentrações eritrocitárias de glutathione reduzida nos gatos clinicamente normais e nos gatos com linfoma, com os últimos apresentando menores concentrações. Em estudos com cães apresentando linfoma, também foram observados valores inferiores de enzimas eritrocitárias como SOD e GSH, quando comparados aos animais normais (VAJDOVICH et al., 2006). É importante ressaltar que na literatura compulsada, inexistem estudos sobre a mensuração de enzimas antioxidantes em felinos com linfoma.

Segundo Santos (2005), que estudou felinos com doença renal crônica e anemia, os animais não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre os animais com doença renal crônica e anemia e gatos clinicamente normais.

Dezoin et al. (2007) mensurou a glutathiona reduzida eritrocitária em 22 felinos saudáveis com idade média de 24 meses (20-28 meses) e observou valores médios de 23,59 mg/dL $\pm$ 3,89 de glutathiona reduzida, resultado diferente do observado neste estudo, onde a média dos valores de GSH para os controles (23) foi de 31,02 mg/dL com idade média de 3,3 anos (39 meses). Segundo vários autores, animais considerados jovens poderiam apresentar valores superiores de GSH em comparação aos animais em estudo, onde a idade média foi considerada alta, uma vez que as dosagens de GSH foram realizadas em pacientes com doenças crônicas e nesta situação, considerados de faixa etária avançada, sendo assim mudanças nas concentrações de GSH em relação ao processo de envelhecimento seriam possíveis e poderiam contribuir com menores concentrações de enzimas antioxidantes como GSH e SOD. (BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004; KARIHTALA; SOINI, 2007; VALKO et al., 2007; WEBB; FALKOWSKI; 2009; VIVIANO et al., 2009). Porém não existem estudos que estabeleçam valores médios de glutathiona em uma população e as diferenças encontradas no estudo em questão comprovam que não há influências devido a idade dos pacientes.

Em um estudo onde foram avaliadas as concentrações eritrocitárias de glutathiona em cães e gatos gravemente doentes (infecções por retrovírus, neoplasias, pancreatite, doenças cardiovasculares, doenças renais, doenças endócrinas, hepáticas e neurológicas) e classificadas quanto a sua gravidade, houve diferença significativa em relação ao grupo controle nos cães, porém o mesmo não foi observado em gatos. Não houve correlação entre os valores de GSH e a idade dos animais acometidos. Durante a análise entre as espécies, os cães normais apresentaram concentrações superiores de GSH em comparação aos felinos normais. Nos cães houve correlação das concentrações de GSH quanto a gravidade e mortalidade dos animais doentes (VIVIANO et al., 2009).

Cristopher (1989) apresentou resultados semelhantes quanto as concentrações de GSH quando avaliou a presença de anemia por corpúsculo de Heinz e sua relação com níveis de GSH. Neste trabalho observou correlação significativa entre a formação de corpúsculos de Heinz (CH) e doenças como diabetes mellitus, linfoma e hipertireoidismo. As concentrações de GSH foram significativamente inferiores em animais apresentando corpúsculo de Heinz em comparação ao grupo controle. Os animais que apresentavam corpúsculo de Heinz

apresentavam menores valores médios de hematócrito em relação ao grupo normal. A hemoglobina felina é sabidamente susceptível à oxidação (ALLISON et al., 2000; WEBB et al., 2003; CENTER, 2004; 2005; WEBB et al., 2006; DENZOIN et al., 2008; WEBB; TWEDT, 2008). Na presença de lesão intracelular pela ação de radicais livres, ocorre a oxidação da hemoglobina em metahemoglobina, que precipita na formação de CH promovendo lesão da membrana do eritrócito e diminuindo a vida média das hemácias (FERREIRA; MATSUBARA 1997). No estudo de Webb et al. (2003) com anemia oxidativa induzida pela administração de acetaminofeno, os autores não observaram alterações nas concentrações plasmáticas de GSH mesmo na presença de grande quantidade de CH. Em contraste aos autores descritos, apesar de apresentarem menores concentrações de GSH, os animais com linfoma do estudo em questão não apresentaram CH de forma significativa, sendo muitas vezes não observado durante a análise do esfregaço sanguíneo.

A diminuição dos valores de GSH durante os processos patogênicos é resultado da menor síntese de glutathiona intracelular, aumento da utilização e diminuição da atividade do ciclo redox (BALENDIRAN; DABUR; FRASER, 2004; ANDERSEN; REGUEIRA; LEIGHTON, 2006) e também podem declinar em decorrência de má nutrição, onde há limitada disponibilidade de cisteína (CIMEN, 2008; VIVIANO et al., 2009) o que pode ocorrer em decorrência da disorexia e processos de caquexia gerados pelo linfoma.

No estudo em questão foi realizada a correlação entre GSH e os valores de hematócrito, apresentando correlação positiva significativa ($p=0,0001$). Webb e Falkowski (2009) e Center et al. (2005) sugerem que as concentrações eritrocitárias de GSH podem ser influenciadas pela vida média eritrocitária já que células maduras apresentam menor habilidade em sintetizar GSH, porém não há estudos de correlação dos valores de hematócrito com as concentrações de GSH. Em associação a vida média das hemácias, a atividade da GSH pode estar diretamente relacionada aos valores de hematócrito, uma vez que as maiores concentrações desta enzima está localizada no interior das hemácias (CIMEN, 2008).

Além disso, em processos patológicos a medula torna-se hipoproliferativa, apresentando menor capacidade de regeneração o que pode influenciar a síntese de GSH (OGILVIE, 1992; FINORA, 2003; BERGMAN, 2007; CIMEN, 2008). A

produção de ERO pode gerar e também ser perpetuada pelos quadros anêmicos. A hipóxia tecidual é acompanhada pelo aumento absoluto na produção de RL por meio de mudanças no metabolismo celular, especialmente no metabolismo energético (GRUNE; SOMMERBURG; SIEMS, 2000; DROGE, 2002). Assim é possível que o estresse oxidativo esteja associado com a intensidade dos quadros anêmicos, o que justificaria a correlação entre GSH e valores de hematócrito.

No presente estudo não se observaram diferenças estatística em relação à atividade da enzima glutathiona peroxidase. A GPX é considerada uma importante enzima antioxidante responsável pelo controle do aumento da produção de peróxido de hidrogênio e outros hidroperóxidos (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JÚNIOR et al., 2001; DICKINSON; FORMAN, 2002; DOTAN; LICHTENBERG; PINCHUK, 2004; CENTER, 2004; VALKO et al., 2006; 2007; MANDELKER, 2004; BARELLI et al., 2008). A atividade da GPX esteve diminuída em um estudo de Vajdovich et al. (2005) com cães (n=10) apresentando linfoma contrastando com estudo de Winter et al. (2009) (n=17), onde houve aumento das concentrações de GPX, porém as técnicas por Winter et al. diferiram da utilizada por Vajdovich et al. (2005) e também deste estudo. Em gatos com infecção por retrovírus (FIV) Webb et al. (2008) e Webb e Falkowski (2009) encontraram resultados semelhantes, apresentando aumento nas concentrações desta enzima, utilizando métodos similares ao utilizado neste estudo (kits comerciais colorimétricos), entretanto, especificamente nos gatos com FIV, neste estudo, os níveis não foram superiores à média do grupo e nem a dos gatos normais. Alguns estudos relacionam a baixa atividade desta enzima à atuação compensatória da catalase ou a baixas concentrações de selênio proveniente da dieta (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2000), o que poderia ocorrer como consequência da diminuição do apetite dos animais doentes. Santos (2005) também não observou alterações na atividade da GPX em felinos com doença renal crônica e anemia.

Em pacientes humanos com linfoma há vários relatos de diminuição das concentrações de GPX. Bewick et al. (1987); Guven et al. (2000) e Kaya et al. (2005) observaram valores inferiores de GPX em pacientes com linfoma. Já no estudo de Gonzales et al. (1984) com pacientes apresentando linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, leucemia mieloblástica aguda e leucemia linfoblástica crônica, à

semelhança de nossos resultados, as concentrações de GPX não apresentaram diferenças significantes quando comparadas ao grupo controle.

Embora não apresentando diferenças estatísticas o grupo experimental avaliado apresentou valores médios menores de GPX em comparação ao grupo controle. Essa diferença não significativa pode estar relacionada ao tamanho da amostra, ao aumento da atividade da catalase, não determinada neste estudo ou ao processo oxidativo presente não ter magnitude suficiente para comprometer a atividade da GPX.

Nos felinos com linfoma também não se observaram diferenças estatísticas significantes na atividade da glutathione redutase. A GR apresenta um importante papel em regenerar e suprir as reservas de glutathione reduzida intraeritrocitária, com a finalidade de restaurar o sistema antioxidante (MATSUBARA; FERREIRA, 1997; MEYER et al., 1998; HALLIWELL, 2002; CENTER, 2004; MANDELKER, 2008).

No estudo de Santos (2005) houve aumento da atividade da GR em gatos com anemia e doença renal crônica. No presente estudo os felinos com linfoma apresentaram valores médios superiores de GR quando comparados ao grupo controle. Embora sem diferença estatística significativa o aumento dessa enzima poderia sugerir a participação efetiva da enzima na redução da glutathione oxidada a fim de restaurar o sistema antioxidante, entretanto, possivelmente seriam necessários aumentos significantes de sua concentração para que ocorresse um efeito compensatório sobre a GSH. A ausência desse aumento poderia explicar também as menores concentrações de GSH. Não há estudos avaliando as concentrações de GR em felinos com linfoma e mesmo trabalhos humanos priorizam a mensuração das demais enzimas antioxidantes como GPX e SOD. No estudo de Ubukata (2010) em cães com linfoma, também não foram observadas diferenças significantes nos animais com e sem anemia, em relação aos cães normais.

Também não foram observadas diferenças significantes na atividade da enzima intraeritrocitária superóxido dismutase ($p=0,476$). O ânion superóxido é considerado extremamente reativo e este é dismutado a um produto menos tóxico, o peróxido de hidrogênio. A SOD age em conjunto com a GPX na tentativa de gerar peróxido de hidrogênio e água (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; OBERLEY;

OBERLEY, 1997; IUCHI et al., 2007; KARIHTALA; SOINI, 2007; GRZELAK et al., 2008).

No estudo de Santos (2005) a atividade da SOD foi significativamente menor no grupo dos gatos apresentando doença renal crônica e anemia quando comparado ao grupo controle. Em um estudo similar de Keegan e Webb (2010) também com DRC em felinos (n=20), a atividade de SOD não apresentou diferença significativa quanto ao grupo controle e não se avaliou a correlação com a anemia, porém houve diferença significativa entre os grupos em relação a esta variável, sendo a média de hematócrito do grupo controle superior (36,5%) aos gatos com DRC (31,9%). A atividade de SOD pode estar alterada de acordo com a gravidade de doença renal, gravidade de apresentação dos sinais e sintomas clínicos e diferenças no tratamento, o que pode levar às diferenças dos resultados encontrados entre os autores citados. É interessante ressaltar que no estudo de Keegan e Webb (2010) os animais utilizados para o grupo controle apresentavam média de idade de 13,1 anos, no intuito de minimizar a variável correspondente a presença de estresse oxidativo em decorrência da idade avançada, questionada pela maioria dos autores.

No estudo de Iuchi et al. (2007) avaliando o estresse oxidativo eritrocitário em camundongos *knockout* apresentando deficiência desta enzima. O estudo demonstrou que a anemia pareceu ser decorrente de uma maior vulnerabilidade dos eritrócitos frente a uma deficiência de SOD intracelular. Um mesmo trabalho com camundongos *knockout* para SOD apresentou resultados contrários ao estudo de Iuchi et al. (2007). No estudo de Grzelak et al. (2008) não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os camundongos normais e os animais *knockout* para SOD. No entanto, os animais com deficiência de SOD apresentaram aumento de corpúsculos de Heinz, que são produzidos a partir da desnaturação oxidativa da hemoglobina, além de diminuição da vida média das hemácias e aumento dos níveis de reticulócitos circulantes. Esses animais apresentavam esplenomegalia como resultado da destruição acelerada de eritrócitos.

Enquanto trabalhos observaram aumento das concentrações de SOD em humanos apresentando linfomas e leucemias (GONZALES et al., 1984) outros não observaram alterações desta enzima (BEWICK et al., 1987) e menores

concentrações de SOD são descritas tanto em cães quanto humanos apresentando linfoma (KAYA et al., 2005; VAJDOVICH et al., 2005).

Assim como nas demais enzimas antioxidantes, embora sem apresentar diferenças estatísticas, os valores médios de SOD dos animais com linfoma foram inferiores aos valores encontrados no grupo controle. Houve correlação significativa entre os valores de SOD e hematócrito. Diante destes resultados é possível que, frente a um número maior de casos, pudesse existir diferença significativa quanto aos valores de SOD. Em nenhum dos trabalhos acima citados foi realizado esse tipo de correlação. No estudo de Gonzales et al. (1984), o autor sugeriu uma correlação entre as diversas concentrações de SOD e parâmetros biológicos como a concentração de hemoglobina e a contagem global de eritrócitos.

Vale ressaltar que, embora uma explicação não tenha sido encontrada, os dois maiores valores de SOD observados, o dobro da média dos animais doentes foram encontrados em dois gatos FIV positivos e com anemia (19 e 22% de hematócrito) (apêndice F), outro gato FIV positivo e sem anemia apresentava-se com níveis de SOD dentro do normal. A inclusão desses animais não alterou os resultados estatísticos. Webb et al. (2008) analisou a atividade de eritocitária de SOD em felinos infectados experimentalmente por FIV e os animais apresentaram aumentos significantes de SOD entre 9 a 12 semanas pós infecção e retorno das concentrações desta enzima após 16 semanas. O estudo foi realizado utilizando-se a mesma técnica que empregada neste estudo, mas mesmo diante desses achados não é possível associar os maiores valores de SOD a presença de infecção pelo FIV, embora estudos em medicina relatem tanto aumento como diminuição da atividade de SOD em pacientes com HIV, mesmo quando na presença de infecções crônicas. As concentrações superiores foram observadas em pacientes apresentando estágios mais avançados da doença (TREITINGER et al., 2000; GIL et al., 2003). Resultados contrastantes são descritos em relação as demais enzimas antioxidantes (GSH, GPX) em humanos infectados por HIV, sugerindo que essas diferenças podem estar correlacionadas a gravidade dos sintomas apresentados (diante de uma doença que gera inúmeras apresentações clínicas) e em relação às diferentes fases da infecção.

Ao final, o que se observa é que diferentes achados podem estar relacionados à falta de estudos comparando as diversas doenças já descritas e a uma falta de padronização das técnicas laboratoriais utilizadas na avaliação da atividade das enzimas antioxidantes e do estresse oxidativo, o que dificulta análises comparativas. Além disso, as enzimas antioxidantes não são afetadas da mesma maneira em diferentes tecidos, gerando por vezes, resultados conflitantes (JÚNIOR et al., 2001; VASCONCELOS et al., 2007; DENZOIN et al., 2008).

6 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia aplicada e condições nas quais foi realizado este estudo, concluiu-se que:

O linfoma em gatos gera desequilíbrio do estado redox causando estresse oxidativo, que pôde ser observado principalmente pela redução significativa do estado antioxidante total.

Os gatos com linfoma apresentaram redução das concentrações intraeritrocitárias de glutathione reduzida, considerada uma das principais defesas antioxidantes, mostrando que o linfoma gera alterações no ciclo redox da glutathione.

A correlação entre o estado antioxidante total e a glutathione reduzida corrobora que o estresse oxidativo está presente pela alteração tanto em antioxidantes plasmáticos quanto antioxidantes intracelulares.

Não houve diferença estatística significativa para os valores de glutathione peroxidases, glutathione redutase, superóxido dismutase e para a mensuração de malonaldeído nos felinos com linfoma quando comparados ao grupo controle.

REFERÊNCIAS

ALLISON, W. R.; LASSEN, D. E.; BURKHARD, M. J.; LAPPIN, M. R. Effect of bioflavonoid dietary supplement on acetaminophen-induced oxidative injury to feline erythrocytes. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 8, p. 1157-1161, 2000.

ANDERSEN, M.; REGUEIRA, T.; LEIGHTON, F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. **Revista Médica de Chile**, v. 134, p. 649-656, 2006.

ARGYLE, D. J.; BLACKING, T. From viruses to cancer stem cells: dissecting the pathways to malignancy. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 311-323, 2008.

BALENDIRAN, K. G.; DABUR, R.; FRASER, D. The role of glutathione in cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 22, p. 343-352, 2004.

BARELLI, S.; CANELLINI, G.; THADIKKARAN, L.; CRETТАZ, D.; QUADRONI, M.; ROSSIER, J. S.; TISSOT, J.; LION, N. Oxidation of proteins: basic principles and perspectives for blood proteomics. **Proteomics Clinical Application**, v. 2, p. 142-157, 2008.

BEATTY, A. J.; LAWRENCE, J. J.; CALLANAN, K. C.; GRANT, K. C.; GAULT, A. E.; JARRET, O. Feline immunodeficiency virus (FIV)- associated lymphoma: a potential role for immune dysfunction in tumourigenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 65, p. 309-322, 1998.

BERGMAN, P. L. Paraneoplastic syndromes. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders; Elsevier, 2007. p. 77-93.

BERTONE, R. E.; SNYDER, A. L.; MOORE, S. A. Environmental tobacco smoke and risk of malignant lymphoma in pet cats. **American Journal of Epidemiology**, v. 156, n.3, p.268-273, 2002.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, n. 5, p. 882-888, 1963.

BEWICK, M.; COUTIE, W.; TUDHOPE, G. R. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase in the red cells of patients with malignant lymphoma. **British Journal of Haematology**, v. 65, p. 347-350, 1987.

BRIDGEFORD, E. C.; MARINI, R. P.; PARRY, N. M.; RICKMAN, B.; FOX, J. Gastric *Helicobacter* species as a cause of feline gastric lymphoma: a viable hypothesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 1-2, p. 106-113, 2008.

CARRERAS, K. J.; GOLDSCHMIDT, M.; LAMB, M.; MCLEAR, C. R.; DROBATZ, J. K.; SORENMO, U. K. Feline epitheliotropic intestinal malignant lymphoma: 10 cases (1997-2000). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, p. 326-331, 2003.

CENTER, A. S. Metabolic, antioxidant, nutraceutical, probiotic, and herbal therapies relating to the management of hepatobiliary disorders. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 34, p. 67-172, 2004.

CENTER, A. S.; RANDOLPH, F. J.; WARNER, L. K.; MACCABE-MCCLELLAND, J.; FOURMAN, P.; HOFFMANN, E. W.; FOUREMAN, P.; ERB, N. H. The Effects of S-adenosylmethionine on clinical pathology and redox potential in the red blood cell, liver, and bile of clinically normal cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 303-314, 2005.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008.

COURT, E. A.; WATSON, A. D.; PEASTON, A. E. Retrospective study of 60 cases of feline lymphosarcoma. **Australian Veterinary Journal**, v. 75, n. 6, p. 424-427, 1997.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Oncology. In: SHERDING, G. R.; **The Cat: Diseases and clinical management**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. cap. 30. p.755-818.

CRISTOPHER, M. M. Relationship of Heinz bodies to disease and anemia in cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 5, p. 696-699, 1989.

DENZOIN, L.; FRANCI, R.; TAPIA, M. O.; SORACI, A. L. Quantification of plasma reduced glutathione, oxidized glutathione and plasma total glutathione in healthy cats. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 10, p. 230-234, 2008.

DICKINSON, A. D.; FORMAN, J. H. Glutathione in defense and signaling lessons from a small thiol. **Annals of New York Academy of Science**, v. 973, p. 488-504, 2002.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**, v. 43, p. 200-227, 2004.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiologic Review**, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUMONT, E.; PETIT, E.; NOUVELOT, A.; TARRAD, A.; Free radicals, lipids and protein degradation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 197-198, 1992.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4- hydroxynomenal. **Methods in Enzimology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

ETTINGER, N. S. Principles of treatment for feline lymphoma. **Clinical Techniques in Small animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 98-102, 2003.

FAN, M. T. Lymphoma up dates. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 455-471, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Médicos do Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FINORA, K. Common paraneoplastic syndromes. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 18, n. 2, p. 123-126, 2003.

FUGINO, Y.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H. Molecular pathogenesis of feline leukemia virus-induced malignancies: insertional mutagenesis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.123, p. 138-143, 2008.

GABOR, L. J.; CANFIELD, P. J.; MALIK, R. Haematological and biochemical finding in cats in Australia with lymphosarcoma. **Australian Veterinary Journal**, v. 78, n. 7, p. 456-461, 2000.

GIL, L. M.; GONZALEZ, G.; TARINAS, I.; ALVAREZ, A.; GIULIANI, A.; MOLINA, A.; TAPANES, R.; PEREZ, R.; LEON, O. S. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. **Pharmacology. Research**, v. 47, p. 217–224, 2003.

GONZALES, R.; AUCLAIR, C.; VOISIN, E.; GAUTERO, H.; DHERMY, D.; BOIVIN, P. Superoxido dismutase, catalase and glutathione peroxidase in red blood cells from patients with malignant diseases. **Cancer Research**, v. 44, p. 4137-4139, 1984.

GRUNE, T.; SOMMERBURG, O.; SIEMS, W. G. Oxidative stress and anemia. **Clinical Nephrology**, v. 53, n. 1, p. 18-22, 2000.

GRZELAK, A.; KRUSZEWSKI, M.; MACIERZYNSKA, E.; PIOTROWSKI, L.; PULASKI, L.; RYCHLIK, B.; BARTOSZ, G. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 14, p. 23-34, 2009.

GUVEN, M.; OZTURK, B.; SAYAL, A.; OZET, A. Lipid peroxidation and antioxidant system in the blood of patients with Hodgkin's disease. **Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 209-212, 2000.

HALLIWELL, B. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? **Free Radicals in Biology and Medicine**. v. 32, n. 10, p. 968-974, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. Ed. Oxford, UK: Oxford University Press, 2000.

HANEY, S. M.; BEAVER, L.; TURREL, C. A.; CLIFFORD, C. A.; KLEIN, M. K.; CRAWFORD, S.; POULSON, J. M.; AZUMA, C. Survival Analysis of 97 cats with nasal lymphoma: a multi-institutional retrospective study (1986-2006). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 287-294.

HARTMANN, K. Feline leukemia virus infection. In: GREENE C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 105-130.

HAYEK, G. M. Potencial for control of oxidative injury by administration of antioxidants in veterinary medicine. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 301-302, 2005.

HAYES, A. Feline lymphoma 2. Specific disease presentations. **In Practice**, v. 28, n. 10, p. 578-585, 2006.

IUCHI, Y.; OKADA, F.; ONUMA, K.; ONODA, T.; ASAO, H.; KOBAYASHI, M.; FUJI, J. Elevated oxidative stress in erythrocytes due to a SOD1 deficiency causes anaemia and triggers autoantibody production. **Journal of Biochemical Society**, v. 402, p. 219-227, 2007.

JACOBS, R. M.; MESSICK, J. B.; VALLI, V. E. Tumors of the hemolymphatic system. In: MEUTEN, D. J. **Tumors in domestic animals**. 4. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2002, p. 119-198.

JAIN, N. C. Comparative hematology of common domestic animals. In: _____. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 19-53.

JÚNIOR, R. L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Appendix IX. In: _____. **Clinical biochemistry of domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 895-899.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 115, p. 81-103, 2007.

KAYA, E.; KESKIN, L.; KUKU, I.; BAYRAKTAR, N.; ERKUT, M. A. Oxidant/antioxidant parameters and their relationship with chemotherapy in Hodgkin's lymphoma. **The Journal of International Medicine Research**, v. 33, p. 687-698, 2005.

KEEGAN, R. F.; WEBB, C. Oxidative stress and neutrophil function in cats with chronic renal failure. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 514-519, 2010.

KOHN, B.; WEINGART, C.; ECKMANN, V.; OTTENJANN, M.; LEIBOLD, W. Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia in 19 cats: Diagnosis, Therapy, and Outcome (1998-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 20, n. 1, p. 159-16, 2006.

KRICK, E. L.; LITTLE, L.; PATEL, R.; SHOFR, S. F.; SORENMO, K.; CLIFFORD, C. A.; BAEZ, J. L. Description of clinical and pathological findings, treatment and outcome of feline large granular lymphocyte lymphoma (1996-2004). **Veterinary and Comparative Oncology**, v. 6, n. 2, p. 102-110, 2008.

LADAS, J. E.; JACOBSON, S. J.; KENNEDY, D. D.; TELL, K.; FLEISCHAUER, A.; KELLY, M. K. Antioxidants and Cancer therapy: A systematic review. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 3, p. 517-528.

LANE, S. B.; KORNEGAY, J. N.; DUNCAN, J. R. Feline spinal lymphosarcoma: a retrospective evaluation of 23 cases. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 8, p. 99-104, 1994.

LEAL, M. L. G. **Avaliação da Frequência de Infecção por Micoplasmas hemotrópicos em Gatos com Linfoma**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LEVY, J.; CRAWFORD, C.; HARTMANN, K.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LITTLE, S.; THAYER, V. 2008 American Association of Feline Practitioners': Feline retrovirus management guidelines. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 10, p. 300-316, 2008.

LIM, S. T.; LEVINE, A. M. Recent advances in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS)-related lymphoma. **Journal of American Cancer Society**, v. 55, n. 4, p. 229-241, 2005.

LINGARD, A. E.; BRISCOE, K.; BEATTY, A. J.; MOORE, A. S.; KROCKENBERGER, M.; CHURCHER, K. R.; CANFIELD, P. J.; BARRS, V. Low-grade alimentary lymphoma: clinicopathological findings and response to treatment in 17 cases. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 11, p. 692-700, 2009.

LITTLE, L.; PATEL, R.; GOLDSCHMIDT, M. Nasal and nasopharyngeal lymphoma incats: 50 cases (1989-2005). **Veterinary Pathology**, v. 44, n. 6, p. 885-892, 2007.

LORIMIER, L.; Updates on the management of canine epitheliotropic cutaneous T cell lymphoma. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**, v 36, p. 213-228, 2006.

LOUWERENS, M.; LONDON, C. A.; PEDERSEN, N. C. Feline lymphoma in the post-feline leukemia virus era. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 329-335, 2005.

LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB)**, v. 13, n. 10, p. 1169-1183, 1999.

LUTZ, H.; ADDIE, D.; BELAK, S.; BOUCRAUT-BARALON, A.; EGBERINK, H.; FRYMUS, T.; GRUFFYDD-JONES, T.; HARTMANN, K.; HOSIE, M. J.; LLORET, A.; MARSILIO, F.; PENNISI, M. G.; RADFORD, A. D.; THIRY, E.; TRUYEN, U.; HORZINEK, M. C. Feline Leukemia: ABCD guidelines on prevention and management. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 11, p. 565-574, 2009.

MANDELKER, L. The natural activities of cells, the role of reactive oxygen species, and their relation to antioxidants, nutraceuticals, botanicals, and others biologic therapies. **The Veterinary Clinics: Small animal Practice**, n. 34, p. 39-66, 2004.

MELLISIMOS, K. D.; DELIDOV, A. Z.; VARSOV, A. G.; GEGIETTI, S. S.; DRIVAS, G. J. Serum and erythrocyte glutathione reductase activity in chronic renal failure. **Nephron**, v. 28, n. 2, p. 76-79, 1981.

MEYER, E. T.; LIANG, Q. H.; BUCKLEY, R. A.; BUCKLEY, J. D. Changes in glutathione redox cycling and oxidative stress response in malignant progression of NB2 lymphoma cells. **Journal of Cancerology**, v. 77, p. 55-63, 1998.

MOONEY, C. S.; HAYES, A. A.; MACWEWEN, E. G.; MATUS, E. R.; GEARY, A.; SHURGOT, A. B. Treatment and prognostic factors in lymphoma in cats: 103 cases (1977-1981). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 195, n. 5, p. 696-699, 1989.

MORRIS, J.; DOBSON, J.; Haematopoietic system. In _____ MORRIS, J.; DOBSON, J. **Small animal oncology**. 1. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2001, p. 228-239.

OBERLEY, T. D.; OBERLEY, L. W. Antioxidant enzyme levels in cancer. **Histology and Pathology**, v.12, n. 2, p. 525-535, 1997.

OGILVIE, K. G. Síndromes paraneoplásicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Manole, 1992. cap 77, p. 733-743.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PERON, J. M. R.; LOPEZ, J. R. M.; LOPEZ, Y. T. Radicales libres em la biomedicine y estrés oxidativo. **Revista Cubana Medicina Militar**, v. 30, n. 1, p. 15-20, 2001.

POHLMAN, L. M.; HIGGINBOTHAM, M. L.; WELLES, E. G.; JOHNSON, C. M. Immunophenotypic and histologic classification of 50 cases of feline gastrointestinal lymphoma. **Veterinary Pathology**, v. 46, p. 259-268, 2009.

RECHE JUNIOR, A.; HAGIWARA, M. K.; LUCAS, S. R. R. Clinical study of acquired immunodeficiency syndrome in domestic cats in São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 34, n. 3, p. 152-155, 1997.

RITCHER, P. K. Feline gastrointestinal lymphoma. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 33, p. 1083-1098, 2003.

SANTOS, M. D. **Avaliação do estresse oxidativo em gatos com insuficiência renal crônica e anemia**. 2005. 79 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SHACTER, E.; WILLIAMS, A. J.; HINSON, M. R.; SENTURKER, S.; LEE, Y. Oxidative stress interferes with cancer chemotherapy: inhibition of lymphoma cell apoptosis and phagocytosis. **Blood**, v. 96, n.1, p. 307-313, 2000.

SMITH, N. A. Extranodal lymphosarcoma. In: AUGUST, R. J. **Feline internal medicine**. 1. Ed. Missouri: Elsevier Saunders, 2006. V. 5, cap.66, p. 633-641.

SPODINICK, G. J.; BERG, J.; MOORE, F. M. Spinal lymphoma in cats: 21 cases (1976- 1989). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v 200, p. 373-376, 1992.

TAYLOR, S. S; GOODFELLOW, M. R.; BROWNE, W. J.; WALDING, B.; MURPHY, S.; TZANNES, S.; GEROU-FERRIANI, M.; SCHWARTZ, A.; DOBSON, J. Feline extanodal lymphoma: response to chemotherapy and survival in 110 cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 50, p. 584-592, 2009.

TESKE, E.; STRATEN, V. G.; NOORT, V. R.; RUTTERMAN, R. G. Chemotherapy with cyclophosphamide, vincristine, and prednisolone (COP) in cats with Malignant lymphoma: New results with an old protocol. **Journal of Veterinery Internal Medicine**, v. 16, p. 179-186, 2002.

TORUN, A. N.; KULAKSIGOGLUT, S.; KULAKSIZOGLU, M.; PAMUK, B. O.; ISBILENT, E.; TUTUNCU, N. B. Serum total antioxidant status and lipid peroxidation marker malondialdehyde levels in overt and subclinical hypothyroidism. **Clinical Endocrinology**, v. 70, p. 469-474, 2009.

TOYOKUNI, S.; OKAMOTO, K.; YODOI, J.; HIAI, H. Persistent oxidative stress in cancer. **Federation of European Bioquimical Societies (FEBS)**, v. 358, n. 1, p. 1-3, 1995.

TREITINGER, A.; SPADA, C.; VERDI, J. C.; MIRANDA, A. F.; OLIVEIRA, O. V.; SILVEIRA, M. V.; MORIEL, P.; ABDALLA, D. S. Decreased antioxidant defence in individuals infected by the human immunodeficiency virus. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 3, p. 454-459, 2000.

TWOMEY, L. N.; ALLEMAN, A. R. Cytodiagnosis of feline lymphoma. **Compendium on Continuing Education for the Practicin Veterinarian**, v. 27, n. 1, p. 17-32, 2005.

UBUKATA, R. **Avaliação do estado total oxidante/antioxidante e defesa antioxidante em cães com linfoma multicêntrico**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

VAIL, D. M. Feline lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 733-756.

VAIL, D. M.; MOORE, A. S.; OGILVIE, G. K.; VOLK, L. M. Feline lymphoma (145 cases): proliferation indices, cluster of differentiation 3 immunoreactivity, and ther association with prognosis in 90 cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 12, n. 349-354, 1998.

VAIL, D.M.; YOUNG, K. Hemopoietic Tumors. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology**. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 699-784.

VAJDOVICH, P.; KRISKA, T.; MÉZES, M.; SZABÓ, R. P.; BALOGH, N.; BÁNFI, A.; ARANY-TÓTH, A.; GAÁL, T.; JAKUS, J. Redox state of dogs with non-hodgkin lymphomas. An ESR study. **Cancer Letters**, v. 224, n. 2, p. 339-346, 2005.

VALDIVIA, A.; PEREZ-ALVAREZ, S.; ARCO-AGUILAR, J. D.; IKUTA, I.; JORDAN, J. Superoxido dismutases: a physiopharmacological update. **Journal of Phisiology Biochemistry**, v. 65, n. 2, p. 195-208, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MANZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. **Chemico-Biological Interactions**, n. 39, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, n. 160, p. 1-40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VEZZALI, E.; PARODI, A. L.; MARCATO, P.S.; BETTINI, G. Histopathologic classification of 171 cases of canine and feline non-Hodgkin lymphoma according the WHO. **Veterinary Comparative Oncology**, v 8, n. 1, p. 38-49, 2010.

VIVIANO, K. R.; LAVERGNE, S. N.; GOODMAN, L.; VANDERWIELEN, B.; GRUNDAHL, L.; PADILLA, M.; TREPAINER, L. A. Glutathione, cysteine, and ascorbate concentration in clinically ill dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 250-257, 2009.

WALTON, M. R.; HENDRICK, J. M. Feline hodgkin's-like lymphoma: 20 cases (1992-1999). **Veterinary Pathology**, v.38, p. 504-511, 2001.

WEBB, C.; BEDWELL, C.; GUTH, A.; AVERY, P.; DOW, S. Use of cytometry and monochlorobimane to quantitate intracellular glutathione concentrations in feline leukocytes. **Journal of Immunology and Immunopathology**, v. 112, p. 129-140, 2006.

WEBB, C.; FALKOWSKI, L. Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 11, p. 271-276, 2009.

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

WEBB, C.; FALKOWSKI, L. Oxidative stress and innate immunity in feline patients with diabetes mellitus: the role of nutrition. **Journal of Feline Medical and Surgery**, v. 11, p. 271-276, 2009.

WEBB, C.; TWEDT, D. Oxidative Stress and Liver disease. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 38, p. 125-135, 2008.

WEBB, C.; TWEDT, D. C.; FETTMAN, M. J.; MANSON, G. S-adenosylmethionine (SAME) in a feline acetaminophen model of feline oxidative injury. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 5, p. 69-75, 2003.

WILSON, H. D. Feline alimentary lymphoma: demystifying the enigma. **Topics in Companion Animal Medicine**, v. 23, n. 4, p. 177-184, 2008.

WINTER, J. L.; BARBER, L. G.; FREEMAN, L.; GRIESSMAYR, P. C.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 23, p. 311-316, 2009.

WOOLIAN, J. A.; WIENER, G. Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 253-256, 1983.

ZWAHLEN, H. C.; LUCROY, D. M.; KRAEGEL, A. S.; MADEWELL, R. B. Results of chemotherapy for cats with alimentary malignant lymphoma: 21 cases (1993-1997). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 8, p. 1144-1149, 1998.

APÊNDICES

Apêndice A: Dados individuais referentes à idade, sexo, raça dos gatos clinicamente normais (grupo controle) - São Paulo – 2008-2010

Animal	Idade	Raça	Sexo
Safira	9 m	SRD	Fêmea
Fred	1 a	SRD	Macho
Mel	9 a	SRD	Macho
Ônix	2 a	SRD	Macho
Lion	2 a	SRD	Macho
Kiara	3 a	SRD	Fêmea
Lilica	2 a	SRD	Fêmea
Marrie	3 a	SRD	Fêmea
Lina	2 a	SRD	Fêmea
Gato	5 a	SRD	Macho
Chico	2 a	Maine Coon	Macho
Azul	2 a	SRD	Macho
Dourado	2 a	SRD	Macho
Vermelha	3 a	SRD	Fêmea
Lilás	3 a	SRD	Fêmea
Rosa	3 a	SRD	Fêmea
Pelada	1 a	SRD	Fêmea
Lince	2 a	SRD	Macho
Tuco	2 a	SRD	Macho
Tuca	2 a	SRD	Fêmea
Teo	4 a	SRD	Macho
Milú	10 a	Siamês	Fêmea
Zequinha	1 a	SRD	Macho

m=meses a=ano (s) SRD=sem raça definida

Apêndice B: Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008-2010

Animal	HEMOGRAMA												
	Hemácias (milh/mm ³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Eosinófilos (/mm ³)	Basófilos (/mm ³)	Linfócitos Típicos (/mm ³)	Linfócitos Atípicos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)
01	10,7	42	14,6	39,25	13,64	34,76	19400	3744	624	312	5616	0	104
02	6,8	27	11,2	39,71	16,47	41,48	14000	7820	1000	0	5040	0	140
03	7,2	36	12,2	50	16,94	33,89	18200	12012	910	0	4368	0	910
04	7,8	33	11,0	42,31	14,10	33,33	9300	5673	465	0	2883	0	279
05	7,2	27	9,3	37,50	12,92	34,44	5600	2828	462	0	2268	0	42
06	7,8	35	11,4	44,87	14,62	32,57	10600	5512	0	0	4664	0	424
07	7,0	31	10,3	44,29	14,71	33,23	8700	6003	87	0	2436	0	174
08	8,1	32	10,4	39,51	12,84	32,50	16400	11152	984	0	4100	0	164
09	7,9	33	10,5	41,77	13,29	31,82	10800	5400	108	0	5076	0	216
10	6,0	27	9,1	45,00	15,17	33,70	18599	15549	920	0	1278	0	852

11	6,8	30	9,7	44,12	14,26	32,33	10200	4080	204	0	5712	0	204
12	9,8	40	14,1	40,82	14,39	35,25	9800	3234	490	0	5880	0	196
13	10,2	44	15,2	43,14	14,90	34,55	9400	4042	376	94	4700	0	188
14	8,7	42	14,7	48,28	16,90	35,00	7100	2982	568	0	3337	0	213
15	6,5	29	10,3	44,62	15,85	35,52	7800	3510	1092	0	3198	0	0
16	9,1	37	13,1	40,66	14,40	35,41	7000	3010	420	0	3080	0	490
17	9,7	43	15,5	44,33	15,98	36,05	7754	2980	248	62	4402	0	62
18	10,9	41	14,0	37,61	12,84	34,15	7200	2592	72	0	4176	0	360
19	9,1	38	13,0	41,76	14,29	34,21	11545	5855	690	0	5000	0	0
20	9,2	43	15,1	46,79	16,41	35,12	15000	7500	1050	0	6000	0	450
21	9,9	45	15,5	45,45	15,66	34,44	13600	6936	272	0	5984	0	408
22	9,3	36	12,9	38,71	13,87	35,83	27100	22764	0	0	3252	0	1084
23	9,6	42	14,9	43,75	15,52	35,48	7900	3950	553	0	3397	0	0

Apêndice C: Valores relativos aos exames bioquímicos dos animais do grupo controle - São Paulo – 2008-2010

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS									
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	GGT (U/L)
01	47,7	1,15	7,20	3,80	36,00	-	-	-	-	1,0
02	68,37	1,19	6,86	3,57	39,89	89,35	-	-	-	-
03	64,95	1,51	8,19	3,63	36,75	-	-	-	-	0,3
04	41,90	1,50	6,90	3,80	56,0	19,0	-	-	-	1,0
05	41,50	1,40	6,80	3,60	49,90	24,0	-	-	-	1,0
06	48,30	1,40	7,20	3,50	29,90	20,0	-	-	-	0
07	40,50	1,30	7,10	3,40	31,50	16,0	-	-	-	0
08	53,30	1,40	6,60	3,00	55,40	11,60	-	-	-	-
09	53,10	1,40	7,10	4,40	65,80	13,40	-	-	-	-
10	55,80	1,50	7,10	1,90	44,50	13,90	-	-	-	-

11	48,50	1,40	6,50	3,20	26,90	13,10	-	-	-	0
12	52,40	0,93	8,20	3,00	13,50	30,20	-	-	-	0
13	47,40	1,00	8,80	3,30	30,70	28,10	-	-	-	0
14	56,30	1,40	8,30	3,1	52,0	10,20	-	-	-	-
15	43,80	1,10	8,20	3,00	51,60	9,80	-	-	-	0
16	54,0	1,30	8,80	3,30	50,7	17,90	-	-	-	-
17	51,20	1,20	7,30	3,10	28,90	38,0	-	-	-	0
18	56,50	1,20	8,20	3,10	35,0	21,40	-	-	-	0
19	48,30	1,43	8,0	3,20	46,70	19,50	-	-	-	0
20	59,50	1,30	8,20	3,30	24,80	13,80	-	-	-	0,7
21	50,60	1,40	8,50	3,30	35,20	22,90	-	-	-	0
22	46,20	0,95	8,30	2,60	27,0	15,70	-	-	-	0
23	47,60	0,99	8,0	2,90	44,50	24,80	-	-	-	0

Apêndice D: Valores relativos aos hemogramas dos animais do grupo linfoma, no momento do diagnóstico - São Paulo – 2008-2010

Animal	HEMOGRAMA												
	Hemácias (milh/mm ³)	Hematócrito (%)	Hemoglobina (g/dL)	V.C.M. (fl)	H.C.M. (pg)	C.H.C.M. (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Eosinófilos (/mm ³)	Basófilos (/mm ³)	Linfócitos Típicos (/mm ³)	Linfócitos Atípicos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)
01	7,62	34,2	10,60	45	13,9	30,9	21800	16568	1962	0	2834	0	436
02	8,00	37	13,00	46,25	16,25	35,14	23000	18860	460	0	2990	0	690
03	6,40	30	9,90	46,88	15,47	33	19300	13896	579	0	3474	0	1315
04	8,30	39	11,80	46,99	14,22	30,26	19200	14016	1536	0	2880	0	768
05	7,35	35	11,10	47,60	15,1	31,7	9000	6660	324	0	1980	0	360
06	5,00	26	8,60	52,00	17,2	33,07	4800	3168	240	0	864	0	384
07	7,80	39	12,60	50,00	16,15	32,31	9100	6916	819	0	1092	0	273
08	3,60	22	6,70	61,11	18,61	30,45	12400	11408	0	0	496	0	496
09	8,10	34	11,6	41,9	14,3	34,1	64000	33920	4480	0	23680	0	1920

10	5,40	25	7,70	46,30	14,26	30,80	16200	11016	1296	0	3402	0	486
11	7,51	36	11,40	47,90	15,20	31,70	5800	4988	116	0	522	0	174
12	4,90	19	6,10	38,78	12,45	32,11	12700	11811	635	0	127	0	127
13	9,10	37	11,80	40,66	12,97	31,89	11700	10179	234	0	234	0	1053
14	6,34	34	10,20	53,63	16,09	30,00	9000	6390	1080	0	1440	0	90
15	7,40	36	11,80	48,65	15,95	32,78	17000	14110	170	0	2210	0	510
16	10,47	47	14,20	44,89	13,56	30,21	18800	16168	752	0	1880	0	0
17	9,74	42	11,60	43,12	11,91	27,62	8500	8245	85	0	170	0	0

APÊNDICE E: Valores relativos aos exames bioquímicos dos animais do grupo linfoma, no momento do diagnóstico. São Paulo, 2010.

Animal	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS									
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Proteína Total (g/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	Fosfatase Alcalina (U/L)	Bilirrubina Total (mg/dL)	Bilirrubina Direta (mg/dL)	Bilirrubina Indireta (mg/dL)	GGT (U/L)
01	65,89	1,12	7,67	3,70	165,85	65,45	0,29	0,12	0,17	4,89
02	40,40	1,40	8,20	3,30	14,40	11,60	-	-	-	0
03	62,20	1,00	7,60	-	71,50	55,20	-	-	-	-
04	22,89	1,27	7,20	3,00	73,70	24,00	-	-	-	2,35
05	62,20	1,51	7,0	1,84	39,80	36,20	-	-	-	-
06	52,00	1,10	7,0	2,40	14,40	7,50	-	-	-	2,70
07	77,00	1,20	6,70	3,30	58,00	18,00	-	-	-	0
08	99,40	0,84	5,70	2,10	199,8	75,90	1,03	0,76	0,27	1,50
09	54,70	0,80	7,30	2,00	20,70	12,30	-	-	-	0

10	34,50	0,76	5,50	2,00	163,50	28,00	1,81	1,45	0,36	0,70
11	62,00	1,50	6,0	3,40	38,00	10,00	-	-	-	0,10
12	69,30	1,10	6,20	2,60	24,40	7,20	-	-	-	1,80
13	40,10	1,40	5,80	2,80	37,10	48,00	-	-	-	1,10
14	36,16	1,52	7,40	3,56	49,00	54,00	-	-	-	2,10
15	54,90	1,40	7,0	3,10	43,10	60,70	-	-	-	0
16	61,40	1,72	7,70	3,10	59,0	51,0	-	-	-	4,6
17	50,40	1,54	-	-	44,0	50,0	-	-	-	3,1

Apêndice F: Tabela representando os animais apresentando sorologia positiva para FIV – São Paulo – 2008-2010

Animal	GSH	GPX	GR	SOD	MDA	TAS
Gordinho	13,06	12,94	9,69	7007,59	0,843	1,09
Felipe	22,75	15,72	31,66	7161,50	1,226	1,03
Média *	24,06	15,91	16,86	3857,2	0,6579	1,39
Média **	31,02	17,60	12,21	4212,00	0,5658	1,61

*Média referente aos valores dos animais do grupo experimental (linfoma).

**Média referente aos valores dos animais do grupo controle.

FIV: Imunodeficiência Viral felina.