VALTER DE MEDEIROS WINKEL

Estudo das concentrações séricas de
amilóide A, α -1 glicoproteína ácida e
proteína C reativa em felinos com linfoma
durante a quimioterapia

São Paulo

2012

VALTER DE MEDEIROS WINKEL

**Estudo das concentrações séricas de amilóide A, α -1
glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com
linfoma durante a quimioterapia**

São Paulo

2012

VALTER DE MEDEIROS WINKEL

**Estudo das concentrações séricas de amilóide A, α -1 glicoproteína
ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a
quimioterapia**

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:

Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas

São Paulo

2012

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.2605
FMVZ

Winkel, Valter de Medeiros

Estudo das concentrações séricas de amilóide A, α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia / Valter de Medeiros Winkel. -- 2012.
98 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas.

1. Gatos. 2. Linfoma. 3. Amilóide sérica A. 4. α -1 glicoproteína ácida.
5. Proteína C reativa. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação das concentrações séricas de amilóide sérica A, α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia", protocolado sob o nº 2132/2011, utilizando 35 (trinta e cinco) 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 no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/03/2011.

We certify that the Research "Evaluation of serum amyloid A, α -1 acid glycoprotein and C-reactive protein in feline lymphoma during chemotherapy", protocol number 2132/2011, utilizing 35 (thirty-five) cats, under the responsibility Profa. Dra. Silvia Regina Ricci Lucas, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 03/16/2011.

São Paulo, 30 de março de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: WINKEL, Valter de Medeiros

Título: **Estudo das concentrações séricas de amilóide A, α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia.**

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: ____/____/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Este trabalho eu dedico em especial a
minha gatinha Mitsy (in memoriam), que me
mostrou o quanto a espécie felina é superior...*

Dedico este trabalho às seguintes pessoas:

À minha querida mãe, Cidinha de Medeiros Winkel, pelo amor, dedicação e por tudo que me ajudou nesta longa jornada, sempre me apoiando em todos os momentos. É nela que me inspiro, pelo seu exemplo de vida e qualidade como profissional.

Ao meu querido pai, Valter Winkel, que com seu exemplo de caráter, integridade e profissionalismo, me inspira a seguir seus passos. Espero um dia conquistar profissionalmente o que ele conseguiu.

Ao Félix de Medeiros Winkel, meu irmão e amigo, pelas saudosas lembranças dos inocentes anos de infância e adolescência.

Ao meu querido tio José Edson de Medeiros, pelo apoio, incentivo e amor a mim dedicado durante toda essa trajetória.

À tia Cidinha e aos primos, Andréa, Juliano e Luciano, pela força, carinho e amizade.

Ao meu padrinho Luís Carlos Rossato e às madrinhas Jeanete Rossato e Mariângela Lampi, pela atenção e carinho;

À minha querida orientadora, prof^a Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, por todas as oportunidades concedidas a mim.

À minha ex-orientadora e amiga, prof. Dra. Viviani De Marco, onde me concedeu a primeira oportunidade na iniciação científica.

À minha amiga Mariana Brito dos Santos, companheira desde os tempos de ensino fundamental e médio, sempre presente e me incentivando em todos os momentos.

À Tatiana Liliane Rossi Pavan, amiga e companheira durante todo o mestrado, fruto de várias gargalhadas, histórias, cafés, almoços... Espero que nossa amizade perdure.

Às alunas de Iniciação Científica, Jéssica Soares Garcia e Ana Luiza Nairismagi Alves, que foram companheiras nos laboratórios e atendimento, tornando-se verdadeiras amigas.

À minha amiga Adriana Silva Santos, pela amizade e companheirismo nestes anos;

Às amigas Patrícia Muiña e Sandra Rincon, médicas veterinárias da UIPA, pela amizade e consideração;

Ao meu cachorro Toby (Janjão), fiel companheiro, sempre me esperando chegar, com muito amor e alegria.

Agradecimentos

À minha orientadora prof. Dra. Sílvia Regina Ricci Lucas, pela orientação, confiança, amizade e oportunidade de realizar o meu mestrado;

À Tatiana Liliane Rossi Pavan, companheira fiel durante todo o mestrado, compartilhando nossos atendimentos, estudos, disciplinas, etceteras;

À Samantha Ive Miyashiro, pela paciência, amizade, ensinamentos e fundamental colaboração na execução das provas laboratoriais deste projeto;

Ao Lucas Campos de Sá Rodrigues, pelos ensinamentos e esclarecimento de dúvidas;

À Jéssica Soares Garcia e à Ana Luiza Nairismagi Alves, pelo auxílio no atendimento e na execução das provas laboratoriais;

À FAPESP, processos nº 2010/19975-3 (auxílio à pesquisa) e nº 2010/03815-7 (bolsa), pelo auxílio fundamental para realização desta pesquisa;

À pós-graduanda Paula Hiromi Itikawa, amiga desde os tempos de estágio obrigatório, que auxiliou na formação do grupo controle deste projeto;

Aos colegas de pós-graduação Thaís Macedo, Daniel Bernandes Calvo e Cínthia Ribas Martorelli;

Aos professores Archivaldo Reche Jr, Carlos Eduardo Larsson, Márcia Mery Kogika, Denise Saretta Schwartz, Mitika Kuribayashi Hagiwara, Maria Helena Matiko Akao Larsoon, Wilson Roberto Fernandes, Maria Cláudia Araripe Sucupira e Fernando José Benesi, pelos ensinamentos e exemplos como profissionais;

Aos professores Viviani De Marco, Alexandre Merlo, Carla e Luís Artur Giuffrida Pereira da Silva, pelos ensinamentos e confiança;

À Neusa Kazue Habe e Elza Maria Rosa Faquim, pela correção técnica desta dissertação;

Aos professores Mischel Carmen Neyra Belderrain e Rodrigo Arnaldo Scarpel, pela ajuda nos esclarecimentos das dúvidas na análise estatística;

Às funcionárias do serviço de hematologia Maria Luisa Franchini e Maria Helena da Silva Pelissari, pela amizade, companheirismo, conversas e por terem agilizado todos os resultados de exames que precisávamos;

Às funcionárias do setor de Laboratório Clínico, Marly Elisabete Ferreira de Castro, Cláudia, Clara Satsuki Mori, Edna Santana dos Santos e Creide Donizete da Costa, pela boa disposição em agilizar tudo que fosse possível;

Às médicas veterinárias do HOVET, Vera Assunta Battistini Fortunato Wirthl, Bruna Maria Pereira Coelho, Khadine Kazue Kanayama, Denise Maria Nunes Simões, Paula Rummy Gonçalves Pereira, Andréia, Silvana (radiologia), Luciane Kanayama (ultrassom), Viviane Galeazzi (cirurgia), Sandra Rosner (cirurgia) e Patrícia Bonifácio Flôr (anestesia), pela constante paciência na triagem dos casos, assistência durante as quimioterapias, sedações, anestésias, cirurgias para biópsia intestinal, citologias guiadas por ultrassom, encaixes para raio-X e ultrassom abdominal, que contribuíram fundamentalmente para conclusão deste trabalho;

Aos auxiliares de enfermagem Carlito dos Santos Belau, Antônio Carlos Malaquias, Milton Gregório dos Santos, Gilberto Pereira da Cruz e Geraldo Natalino Tezzi, pelas incomensuráveis colheitas de sangue e auxílio durante as quimioterapias, além das boas conversas e histórias...

Às secretárias da graduação e pós-graduação Carolina, Aparecida Freitas, Silvana Rossi Guedes e Adelaide Borges;

Aos animais que fizeram parte deste experimento e seus proprietários;

A todos que, de uma forma ou outra, contribuíram na conclusão desta dissertação.

“Se você quer ser bem sucedido, precisa ter dedicação total, buscar seu limite e dar o melhor de si”. Ayrton Senna

“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço, à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz bem feito ou não faz”. Ayrton Senna

“Egoísmo não é viver à nossa maneira, mas desejar que os outros vivessem como nós queremos”. Oscar Wilde

RESUMO

WINKEL, V.M. **Estudo das concentrações séricas de amiloide A, α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia.** [Study of amyloid A, α -1 acid glycoprotein and C-reactive protein concentrations in feline lymphoma during chemotherapy]. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Linfomas pertencem a um grupo de neoplasias que têm em comum a origem em células linforreticulares, manifestando-se geralmente em tecidos linfóides. Em sua evolução, há uma reação generalizada do organismo de forma não específica contra as alterações sistêmicas que comprometem a homeostase, conhecida como resposta de fase aguda, a qual leva a uma importante alteração na síntese de proteínas pelo fígado, resultando no aumento de algumas proteínas conhecidas como proteínas de fase aguda, sendo as de maior relevância a amiloide sérica A, α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa. Foram objetivos deste estudo, definir o perfil eletroforético do felino com linfoma e avaliar as concentrações séricas de amiloide sérica A (ASA), α 1-glicoproteína ácida (GPA) e proteína C reativa (PCR) destes animais durante a quimioterapia, avaliando-se como possíveis indicadores de remissão de doença. Os grupos de estudo foram constituídos por 20 felinos clinicamente normais (controle) e 16 felinos com linfoma (experimental). Foram excluídos pacientes que apresentavam tratamentos prévios e/ou doenças concomitantes. A eletroforese das proteínas séricas foi realizada em tiras de acetato de celulose. Para as mensurações de ASA, GPA e PCR utilizaram-se kits comerciais, sendo as mesmas determinadas no grupo controle, uma única vez e, no grupo experimental, quando do diagnóstico e a cada 2 semanas durante 3 meses de tratamento. A análise estatística foi realizada com testes paramétricos, sendo o teste t não pareado utilizado para comparações entre os grupos controle e experimental no momento do diagnóstico e análise de variância simples (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, para comparar o grupo experimental no diagnóstico e semanas de tratamento. Foram observadas diferenças significantes entre os grupos controle e experimental no momento do diagnóstico, com relação à GPA ($p < 0,0001$), ASA ($p = 0,0028$), PCR ($p = 0,0003$), globulina ($p = 0,0087$), relação albumina: globulinas ($p < 0,0001$) e α -2 globulinas ($p = 0,0082$). Quando se compararam os achados do grupo experimental no diagnóstico e nas semanas de tratamento houve diferença nos resultados referente à GPA ($p = 0,0021$) e ASA ($p = 0,0053$), enquanto os níveis de PCR não se alteraram significativamente ($p = 0,4510$). Concluiu-se que os felinos com linfoma apresentaram uma expressiva resposta de fase aguda, caracterizada por aumento

das concentrações séricas de α -1 glicoproteína ácida, amiloide sérica A e proteína C reativa, sendo a amilóide sérica A e α -1 glicoproteína ácida potenciais indicadores de remissão de doença naqueles pacientes que estavam com suas concentrações elevadas quando do diagnóstico.

Palavras-chave: Gatos. Linfoma. α -1 glicoproteína ácida. Amilóide sérica A. Proteína C-reativa.

ABSTRACT

WINKEL, V.M. **Study of amyloid A, α -1 acid glycoprotein and C-reactive protein concentrations in feline lymphoma during chemotherapy.** [Estudo das concentrações séricas de amiloide A, alfa-1 glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma durante a quimioterapia]. 2012. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Lymphoma belongs to a group of malignancies that have in common their origin in lymphoreticular cells, and is generally manifested in lymphoid tissues. In its evolution, there is a generalized reaction of the organism against a non-specific systemic conditions that compromises the homeostasis, known as acute phase response, which leads to a significant change in protein synthesis by the liver, resulting in an increase of some proteins known as acute phase proteins, and the most relevant are serum amyloid A, α -1 acid glycoprotein and C-reactive protein. This study was designed to define the electrophoretic profile of feline lymphoma and to evaluate serum concentrations of serum amyloid A (ASA), α 1-acid glycoprotein (GPA) and C-reactive protein (PCR) of these animals during chemotherapy, evaluated as possible indicators of disease remission. The study groups consisted of 20 clinically normal cats (control) and 16 cats with lymphoma (experimental). We excluded patients who had previous treatments and/or concomitant diseases. Electrophoresis of serum proteins was conducted on strips of cellulose acetate. For measurements of ASA, GPA and PCR we used commercial kits, which are then determined, in the control group, only once and, in the experimental group, at diagnosis and every 2 weeks during 3 months of treatment. Statistical analysis was performed with parametric tests, where unpaired t test was used for comparisons between control and experimental groups at diagnosis and simple analysis of variance (ANOVA) test followed by Tukey's multiple comparisons to compare the experimental group in the diagnosis and weeks of treatment. There were significant differences between control and experimental groups at diagnosis of α -1 acid glycoprotein ($p<0,0001$), serum amyloid A ($p=0,0028$), C-reactive protein ($p=0,0003$), total globulin ($p=0,0087$), albumin: globulin ($p<0,0001$) and α -2 globulins ($p=0,0082$). When comparing the experimental group in the diagnosis and weeks of treatment was significant in the results of α -1 acid glycoprotein ($p=0,0021$) and serum amyloid A ($p=0,0053$), whereas C-reactive protein did not change significantly ($p=0,4510$). It is concluded that cats with lymphoma have an expressive acute phase response, characterized by increased in serum concentrations of serum amyloid A, α -1 acid glycoprotein and C-reactive protein, and the serum amyloid A and alpha-

1 acid glycoprotein reference potential indicators of remission in those patients who were with their high concentrations at diagnosis.

Keywords: Cats. Lymphoma. Alpha-1 acid glycoprotein. Serum amyloid A. C-reactive protein.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado das comparações múltiplas de Tukey de alfa-1 glicoproteína ácida entre as semanas de tratamento - São Paulo - 2012.....	72
Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas de Tukey de amilóide sérica A entre as semanas de tratamento - São Paulo - 2012.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cuba específica para eletroforese em fitas de acetato de celulose e aparelho para corrida eletroforética - São Paulo - 2012.....	43
Figura 2 – Coloração das fitas de acetato de celulose em corante Ponceau-S - São Paulo - 2012.....	43
Figura 3 – Corrida eletroforética em fita de acetato de celulose de 8 amostras de soro sanguíneo do grupo experimental - São Paulo - 2012.....	45
Figura 4 – Representação gráfica da eletroforese de proteínas séricas em fita de acetato de celulose - São Paulo - 2012.....	45
Figura 5 – Placa de Agar gel com 10 poços e as duas soluções “Standard” A e B - técnica de imunodifusão radial para determinação de alfa-1 glicoproteína ácida sérica em felinos - São Paulo - 2012.....	46
Figura 6 e 7 – Reação de precipitina na placa (esquerda) e mensuração do diâmetro da reação com régua plástica com escala específica para GPA (direita) - São Paulo - 2012.....	47
Figura 8 – Lavagem da placa em aparelho automático - São Paulo - 2012.....	48
Figura 9 – Placa de ELISA para ASA após reação completa e leitura em Aparelho - São Paulo - 2012.....	48
Figura 10 – Exemplo da curva de calibração de uma das placas de ELISA utilizada na determinação sérica de ASA ($R^2 = 1$) - São Paulo - 2012.....	49
Figura 11 – Lavagem da placa em aparelho automático - São Paulo - 2012.....	50
Figura 12 – Leitura da placa em aparelho Multiscan plus (Biotek) - São Paulo - 2012.....	50
Figura 13 – Placa de ELISA para PCR após reação completa e leitura em Aparelho - São Paulo - 2012.....	51
Figura 14 – Exemplo da curva de calibração de uma das placas de ELISA utilizadas na determinação sérica de PCR ($R^2 = 1$) - São Paulo - 2012.....	51
Figura 15 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de albumina sérica do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,3559$) - São Paulo - 2012.....	60

Figura 16 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de albumina sérica do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,8944) - São Paulo - 2012.....	61
Figura 17 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de proteína total do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,4261) - São Paulo - 2012.....	61
Figura 18 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de proteína total do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,7837) - São Paulo - 2012.....	62
Figura 19 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0087) - São Paulo - 2012.....	62
Figura 20 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,6015) - São Paulo - 2012.....	63
Figura 21 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da relação albumina: globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p<0,0001) - São Paulo - 2012.....	63
Figura 22 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da relação albumina: globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,8357) - São Paulo - 2012.....	64
Figura 23 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -1 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,9746) - São Paulo - 2012.....	64
Figura 24 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -1 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,7481) - São Paulo - 2012.....	65
Figura 25 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -2 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0082) - São Paulo - 2012.....	65
Figura 26 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,3974) - São Paulo - 2012.....	66

Figura 27 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -1 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,1613$) - São Paulo - 2012.....	66
Figura 28 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -1 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento ($p=0,7093$) - São Paulo - 2012.....	67
Figura 29 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -2 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,6329$) - São Paulo - 2012.....	67
Figura 30 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento ($p=0,8944$) - São Paulo - 2012.....	68
Figura 31 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração γ -globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,3727$) - São Paulo - 2012.....	68
Figura 32 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração γ -globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento ($p=0,5658$) - São Paulo - 2012.....	69
Figura 33 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p<0,0001$) – São Paulo - 2012.....	70
Figura 34 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento ($p=0,0021$) - São Paulo - 2012.....	70
Figura 35 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo controle e experimental na 12 ^a semana de tratamento ($p=0,0200$) - São Paulo - 2012.....	71
Figura 36 – Curva de regressão entre os valores de α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa do grupo experimental no momento do Diagnostic - São Paulo - 2012.....	71
Figura 37 – Curva de regressão entre os valores de α -1 glicoproteína ácida e α -1 globulinas do grupo experimental no momento do Diagnostic - São Paulo - 2012.....	72

Figura 38 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da amilóide sérica A do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0028). São Paulo, 2012.....	74
Figura 39 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da amilóide sérica A do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,0053) - São Paulo - 2012.....	74
Figura 40 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da amilóide sérica A do grupo controle e experimental na 12 ^a semana de tratamento (p=0,9076) - São Paulo - 2012.....	75
Figura 41 – Curva de regressão entre os valores de α -1 glicoproteína ácida e amilóide sérica A do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012.....	75
Figura 42 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0003) - São Paulo - 2012.....	77
Figura 43 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento (p=0,4510) - São Paulo - 2012.....	78
Figura 44 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo controle e experimental na 12 ^a semana de tratamento (p=0,0011) - São Paulo - 2012.....	78
Figura 45 – Curva de regressão entre os valores de proteína C reativa e β -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012.....	79
Figura 46 – Curva de regressão entre os valores de proteína C reativa e amilóide sérica A do grupo experimental no momento do Diagnóstico - São Paulo 2012.....	79

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Caracterização e resultados do teste sorológico de FIV / FeLV do grupo controle - São Paulo - 2012.....	53
Quadro 2 – Valores individuais, da média e do desvio padrão das proteínas de fase aguda GPA, PCR e ASA, proteína total e frações de albumina e globulinas do eletroforetograma do grupo controle - São Paulo - 2012.....	54
Quadro 3 – Caracterização do grupo experimental segundo a raça, sexo, idade, forma anatômica, e sorologia para FIV/FeLV - São Paulo - 2012.....	55
Quadro 4 – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo experimental previamente à quimioterapia - São Paulo - 2012....	56
Quadro 5 – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos e plaquetometria do grupo experimental prévio à quimioterapia - São Paulo - 2012.....	56
Quadro 6 - Determinação das proteínas de fase aguda GPA, ASA e PCR, e o perfil eletroforético de cada paciente do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2 ^a , 4 ^a , 6 ^a , 8 ^a , 10 ^a e 12 ^a semana de tratamento - São Paulo - 2012.....	57
Quadro 7 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida (em $\mu\text{g/mL}$) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante a quimioterapia - São Paulo – 2012.....	72
Quadro 8 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da amilóide sérica A (em $\mu\text{g/mL}$) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante à quimioterapia - São Paulo - 2012.....	76
Quadro 9 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da proteína C – reativa (em $\mu\text{g/mL}$) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante à quimioterapia - São Paulo - 2012.....	80

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo controle - São Paulo - 2012.....	97
Apêndice B – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos do grupo controle - São Paulo - 2012.....	98

LISTA DE ABREVIATURA

GPA – Alfa-1 glicoproteína ácida
ASA – Amilóide sérica A
PCR – Proteína C reativa
FeLV – Vírus da Leucemia felina
FIV – Vírus da Imunodeficiência felina
RNA – Ácido ribonucléico
WHO – World Health Organization
PFA – Proteínas de fase aguda
Ig – Imunoglobulinas
PIF – Peritonite Infecciosa Felina
COP – Ciclofosfamida, Oncovin® (vincristina) e prednisona
VCM – Vincristina, ciclofosfamida e metotrexato
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
SRID – Imunodifusão radial simples
TMB – Tetrametilbenzidina
HRP – Horseradish peroxidase
ANOVA – Análise de variância
SRD – Sem raça definida
Ht – Hematócrito
Hg – Hemoglobina
Hcs - Hemácias
VCM – Volume corpuscular médio
HCM – hemoglobina corpuscular média
CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média
PT – Proteína total
ALT – Alaninoaminotransferase
FA – Fosfatase alcalina
BT – Bilirrubina total
BI – Bilirrubina indireta
BD – Bilirrubina direta
GGT – Gamaglutamiltransferase

Alb. S. – Albumina sérica

Creat. – Creatinina

Plaq. – Plaquetas

Diag. – Diagnóstico

p – nível de significância

q – gama estudentizados de distribuição

ns – não significativo

s. - semana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
2 OBJETIVOS.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 GRUPOS DE ESTUDO.....	39
3.1.1 Grupo Controle.....	39
3.1.2 Grupo Experimental.....	39
3.2 EXAMES COMPLEMENTARES.....	41
3.2.1 Hemograma completo.....	41
3.2.2 Provas bioquímicas.....	41
3.2.3 Testes sorológicos para detecção de FIV / FeLV.....	41
3.2.4 Exames de Imagem.....	41
3.2.5 Citologia Aspirativa.....	42
3.2.6 Análise Histopatológica.....	42
3.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SÉRICAS EM FITAS DE ACETATO DE CELULOSE.....	42
3.4 DETERMINAÇÃO DE α-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA.....	46
3.5 DETERMINAÇÃO DE AMILÓIDE SÉRICA A.....	47
3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA.....	49
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4 RESULTADOS.....	53

4.1 GRUPO CONTROLE.....	53
4.2 GRUPO EXPERIMENTAL.....	55
5 DISCUSSÃO.....	81
6 CONCLUSÃO.....	89
REFERÊNCIAS.....	90
APÊNDICES.....	97

1 INTRODUÇÃO

Linfomas, também conhecidos pelos sinônimos Linfossarcoma ou Linfoma maligno, representam um grupo de neoplasias que tem em comum a origem em células linforreticulares, manifestando-se geralmente em tecidos linfoides, a exemplo do baço, linfonodos e fígado, entretanto, podem ocorrer em quase todos os tecidos do organismo (VAIL, 2007), sendo uma das neoplasias mais comumente diagnosticadas em felinos, respondendo por cerca de 30% de todas as neoplasias nessa espécie (ETTINGER, 2003).

Até os anos de 1980, a infecção pelo FeLV era a causa mais frequentemente relacionada com o desenvolvimento de neoplasias hematopoiéticas em gatos, sendo que 70% dos animais eram positivos ao FeLV. As formas anatômicas mais comumente observadas eram a mediastinal e a multicêntrica, afetando principalmente felinos jovens (ETTINGER, 2003). Contudo, com o advento da vacina contra o FeLV, por volta de 1985, a incidência de linfomas relacionados com o vírus diminuiu drasticamente, representando, nos últimos anos, cerca de 10 a 25% dos casos (VAIL, 2007; PINTO, 2010). Atualmente, a forma anatômica mais freqüente é a alimentar, afetando principalmente gatos idosos, FeLV-negativos, com idade média em torno de 9 a 12 anos, não havendo franca predisposição sexual ou racial (VAIL; THAMM, 2005; PINTO, 2010).

FeLV e FIV são retrovirus, compostos por duas fitas simples de RNA, em forma de um capsídeo icosaédrico e envelopado, com a presença de uma enzima denominada transcriptase reversa, necessária para sua replicação. A transmissão ocorre por contato direto, através da saliva do gato (ETTINGER, 2003; NORSWORTHY, 2004). O FeLV é considerado um carcinógeno biológico capaz de induzir linfomas e doenças mieloproliferativas, como as leucemias, além de gerar alterações hematopoiéticas como atrofia tímica, linfopenia, neutropenia, anormalidades da função neutrofílica e diminuição de linfócitos CD4 e CD8 (LEVY et al., 2008; LUTZ et al., 2009).

Evidências também indicam que o FIV pode aumentar a incidência de linfoma em gatos. Em contraste com o FeLV, que exerce um papel direto na oncogênese, por se tratar de um oncovirus (BARR et al., 1995; NORSWORTHY, 2004), acredita-se que o FIV exerça um papel indireto, secundário à imunossupressão (VAIL, 2007).

Além das retroviroses, os processos inflamatórios crônicos podem estar associados com a ocorrência de linfomas. Em humanos já se reconhece que infecções crônicas por *Helicobacter pylori* podem desencadear gastrite e câncer gástrico. Bridgeford et al. (2008)

relatam a associação de infecção crônica por *H. Heilmannii* com gastrite crônica e linfoma em gatos.

Fatores dietéticos têm sido relacionados principalmente com a maior ocorrência de linfomas alimentares, enquanto que, com relação às condições ambientais, estudos indicam um aumento significativo na probabilidade de desenvolvimento de linfomas e outros tumores em felinos expostos cronicamente à fumaça de cigarros (VAIL, 2007). Outros fatores que podem estar relacionados com o desenvolvimento de linfoma em felinos são as alterações genéticas, como já descrito em gatos de raças orientais, indicando riscos hereditários (VAIL, 2000).

A classificação do linfoma felino pode ser feita com base em sua forma anatômica (nodal, extranodal, alimentar e mediastínica), estadiamento clínico preconizado pela World Health Organization (WHO), análise histopatológica e em características imunofenotípicas (VAIL; THAMM, 2005; HAYES, 2006).

Histologicamente essa neoplasia é classificada de acordo com o tipo celular, arquitetura e morfologia das células acometidas em linfocítico (de células pequenas) ou linfoblástico (de células grandes) (RICHTER, 2003). Embora a classificação imunofenotípica também seja importante nos felinos, esta não aparenta apresentar valor prognóstico, uma vez que o linfoma nesta espécie está relacionado a influências genéticas e associação aos retrovírus (VAIL, 2007), de modo que parecem predominar os linfomas de células B (cerca de 70%); no entanto, as formas mediastinal, hepática e leucêmica são, em sua maioria, oriundas de células T (ETTINGER, 2003).

O linfoma alimentar, forma mais frequente, acomete animais idosos, com idade média de 10 a 12 anos, FeLV negativos e pode manifestar-se exclusivamente por infiltração intestinal ou por combinação de envolvimento intestinal, de linfonodos mesentéricos e do fígado. O local mais comum de acometimento no trato gastrointestinal é o intestino delgado (cerca de 50 a 80% dos casos), seguido do estômago (cerca de 25%), junção íleo-ceco-cólica e cólon, podendo apresentar-se de forma única ou difuso infiltrando as camadas do intestino, causando ou não obstrução parcial ou total da luz intestinal (ETTINGER, 2003; VAIL, 2007; PINTO, 2010). Os sintomas mais comumente observados são perda de peso, anorexia, diarreia e ocasionalmente vômitos, enquanto hematoquezia e tenesmo podem estar presentes nos casos de envolvimento do cólon. Ao exame físico, mais de 50% dos casos têm massa abdominal palpável (VAIL; THAMM, 2005; HAYES, 2006). Ressalta-se que o linfoma alimentar tem como diagnóstico diferencial a doença intestinal inflamatória e intolerância

alimentar, sendo necessários biópsia intestinal e exame histopatológico para o diagnóstico definitivo (SMITH, 2006; VAIL, 2007).

A forma mediastinal acomete mais frequentemente felinos jovens e FeLV-positivos, podendo envolver o timo e os linfonodos mediastinal e esternal, sendo comumente oriundas de células T. Os sintomas são dispneia e intolerância ao exercício, devido ao espaço ocupado pela massa ou pela efusão pleural (HAYES, 2006).

Em contraste com os cães, a forma multicêntrica é pouco freqüente, representando aproximadamente 4 a 10% dos casos. Um terço dos gatos com esta forma anatômica são FeLV-positivos e ocorre o envolvimento de linfonodos mandibulares ou cervicais e, com a progressão da doença, pode-se observar infiltração medular e hepatoesplenomegalia (ETTINGER, 2003).

O linfoma é a neoplasia renal mais comum na espécie felina, representando cerca de 5% de todos os linfomas, associada ou não à forma alimentar, apresentando-se geralmente com quadro de insuficiência renal aguda, perda de peso e anorexia. Alterações neurológicas secundárias ocorrem em cerca de 50% dos casos. À palpação abdominal, pode-se constatar aumento de volume bilateral em topografia renal e superfície irregular (HAYES, 2006).

Considerando as formas extranodais, os sintomas dependem basicamente do órgão envolvido, a exemplo cavidade nasal, ocular, sistema nervoso central e pele (VAIL, 2007). O desenvolvimento dessas outras formas ocorre devido ao estímulo oncogênico do tecido linfóide, que pode acontecer a partir de um único linfócito e afetar qualquer órgão ou tecido (SMITH, 2006; PINTO, 2010).

Os exames laboratoriais podem revelar alterações inespecíficas no hemograma, como anemia, leucocitose, linfocitose ou linfopenia, trombocitopenia e hipoproteïnemia. Elevações nas enzimas hepáticas podem ser observadas quando há acometimento hepático, enquanto que alterações na função renal e no exame de urina são detectadas quando há o envolvimento dos rins. Gamopatia monoclonal e hipercalcemia são raras de ocorrer em felinos com linfoma e deve-se sempre realizar testes sorológicos para FIV e FeLV, uma vez que tais doenças estão frequentemente relacionadas com o desenvolvimento de linfoma (ROSOL; CAPEN, 2000; ETTINGER, 2003; VAIL; THAMM, 2005).

Radiografias torácicas são importantes para avaliar a presença de massa em região mediastinal cranial ou esternal, bem como efusões pleurais e infiltração pulmonar, enquanto que a ultrassonografia abdominal encontra-se alterada em cerca de 70 a 90% dos casos de linfoma alimentar, incluindo aumento de linfonodos mesentéricos, massa intestinal distinta ou

perda difusa das características das camadas intestinais, hepatomegalia, esplenomegalia ou ascite (COUTO, 2000; HAYES, 2006; VAIL, 2007).

Para o diagnóstico definitivo do linfoma, faz-se necessária a análise citológica de material aspirado de linfonodos ou outros órgãos acometidos, por punção com agulha fina ou histopatológico após biópsia (VAIL; OGILVIE, 1998). Embora o exame histopatológico permita a classificação precisa do processo, além de possibilitar imunofenotipagem, a análise citológica é mais amplamente utilizada por ser um procedimento ambulatorial que não requer anestesia, tem baixo custo e representa pouco risco ao paciente (VAIL, 2007).

Contudo, quando da suspeita de linfoma multicêntrico na espécie felina, a análise citológica com agulha fina mostra-se menos sensível e, em muitos casos, insuficiente para se estabelecer o diagnóstico, devido à dificuldade em se distinguir linfoma de hiperplasia dos linfonodos, incluindo a linfadenopatia periférica idiopática e a hiperplasia periférica dos linfonodos dos gatos jovens (VAIL, 2000).

Nos casos de suspeita de linfoma alimentar, pode-se optar pelo aspirado de linfonodo mesentérico com agulha fina guiado por ultrassom, já que este se apresenta alterado em cerca de 50% dos casos, ou pela coleta de material para biópsia intestinal por laparotomia, uma vez que cerca de 40% dos casos apresentam formação intestinal detectada ao exame ultra-sonográfico (HAYES, 2006; VAIL, 2007). Já, quando a suspeita recai sobre a forma mediastinal da doença, a análise citológica do fluido pleural ou de qualquer massa torácica pode ser suficiente para estabelecer o diagnóstico (VAIL, 2000; ETTINGER, 2003). O diagnóstico para as formas extra-nodais é sítio específico, por exemplo, quando a suspeita é de linfoma no sistema nervoso central deve optar-se pela realização de análise citológica de fluido cefalorraquidiano e tomografia computadorizada, enquanto nos casos da forma cutânea da doença deve-se realizar biópsia da lesão e análise histopatológica da pele (MORIELLO, 2000; VAIL; THAMM, 2005).

Com relação ao tratamento, independente da apresentação anatômica, o mais efetivo é a quimioterapia, uma vez que o linfoma é uma doença sistêmica, sendo descritos diversos protocolos antineoplásicos. O protocolo a ser escolhido deve ser determinado pelo estágio da doença, presença ou não de alterações paraneoplásicas, estado físico do paciente, condição financeira e disponibilidade de tempo do proprietário. De forma geral, a poliquimioterapia com a combinação dos antineoplásicos sulfato de vincristina, L-asparaginase, clorambucil, cloridrato de doxorrubicina e prednisolona, mostra-se superior em eficácia se comparado a monoquimioterapia, sendo o tratamento bem tolerado pelo animal. O objetivo do tratamento é aumentar a sobrevida do paciente com qualidade de vida, uma vez que a cura é extremamente

rara (MCKNIGHT, 2003; CHUN et al., 2007; OBERTHALER et al., 2008; TZANNES et al., 2008).

Protocolos quimioterápicos descritos incluem o COP e Madison-Wisconsin “curto”. Diferentemente dos cães, a monoquimioterapia com doxorubicina é menos eficaz, com taxas de remissão completa em torno de 26 a 32%, sendo um tratamento pouco recomendado (ETTINGER, 2003). Quando da recidiva do linfoma, os fármacos mais comumente utilizados em gatos no chamado “resgate” são a mitoxantrona, a doxorubicina (quando não utilizada no protocolo inicial) ou a lomustina, contudo, a taxa de resposta é de apenas 40% dos casos e com menor tempo livre de doença em relação à primeira linha de tratamento (VAIL, 2007).

O prognóstico do linfoma em felinos é variável e depende de diversos fatores, como a infecção pelo FeLV e a forma anatômica da doença, mas sabe-se que a resposta à quimioterapia e sobrevida é menor do que a dos cães (VAIL et al., 1998; ETTINGER, 2003; VAIL, 2007). Richter (2003) refere que o fator prognóstico mais importante é a resposta inicial à quimioterapia, enquanto que Vail (2000) acrescenta como fatores fortemente associados com um prognóstico positivo o estágio clínico inicial, “status” FeLV negativo e associação de doxorubicina ao protocolo quimioterápico.

Na evolução do linfoma, assim como ocorre com outros processos neoplásicos, infecciosos, traumáticos, imunomediados ou inflamatórios, há uma reação generalizada do organismo de forma não específica e aguda contra lesões locais e/ou sistêmicas que comprometem a homeostase. Esta reação é conhecida como resposta de fase aguda e compõe o sistema de defesa inato do organismo (GRUYS et al., 1994; CERÓN et al., 2005). Citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e células inflamatórias são ativados, levando à produção de mais citocinas e de outros mediadores inflamatórios como a interleucina 1 e 6 e o fator de necrose tumoral, os quais têm como órgão alvo o fígado, que reage ao estímulo produzindo as proteínas de fase aguda (PFA) (WANG; TRACEY, 1999; ECKERSALL, 2004; TECLES et al., 2005).

A modulação da produção de proteínas pelo fígado depende de uma ação sinérgica das citocinas acima citadas: o fator de necrose tumoral induz a proteólise, aumentando a disponibilidade de aminoácidos para o fígado sintetizar novas proteínas; a interleucina 1 inibe a síntese de PFA negativas e estimula a produção de PFA positivas em sinergismo com os glicocorticóides, que também medeiam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a interleucina 6 está envolvida na liberação de PFA positivas pelos hepatócitos (BAUMANN; GAULDIE, 1994; PALTRINIERI, 2007).

A resposta de fase aguda é caracterizada por diferentes efeitos sistêmicos, incluindo febre, leucocitose, hipercortisolismo, diminuição nas concentrações séricas de tiroxina, mudanças metabólicas (gliconeogênese, lipólise e catabolismo muscular) e diminuição sérica de cálcio, ferro e zinco (GRUYS et al., 1994; YAMASHITA et al., 1994; CERÓN et al., 2005).

Após algumas horas da ocorrência da lesão, a síntese de proteínas pelo fígado é drasticamente alterada, resultando no aumento de algumas proteínas sangüíneas, as PFA positivas, e na diminuição da síntese de outras proteínas, as PFA negativas (GRUYS et al., 2005). Exemplos de PFA negativas são a pré-albumina, albumina e transferrina (KUSHNER; RZEWNICKI, 1999; CERÓN et al., 2005). As PFA positivas incluem proteínas com atividade antibacteriana ou imunomoduladoras, como a proteína C reativa e a α -1 glicoproteína ácida, proteínas de transporte, a exemplo da haptoglobina e da ceruloplasmina, e proteínas que protegem os tecidos contra moléculas potencialmente danosas, tais como amiloide sérica A e α -globulinas (PALTRINIERI, 2007).

As proteínas de fase aguda têm sido utilizadas como biomarcadores de infecção, inflamação e trauma há várias décadas em medicina humana, contudo são pouco usadas na rotina clínica veterinária (MOBASHERI; CASSIDY, 2010). Um biomarcador é uma molécula biológica usada para definir a progressão de uma doença, estadiando e determinando prognóstico ou os efeitos do tratamento sobre a mesma, como indicador de remissão ou recidiva da doença (HENRY, 2010).

A eletroforese de proteínas é recomendada quando o paciente apresenta hiperglobulinemia, sendo uma técnica que separa as globulinas em frações α , β e γ , quantificando-as e comparando-as com o valor de referência de cada espécie. (THOMAS, 2000; KANEKO, 2008). Estas globulinas são separadas com base em seu grau de migração no campo elétrico (THRALL, 2004; ECKERSALL, 2008), sendo que proteínas que migram na fração α -globulinas incluem as PFA, lipoproteína de alta densidade e α -fetoproteína, as da fração β -globulinas são outras PFA, lipoproteína de alta densidade, ferritina, transferrina e algumas imunoglobulinas como a IgM e IgA e, por sua vez, as γ -globulinas incluem as imunoglobulinas IgG, IgM, IgA e IgE (THOMAS, 2000).

Aumentos concomitantes de α e β -globulinas ocorrem muitas vezes como parte da resposta de fase aguda, enquanto que aumentos de β e γ -globulinas estão associadas com inflamação crônica ou infecção (THOMAS, 2000).

Diferentes técnicas são descritas na bibliografia veterinária para realização de eletroforese, como a técnica de acetato de celulose, em gel de agarose e, mais recentemente, eletroforese por zona capilar (GIORDANO; PALTRINIERI, 2010).

Gerou-Ferriani et al. (2011), que analisaram o perfil eletroforético de gatos com linfoma no ato do diagnóstico, por meio da técnica de gel de agarose, constataram diminuição estatisticamente significativa da concentração de albumina e aumento da fração β -globulinas no grupo experimental quando comparado ao controle, não sendo observada alteração na fração γ -globulinas, mostrando a baixa ocorrência de gamopatias em felinos com linfoma.

Por sua vez, Taylor et al. (2010) estudaram o perfil eletroforético pela técnica de gel de agarose em 155 felinos, dos quais 87,7% (136/155) apresentaram alterações no eletroforetograma, notadamente diminuição na concentração de albumina e aumento na fração γ -globulinas, caracterizada essencialmente por uma gamopatia policlonal, associada principalmente com doenças infecciosas/inflamatórias (83 casos, sendo 39 peritonite infecciosa Felina) e neoplasias (14 casos). Já os achados de gamopatia monoclonal foram incomuns (4,9%) e estiveram associados com neoplasias e peritonite infecciosa.

Com relação às proteínas de fase aguda, estudos demonstram que as de maior relevância na espécie felina são a α -1 glicoproteína ácida, amilóide sérica A e haptoglobina, com aumento significativo em suas concentrações após algumas horas da indução de inflamação e mantendo-se elevadas pelo mesmo tempo em que o estímulo inflamatório persistir (KAJIKAWA et al., 1999; CERÓN et al., 2005, 2008; PALTRINIERI, 2007).

Segundo Kajikawa et al. (1999), as concentrações séricas de amilóide sérica A, α -1 glicoproteína ácida e haptoglobina apresentaram-se aumentadas entre 7 a 11 vezes em gatos com inflamação induzida ou submetidos à cirurgia, se comparado a um grupo controle de felinos clinicamente saudáveis, em contraste às concentrações de proteína C reativa (PCR), que não sofreram alterações significativas entre os dois grupos.

A α -1 glicoproteína ácida (GPA) é uma glicoproteína com peso molecular de cerca de 42 kDs e composta por 45% de carboidrato, migrando no eletroforetograma na região α 1-globulina. É sintetizada e secretada principalmente pelos hepatócitos, contudo, a produção e expressão gênica de GPA extra-hepática já foram confirmadas (GORDON; KOJ, 1985; FOURNIER et al., 2000; THOMAS, 2000; MURATA et al., 2004). A GPA tem duas principais funções fisiológicas, de imunomodulação e de ligação a fármacos. Esta última função tem papel importante, uma vez que a albumina, a mais importante proteína que se liga a drogas encontra-se em concentrações diminuídas na resposta de fase aguda, por se tratar de uma PFA negativa (FOURNIER et al., 2000; MURATA et al., 2004).

Em humanos, as concentrações de GPA são de importante valia para o estadiamento e monitoração de doenças malignas, a exemplo do linfoma, do câncer colorretal, cervical e esofágico, com aumento de suas concentrações quando a doença está ativa (GANZ et al., 1983; SELTING et al., 2000). Já em cães, vários trabalhos têm associado o aumento sérico de GPA a diferentes afecções, a exemplo do linfoma, erliquiose e condições de inflamação aguda, como na gastrenterite hemorrágica (OGILVIE et al., 1993; HAYASHI et al., 2001; FAN, 2003; KOGIKA et al., 2003).

Ogilvie et al. (1993) sugeriram que a determinação das concentrações de GPA em cães com câncer pode ser útil para monitoração da resposta quimioterápica e para detectar recidiva da doença antes que o animal apresente alterações clínicas. De forma similar, Hahn et al. (1999), após estudar cães com linfoma submetidos a tratamento com doxorrubicina, concluíram que a mensuração sérica da α -1 glicoproteína ácida pode ser um método benéfico para prever a recidiva da doença antes mesmo que o animal apresente recidiva clínica.

Hagman (2011) avaliou GPA em cadelas com piometra hospitalizadas e constatou aumento em suas concentrações, estando este aumento diretamente relacionado com a gravidade da doença. Em estudo similar conduzido por DABROWSKI et al. (2007), foram observados resultados semelhantes, porém utilizando-se as dosagens de PCR e ASA.

Segundo Kajikawa et al. (1999), GPA aumentou significativamente em felinos com inflamação espontânea ou induzida experimentalmente, assim como também foi observado em gatos com doença neoplásica, notadamente o linfoma, contudo a intensidade do aumento de GPA apresentada não teve importância prognóstica (SELTING et al., 2000; CÔRREA et al., 2001; PALTRINIERI, 2008; ECKERSALL; BELL, 2010), contrastando com o que já havia sido confirmado em cães (TECLES et al., 2005).

Outra aplicação relatada para GPA em medicina de felinos está relacionada com o diagnóstico diferencial de PIF, sendo que sua mensuração melhoraria a especificidade e sensibilidade clínica do diagnóstico da doença, em conjunto com alterações clínicas, titulação de anticorpos e relação albumina: globulinas (DUTHIE et al., 1997; ECERKSALL, 2004), considerando que, ainda hoje, o diagnóstico da doença é confirmado apenas com a necropsia.

A amilóide sérica A (ASA), que migra na região α 1-globulinas do eletroforetograma (JAIN, 1993), é uma pequena proteína sérica com peso molecular de 15 KDa, considerada a principal PFA em gatos (JAIN, 1993; PETERSEN et al., 2004; PALTRINIERI, 2008), sendo que o aumento em suas concentrações séricas pode ser superior a 1000 vezes os valores de referência durante a inflamação, indicando que pode ser um importante marcador da evolução de doenças, sejam elas de origem traumática, inflamatória, infecciosa ou neoplásica

(KUSHNER; RZEWNICKI, 1999; UHLAR; WHITEHEAD, 1999). O local primário da síntese é o fígado, contudo a produção extra-hepática já tem sido descrita (GORDON; KOJ, 1985; KIMURA et al., 2001; SASAKI et al., 2003).

O papel preciso da ASA no sistema de defesa durante a inflamação não está bem definido, contudo, muitas funções clinicamente importantes têm sido propostas, a exemplo de envolvimento no transporte e metabolismo de lipídeos, degradação de enzimas da matriz extracelular e quimiotaxia de células inflamatórias ao local da lesão tecidual (KUSHNER; RZEWNICKI, 1999; UHLAR; WHITEHEAD, 1999; PETERSEN et al., 2004). Além disso, Gruys *et al.* (2005) referem seu envolvimento na resposta imune-moduladora.

Em humanos, a ASA é precursora da proteína amilóide A e está potencialmente envolvida na patogênese da amiloidose, da artrite reumatóide e aterosclerose (UHLAR; WHITEHEAD, 1999; CERÓN et al., 2005). De acordo com Kimura et al. (2001) e Ramankulov et al. (2008), o aumento nas concentrações de ASA em pacientes humanos com carcinoma de células renais é fator prognóstico negativo em termos de sobrevida, além de ser indicativo da presença de metástase nestes pacientes.

Por sua vez, Cho et al. (2004) estudaram 42 pacientes humanos com câncer nasofaríngeo, sendo que 70% deles apresentavam elevação expressiva de ASA previamente ao tratamento e correlação positiva entre o aumento de ASA e a recidiva da doença durante a monitoração do tratamento, indicando que a ASA é um importante marcador tumoral para recidiva da doença. Resultados similares foram constatados por Chan et al. (2006), que analisaram a ASA em pacientes humanos com câncer gástrico.

Segundo Merlo et al. (2008), a ASA encontrou-se significativamente aumentada em cães com linfoma antes da quimioterapia se comparada ao grupo controle, contudo, não se observou aumento em suas concentrações quando houve recidiva da doença, demonstrando que a ASA não pode ser utilizada como marcador de recidiva de linfoma multicêntrico em cães. Em felinos, Kajikawa et al. (1999) e Sasaki et al. (2003) avaliaram que as concentrações de ASA aumentaram rapidamente 3 a 6 horas após estímulo inflamatório, sendo este aumento mais significativo em algumas doenças, a exemplo da insuficiência renal, infecção, neoplasias e hepatopatias. Contudo, a magnitude deste aumento foi menor do que a observada em outras espécies (KAJIKAWA et al., 1999; CERÓN et al., 2005).

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína sérica com peso molecular de 100kD, constituída por 5 subunidades de 20kD cada, que migra na região β 2-globulinas do eletroforetograma, sendo a primeira proteína de fase aguda descrita em literatura (CERON et al., 2005; GRUYS et al., 2005, MERLO, 2005). Na espécie canina é considerada a principal

PFA, tendo sido isolada e caracterizada por Caspi et al. (1984). Esta proteína desenvolve papel importante na proteção contra infecções, na prevenção de resposta auto-imune e na regulação da resposta inflamatória (MURATA et al., 2004).

De acordo com Kajikawa et al. (1999) e Ceron et al. (2005), os métodos para detecção da proteína C reativa na espécie felina permanecem escassos, já que se acredita que tal proteína não esteja envolvida na resposta de fase aguda nesta espécie.

Kajikawa et al. (1999) estudaram as concentrações séricas de proteína C reativa em felinos sadios e naqueles com inflamação induzida (pós cirúrgico), contudo não foram observadas alterações significativas em tais concentrações entre os dois grupos (controle e experimental), ao contrário do que já foi constatado em cães (MURATA et al., 2004; MERLO et al., 2007), nos quais a proteína C reativa aumenta significativamente em várias doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas, estando este aumento relacionado diretamente com a extensão e a atividade da doença.

Em dois estudos distintos, Merlo et al. (2007) e Nielsen et al. (2007) avaliaram a PCR em cães com linfoma durante a quimioterapia e concluíram de maneira similar que há um aumento significativo em suas concentrações no momento do diagnóstico, diminuição durante o tratamento bem-sucedido dos pacientes, porém não ocorre novo aumento relacionado à recidiva do linfoma.

Matijatko et al. (2007) constataram evidências de resposta de fase aguda em cães naturalmente infectados por *Babesia canis* por meio da mensuração da proteína C reativa e amilóide sérica A, e essas proteínas foram úteis para monitoração do tratamento.

Tecles *et al.* (2009) constataram que a resposta de fase aguda, avaliada pela mensuração da PCR, ASA e haptoglobina, foi estimulada na cadela com neoplasia mamária principalmente quando da presença de metástases, não se relacionando diretamente com o câncer primário.

O impacto da quimioterapia sobre a resposta de fase aguda foi avaliado por Merlo (2005), por meio da mensuração da amilóide sérica A e da proteína C reativa em cães clinicamente sadios, e não foram observadas alterações significativas nos níveis séricos das proteínas de fase aguda em dois grupos controles de cães sadios submetidos aos protocolos quimioterápicos COP (ciclofosfamida, vincristina e prednisona) e VCM (vincristina, ciclofosfamida e metotrexato) se comparados ao grupo controle de animais hígidos não tratados, indicando que a quimioterapia por si só não induz à resposta de fase aguda.

Martinez-Subiela et al. (2004) avaliaram a influência da administração de corticosteróide na produção das proteínas de fase aguda de cães e concluíram que a

haptoglobina apresentou aumento significativo em suas concentrações, enquanto que a ASA, PCR e ceruloplasmina não foram afetadas.

Ainda não está completamente esclarecido o real significado da resposta de fase aguda em felinos com linfoma, principalmente no que tange a relacionar as PFA como marcadores de remissão da doença, não estando definido o quanto elas estão aumentadas quando do diagnóstico e se a melhora clínica do paciente felino com linfoma em tratamento quimioterápico é acompanhada por uma progressiva diminuição em seus níveis séricos.

2 OBJETIVOS

Considerando-se a importância dos linfomas na rotina de atendimento clínico de felinos, a mensuração sérica das proteínas de fase aguda, notadamente a alfa-1 glicoproteína ácida, amiloide sérica A e proteína C reativa, pode ser de grande valia para monitorar o tratamento.

Desta forma, os objetivos do presente estudo foram:

- a) avaliar o perfil eletroforético de felinos com linfoma pela técnica de acetato de celulose
- b) determinar as concentrações séricas das proteínas de fase aguda amiloide sérica A, α 1-glicoproteína ácida e proteína C reativa em felinos com linfoma, no diagnóstico e durante 12 semanas de quimioterapia antineoplásica;
- c) verificar se as PFA podem atuar como indicadores de remissão da doença.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS DE ESTUDO

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.

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

3.1.1 Grupo Controle

Foi constituído por 20 felinos adultos, submetidos à anamnese, exames físico e laboratoriais (hemograma completo, plaquetometria, uréia, creatinina, alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamyltransferase, bilirrubinas, proteínas totais, albumina sérica e testes sorológicos de FIV / FeLV que comprovaram a sua higidez, sendo a amostra de sangue desses animais colhida uma única vez.

3.1.2 Grupo Experimental

Foram estudados 16 animais da espécie felina com diagnóstico linfoma, atendidos no Serviço de Clínica Médica (VCM-HOVET- FMVZ/USP). Não houve restrições sexuais, etárias ou raciais no grupo estudado, entretanto foi utilizado como critério de exclusão a utilização de qualquer tratamento prévio e a ocorrência de doenças concomitantes.

Para a confirmação do diagnóstico de linfoma e inclusão do paciente no grupo de estudo foram considerados dados de anamnese e exames físico e laboratoriais, bem como a análise de exame citológico de material proveniente de punção aspirativa de órgãos acometidos. Nos casos em que a citologia não foi conclusiva ou que não foi possível ser realizada, os animais foram encaminhados ao Serviço de Cirurgia (VCI-HOVET-FMVZ/USP) para realização de biópsia para análise histopatológica.

Foram colhidos 8,0mL de sangue por punção venosa jugular ou cefálica, dos quais 2,0mL foram acondicionados em frasco contendo EDTA a 10% para confecção de hemograma e contagem de plaquetas e o restante mantido em frasco siliconizado, sem anti-coagulante, o qual

foi centrifugado para obtenção do soro sanguíneo e aliqotado para a realização dos outros exames laboratoriais.

As amostras de soro sanguíneo para análise das proteínas de fase aguda foram colhidas quando do diagnóstico, após 2, 4, 6, 8, 10 e 12 semanas do início do protocolo quimioterápico. O soro foi armazenado a -70°C até o momento da realização das determinações específicas das PFA.

O protocolo quimioterápico instituído foi escolhido segundo a forma anatômica do linfoma, que responde de maneira diferente a ação dos quimioterápicos, considerando-se também que, diferente dos cães, não existe um protocolo melhor estudado e definido, em termos de eficiência, para o tratamento do linfoma felino. Durante o tratamento, o protocolo também foi modificado, de acordo com a resposta à quimioterapia ou aos efeitos colaterais observados, entretanto, a base do tratamento foi a utilização de prednisolona, clorambucil, L-asparaginase, cloridrato de doxorrubicina e sulfato de vincristina.

Durante o tratamento, a resposta dos animais à quimioterapia (ausência de resposta, parcial ou completa) foi acompanhada de acordo com a forma anatômica do linfoma:

- alimentar: melhora nos sintomas (ausência de vômitos e diarreia, ganho de peso e melhora no apetite) e redução dos linfonodos mesentéricos e alças intestinais sem alterações detectadas por meio de ultrassonografia abdominal;
- multicêntrica: redução parcial ou total dos linfonodos periféricos (medidos a cada exame físico com paquímetro) e controle dos sintomas relacionados à doença;
- renal: ultrassonografia abdominal (diminuição no tamanho dos rins e avaliação da arquitetura renal), exame de urina tipo 1 e perfil sérico renal (melhora da função renal) e melhora clínica relacionada à doença.
- mediastinal: ausência de efusão pleural, redução do tamanho do linfonodo mediastinal e melhora clínica.

Para os animais em tratamento, a frequência de atendimento no hospital foi quinzenal durante os três meses iniciais, quando então, se tornava mensal.

Os animais com linfoma em estado clínico grave que não chegaram a completar os três meses de tratamento estipulados para a avaliação da resposta de fase aguda foram excluídos do estudo.

3.2 EXAMES COMPLEMENTARES

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

3.2.1 Hemograma completo

As contagens absolutas de hemácias, leucócitos e plaquetas foram determinadas em contador automático veterinário ABC Vet Horiba – SP, e a contagem diferencial de leucócitos, bem como as análises morfológicas das células foram realizadas no microscópio através da confecção de lâmina *in natura* corada pelo corante Rosenfeld.

3.2.2 Provas Bioquímicas

Incluíram as determinações de uréia, creatinina, alanina-aminotransferase, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase, bilirrubinas, proteínas totais e albumina, as quais foram determinadas em analisador automático Liasys® - Roche, de acordo com o Laboratório Clínico do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.2.3 Testes sorológicos para detecção de FIV/FeLV

Realizados por meio de kit comercial ELISA (Snap® FIV / FeLV Combo Test IDEXX) no momento do diagnóstico.

3.2.4 Exames de Imagem

Foram realizadas, conforme a necessidade, radiografias torácicas e ultrassonografia abdominal no grupo experimental, obedecendo às diretrizes do serviço de Diagnóstico por

Imagem do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VCI- HOVET – FMVZ/USP).

3.2.5 Citologia Aspirativa

Os pacientes do grupo experimental foram submetidos à punção aspirativa com agulha fina para análise citológica nos seguintes casos:

- de linfonodos periféricos, quando estes apresentavam-se alterados;
- de órgãos e/ou linfonodos abdominais alterados, guiada por ultra-som;
- de efusões pleurais ou abdominais, com finalidade terapêutica e diagnóstica.

O conteúdo obtido, após confecção de esfregaço em lâmina, foi corado pela técnica de Rosenfeld e analisado em microscópio óptico.

3.2.6 Análise histopatológica

Nos casos em que a análise citológica não foi elucidativa, bem como naqueles pacientes em se fez necessária a intervenção cirúrgica para fins terapêuticos, optou-se pela biópsia de tecidos para análise histopatológica, sendo os animais encaminhados para o Serviço de Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). O material colhido foi fixado em formol a 10% e enviado ao Serviço de Patologia Animal (VPT – HOVET – FMVZ/USP) ou a centros especializados.

3.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS SERICAS EM FITAS DE ACETATO DE CELULOSE

As amostras de soro sanguíneo congeladas a -70°C foram utilizadas para eletroforese de proteínas séricas em fitas de acetato de celulose de acordo com a técnica de VAN ZYL (1966) modificada, que segue descrita abaixo.

Figura 1 – Cuba específica para eletroforese em fitas de acetato de celulose e aparelho para corrida eletroforética - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Figura 2 – Coloração das fitas de acetato de celulose em corante Ponceau-S - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Após descongelamento das amostras em temperatura ambiente, as mesmas foram aplicadas em fitas de acetato celulose sob um suporte (após imergir as tiras em solução tampão a 10%, para preencher todos os poros da fita com a solução tampão, durante 10 minutos e enxutas com papel filtro) e realizou-se a corrida eletroforética em cuba específica para eletroforese (cuba horizontal Biosystem® modelo 280) preenchida com solução tampão a 10% (tampão tris-veronal, pH 8,8 e força iônica 0,05) durante 35 minutos, a 220mV (Figura 1). Cada fita de acetato de celulose de 5,7 X 14 cm abrigava 8 amostras de soro. Desligou-se o aparelho, retiraram-se as tiras, deixando o excesso de tampão escorrer, sem entrar em contato com a área da corrida. As fitas foram colocadas em uma cuba plástica para coloração com corante Ponceau-S (ponceau-S a 0,5% em solução ácido tricloroacético a 5%) por 15 a 20 minutos (Figura 2).

Então, procedeu-se com a descoloração das tiras, lavando-as com água destilada e ácido acético glacial a 5% de forma alternada (3 vezes de água e 2 vezes do ácido acético a 5%). Na sequência, adicionou-se metanol (álcool metílico - agente desidratante), deixando agir por 3 minutos, seguido da solução diafanizadora (metanol PA 42mL + ácido acético glacial 8 mL + glicerina 0,3mL), durante mais 3 minutos. Decorrido esse tempo, as tiras foram estendidas em uma placa de vidro liso, e levadas rapidamente para a estufa a 70°C, aguardando aproximadamente 7 minutos para secar.

Depois de secas, após o resfriamento da placa, procedeu-se com a identificação das fitas com caneta permanente, em área diferente da corrida eletroforética. Por fim, a leitura foi realizada em densitômetro, para transformação da distribuição das manchas (Figura 3) em um gráfico representativo (Figura 4) e posterior integração das áreas discriminadas, obtendo-se resultados em porcentagem e em concentração.

Figura 3 – Corrida eletroforética em fita de acetato de celulose de 8 amostras de soro sanguíneo do grupo experimental - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Figura 4 – Representação gráfica da eletroforese de proteínas séricas em fita de acetato de celulose - São Paulo - 2012

3.4 DETERMINAÇÃO DE α -1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA

Para determinação das concentrações séricas da α -1 glicoproteína ácida nas amostras de soro congelado a -70°C , utilizou-se um teste comercial de procedência irlandesa específico para a espécie felina (“PHASE” Feline α -1 Acid Glycoprotein SRID Assay Kit TP-805-F Tridelta Development Limited). Trata-se de uma técnica de imunodifusão radial, realizada em placa de Agar gel com 10 poços cada (Figura 5), na qual uma reação de precipitina específica ocorre entre a GPA da amostra e um anticorpo específico para GPA felino incorporado no gel, sendo visível o anel de precipitina formado.

O soro descongelado em temperatura ambiente foi pipetado na dose de $5\mu\text{L}$ em cada poço da placa. Duas soluções “Standard” A ($2.000\mu\text{g/mL}$) e B ($500\mu\text{g/mL}$) foram utilizadas em cada placa para comparar com as concentrações das amostras. Então, as placas foram incubadas a 37°C , mantidas na posição horizontal, cobertas, em ambiente umedecido, por 24 a 48 horas, quando se realizou a leitura do teste.

Figura 5 – Placa de Agar gel com 10 poços e as duas soluções “Standard” A e B - técnica de imunodifusão radial para determinação de α -1 glicoproteína ácida sérica em felinos - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

O diâmetro do anel (Figura 6), mensurado através de uma régua plástica de escala específica (Figura 7), é diretamente proporcional à concentração de GPA da amostra, quando comparada com as concentrações das duas soluções-padrão A e B.

Figuras 6 e 7 – Reação de precipitina na placa (esquerda) e mensuração do diâmetro da reação com régua plástica com escala específica para GPA (direita) - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

3.5 DETERMINAÇÃO DE AMILÓIDE SÉRICA A

A amilóide sérica A foi mensurada nas amostras estocadas a -70°C utilizando-se um teste comercial ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) multiespécies (cães, gatos, bovinos, suínos e equinos) de procedência irlandesa ("PHASE™" RANGE Serum Amyloid A Assay, Tridelta Development Limited). As placas eram compostas por 96 poços contendo anticorpos monoclonais anti-amilóide A sérica aderidos.

As amostras foram previamente diluídas em proporção 1:500 (mistura de $10\mu\text{L}$ de soro homogeneizado a 5mL de tampão diluente específico), como recomendado pela fabricante. Procedeu-se, após esta etapa, com a preparação da curva de calibração, onde C1 representou o ponto de maior concentração e C6 o ponto de concentração nulo (C1 – 100ng/mL ; C2 – 50ng/mL ; C3 – 25ng/mL ; C4 – $12,5\text{ng/mL}$; C5 $6,25\text{ng/mL}$; C6 – 0). Então, adicionaram-se $50\mu\text{L}$ de anticorpos monoclonais biotinilados anti-amilóide A sérica / conjugado HRP em cada poço, seguido da adição de mais $50\mu\text{L}$ da amostra diluída em cada poço, em duplicata, sendo a placa

incubada a 37°C por uma hora. Após incubação, a placa foi lavada com solução específica por 4 ciclos em aparelho automático (Microplate washer - Alka) (Figura 8), quando adicionaram-se 100µL por poço de substrato TMB e incubou-se por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, aplicou-se a solução de bloqueio (100µL por poço) e procedeu-se imediatamente com a leitura da placa (Figura 9), com absorvância de 450 nm em aparelho MULTISCAN® PLUS (BIOTEK).

Devido à curva de calibração (Figura 10) e ao fato da análise das amostras ser feita em duplicada, foi possível processar quarenta e duas amostras em cada placa. Quando a absorvância da diluição 1:500 superava a do controle máximo, realizava-se nova análise das amostras numa diluição de 1:1000 ou 1:2000.

Figura 8 – Lavagem da placa em aparelho automático - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Figura 9 – Placa de ELISA para ASA após reação completa e leitura em aparelho - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Foi calculada a média entre as duas absorvâncias geradas para cada amostra e cada controle, onde o valor da absorvância da amostra do controle nulo foi subtraído. Também foi gerada uma curva (curva de calibração) que delineava a dispersão das absorvâncias dos controles e suas concentrações de amilóide sérica A. Uma curva de calibração foi feita para cada placa.

Figura 10 – Exemplo da curva de calibração de uma das placas de ELISA utilizada na determinação sérica de ASA ($R^2 = 1$) - São Paulo - 2012

Para atingir a concentração de amilóide sérica A, multiplicava-se o valor oriundo do gráfico pelo fator de diluição da amostra, neste caso, 500.

3.6 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA

A determinação das concentrações séricas de proteína C reativa foi realizada por meio de um teste comercial de procedência americana, específico para a espécie felina (Feline CRP ELISA Kit, Icllab, USA). Este imunoensaio foi realizado numa placa, na qual estão aderidos anticorpos anti-proteína C reativa felina. Em cada placa, contendo 96 poços, foi possível processar 40 amostras, devido à curva de calibração e à análise duplicata das amostras.

As amostras foram diluídas na proporção de 1:8000, quando então se preparou a curva de calibração, onde “Standard 0” representava o ponto de concentração nulo e “Standard 7” o ponto de concentração máximo (S0 – 0ng/mL; S1 – 3,125ng/mL; S2 – 6,25ng/mL; S3 – 12,5ng/mL; S4 – 25ng/mL; S5 – 50ng/mL; S6 – 100ng/mL; S7 – 200ng/mL). Desta forma, procedeu-se com a pipetagem de 100μL das amostras diluídas nos poços da placa que foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Depois da remoção do excesso de amostra com solução apropriada, em lavador automático por 4 ciclos de lavagem (Figura 11),

acrescentaram-se à placa 100µL de conjugado (anticorpo anti-proteína C reativa felina com “horseradish peroxidase”) e incubou-se por mais 30 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Após novo ciclo de lavagens, pipetaram-se 100µL de solução substrato tetrametilbenzidina (TMB) e incubou-se novamente a placa durante mais 10 minutos, quando se aplicaram 100µL da solução de bloqueio (stop solution), encerrando a reação. A leitura da placa foi realizada na sequência, em aparelho MULTISCAN®PLUS (BIOTEK) com absorvância de 450 nm (Figuras 12 e 13).

Figura 11 – Lavagem da placa em aparelho automático - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Figura 12 – Leitura da placa em aparelho Multiscan plus - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Obteve-se a média entre as duas absorvâncias geradas para cada amostra e cada controle, sendo subtraído o valor da absorvância proporcionado pela amostra do controle nulo. Também foi gerada uma curva (curva de calibração – Figura 14) que delineava a dispersão das absorvâncias dos controles e suas concentrações de proteína C reativa. Uma curva de calibração era construída para cada placa utilizada.

Figura 13 – Placa de ELISA para PCR após reação completa e leitura em aparelho - São Paulo - 2012

Fonte: (WINKEL, V.M., 2012)

Figura 14 – Exemplo da curva de calibração de uma das placas de ELISA utilizadas na determinação sérica de PCR ($R^2 = 1$) - São Paulo - 2012

Para atingir a concentração de proteína C reativa, multiplicou-se o valor oriundo do gráfico pelo fator de diluição da amostra, neste caso, 8000.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com o auxílio de dois programas estatísticos computadorizados: Minitab 15.1 e Instat.

Para atender aos objetivos propostos, inicialmente, foram utilizadas estatísticas descritivas e análise da distribuição dos dados quanto à normalidade (média, desvio padrão e dispersão). Após, aplicou-se testes estatísticos paramétricos ou não paramétricos para verificar a existência de diferença significativa entre os grupos controles e experimental.

O teste paramétrico *t* não pareado foi utilizado para comparar os resultados dos grupos controle e ato do diagnóstico da eletroforese, amilóide sérica A, proteína C reativa e α -1 glicoproteína ácida.

O teste paramétrico para análise de variância simples (ANOVA) seguido pelos testes múltiplos de Tukey's, quando aplicável, foram utilizados para comparar os resultados do grupo experimental e as semanas de tratamento da eletroforese, amilóide sérica A, proteína C reativa e α -1 glicoproteína ácida.

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

Para todas as análises adotou-se um nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 GRUPO CONTROLE

O grupo controle foi composto por 20 animais adultos, clinicamente normais submetidos a exames clínico e laboratoriais, a citar hemograma completo, perfis renal e hepático e sorologia para FIV e FeLV, caracterizados no quadro 1 e nos apêndices A e B.

A idade média dos animais do grupo controle foi de $2,7 \pm 1,0$ anos, sendo 6 machos (30%) e 14 fêmeas (70%), predominantemente sem raça definida (65 %). Todos os animais foram negativos no teste sorológico Snap para detecção de FIV e FeLV.

Quadro 1 – Caracterização e resultados do teste sorológico de FIV / FeLV do grupo controle - São Paulo - 2012

Animal	Idade (anos)	Raça	Sexo	FIV	FeLV
1	3	SRD	Fêmea	negativo	negativo
2	2	SRD	Fêmea	negativo	negativo
3	5	SRD	Macho	negativo	negativo
4	2	Maine Coon	Macho	negativo	negativo
5	2	SRD	Macho	negativo	negativo
6	2	SRD	Macho	negativo	negativo
7	2	Maine Coon	Fêmea	negativo	negativo
8	3	SRD	Fêmea	negativo	negativo
9	3	SRD	Fêmea	negativo	negativo
10	3	SRD	Fêmea	negativo	negativo
11	2	Maine Coon	Macho	negativo	negativo
12	1	SRD	Fêmea	negativo	negativo
13	3	SRD	Macho	negativo	negativo
14	2	SRD	Macho	negativo	negativo
15	3	Maine Coon	Fêmea	negativo	negativo
16	4	SRD	Fêmea	negativo	negativo
17	1	Maine Coon	Fêmea	negativo	negativo
18	4	Maine Coon	Fêmea	negativo	negativo
19	3	SRD	Fêmea	negativo	negativo
20	4	Maine Coon	Fêmea	negativo	negativo

Após seleção dos animais para ingresso no grupo controle, procedeu-se com as determinações específicas das proteínas de fase aguda GPA, ASA e PCR e caracterização do perfil eletroforético, para comparação com o grupo experimental, como se pode observar no quadro 2.

Quadro 2 – Valores individuais, da média e do desvio padrão das proteínas de fase aguda GPA, PCR e ASA, proteína total e frações de albumina e globulinas do eletroforetograma do grupo controle - São Paulo - 2012

Animal	GPA ($\mu\text{g/mL}$)	PCR ($\mu\text{g/mL}$)	ASA ($\mu\text{g/mL}$)	Pr.tot. (g/dL)	Alb.s. (g/dL)	$\alpha 1$ (g/dL)	$\alpha 2$ (g/dL)	$\beta 1$ (g/dL)	$\beta 2$ (g/dL)	γ (g/dL)
1	280,70	111,60	0,48	6,58	2,51	0,32	0,63	0,27	0,55	2,31
2	280,70	71,60	0,10	7,65	2,79	0,49	0,88	0,53	0,28	2,68
3	31,70	113,70	0,00	7,00	3,06	0,47	0,51	0,41	0,59	1,96
4	17,50	113,70	0,00	7,12	3,14	0,68	0,45	0,38	0,48	1,97
5	0,00	50,30	0,00	8,18	3,74	0,66	0,53	0,39	0,83	2,03
6	122,80	60,07	0,00	7,29	2,88	0,64	0,42	0,36	0,54	2,45
7	318,80	189,60	0,90	6,80	2,43	0,41	0,54	0,43	0,65	2,34
8	175,40	77,30	0,00	7,89	3,32	0,40	0,47	0,54	0,54	2,62
9	122,80	66,30	0,00	7,74	3,21	0,40	0,69	0,72	0,39	2,32
10	0,00	121,10	0,00	6,68	2,71	0,73	0,42	0,34	0,60	1,87
11	362,30	98,70	0,45	6,30	2,90	0,54	0,54	0,58	0,61	1,14
12	269,80	91,30	0,00	6,52	2,59	0,36	0,57	0,33	0,70	1,97
13	365,10	84,40	0,00	7,57	2,82	0,38	0,52	0,43	0,69	2,73
14	269,90	79,50	0,10	7,72	3,55	0,62	0,50	0,40	0,81	1,83
15	275,30	122,70	0,96	7,70	3,38	0,61	0,79	0,52	0,55	1,85
16	492,70	192,90	0,67	7,07	3,58	0,57	0,66	0,35	0,45	1,47
17	362,30	196,70	0,82	7,40	2,83	0,57	0,48	0,57	0,69	2,26
18	188,40	93,50	0,67	6,80	2,27	0,38	0,58	0,51	0,42	2,64
19	536,20	161,90	0,86	7,01	3,14	0,49	0,58	0,42	0,71	1,65
20	231,90	80,40	0,28	7,50	2,60	0,44	0,58	0,45	0,65	2,78
Média	235,22	108,86	0,31	7,23	2,97	0,51	0,57	0,45	0,59	2,14
Des. Pad.	154,19	44,38	0,37	0,52	0,41	0,12	0,12	0,11	0,14	0,45

4.2 GRUPO EXPERIMENTAL

O grupo experimental foi composto por 16 animais com diagnóstico de linfoma acompanhados durante 12 semanas de tratamento. No quadro 3 caracterizou-se os animais conforme a idade, sexo, raça, forma anatômica da doença e a sorologia para FIV / FeLV. Os quadros 4 e 5 demonstram os valores relativos dos hemogramas e exames bioquímicos do grupo experimental no momento do diagnóstico.

A idade média dos animais do grupo experimental foi de $9,3 \pm 4,0$ anos, com predomínio de felinos machos (62,5% - 10/16) e sem raça definida (100% - 16/16). Dentre estes, 12,5% (2/16) dos animais foram positivos para FeLV e 6,25 % (1/16) positivos para FIV.

Com relação à forma anatômica do linfoma, a mais frequente foi a alimentar, representando 68,75% (11/16), seguido pelas renal (12,5% - 2/16), mediastinal (6,25% - 1/16), multicêntrica (6,25% - 1/16) e extra-nodal (6,25% - 1/16).

Quadro 3 – Caracterização do grupo experimental segundo a raça, sexo, idade, forma anatômica, e sorologia para FIV/FeLV - São Paulo - 2012

Animal	Raça	Sexo	Idade	Forma Anatômica	FIV	FeLV
1	SRD	fêmea	14 anos	alimentar	positivo	negativo
2	SRD	fêmea	13 anos	alimentar	negativo	negativo
3	SRD	macho	9 anos	alimentar	negativo	negativo
4	SRD	macho	10 anos	alimentar	negativo	negativo
5	SRD	macho	5 anos	multicêntrica	negativo	negativo
6	SRD	macho	9 anos	alimentar	negativo	negativo
7	SRD	macho	8 anos	alimentar	negativo	negativo
8	SRD	fêmea	9 anos	alimentar	negativo	negativo
9	SRD	macho	5 anos	renal	negativo	negativo
10	SRD	fêmea	13 anos	alimentar	negativo	negativo
11	SRD	fêmea	7 anos	extra-nodal	negativo	negativo
12	SRD	macho	2 anos	mediastinal	negativo	positivo
13	SRD	macho	10 anos	alimentar	negativo	negativo
14	SRD	macho	16 anos	alimentar	negativo	negativo
15	SRD	macho	2 anos	renal	negativo	positivo
16	SRD	fêmea	7 anos	alimentar	negativo	negativo

Quadro 4 – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo experimental previamente à quimioterapia - São Paulo - 2012

Hcs (mil/ μ L)	Ht (%)	Hg g/dl	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leucócitos (mm ³)	Neutrófilos (mm ³)	Eosinófilos (mm ³)	Linfócitos (mm ³)	Monócitos (mm ³)
7,8	36	13	46,2	16,3	35,3	18300	10980	1098	6039	183
6,4	35	11	54,7	17,0	31,1	9000	7290	810	450	450
7,2	34	12	47,9	17,2	35,9	10300	8961	103	721	515
6,4	38	13	59,4	19,5	32,9	8400	6468	336	1428	168
8,4	37	12	44,1	14,4	32,7	11500	7015	230	4255	0
5,4	29	9	53,7	16,7	31,0	14600	13140	146	1314	0
7,1	39	12	54,9	17,5	31,8	12800	8576	1536	2560	128
6,5	35	12	53,8	19,1	35,4	15000	12450	1050	750	750
3,4	18	6,4	52,9	18,8	35,6	13200	12804	0	0	396
7,0	35	11	50,0	15,6	31,1	38100	34290	381	2286	1143
6,4	33	10	51,0	16,0	31,0	17300	14359	865	692	1384
8,2	42	14	51,0	14,0	33,0	9700	7275	97	2037	291
7,1	37	12	53,0	16,0	31,0	7000	4900	70	1820	210
6,1	32	10	52,0	17,0	33,0	13100	10873	1048	786	393
7,8	39	13	50,0	17,0	33,0	9300	8463	0	651	186
5,9	33	11	57,0	19,0	34,0	13900	10008	0	3058	834

Quadro 5 – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos e plaquetometria do grupo experimental prévio à quimioterapia - São Paulo - 2012

Animal	Uréia (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	PT (mg/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)	GGT (U/L)	Plaq. (mm ³)
1	51,3	0,79	8,2	2,7	22,9	16,2	0	221000
2	83,0	1,60	8,2	3,3	62,1	19,0	0	250000
3	57,0	1,02	6,8	2,8	7,4	3,1	0	514000
4	54,0	1,00	7,9	2,8	23,7	16,8	0	520000
5	55,1	1,40	8,5	3,4	76,0	13,6	0	530000
6	60,1	1,20	7,1	3,0	60,7	29,4	1,7	484000
7	85,4	0,93	8,0	3,3	21,8	9,1	0,8	336000
8	45,5	1,00	7,4	3,2	39,6	7,1	0	552000
9	104,0	1,60	7,3	3,4	26,5	7,4	0	127000
10	54,3	1,40	5,1	1,9	9,5	10,8	0	510000
11	43,2	1,50	9,1	2,8	18,5	16,4	1,9	246000
12	41,9	1,50	6,4	3,8	25,9	15,7	1,0	620000
13	54,1	1,30	7,7	3,5	26,4	20,9	0	600000
14	42,6	0,95	6,7	3,1	37,1	25,9	0,6	543000
15	480,0	6,10	8,2	3,8	18,9	6,7	0	610000
16	57,4	1,76	7,7	3,2	22,8	20,4	0	600000

Após a seleção dos pacientes para inclusão no grupo experimental e acompanhamento durante as 12 semanas de tratamento quimioterápico, procedeu-se com as dosagens específicas das proteínas de fase aguda GPA, ASA e PCR, e caracterização do perfil eletroforético, como pode ser observado no quadro 6.

Quadro 6 - Determinação das proteínas de fase aguda GPA, ASA e PCR, e o perfil eletroforético de cada paciente do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semana de tratamento - São Paulo - 2012

Animal 1										
Semana	GPA (µg/mL)	PCR (µg/mL)	ASA (µg/mL)	PT (g/dL)	Alb.s. (g/dL)	α1 (g/dL)	α2 (g/dL)	β1 (g/dL)	β2 (g/dL)	γ (g/dL)
Diag.	786,7	294,3	0,90	7,61	2,87	0,55	0,52	0,51	0,75	2,40
2	706,7	295,9	1,00	7,40	3,00	0,69	0,50	0,35	0,79	2,08
4	626,7	426,8	1,22	7,53	2,91	0,59	0,62	0,28	0,76	2,37
6	546,7	327,6	0,48	6,94	2,88	0,50	0,48	0,35	0,76	1,97
8	626,7	336,7	0,46	7,71	3,32	0,56	0,61	0,38	0,85	1,99
10	438,6	331,0	0,59	7,43	2,91	0,58	0,43	0,47	0,87	2,18
12	543,8	269,7	0,30	7,13	3,07	0,59	0,44	0,42	0,80	1,81
Animal 2										
Diag.	824,6	341,0	1,03	7,61	2,72	0,48	0,51	0,50	0,62	2,79
2	614,0	237,4	1,00	7,32	2,88	0,39	0,50	0,49	0,50	2,57
4	456,1	203,2	0,35	7,75	3,23	0,51	0,71	0,45	0,63	2,24
6	333,3	170,8	0,66	7,25	3,17	0,61	0,31	0,52	0,66	1,98
8	280,7	236,4	0,88	7,53	2,95	0,50	0,62	0,54	0,80	2,11
10	333,3	254,9	0,55	7,51	2,74	0,58	1,05	0,61	0,56	1,97
12	280,7	309,5	0,29	7,44	2,85	0,82	0,88	0,40	0,62	1,86
Animal 3										
Diag.	730,1	331,0	7,96	6,86	2,35	0,47	0,91	0,35	0,91	1,86
2	1.015,8	425,4	3,71	7,15	2,30	0,57	0,99	0,33	0,87	2,10
4	396,8	351,2	4,38	6,38	2,15	0,53	0,97	0,25	0,66	1,82
6	634,9	267,2	2,47	6,72	2,47	0,51	0,86	0,29	0,79	1,81
8	568,2	374,5	2,35	6,55	2,40	0,51	0,87	0,40	0,56	1,82
10	444,4	321,1	2,33	6,53	2,51	0,57	0,81	0,32	0,69	1,63
12	412,9	303,1	2,03	6,65	2,48	0,51	0,71	0,26	0,63	1,87
Animal 4										
Diag.	50	196,5	0,66	7,67	2,78	0,62	0,47	0,52	0,50	2,78
2	87,7	257,2	0,68	7,69	2,61	0,55	0,50	0,59	0,59	2,85
4	0	138,8	0,65	7,70	2,75	0,55	0,37	0,59	0,47	2,96
6	0	132,3	0,60	7,41	2,99	0,50	0,66	0,47	0,56	2,22
8	0	305,6	0,70	7,97	3,10	0,49	0,53	0,35	0,62	2,88
10	153,8	333,4	0,73	7,29	2,74	0,41	0,54	0,41	0,60	2,59

(Próxima página)

Semana	GPA (µg/mL)	PCR (µg/mL)	ASA (µg/mL)	PT (g/dL)	Alb.s. (g/dL)	α1 (g/dL)	α2 (g/dL)	β1 (g/dL)	β2 (g/dL)	γ (g/dL)
12	192,3	247,6	1,16	7,50	2,47	0,94	0,81	0,49	0,48	2,29
Animal 5										
Diag.	579,7	341,1	0,27	8,73	3,25	0,38	0,99	0,47	0,49	3,15
2	144,9	132,9	0,29	8,82	3,54	0,60	1,17	0,36	0,78	2,37
4	57,9	108,8	0,15	7,98	3,14	0,63	0,77	0,60	0,54	2,30
6	14,4	97,5	0	7,41	2,91	0,53	0,72	0,56	0,54	2,14
8	405,8	183,8	0	8,29	3,32	0,76	0,55	0,51	0,75	2,40
10	362,3	159,8	0	7,96	3,07	0,85	0,45	0,70	0,82	2,08
12	275,3	134,6	0	8,36	2,95	0,81	0,78	0,68	0,79	2,36
Animal 6										
Diag.	2.825,4	147,6	10,7	6,89	2,13	0,62	0,72	0,63	0,70	2,10
2	1.545,4	112,8	0	7,16	2,70	0,51	0,74	0,50	0,69	2,02
4	863,6	118,0	0,29	7,05	2,99	0,40	0,70	0,41	0,59	1,96
6	545,4	88,9	0	7,24	2,85	0,50	0,79	0,60	0,63	1,87
8	545,4	98,0	0	7,49	2,62	0,48	1,00	0,70	0,65	2,04
10	272,7	87,5	0	7,58	2,99	0,44	0,78	0,63	0,65	2,08
12	363,6	81,1	0	7,10	2,77	0,34	0,78	0,51	0,52	2,17
Animal 7										
Diag.	846,2	420,0	1,04	7,39	2,76	0,48	0,86	0,34	0,65	2,30
2	615,4	256,2	0,61	7,44	2,92	0,41	0,98	0,34	0,71	2,08
4	461,5	184,6	0,69	7,03	2,84	0,40	0,84	0,32	0,78	1,84
6	500	262,6	0,88	7,56	3,41	0,46	0,87	0,33	0,78	1,71
8	461,5	215,9	0,55	7,09	3,18	0,30	0,89	0,40	0,78	1,55
10	346,2	168,3	0,95	7,29	3,22	0,55	0,44	0,63	0,87	1,58
12	63,5	220,7	1,03	8,30	2,87	0,76	1,22	0,60	0,80	2,05
Animal 8										
Diag.	1.231,9	94,9	1,74	7,06	2,67	0,48	0,81	0,42	0,61	2,08
2	682,5	77,7	0,41	7,36	2,89	0,45	0,65	0,40	0,54	2,42
4	825,4	94,3	2,41	7,91	2,85	0,52	0,62	0,44	0,51	2,98
6	825,4	95,2	1,29	7,65	2,75	0,43	0,67	0,44	0,66	2,70
8	444,4	67,5	0	7,34	2,64	0,46	0,58	0,45	0,72	2,48
10	444,4	66,1	0	7,58	3,16	0,54	0,57	0,49	0,68	2,13
12	492,0	64,5	0	7,10	2,57	0,54	0,68	0,47	0,75	2,08
Animal 9										
Diag.	539,7	302,8	3,42	6,29	3,00	0,32	0,73	0,55	0,58	0,78
2	206,3	228,7	0	6,94	3,58	0,31	0,77	0,52	0,59	0,88
4	158,7	228,6	0,06	6,75	2,83	0,42	0,72	0,47	0,60	0,98
6	350	309,3	0	6,86	1,87	0,30	0,88	0,52	0,67	2,23
8	300	125,2	0	6,15	1,88	0,27	0,69	0,44	0,55	1,92
10	149,1	201,9	0	5,85	2,37	0,41	1,07	0,74	0,37	0,88
12	156,9	187,7	0	6,38	1,82	0,28	0,93	0,46	0,67	1,81

Animal 10										
Semana	GPA ($\mu\text{g/mL}$)	PCR ($\mu\text{g/mL}$)	ASA ($\mu\text{g/mL}$)	PT (g/dL)	Alb.s. (g/dL)	$\alpha 1$ (g/dL)	$\alpha 2$ (g/dL)	$\beta 1$ (g/dL)	$\beta 2$ (g/dL)	γ (g/dL)
2	1.508,8	122,0	5,36	8,64	2,98	0,60	0,93	0,47	0,67	2,18
4	1.035,1	107,3	5,64	9,08	3,38	0,69	0,96	0,36	0,85	2,55
6	1.245,6	141,2	2,33	8,12	2,42	0,58	0,95	0,31	0,59	2,34
8	771,9	128,7	0	7,70	2,22	0,55	0,95	0,25	0,59	2,51
10	666,6	113,9	0	7,27	1,98	0,42	0,72	0,26	0,35	3,12
12	771,9	155,9	0	7,27	1,77	0,38	0,76	0,23	0,45	2,87
Animal 11										
Diag.	771,9	353,4	1,24	6,07	2,01	0,18	0,47	0,18	0,19	3,04
2	873	233,2	2,05	6,77	2,76	0,44	0,69	0,29	0,57	1,35
4	825,4	138,5	0	6,29	2,79	0,44	0,56	0,30	0,52	1,26
6	682,5	91,9	0,05	6,08	2,41	0,36	0,48	0,27	0,58	1,47
8	444,4	65,6	0	5,47	2,76	0,24	0,38	0,32	0,38	0,82
10	111,1	67,0	0	5,56	2,79	0,28	0,46	0,39	0,39	0,90
12	188,4	156,8	0	5,86	3,55	0,52	0,57	0,35	0,27	0,59
Animal 12										
Diag.	1.405,8	174,7	0	5,07	1,49	0,29	0,59	0,47	0,43	1,79
2	1.449,3	325,7	0	6,25	2,34	0,34	0,81	0,64	0,42	1,70
4	1.144,9	156,9	0,23	5,49	1,87	0,69	0,61	0,58	0,33	1,41
6	884,1	172,4	0	5,18	1,78	0,60	0,68	0,47	0,41	1,23
8	1.058,0	87,5	0	4,35	1,56	0,60	0,39	0,43	0,38	1,00
10	1.318,8	194,8	0	5,09	1,96	0,60	0,48	0,51	0,34	1,20
12	1.057,9	186,6	0	5,93	2,18	0,72	0,76	0,56	0,39	1,32
Animal 13										
Diag.	873,0	146,5	0	8,05	3,15	0,75	0,69	0,73	0,57	2,16
2	396,8	99,5	0	7,72	3,06	0,64	0,73	0,51	0,43	2,36
4	772,7	146,4	0	7,96	3,18	0,48	0,64	0,47	0,58	2,61
6	681,8	169,4	0,21	7,90	3,12	0,85	0,72	0,59	0,48	2,15
8	636,4	80,3	0,31	7,36	3,07	0,72	0,65	0,49	0,40	2,03
10	1.000,0	151,5	0,39	7,67	3,30	0,59	0,80	0,45	0,55	1,98
12	272,7	160,3	0	6,83	3,07	0,59	0,52	0,60	0,42	1,64
Animal 14										
Diag.	840,6	67,8	0,27	7,50	2,47	0,94	0,81	0,49	0,48	2,29
2	539,7	44,5	0	7,85	2,56	0,95	1,32	0,44	0,39	2,20
4	206,3	71,6	0	6,94	2,49	0,67	0,72	0,42	0,63	2,01
6	158,7	45,9	1,39	7,61	2,81	0,77	0,84	0,43	0,60	2,15
8	158,7	42,7	0,37	6,95	2,60	0,73	0,76	0,44	0,56	1,88
10	634,9	39,0	0,02	7,38	2,76	0,79	0,93	0,46	0,45	1,98
12	492,0	92,6	0,22	7,15	2,74	0,86	0,96	0,61	0,41	1,57
Animal 15										
Diag.	1.727,3	754,5	1,82	9,59	3,58	0,61	1,59	0,78	0,61	2,42

Semana	GPA (μ g/mL)	PCR (μ g/mL)	ASA (μ g/mL)	PT (g/dL)	Alb.s.(g/dL)	α 1 (g/dL)	α 2 (g/dL)	β 1 (g/dL)	β 2 (g/dL)	γ (g/dL)
2	863,6	687,9	0,03	6,69	2,90	0,48	0,74	0,49	0,48	1,60
4	636,4	325,6	0	7,27	2,93	0,73	0,93	0,43	0,47	1,78
6	1.045,5	362,3	0,15	7,39	2,78	0,68	0,94	0,64	0,50	1,87
8	1.409,1	759,2	0,42	7,82	2,97	0,54	1,24	0,56	0,52	1,98
10	1.363,6	353,0	0,15	7,52	2,95	0,48	1,21	0,50	0,48	1,91
12	1.090,9	338,5	0,30	7,16	2,76	0,34	1,23	0,40	0,53	1,90
Animal 16										
Diag.	454,5	156,2	0,23	9,06	3,43	0,60	0,67	0,48	0,81	3,07
2	681,8	160,5	0,60	9,40	3,90	0,53	0,91	0,62	0,88	2,55
4	272,7	81,9	0	8,93	4,13	0,54	0,70	0,77	0,50	2,29
6	227,3	188,5	0	9,02	3,37	0,60	0,81	1,06	0,45	2,73
8	275,3	124,5	0,13	9,07	3,77	0,51	0,88	0,60	0,85	2,46
10	318,8	111,7	0	8,70	4,03	0,53	0,68	0,75	0,49	2,23
12	188,4	98,9	0	9,22	3,44	0,62	0,83	1,09	0,46	2,79

Nas figuras de 15 a 32, segue a análise estatística do perfil eletroforético dos animais dos grupos controle e experimental no momento do diagnóstico, e momento do diagnóstico versus semanas de tratamento.

Para comparação dos grupos controle e experimental no momento do diagnóstico utilizou-se o teste paramétrico t não pareado. Quando se comparou o grupo experimental no momento do diagnóstico e ao longo das semanas de tratamento fez-se uso do teste paramétrico para análise de variância simples ANOVA.

Figura 15 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de albumina sérica do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,3559) - São Paulo - 2012

Figura 16 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de albumina sérica do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento ($p=0,8944$) - São Paulo - 2012

Figura 17 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de proteína total do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,4261$) - São Paulo - 2012

Figura 18 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de proteína total do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semana de tratamento ($p=0,7837$) - São Paulo - 2012

Figura 19 – Representação dos valores da média e do desvio padrão de globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,0087$) - São Paulo - 2012

Figura 20 - Representação dos valores da média e do desvio padrão de globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento ($p=0,6015$) - São Paulo - 2012

Figura 21 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da relação albumina: globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p<0,0001$) - São Paulo - 2012

Figura 22 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da relação albumina: globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento (p=0,8357) - São Paulo - 2012

Figura 23 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -1 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,9746) - São Paulo - 2012

Figura 24 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -1 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento (p=0,7481) - São Paulo - 2012

Figura 25 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -2 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0082) - São Paulo - 2012

Figura 26 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração α -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semana de tratamento (p=0,3974) - São Paulo - 2012

Figura 27 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -1 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,1613) - São Paulo - 2012

Figura 28 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -1 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento (p=0,7093) - São Paulo - 2012

Figura 29 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -2 globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,6329) - São Paulo - 2012

Figura 30 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração β -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento ($p=0,8944$) - São Paulo - 2012

Figura 31 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração γ -globulinas do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,3727$) - São Paulo - 2012

Figura 32 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da fração γ -globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semana de tratamento (p=0,5658) - São Paulo - 2012

Pela análise realizada, concluiu-se que as globulinas, a relação albumina: globulinas e a fração α -2 globulinas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p=0,0087$, $p<0,0001$ e $p=0,0082$, respectivamente) quando comparadas ao grupo controle no momento do diagnóstico, contudo não houve diferenças quando as mesmas foram comparadas ao longo das semanas de tratamento. Com relação às proteínas totais, albumina sérica e as frações α -1, β -1, β -2 e γ -globulinas, tais análises não diferiram estatisticamente com o grupo controle e durante as semanas de quimioterapia.

Para análise das proteínas de fase aguda GPA, ASA e PCR utilizaram-se os seguintes testes estatísticos: teste paramétrico t não pareado para comparar os grupos controle versus experimental no diagnóstico, e teste paramétrico para análise de variância simples ANOVA seguido do teste múltiplo de Tukey, quando aplicável, para comparação do grupo experimental no diagnóstico e semanas de tratamento.

A fim de se verificar a existência de alguma diferença estatística entre o diagnóstico e as semanas de tratamento da PCR, fez-se uso também do teste t não pareado, que possibilitou a análise individual entre o diagnóstico e cada semana de tratamento.

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

Figura 33 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p<0,0001$) - São Paulo - 2012

Figura 34 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento ($p=0,0021$) - São Paulo - 2012

Figura 35 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida do grupo controle e experimental na 12ª semana de tratamento ($p=0,0200$) - São Paulo - 2012

Figura 36 – Curva de regressão entre os valores de α -1 glicoproteína ácida e proteína C reativa do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012

Figura 37 – Curva de regressão entre os valores de α -1 glicoproteína ácida e α -1 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012

Tabela 1 – Resultado das comparações múltiplas de Tukey de α -1 glicoproteína ácida entre as semanas de tratamento - São Paulo - 2012

Comparação	Diferença Média	q (#)	p
Diagnóstico vs 2ª semana	304,06	2,728	ns P>0,05
Diagnóstico vs 4ª semana	506,13	4,615	* P<0,05
Diagnóstico vs 6ª semana	510,17	4,652	* P<0,05
Diagnóstico vs 8ª semana	528,24	4,817	* P<0,05
Diagnóstico vs 10ª semana	529,98	4,833	* P<0,05
Diagnóstico vs 12ª semana	624,69	5,697	** P<0,01
2ª semana vs 4ª semana	202,07	1,813	ns P>0,05
2ª semana vs 6ª semana	206,11	1,849	ns P>0,05
2ª semana vs 8ª semana	224,18	2,011	ns P>0,05
2ª semana vs 10ª semana	225,92	2,027	ns P>0,05
2ª semana vs 12ª semana	320,63	2,876	ns P>0,05
4ª semana vs 6ª semana	4,037	0,03682	ns P>0,05
4ª semana vs 8ª semana	22,106	0,2016	ns P>0,05
4ª semana vs 10ª semana	23,850	0,2175	ns P>0,05
4ª semana vs 12ª semana	118,56	1,081	ns P>0,05
6ª semana vs 8ª semana	18,069	0,1648	ns P>0,05
6ª semana vs 10ª semana	19,813	0,1807	ns P>0,05
6ª semana vs 12ª semana	114,53	1,044	ns P>0,05
8ª semana vs 10ª semana	1,744	0,01590	ns P>0,05
8ª semana vs 12ª semana	96,456	0,8796	ns P>0,05
10ª semana vs 12ª semana	94,713	0,8637	ns P>0,05

quando valor de “q” é maior que 4,259 significa $p<0,05$

Quadro 7 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da α -1 glicoproteína ácida (em $\mu\text{g/mL}$) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante a quimioterapia - São Paulo - 2012

Animal	Diagn.	2ª s.	4ª s.	6ª s.	8ª s.	10ª s.	12ª s.
1	786,70	706,70	626,70	546,70	626,70	438,60	543,80
2	824,60	614,00	456,10	333,30	280,70	333,30	280,70
3	730,10	1015,80	396,80	634,90	568,20	444,40	412,90
4	50,00	87,70	0,00	0,00	0,00	153,80	192,30
5	579,70	144,90	57,90	14,40	405,80	362,30	275,30
6	2825,40	1545,40	863,60	545,40	545,40	272,70	363,60
7	846,20	615,40	461,50	500,00	461,50	346,20	63,50
8	1231,90	682,50	825,40	825,40	444,40	444,40	492,00
9	539,70	206,30	158,70	350,00	300,00	149,10	156,90
10	2350,90	1508,80	1035,10	1245,60	771,90	666,60	771,90
11	771,90	873,00	825,40	682,50	444,40	111,10	188,40
12	1405,80	1449,30	1144,90	884,10	1058,00	1318,80	1057,90
13	873,00	396,80	772,70	681,80	636,40	1000,00	272,70
14	840,60	539,70	206,30	158,70	158,70	634,90	492,00
15	1727,30	863,60	636,40	1045,50	1409,10	1363,60	1090,90
16	454,50	681,80	272,70	227,30	275,30	318,80	188,40
Média	1052,39	745,73	546,26	542,23	524,16	522,41	427,70
D.P.	717,19	455,55	349,75	355,35	343,06	388,44	308,36

Com base na análise destes resultados (Figuras 33 e 34, Tabela 1 e Quadro 7) pôde-se concluir que a α -1 glicoproteína ácida, no diagnóstico, apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle ($p < 0,0001$) e, quando analisada ao longo das semanas de tratamento, houve uma diminuição gradativa em seus níveis séricos, sendo significativa a partir da 4ª semana ($p = 0,0166$) até a 12ª semana ($p = 0,0032$), quando comparada ao diagnóstico, porém, entre as semanas não houve diferença ($p > 0,05$), mostrando que a diminuição é lenta e gradativa.

Quando comparado o controle com a 12ª semana (Figura 35) não se constatou normalização dos níveis séricos de GPA ($p = 0,0200$).

Pela análise de correlação entre variáveis (Figuras 36 e 37), não se observou correlação entre os níveis de GPA e α -1 globulinas ($r = 0,002$) e entre GPA e PCR ($r = 0$).

Figura 38 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da amiloide sérica A do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico (p=0,0028) - São Paulo - 2012

Figura 39 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da amiloide sérica A do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2ª, 4ª, 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de tratamento (p=0,0053) - São Paulo - 2012

Figura 40 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da amiloide sérica A do grupo controle e experimental na 12ª semana de tratamento (p=0,9076) - São Paulo - 2012

Figura 41 – Curva de regressão entre os valores de alfa-1 glicoproteína ácida e amilóide sérica A do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo – 2012

Tabela 2 – Resultado das comparações múltiplas de Tukey de amilóide sérica A entre as semanas de tratamento - São Paulo - 2012

Comparação	Diferença Média	q (#)	p
Diagnóstico vs 2ª semana	2,146	3,927	ns P>0,05
Diagnóstico vs 4ª semana	2,126	3,889	ns P>0,05
Diagnóstico vs 6ª semana	2,473	4,525	* P<0,05
Diagnóstico vs 8ª semana	2,744	5,021	* P<0,05
Diagnóstico vs 10ª semana	2,773	5,074	** P<0,01
Diagnóstico vs 12ª semana	2,797	5,117	** P<0,01
2ª semana vs 4ª semana	-0,02063	0,03774	ns P>0,05
2ª semana vs 6ª semana	0,3269	0,5981	ns P>0,05
2ª semana vs 8ª semana	0,5981	1,094	ns P>0,05
2ª semana vs 10ª semana	0,6269	1,147	ns P>0,05
2ª semana vs 12ª semana	0,6506	1,190	ns P>0,05
4ª semana vs 6ª semana	0,3475	0,6358	ns P>0,05
4ª semana vs 8ª semana	0,6188	1,132	ns P>0,05
4ª semana vs 10ª semana	0,6475	1,185	ns P>0,05
4ª semana vs 12ª semana	0,6713	1,228	ns P>0,05
6ª semana vs 8ª semana	0,2713	0,4963	ns P>0,05
6ª semana vs 10ª semana	0,3000	0,5489	ns P>0,05
6ª semana vs 12ª semana	0,3238	0,5923	ns P>0,05
8ª semana vs 10ª semana	0,02875	0,05260	ns P>0,05
8ª semana vs 12ª semana	0,05250	0,09606	ns P>0,05
10ª semana vs 12ª semana	0,02375	0,04345	ns P>0,05

quando valor de “q” maior que 4,259 significa p<0,05

Quadro 8 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da amilóide sérica A (em µg/mL) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante à quimioterapia - São Paulo - 2012

Animal	Diagn.	2ª s.	4ª s.	6ª s.	8ª s.	10ª s.	12ª s.
1	0.9	1	1.22	0.48	0.46	0.59	0.3
2	1.03	1	0.35	0.66	0.88	0.55	0.29
3	7.96	3.71	4.38	2.47	2.35	2.33	2.03
4	0.66	0.68	0.65	0.6	0.7	0.73	1.16
5	0.27	0.29	0.15	0	0	0	0
6	10.7	0	0.29	0	0	0	0
7	1.04	0.61	0.69	0.88	0.55	0.95	1.03
8	1.74	0.41	2.41	1.29	0	0	0
9	3.42	0	0.06	0	0	0	0
10	18.8	5.36	5.64	2.33	0	0	0
11	1.24	2.05	0	0.05	0	0	0
12	0	0	0.23	0	0	0	0
13	0	0	0	0.21	0.31	0.39	0
14	0.27	0	0	1.39	0.37	0.02	0.22
15	1.82	0.03	0	0.15	0.42	0.15	0.3
16	0.23	0.6	0	0	0.13	0	0
Média	3.13	0.98	1.00	0.66	0.39	0.36	0.33
D.P.	5.15	1.52	1.70	0.82	0.60	0.61	0.58

A figura 38 aponta diferença significativa entre os grupos controle e experimental ($p=0,0028$), contudo vale salientar o importante desvio padrão observado no grupo experimental, uma vez que os níveis séricos de ASA variaram no grupo de 0 a 18,8 $\mu\text{g/mL}$. Durante o tratamento (Figura 39, Tabela 2 e Quadro 8) constatou-se uma diminuição gradativa de ASA, sendo significativo a partir da 6ª semana ($p=0,0424$) até a 12ª semana ($p=0,0058$), quando comparada ao diagnóstico, contudo não houve diferenças entre as semanas de tratamento ($p>0,05$), provavelmente devido a diminuição lenta e gradativa dos níveis séricos de ASA.

Quando comparado o controle com a 12ª semana (Figura 40) constatou-se que os níveis séricos de ASA voltaram aos níveis de normalidade ($p=0,9076$).

Pela análise de correlação entre variáveis (Figura 41), observou-se correlação entre os níveis de GPA e ASA ($r=0,485$).

Figura 42 – Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo controle e grupo experimental no momento do diagnóstico ($p=0,0003$) - São Paulo - 2012

Figura 43 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo experimental no momento do diagnóstico, na 2^a, 4^a, 6^a, 8^a, 10^a e 12^a semana de tratamento ($p=0,4510$) - São Paulo - 2012

Figura 44 - Representação dos valores da média e do desvio padrão da proteína C reativa do grupo controle e experimental na 12^a semana de tratamento ($p=0,0011$) - São Paulo - 2012

Figura 45 – Curva de regressão entre os valores de proteína C reativa e β -2 globulinas do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012

Figura 46 – Curva de regressão entre os valores de proteína C reativa e amilóide sérica A do grupo experimental no momento do diagnóstico - São Paulo - 2012

Quadro 9 – Valores individuais, da média e do desvio padrão da proteína C – reativa (em $\mu\text{g/mL}$) de 16 felinos com linfoma, no diagnóstico e durante à quimioterapia - São Paulo - 2012

Animal	Diagn.	2ª s.	4ª s.	6ª s.	8ª s.	10ª s.	12ª s.
1	294,30	295,90	426,80	327,60	336,70	331,00	269,70
2	341,00	237,40	203,20	170,80	236,40	254,90	309,50
3	331,00	425,40	351,20	267,20	374,50	321,10	303,10
4	196,50	257,20	138,80	132,30	305,60	333,40	247,60
5	341,10	132,90	108,80	97,50	183,80	159,80	134,60
6	147,60	112,80	118,00	88,90	98,00	87,50	81,10
7	420,00	256,20	184,60	262,60	215,90	168,30	220,70
8	94,90	77,70	94,30	95,20	67,50	66,10	64,50
9	302,80	228,70	228,60	309,30	125,20	201,90	187,70
10	161,80	122,00	107,30	141,20	128,70	113,90	155,90
11	353,40	233,20	138,50	91,90	65,60	67,00	156,80
12	174,70	325,70	156,90	172,40	87,50	194,80	186,60
13	146,50	99,50	146,40	169,40	80,30	151,50	160,30
14	67,80	44,50	71,60	45,90	42,70	39,00	92,60
15	754,50	687,90	325,60	362,30	759,20	353,00	338,50
16	156,20	160,50	81,90	188,50	124,50	111,70	98,90
Média	267,76	231,09	180,16	182,69	202,01	184,68	188,01
D.P.	167,44	158,56	104,03	95,99	180,54	105,42	86,14

A figura 42 indica uma diferença significativa entre os grupos controle e experimental ($p=0,0003$), contudo, durante o tratamento (Figura 43 e Quadro 9) os níveis séricos de PCR oscilaram bastante, havendo uma diminuição gradativa, principalmente na 12ª semana, porém não sendo significativo ($p=0,1006$).

Quando comparado o controle com a 12ª semana (Figura 44) não se constatou normalização dos níveis séricos de PCR ($p=0,0011$).

Pela análise de correlação entre variáveis (Figuras 45 e 46), não se observou correlação entre as variáveis PCR e β -2 globulinas ($r=0,006$) e PCR e ASA ($r=0,02$).

5 DISCUSSÃO

As proteínas de fase aguda têm sido amplamente estudadas como biomarcadores de remissão e recidiva em diversos processos neoplásicos, especialmente em medicina humana e em cães. Em medicina felina há uma escassez com relação aos estudos no que tange a tal associação.

Os achados epidemiológicos no presente estudo foram compatíveis com a bibliografia (VAIL, 2007; OBERTHALER et al., 2008; PINTO, 2010) em relação ao linfoma, que acometeu gatos de meia idade a idosos, não havendo uma franca predisposição sexual. A idade média dos felinos neste estudo foi de $9,3 \pm 4,0$ anos, sendo este achado similar aos de Côrrea et al. (2001), Tzannes et al. (2008) e Pinto (2010).

Com relação ao “status” retroviral, houve uma baixa frequência de animais infectados com os vírus FeLV (2/16 – 12,5%) e FIV (1/16 – 6,25%). Estes achados foram inferiores ao relatado por Pinto (2010), com uma frequência de 17% de FeLV positivos e 17% FIV positivos, e aos de Oberthaler et al. (2008), que referiram 18% de animais FeLV positivos. Essa variação deve-se em parte à não linearidade na ocorrência de retroviroses na população de felinos, podendo variar de acordo com a região e também ao fato do grupo ora estudado ter sido composto principalmente por felinos com mais de sete anos (12/16 – 75%), nos quais as retroviroses, notadamente o FeLV, são detectadas com menor frequência.

Vail et al. (1998), em um estudo retrospectivo com 145 gatos com linfoma, entre os anos de 1988 a 1996, constataram prevalência de 25,5% de gatos FeLV, sendo a média de idade de cinco anos, dados estes bastante superiores aos que encontramos. Essa diferença provavelmente ocorreu devido ao período em que foi realizado tal estudo, quando a prevalência de retroviroses era maior.

Os dois felinos FeLV positivos neste estudo eram gatos jovens, com 2 anos de idade, apresentando as formas anatômicas mediastinal e renal, concordando com Couto (2000), que relatou que a viremia em felinos com linfoma variava de acordo com a forma anatômica da doença, mas de uma maneira geral, gatos jovens tendiam a ser FeLV positivos, enquanto que os idosos FeLV negativos.

No presente estudo, a forma anatômica de maior ocorrência foi a alimentar, representando 68,75% (11/16), achados estes similares aos referidos por Ettinger (2003), Vail (2007) e Pinto (2010), representando atualmente a principal forma anatômica da doença. Em contraste, Vail et al. (1998) descreveram a ocorrência da forma alimentar em 34,7% dos

casos, contudo esse estudo citado foi realizado em um período em que havia maior associação do linfoma com retrovíroses e portanto, maior número de casos de outras formas anatômicas da doença.

As demais formas anatômicas de linfoma apresentaram-se com menor ocorrência, sendo elas a extra-nodal (18,75% - 3/16), mediastinal (6,25% - 1/16) e multicêntrica (6,25% - 1/16), contudo tal frequência pode ter sido influenciada pela amostragem.

Outro fator que pode ter influenciado este resultado foi a seleção dos animais, uma vez que foram excluídos gatos que receberam tratamento antineoplásico prévio, glicocorticóides ou que apresentassem comorbidades, além de que só permaneceram no grupo experimental felinos que completaram os três meses de acompanhamento do tratamento e, sabidamente, outras formas anatômicas do linfoma tendem a ter uma baixa resposta terapêutica, resultando em sobrevida menor e conseqüente exclusão do grupo de estudo.

A eletroforese de proteínas séricas é o método de escolha para uma separação analítica de proteínas (ECKERSALL, 2008), sendo recomendada principalmente quando da detecção de hiperglobulinemia (THOMAS, 2000). Na análise estatística deste estudo verificou-se diferença significativa nos níveis de globulinas entre os grupos controle e linfoma no momento do diagnóstico, sendo a média de globulinas superior aos valores de referência descritos por Kaneko (2008). Uma vez que as globulinas totais representam, em parte, as PFA, justificam-se elevações inespecíficas em suas concentrações séricas, como parte da resposta de fase aguda.

No tocante à relação albumina: globulinas também houve diferença significativa entre os grupos controle e linfoma no momento do diagnóstico, contudo, devido à ampla faixa de normalidade (0,45 – 1,19) descrita na bibliografia (ECERKSALL, 2008), a variação ocorreu dentro dos valores de referência, sendo esta diferença realmente esperada, já que durante a resposta de fase aguda, ocorre diminuição nos níveis séricos de albumina uma vez que parte dos substratos são utilizados para produção das PFA positivas, ocasionando aumento dos níveis de globulinas totais e conseqüente mudança na relação albumina:globulinas.

Outra alteração encontrada nos grupos estudados, no que tange ao perfil eletroforético, foi um aumento significativo na fração α -2 globulinas, quando se comparou o grupo controle e linfomas no momento do diagnóstico. Tal alteração difere dos achados de Gerou-Ferriani et al. (2011), que também avaliaram a eletroforese de gatos com linfoma no momento do diagnóstico por meio da técnica de gel de agarose e observaram aumento somente na fração β -2 globulinas. Esta diferença pode estar relacionada ao fato da técnica de

eletroforese utilizada neste estudo ter sido a de acetato de celulose. Giordano e Paltrinieri (2010), compararam as duas técnicas e observaram diferenças significativas na maior parte das frações protéicas, o que foi explicado pelo fato de tratar-se de técnicas de separação inespecífica de proteínas, podendo ocorrer migrações em diferentes regiões, de acordo com a sensibilidade de cada uma delas.

Quanto às concentrações séricas de albumina, neste estudo constatou-se diminuição em apenas um caso no momento do diagnóstico (6,25%), não havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, contradizendo os resultados de Taylor et al. (2010), que encontraram hipoalbuminemia em 52,2% (71/136) dos gatos com linfoma. Por sua vez, Gerou-Ferriani et al. (2011) constataram diferença estatisticamente significativa nos níveis de albumina sérica no grupo de felinos com linfoma quando comparado ao controle. No primeiro estudo citado, os autores utilizaram valores de referência próprios, embasados na eletroforese de 77 gatos clinicamente normais, contudo, o menor intervalo de referência relatado por eles, diferiu significativamente do citado por Kaneko (2008), influenciando diretamente na alta porcentagem de hipoalbuminemia do estudo, enquanto no presente estudo, utilizou-se a referência clássica do referido autor. Em virtude do intervalo de referência ser amplo, é esperado que, mesmo a albumina sendo uma PFA negativa, ainda assim oscile em vários casos dentro da faixa de normalidade.

Com relação à fração gamaglobulinas, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e linfoma no momento do diagnóstico, corroborando dados de Gerou-Ferriani et al. (2011), que também não descreveram diferenças entre tais grupos. Em contraste, Taylor et al. (2010) relataram gamopatia policlonal como um achado comum no eletroforetograma de felinos com diversas enfermidades, sendo descrita em 59,6% dos casos, estando principalmente relacionada a doenças infecciosas, inflamatórias e, em menor grau, a neoplasias, enquanto que os achados de gamopatia monoclonal foram incomuns, em cerca de 5% dos casos. Sabidamente, é raro gatos com linfoma apresentarem gamopatias (VAIL; THAMM, 2005; GEROU-FERRIANI et al. 2011).

Os níveis séricos de GPA do grupo controle no presente estudo foram muito próximos aos de Kajikawa et al. (1999), que obtiveram valores médios de 244,1µg/mL e aos de Côrrea et al. (2001), com mediana de 220µg/mL, porém, bastante inferiores aos de Selting et al. (2000), com valores médios de 501µg/mL. A metodologia empregada para determinação de GPA nos estudos citados foi a mesma, imunodifusão radial simples.

Os achados de GPA no grupo experimental, no momento do diagnóstico, apresentaram-se com diferença significativa, quando comparados ao grupo controle, em

conformidade com os dados de Côrrea et al. (2001), que também avaliaram GPA em felinos com linfoma. Gerou-Ferriani et al. (2011) também obtiveram diferença estatisticamente significativa entre tais grupos, com média e desvio padrão mais próximo ao que constatamos. Este dado reforça a importância da GPA na resposta de fase aguda na espécie felina, notadamente nos quadros de linfoma.

Em medicina humana, Kushner e Rzewnicki (1999) afirmaram que a GPA aumenta geralmente cerca de duas a cinco vezes durante a resposta de fase aguda, diferindo do que constatamos, com aumentos de até onze vezes quando comparado com a média do controle, e à semelhança do relatado por Kajikawa et al. (1999) em felinos com inflamação induzida ou hospitalizados com diferentes afecções, indicando uma expressiva resposta da GPA na espécie felina.

Ogilvie et al. (1993), também apresentaram resultados similares aos que observados neste estudo, quando avaliaram concentrações de GPA em algumas neoplasias malignas em cães, como linfomas, sarcomas e carcinomas, sendo maior a média das concentrações de GPA em cães com linfoma (748,7µg/mL) quando comparadas ao grupo controle (310,5µg/mL). Hahn et al. (1999) obtiveram resultados bastante próximos aos supracitados, quando também avaliaram GPA em cães com linfoma, mostrando, à semelhança dos felinos, a importância de tal proteína na resposta de fase aguda na espécie canina.

Ao longo das semanas de tratamento pode-se observar uma diminuição gradativa nos níveis séricos de GPA, sendo significativa a partir da 4ª semana ($p=0,0166$) até a 12ª semana ($p=0,0032$), contradizendo os resultados de Côrrea et al. (2001), que não constataram diferenças significativas entre os grupos pré-indução ($n=8$), 1 semana pós-indução ($n=8$) e remissão parcial ($n=3$) e total ($n=3$). Uma importante limitação citada neste estudo foi a pequena amostragem, além de que, de acordo com o que se pode observar, a diminuição das concentrações séricas de GPA é lenta, ao longo das semanas de tratamento, não sendo esperadas alterações significativas após a 1ª semana, tampouco num grupo com remissão parcial e “n” pouco expressivo, para concluir que a GPA não é um preditor de tempo livre de doença em gatos com linfoma. Não há outros trabalhos que avaliem GPA em felinos com linfoma durante o tratamento. Em medicina humana, Ganz et al. (1983) já descreviam que dosagens seriadas de GPA poderiam ser úteis para monitorar vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de pulmão, colorretal e linfomas, a exemplo do que constatamos neste estudo.

Ogilvie et al. (1993) e Hahn et al. (1999) obtiveram resultados similares aos que observados aqui, em um estudo em cães com linfoma, com a média das concentrações séricas

de GPA significativamente diminuídas quando da remissão completa, após tratamento com cloridrato de doxorubicina, se comparadas à média dos cães com linfoma não tratados, indicando a GPA como marcador potencialmente útil para monitorar a resposta quimioterápica.

Neste estudo, quando se comparou o grupo controle com a 12^a semana de tratamento, não se constatou o retorno das concentrações séricas à normalidade, diferindo dos achados de Hahn et al. (1999) em cães com linfoma. Uma explicação para este achado pode estar relacionada ao tempo de evolução do quadro, sendo a diminuição lenta e gradativa, podendo levar vários meses para que seus níveis séricos se normalizem.

Com relação à amilóide sérica A, a concentração média observada no grupo controle foi muito próxima àquela relatada por Sasaki et al. (2001), porém, bem discrepante do encontrado por Kajikawa et al. (1999), sendo ambos os estudos realizados com a técnica de ELISA específica para a espécie felina. Merlo (2005) constatou concentrações séricas baixas de ASA no grupo controle de cães, sendo uma constante os achados de níveis indetectáveis, a exemplo do que também observou-se nos gatos. De forma geral, espera-se concentrações baixas em animais clinicamente normais e, neste caso, observou-se que muitos animais tinham níveis indetectáveis.

Quando se comparou o controle com o grupo experimental, houve diferença significativa entre os grupos, contudo ASA variou de níveis indetectáveis a 18,8 µg/mL, com média de 3,13 µg/mL e um importante desvio padrão (5,15 µg/mL), de forma similar ao que Sasaki et al. (2001) observaram em felinos com diferentes tipos de neoplasias.

Kushner e Rzewnicki (1999) descreveram que, em medicina humana, a ASA, presente no soro sanguíneo em pequenas quantidades, pode apresentar expressivo aumento em sua síntese após um estímulo, alcançando valores superiores a 1000 vezes os normais, diferindo do que se observou na espécie felina, na qual a ASA apresentou no diagnóstico, em alguns casos, aumentos variando de 25 a 60 vezes, quando comparada com a média do grupo controle e vários animais não apresentaram níveis detectáveis.

Na análise do momento do diagnóstico em relação às semanas de tratamento do grupo com linfoma, constatou-se uma diminuição gradativa nos níveis séricos de ASA naqueles animais que apresentavam aumentos iniciais, sendo significativa a partir da 6^a semana até a 12^a semana. No que tange ao monitoramento do tratamento de felinos com linfoma, a bibliografia veterinária é escassa em termos de estudos desta PFA. Kajikawa et al. (1999) refere que após uma lesão induzida com uma injeção de LPS intramuscular em felinos, os níveis séricos de ASA aumentaram significativamente após 48 horas, declinando ao longo

dos dias subsequentes até atingir novamente níveis de normalidade. Similarmente, observou-se este mesmo comportamento no linfoma, sendo que 12^a semana de tratamento a média de concentração de ASA voltou à normalidade, sem diferença estatística, quando comparada ao grupo controle. Desta forma, ASA parece ter importância com indicador de remissão durante o tratamento naqueles pacientes que apresentarem seus níveis elevados no momento do diagnóstico, uma vez que, neste estudo, animais que tiveram concentrações menores que 1 µg/mL, mantiveram-se praticamente do mesmo modo no decorrer da quimioterapia.

Merlo et al. (2008) também constataram resultados similares aos deste estudo quando avaliaram cães com linfoma durante o tratamento quimioterápico. ASA esteve significativamente elevada no diagnóstico, diminuindo ao longo das semanas, atingindo níveis séricos próximos ao da normalidade quando a doença estava em remissão. Em cães, Matijatko et al. (2007), ao estudar a resposta de fase aguda em animais naturalmente infectados por *Babesia canis*, também constataram aumento significativo de ASA e de PCR no diagnóstico e diminuição gradativa ao longo dos dias, voltando a níveis próximos do normal, sugerindo a utilidade destas proteínas na monitoração da resposta ao tratamento nesta afecção.

Em medicina humana, ASA também tem sido investigada em pacientes com câncer. Chan et al. (2007) relataram-na no câncer gástrico, como sendo um importante biomarcador na monitoração do tratamento, uma vez que esteve elevada no pré-operatório, retornou aos níveis normais após um mês da gastrectomia, mantendo-se assim até ocorrência de recidiva do processo.

No presente estudo, quando se analisaram GPA e ASA entre as semanas de tratamento, por meio do teste de comparações múltiplas de Tukey, não se observaram diferenças estatisticamente significativas. A hipótese mais plausível para este resultado é de que a queda nos níveis séricos destas proteínas, quando se atinge a remissão, tende a ser lenta e gradativa ao longo das semanas do tratamento antineoplásico, sendo apenas estatisticamente significativa quando comparadas com o momento do diagnóstico. Similarmente, Merlo (2005) também não observou alterações significativas de ASA e PCR entre as primeiras semanas de tratamento de cães com linfoma e sugeriu uma diminuição mais importante a partir da 4^a semana do tratamento.

Com relação à PCR, quando se confrontou os valores séricos do grupo experimental no momento do diagnóstico com o grupo controle, observou-se diferença significativa. Não há dados em bibliografia veterinária sobre PCR em gatos com linfoma. Achados similares aos deste estudo foram observados por Kajikawa et al. (1999), que avaliaram a resposta de fase aguda em gatos hospitalizados com diferentes afecções e constataram aumentos significantes

de PCR, ASA e GPA. A PCR aumentou significativamente, porém, em menor magnitude quando comparada à ASA e GPA.

Kajikawa et al. (1999) também avaliaram gatos com inflamação induzida pela aplicação intramuscular de LPS e de óleo turpentina e não constataram diferença significativa nestes dois grupos com relação aos níveis de PCR antes e durante a monitoração pós-aplicação, corroborando os resultados deste estudo em que evidenciou-se que, apesar de a PCR tender a queda nas semanas subsequentes ao tratamento, não houve diferença estatisticamente significativa. De fato, a PCR parece ser menos responsiva em estágios mais iniciais dos processos inflamatórios.

Na espécie canina, de acordo com Merlo et al. (2007) e Nielsen et al. (2007), diferentemente do que constatou-se em gatos, houve diminuição significativa dos níveis séricos de PCR durante o tratamento quimioterápico do linfoma, sendo um indicador de remissão de doença, contudo, quando da recidiva, não se alterou novamente. Sabidamente, a PCR é a principal PFA na espécie canina (ECERKSALL, 2008), tendo sido isolada e caracterizada nesta espécie por Caspi et al. (1984), estando envolvida na resposta a diferentes doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas, sendo um importante indicador da resposta de fase aguda, útil durante o monitoramento do tratamento, seja como biomarcador de resposta ou de progressão da doença, podendo fornecer dados prognósticos importantes.

Kushner e Rzewnicki (1999) descreveram que, em medicina humana, a PCR, presente no soro sanguíneo em concentrações baixas, pode apresentar acentuado aumento em sua síntese após um estímulo, alcançando valores superiores a 1000 vezes os normais, de forma diferente ao que se observou na espécie felina, na qual a PCR aumentou entre duas a cinco vezes, quando comparada com a média do grupo controle.

Na análise estatística de correlação entre as proteínas estudadas constatou-se correlação positiva entre ASA e GPA no momento do diagnóstico, as quais representam as duas principais PFA na espécie felina. Contudo, vale salientar a presença de valores discrepantes, os quais podem ter influenciado na significância dos modelos lineares. Kajikawa et al. (1999) constatou resultados semelhantes no grupo de felinos estudado, com correlação entre ASA e GPA. Em um estudo de correlações, quando há uma forte correlação ($r > 0,9$) pode-se dizer que as duas proteínas apresentam comportamentos similares e desta forma, na rotina clínica, não seria necessário determinar a concentração das duas, já que uma pode representar a concentração da outra. Tal afirmação não se aplica a este estudo, já que a correlação foi fraca e com a presença de valores discrepantes.

Tecles et al. (2005) observaram correlação positiva entre as duas principais PFA canina, ASA e PCR em doenças neoplásicas e hematológicas não neoplásicas. Equivalentemente, Merlo (2005) detectou correlação entre tais proteínas em cães com linfoma.

Não houve correlação entre os níveis de ASA e α -1globulinas, de GPA e α -1 globulinas e PCR com β -2 globulinas. Apesar de se tentar estabelecer uma correlação entre PFA e globulinas, com base nestes resultados, não é correto afirmar que a detecção de uma PFA aumentada é capaz de induzir alteração no eletroforetograma, uma vez que há outras proteínas que migram nestas frações e que não foram especificamente analisadas neste estudo. Assim, embora tenha se observado hiperglobulinemia, não houve correlação deste aumento com as PFA. Sendo assim, a explicação mais plausível seria a ocorrência de aumentos associados de outras PFA e de lipoproteínas, além da possível migração de gamaglobulinas em fração β -2, como IgM e IgA, descrita nos quadros de linfoma (ECKERSALL, 2008).

Nas demais variáveis analisadas no momento do diagnóstico e entre as semanas de tratamento, não foram observadas correlações.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados analisados e na metodologia aplicada pode-se concluir que:

- há aumento de globulinas caracterizada principalmente por aumento da fração α_2 -globulinas;
- não houve diferenças estatísticas de albumina sérica, proteína total e das demais frações de globulinas no diagnóstico, quando comparado com o grupo controle, e durante o tratamento quimioterápico, quando comparadas as semanas de tratamento com o diagnóstico;
- o linfoma na espécie felina induz uma resposta de fase aguda, caracterizada pelo aumento da produção de Alfa-1 glicoproteína ácida, Amilóide sérica A e, menos expressivamente, da proteína C reativa;
- a proteína C reativa não é um biomarcador de remissão de doença, mesmo quando apresenta-se em níveis elevados;
- existe correlação entre os níveis de α_1 glicoproteína ácida e amiloide sérica A no momento do diagnóstico;
- α_1 glicoproteína ácida e amilóide sérica A, quando se apresentam elevadas no momento do diagnóstico, podem ser utilizadas como indicadores de remissão de doença durante o monitoramento do tratamento;

REFERÊNCIAS

BARR, M. C.; OLSEN, C. W.; SCOTT, F. W. Moléstias virais felinas. In: **ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Editora Manole, 1995. p. 589-631, v. 1, cap.70.

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.

CASPI, D.; BALTZ, M. L.; SNEL, F.; GRUYS, E.; NIV, D.; BATT, R. M.; MUNN, E. A.; BUTTRESS, N.; PEPYS, M. B. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. **Immunology**, v. 53, n.2, p. 307-313, 1984.

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

CERÓN, J. J.; OHNO, K.; CALDIN, M. A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 6-7, 2008.

CHAN, D. C.; CHEN, C. J.; CHU, H. C.; CHANG, W. K.; YU, J. C.; CHEN, Y. J.; WEN, L. L.; HUANG, S. C.; KU, C. H.; LIU, Y. C.; CHEN, J. H. Evaluation of serum amyloid A as a biomarker for gastric cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 14, n. 1, p. 84 – 93, 2006.

CHO, W. C. S.; YIP, T.; YIP, C.; YIP, V.; THULASIRAMAN, V.; NGAN, R.; LAW, S.; CHENG, W.; MA, V.; LIM, C. Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 43-52, 2004.

CHUN, R.; GARRETT, L. D.; VAIL, D. M. Cancer chemotherapy. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 163-192, cap. 11.

CORREA, S. S.; MAULDIN, G. N.; MAULDIN, G. E.; MOONEY, S. C. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, p. 153-158, 2001.

COUTO, C. G. Advances in the treatment of the cat with lymphoma in practice. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 2, p. 95 – 100, 2000.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, v. 67, p. 321-327, 2007.

DUTHIE, S.; ECKERSALL, P. D.; ADDIE, D. D.; LAWRENCE, C. E.; JARRETT, O. Value of alpha-1 acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. **Veterinary Record**, v. 141, p. 299-303, 1997.

ECKERKSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. Maryland Heights: Elsevier Inc, 2008. p. 117-155, cap. 5.

ECKERSALL, P. D. Recent advances in the use of acute phase proteins as biomarkers for infection and inflammation in veterinary clinical biochemistry. **XI Congress International Society of Animal Clinical Biochemistry**. p. 59 – 63, 2004.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 23-27, 2010.

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

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

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

GANZ, P. A.; SHELL, W. E.; TOKES, Z. A. Evaluation of a radioimmunoassay for α 1-acid glycoprotein to monitor therapy of cancer patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 71, n. 1, p. 25-30, 1983.

GEROU-FERRIANI, M.; MCBREARTY, A. R.; BURCHMORE, R. J.; JAYAWARDENA, K. G. I.; ECKERSALL, P. D.; MORRIS, J. S. Agarose gel serum protein electrophoresis in cats with and without lymphoma and preliminary results of tandem mass fingerprinting analysis. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 2, p. 159 – 173, 2011.

GIORDANO, A.; PALTRINIERI, S. Interpretation of capillary zone electrophoresis compared with cellulose acetate and agarose gel electrophoresis: reference intervals and diagnostic efficiency in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 39, n. 4, p. 464-473, 2010.

GORDON, A. H.; KOJ, A. **The acute-phase response to injury and infection**. Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), 1985. p. 139-284, cap. 12-21.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M. J. M.; NIEWOLD, T. A.; KOOPMANS, S. J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 6B, n. 11, p. 1045-1056, 2005.

HAGMAN, R. Serum alpha-1 acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 1, p. 52 – 59, 2011.

HAHN, K. A.; FREEMAN, K. P.; BARNHILL, M. A.; STEPHEN, E. L. Serum α 1-acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with lymphoma treated with doxorubicin. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 7, p. 1023-1025, 1999.

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

HAYES, A. Feline lymphoma – principles of diagnosis and management. **In practice**, v. 28, p. 516 – 524, 2006.

HENRY, J. C. Biomarkers in veterinary cancer screening: applications, limitations and expectations. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 10 -14, 2010.

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.349-361, cap. 21. The plasma proteins, dysproteinemias and immune deficiency disorders.

KAJIKAWA, T.; FURUTA, A.; ONISHI, T.; TAJIMA, T.; SUGII, S. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha-1-acid glycoprotein, haptoglobin and C-

reactive protein in feline será due to induced inflammation and surgery. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, p. 91-98, 1999.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. Maryland Heights: Elsevier Inc, 2008. p. 889 -895. Appendix IX: Blood Analyte Reference Values in Small Animals.

KIMURA, M.; TOMITA, Y.; IMAI, T.; SAITO, T.; KATAGIRI, A.; MIKAMI, Y.O.; MATSUDO, T.; TAKAHASHI, K. Significance of serum amyloid A on the prognosis of patients with renal cell carcinoma. **Cancer**, v. 92, n. 8, p. 2072-2075, 2001.

KOGIKA, M. M.; PEREIRA, D. A.; ELIAS, F.; NOTOMI, M. K.; DELAYTE, E. H.; KAWAHARA, R.; HAGIWARA, M. K. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e α -glicoproteína ácida. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

KUSHNER, I.; RZEWNICKI, D. Acute Phase Response. In: GALLIN, J. I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999. p. 317-330, cap. 20.

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.

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.

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

MATIJATKO, V.; MRLJAK, V.; KIS, I.; KUCER, N.; FORSEK, J.; ZIVICNJAK, T.; ROMIC, Z.; SIMEC, Z.; CERON, J. J. Evidence of an acute phase response in dogs with naturally infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 144, p. 242-250, 2007.

MCKNIGHT, J. A. Principles of chemotherapy. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.18, n. 2, p. 67-72, 2003.

MERLO, A. **Estudos das concentrações séricas de proteína-C reativa e amiloide A em cães com linfoma submetidos à quimioterapia** [Serum concentrations of C-reactive protein and amyloid A in dogs with lymphoma submitted to chemotherapy]. 2005. 103f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MERLO, A.; REZENDE, B. C. G.; FRANCHINI, M. L.; MONTEIRO, P. R. G.; LUCAS, S. R. R. Serum amyloid A is not a marker for relapse of multicentric lymphoma in dogs. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 37, n. 1, p. 79-85, 2008.

MERLO, A.; REZENDE, B. C. G.; FRANCHINI, M. L.; SIMOES, D. M. N.; LUCAS, S. R. R. Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 230, n. 4, p. 522-526, 2007.

MOBASHERI, A.; CASSIDY, J.P. Biomarkers in veterinary medicine: towards targeted, individualised therapies for companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 1-3, 2010.

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

NIELSEN, L.; TOFT, N.; ECKERSALL, P. D.; MELLOR, D. J.; MORRIS, J. S. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p. 1231 – 1236, 2007.

NORSWORTHY, G. D. Doença do vírus da leucemia felina. In: NORSWORTHY, G. D.; CRYSTAL, M. A.; GRACE, S. F.; TILLEY, L. P. **O paciente felino**. São Paulo: Editora Manole, 2004. p. 253-257, cap. 59.

OBERTHALER, K. T.; MAULDIN, E.; MCMANUS, P. M.; SHOFER, F. S.; SORENMO, K. U. Rescue therapy with doxorubicin-based chemotherapy for relapsing or refractory feline lymphoma: a retrospective study of 23 cases. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. (2008). doi:10.1016/j.jfms.2008.07.003.

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

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31, s. 1, p. 125-129, 2007.

PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **The Veterinary Journal**, v. 177, p. 26-35, 2008.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

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. 103f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

RAMANKULOV, A.; LEIN, M.; JOHANNSEN, M.; SCHRADER, M.; MILLER, K.; LOENING, S. A.; JUNG, K. Serum amyloid A as indicator of distant metastases but not as early tumor marker in patients with renal cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 269, p. 85-92, 2008.

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

SASAKI, K.; MA, Z.; KHATLANI, T. S.; OKUDA, M.; INOKUMA, H.; ONISHI. Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. **Clinical Pathology**, v. 65, n. 4, p. 545-548, 2003.

SELTING, K. A.; OGILVIE, G. K.; LANA, S. E.; FETTMAN, M. J.; MITCHENER, K. L.; HANSEN, R. A.; RICHARDSON, K. L.; WALTON, J. A.; SCHERK, M. A. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, p. 503-506, 2000.

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

TAYLOR, S. S.; TAPPIN, S. W.; DODKIN, S. J.; PAPASOULIOTIS, K.; SORROSAL, D. C.; TASKER, S. Serum protein electrophoresis in 155 cats. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 12, p. 643 – 653, 2010.

TECLES, F.; CALDIN, M.; ZANELLA, A.; MEMBIELA, F.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SUBIELA, S. M.; CERON, J. J. Serum acute phase protein concentrations in female dogs

with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 21, p. 214 - 219, 2009.

TECLES, F.; SPIRANELLI, E.; BONFANTI, U.; CERÓN, J. J.; PALTRINIERI, S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 19, p. 865-870, 2005.

THOMAS, J. S. Protein Electrophoresis. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 899-903, cap. 135.

TZANNES, S.; HAMMOND, M. F.; MURPHY, S.; SPARKES, A.; BLACKWOOD, L. Owners 'perception of their cats' quality of life during COP chemotherapy for lymphoma. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 10, p. 73 -81, 2008.

UHLAR, C. M.; WHITEHEAD, A. S. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. **European Journal of Biochemistry**, v. 265, p. 501-523, 1999.

VAIL, D. M. Feline Lymphoma and Leukemia. In: WITHROW, S. J.; VAIL, D. M. **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 733-756, cap. 31.

VAIL, D. M. Lymphoma. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 2000. p. 620-630, cap. 91.

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

VAIL, D. M.; OGILVIE, G. K. Neoplasias linfóides. In: BIRCHARD, S. J. SHERDING, R. G. **Manual Saunders - Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 218-225.

VAIL, D. M.; THAMM, D. H. Hematopoietic tumors. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 732-747, v. 1, cap. 181.

WANG, H.; TRACEY, K. J. Tumor necrosis factor, interleukin-6, macrophage migration inhibitory factor, and macrophage inflammatory protein-1 in inflammation. In: GALLIN, J.I.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: basic principles and clinical correlates**. 3. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1999. p. 471-484, cap. 32.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Valores individuais relativos aos hemogramas do grupo controle. São Paulo, 2012.

Animal	Ht (%)	Hg (g/dL)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Eosinófilos (/mm ³)	Linfócitos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)
1	32	10,4	39,51	12,84	32,50	16400	11152	984	4100	164
2	27	9,1	45,00	15,17	33,70	18599	15549	920	1278	852
3	30	9,7	44,12	14,26	32,33	10200	4080	204	5712	204
4	40	14,1	40,82	14,39	35,25	9800	3234	490	5880	196
5	44	15,2	43,14	14,90	34,55	9400	4042	470	4700	188
6	42	14,7	48,28	16,90	35,00	7100	2982	568	3337	213
7	35	11,4	47,30	15,41	32,57	16200	9996	1020	4374	486
8	29	10,3	44,62	15,85	35,52	7800	3510	1092	3198	0
9	37	13,1	40,66	14,40	35,41	7000	3010	420	3080	490
10	43	15,5	44,33	15,98	36,05	7754	2980	310	4402	62
11	34	12,0	46,58	16,44	35,29	9,700	5,365	1,037	2,910	97
12	45	14,9	50,56	16,74	33,11	7900	4898	158	2844	0
13	33	10,6	47,83	15,36	32,12	16300	8802	2608	4401	489
14	48	16,0	57,83	19,28	33,33	4600	2346	368	1702	184
15	34	11,6	44,74	15,26	34,12	14,500	7,975	1,160	5,075	290
16	45	15,2	50,56	17,08	33,78	10,700	6,527	749	2,354	856
17	52	16,3	50,00	16,00	31,00	7700	4466	847	2156	231
18	49	15,7	46,23	14,81	32,04	11800	9086	236	2006	472
19	48	15,0	57,00	18,00	31,00	10600	7950	636	1696	318
20	39	12,5	39,39	12,63	32,05	5000	2900	150	1650	200

APÊNDICE B – Valores individuais relativos aos exames bioquímicos do grupo controle. São Paulo, 2012.

Animal	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	PT (mg/dL)	Albumina (g/dL)	ALT (U/L)	FA (U/L)	BT	BD	BI	GGT (U/L)
1	53.3	1.4	6.6	3	55.4	11.6	-	-	-	0
2	55.8	1.5	7.1	1.9	44.5	13.9	-	-	-	0
3	48.5	1.4	6.5	3.2	26.9	13.1	-	-	-	0
4	52.4	0.93	8.2	3	13.5	30.2	-	-	-	0
5	47.4	1	8.8	3.3	30.7	28.1	-	-	-	0
6	56.3	1.4	8.3	3.1	52	10.2	-	-	-	0
7	54.7	1.4	6.3	3.1	47.4	16	-	-	-	0.5
8	43.8	1.1	8.2	3	51.6	9.8	-	-	-	0
9	54	1.3	8.8	3.3	50.7	17.9	-	-	-	0
10	51.2	1.2	7.3	3.1	28.9	38	-	-	-	0
11	52.5	1.4	6.8	3.4	15.5	13	-	-	-	0
12	69.5	1.6	6.5	3.3	24.7	18	-	-	-	0
13	45.7	1.1	7.4	3	67	21	-	-	-	0
14	55.6	1.8	7.4	3.8	73.3	29	-	-	-	0
15	47.7	1.4	7.5	3.5	19.6	13.9	-	-	-	0
16	57.3	1.1	6.8	3.5	62.8	42.2	-	-	-	0
17	63.4	1.4	7.3	3.4	34.5	33	-	-	-	0
18	41.4	1.3	7.4	3.3	36.6	13	-	-	-	3
19	38.6	1.6	6.5	3.3	95	29	-	-	-	0
20	58.3	1.4	7.7	3.6	26.2	17	-	-	-	0