

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA
CINOMOSE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Andressa Oliveira de Curtis

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA
CINOMOSE**

Andressa Oliveira de Curtis

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção de grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Alexandre Krause

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES
NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE**

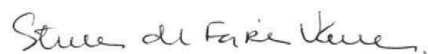
Elaborada por
Andressa Oliveira de Curtis

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:



Alexandre Krause, Dr.
(Presidente/Orientador)



Stella de Faria Valle, Dra. (UFRGS)

Roberta Schmatz, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 04 de março de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter colocado em meu caminho pessoas tão importantes para que este trabalho pudesse ser concretizado.

A minha mãe, Dilnara, e ao meu noivo, Cassiano, pois sem seu suporte jamais teria dado início a mais uma etapa acadêmica.

À professora Cinthia Mazzanti, pela importante coorientação e apoio prestado durante todas as etapas deste projeto, desde a sua criação.

As minhas colegas de mestrado, Heloisa Palma, Ana Rita e Desydere, que ajudaram com o processamento das amostras, análises sanguíneas, transporte de material e coletas de sangue.

As minhas amigas Bianca Bertoletti e Luciana Wolle.

À professora Stella Valle, que teve papel fundamental para que este projeto pudesse ter sua parte prática executada na UFRGS. Obrigada por me receber no LACVET e obrigada por colaborar com a realização dos hemogramas.

Às médicas-veterinárias residentes da UFRGS por estarem sempre dispostas a colaborar com este estudo.

À equipe do Laboratório de Virologia da UFRGS, mais precisamente ao Oscar e à Renata, que realizaram as PCR.

À Fátima, do Laboratório de Enzimologia e Toxicologia da UFSM, pelas análises laboratoriais referentes ao estresse oxidativo.

Ao Fabiano, pela ajuda com a estatística.

E por fim ao meu orientador, Alexandre Krause, pela oportunidade, confiança e compreensão nos momentos de dificuldade.

Obrigada!

*Dedico este estudo a minha
querida mãe, incansável em seus
esforços, e ao meu amado noivo,
pelo apoio em todos os momentos.*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS PELO VÍRUS DA CINOMOSE

AUTORA: ANDRESSA OLIVEIRA DE CURTIS

ORIENTADOR: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, 04 de março de 2013.

A cinomose canina é uma doença multissistêmica grave, que afeta os sistemas respiratório, hemolinfático, gastrointestinal e neurológico. As lesões induzidas pela replicação do vírus da cinomose canina (VCC) produzem um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam a um quadro de estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi verificar parâmetros de estresse oxidativo através da mensuração da peroxidação lipídica através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose. Neste estudo, foram utilizados 33 animais positivos para o VCC, provenientes do atendimento da rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e 21 animais clinicamente sadios como controle. Para a confirmação do diagnóstico da doença a técnica de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa) foi realizada em amostras de swab retal e/ou soro. Este estudo demonstrou que houve diferença significativa na peroxidação lipídica, atividades da SOD e CAT entre grupos analisados, sugerindo o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese desta doença.

Palavras-chave: *Morbillivirus*. Peroxidação lipídica. TBARS. Catalase. CAT. Superóxido dismutase. SOD.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduate Program in Veterinary Medicine

Federal University of Santa Maria

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN DOGS NATURALLY INFECTED WITH CANINE DISTEMPER VIRUS

AUTHOR: ANDRESSA OLIVEIRA DE CURTIS

ADVISER: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, March 04th, 2013.

Canine distemper disease is a severe multisystem disease that affects the respiratory, hemolymphatic, gastrointestinal and neurological systems. The lesions induced by replication of canine distemper virus (CDV) produce an increase in reactive oxygen species (ROS), leading to oxidative stress. The aim of this study was to investigate parameters of oxidative stress by measuring the lipid peroxidation through the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the activity of the enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) in dogs naturally infected with distemper virus. In this study we used 33 animals positive for CDV, attended at the Veterinary Hospital of the University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and 21 clinically healthy animals were used as control. For the confirmation of the diagnosis RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) was performed in samples of rectal swab and/or serum. This study demonstrated a significant difference in lipid peroxidation, SOD and CAT activities in the analyzed groups, suggesting the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of the disease.

Key words: *Morbillivirus*. Lipid peroxidation. TBARS. Catalase. CAT. Superoxidedismutase. SOD.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na cinomose canina..... 17
- Figura 2 - Esfregaço sanguíneo de canino exibindo inclusões patognomônicas da cinomose (Corpúsculos de Lentz) em hemácia e neutrófilo..... 19
- Figura 3 – Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons..... 24
- Figura 4 – Integração dos sistemas de defesa antioxidante enzimáticos..... 26

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro de cães saudáveis e cães infectados com o vírus da cinomose (**P<0,01)..... 41
- Figura 2- A: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no sangue de cães saudáveis e cães infectados com o vírus da cinomose (*P<0,05). B: Atividade da catalase (CAT) no sangue de cães saudáveis e cães infectados com o vírus da cinomose. (*P<0,05)..... 42

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Frequência (*f*) das alterações clínicas observadas no exame físico de 33 cães positivos para o vírus da cinomose..... 43
- Tabela 2 – Frequência (*f*) das alterações hematológicas observadas no hemograma de 33 cães positivos para o vírus da cinomose..... 44

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido de Participação em Pesquisa.....	52
APÊNDICE B- Sinais clínicos apresentados pelos cães positivos para o vírus da cinomose.....	53
APÊNDICE C – Eritrograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.....	57
APÊNDICE D – Leucograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.....	59

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	12
1 - INTRODUÇÃO.....	12
2 - REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Cinomose canina	15
2.2 Radicais livres e estresse oxidativo	20
2.2.1 Peroxidação lipídica.....	22
2.3 Enzimas antioxidantes	23
2.3.1. Superóxido dismutase (SOD).....	25
2.3.2 Catalase (CAT).....	26
CAPÍTULO II.....	28
3 - ARTIGO CIENTÍFICO	28
RESUMO.....	29
ABSTRACT.....	30
INTRODUÇÃO	30
MATERIAL E MÉTODOS	32
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
CONCLUSÃO	37
AGRADECIMENTOS	37
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS	37
REFERÊNCIAS.....	37
4 – CONCLUSÃO	45
5 – REFERÊNCIAS.....	46

CAPÍTULO I

1 - INTRODUÇÃO

O vírus da cinomose canina (VCC) é o causador de uma doença de distribuição mundial sistêmica grave e altamente contagiosa que afeta os sistemas respiratório, hemolinfático, gastrintestinal e nervoso (BEINECKE et al., 2009; KAPIL & YEARY, 2011). O cão doméstico é o principal hospedeiro do VCC, um *Morbillivirus* da família Paramyxoviridae (NORRIS et al., 2006), que acomete outros carnívoros, incluindo todos os membros das famílias Canidae, Mustelidae e alguns membros das famílias Procyonidae, Hyenidae, Ursidae e Viverridae, sendo também observado em felídeos e mamíferos marinhos (KAPIL & YEARY, 2011). Cães de qualquer idade, raça e sexo, com maior predileção por filhotes e cães imprópriamente, ou não vacinados são acometidos (GREENE & APPEL, 2006). Os cães infectados pelo vírus da cinomose podem manifestar uma combinação de sinais e/ou lesões respiratórias, gastrintestinais, cutâneas e neurológicas que podem ocorrer em sequência ou simultaneamente (GRÖNE et al., 2003; KOUTINAS et al., 2004; BEINECKE et al., 2009).

Os radicais livres são espécies químicas constituídas de um átomo ou associação dos mesmos, possuindo um elétron desemparelhado na sua órbita mais externa. Essa situação implica em alta instabilidade energética e cinética, e para se manter estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. A formação de radicais livres conduz ao estresse oxidativo, processo no qual estes iniciarão uma cadeia de reações, originando alterações em proteínas extracelulares e a modificações celulares. O maior dano causado pelo estresse oxidativo é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica que, em última instância, leva à morte celular. (HIRATA et al., 2004; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A principal fonte de radicais livres em sistemas biológicos é a molécula de oxigênio, que, no entanto, é fundamental para o metabolismo celular e para a produção de energia (HIRATA et al., 2004). Sendo assim, a mais abundante fonte endógena geradora são as mitocôndrias (que usam cerca de 90% do oxigênio) onde o oxigênio é reduzido em etapas sequenciais para produzir água. Ou seja, ele participa da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria para que haja a produção de ATP. Para a completa redução de uma molécula de

oxigênio em duas moléculas de água, quatro elétrons são transportados dentro da membrana mitocondrial interna. Entretanto, 1 a 2% desses elétrons são perdidos durante o transporte, levando a formação de superóxido (O_2^-) e subsequentemente de outras numerosas espécies reativas de oxigênio (EROs) como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH) (HIRATA et al., 2004). Em condições patológicas, entretanto, a formação de EROs pode se elevar, resultando em estresse oxidativo, o qual leva ao aumento na peroxidação lipídica, que é mensurada através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

Em contrapartida, as consequências nocivas causadas pelo estresse oxidativo são minimizadas por sistemas de defesa antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas que apresentam ação antioxidante são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), as quais constituem a primeira linha de defesa endógena do organismo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2010). Segundo RAO & BALACHANDRAN (2002), antioxidantes incluem compostos de baixo peso molecular como a glutathione, tocoferol (vitamina E), ácido retinoico, ácido ascórbico (vitamina C), albumina, bilirrubina, ferritina, ceruloplasmina, melatonina, ácido úrico, minerais (selênio) e fitonutrientes (flavonoides e carotenoides). Normalmente há um equilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e os fatores que promovem a formação dos radicais livres assim sendo, qualquer desequilíbrio que favoreça a formação de radicais livres é definido com um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Na cinomose canina, assim como na etiopatogenia de diversas outras doenças neurodegenerativas bem conhecidas em humanos (Parkinson e Alzheimer), o estresse oxidativo contribui para a ocorrência de lesões no SNC, destacando principalmente a desmielinização, sendo que os mecanismos patogênicos de muita destas condições são pouco compreendidos. O SNC parece ser particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, visto que as membranas neuronais contêm uma alta proporção de ácidos graxos poliinsaturados suscetíveis às espécies reativas de oxigênio (EROs), por conseguinte, ao dano oxidativo (KARADENIZ et al., 2008; ORSINI & BONDAN, 2008).

Estudos realizados por KARADENIZ et al. (2008) comprovaram que existe aumento das concentrações de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, e acúmulo de EROs em cães infectados com o vírus da cinomose. Segundo estes autores, existe um aumento das concentrações plasmáticas de marcadores para o dano oxidativo associado à diminuição das concentrações de antioxidantes não enzimáticos (como retinol e β -caroteno) em cães infectados pelo VCC.

Apesar desses resultados sugerirem insuficiência dos sistemas antioxidantes não enzimáticos durante a cinomose em cães, não há até o momento estudos associando o estresse oxidativo com alterações no sistema antioxidante enzimático. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar as alterações clínicas e hematológicas, bem como parâmetros de estresse oxidativo, através da mensuração da peroxidação lipídica e da atividade da catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cinomose canina

A cinomose é uma grave doença infecciosa, altamente contagiosa, com elevado índice de mortalidade e geradora de transtornos oculares, respiratórios, gastrintestinais e neurológicos (GREENE & APPEL, 2006; MARTELLA et al., 2008). Segundo SPITZBARTH et al. (2012), é a uma das doenças do sistema nervoso central (SNC) mais comum nesta espécie. É causada por um *Morbillivirus*, da família *Paramyxoviridae*, sendo mundialmente importante para os cães domésticos (*Canis familiaris*), pois apresenta alta morbidade (GREENE & APPEL, 2006).

As lesões e os sinais clínicos da forma neurológica da cinomose são extremamente variáveis. Os cães são frequentemente afetados por várias condições inflamatórias e degenerativas espontâneas do sistema nervoso central (SNC). Devido à baixa capacidade de regeneração do SNC um conhecimento detalhado sobre a base molecular relacionada ao início, progressão e remissão das doenças do SNC em caninos representa um pré-requisito para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Além disso, como muitas doenças espontâneas do SNC em cães compartilham semelhanças marcantes com as doenças em humanos, o conhecimento sobre a patogênese da cinomose pode em parte ser traduzida para uma melhor compreensão de determinadas doenças humanas. (SPITZBARTH et al., 2012).

São descritas quatro formas de encefalite: uma que afeta os cães novos, de caráter severo e agudo, na qual os sinais sistêmicos ocorrem ao mesmo tempo que os neurológicos; outra que atinge cães adultos, do tipo crônica, na qual os distúrbios neurológicos podem aparecer desacompanhados de transtornos sistêmicos e outras duas denominadas encefalite do cão velho e encefalite recidivante crônica (BRAUND, 1994; TUDURY et al., 1997). A encefalite aguda, que ocorre inicialmente no curso da infecção em animais jovens ou imunossuprimidos, é caracterizada por lesão viral direta (SUMMERS et al., 1995; GREENE & APPEL, 2006). O vírus causa lesão multifocal nas substâncias cinzenta e branca. As lesões na substância cinzenta são resultados de infecção neuronal e necrose, e podem levar a uma poliencfalomalácia. Lesões na substância branca são caracterizadas por danos mielínicos e estão associados com replicação viral nas células da glia. Mudanças inflamatórias são mínimas devido à imunodeficiência resultante de imaturidade fisiológica do sistema imune

e/ou decorrente da imunossupressão viral induzida (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; GREENE & APPEL, 2006). A encefalite multifocal em cães adultos acomete frequentemente animais entre os quatro e seis anos, com curso crônico. Esta enfermidade não é precedida nem coincide com os sinais sistêmicos (SILVA et al., 2009). As alterações têm início com hiperplasia dos astrócitos e proliferação microglial em estruturas subpiaais e subependimárias na substância branca. Esta forma também está associada com a alta concentração de anticorpos antimielínicos, podendo ser uma reação secundária ao processo inflamatório. Anticorpos contra o vírus interagem com macrófagos infectados em lesões no SNC, causando sua ativação com liberação de radicais livres de oxigênio. Esta atividade por sua vez pode levar à destruição de oligodendrócitos e bainha de mielina (SUMMERS et al., 1995; VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005). Há indícios que as lesões induzidas pela replicação do vírus da cinomose canina (VCC) produzam um intenso estresse oxidativo (KARADENIZ et al., 2008).

Durante a exposição natural, o vírus da cinomose se propaga por gotas de aerossóis e entra em contato com o epitélio do trato respiratório superior. Em 24 horas, as partículas virais se replicam nos macrófagos e se disseminam pela via linfática local, para tonsilas e linfonodos brônquicos, resultando em uma severa imunossupressão (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005; MARTELLA et al., 2008). A função imune prejudicada, associada à depleção dos órgãos linfoides, consiste em perda de linfócitos, especialmente de células T CD4+ (devido à apoptose de células linfoides) (BEINECKE et al., 2009). De dois a quatro dias pós-infecção, o número de partículas virais nas tonsilas, linfonodos retrofaríngeos e bronquiais aumenta, porém uma quantidade pequena de células mononucleares infectadas é encontrada no sistema linfoide, medula óssea, timo, baço, linfonodos mesentéricos, placas de Peyer, células estomacais, células de Küpffer e células mononucleares ao redor dos vasos pulmonares e bronquiais. A ampla proliferação viral nos órgãos linfoides induz um aumento inicial na temperatura corporal, entre o segundo e sexto dia, ocorrendo leucopenia, causada por danos virais nas células linfoides (GREENE & APPEL, 2006). A disseminação do vírus no epitélio e nos tecidos do SNC (Figura 1) ocorre no período de 8 a 10 dias pós-infecção, por via hematogena ou pelo líquido, após viremia (GREENE & APPEL, 2006). O período de incubação pode variar de uma a quatro semanas ou mais. Febre transitória atinge o pico de três a seis dias pós-infecção e está associada com o início da viremia. Perda de apetite, prostração, descarga nasal e ocular e tonsilite podem ser observados (MARTELLA et al., 2008).

O VCC causa uma doença desmielinizante multifocal que ocorre naturalmente em cães e outros carnívoros e é considerado um modelo experimental para doenças desmielinizantes em humanos, como a esclerose múltipla (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005). Estudos experimentais têm demonstrado que a desmielinização aguda da cinomose canina é uma lesão não inflamatória, que ocorre aproximadamente três semanas pós-infecção e durante período de intensa imunossupressão. A desmielinização está também diretamente relacionada à replicação viral ativa, principalmente em astrócitos e, possivelmente, a uma infecção do VCC restrita de oligodendrócitos, as células produtoras de mielina, e tem predileção por algumas regiões como cerebelo, sistema óptico e medula espinhal (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

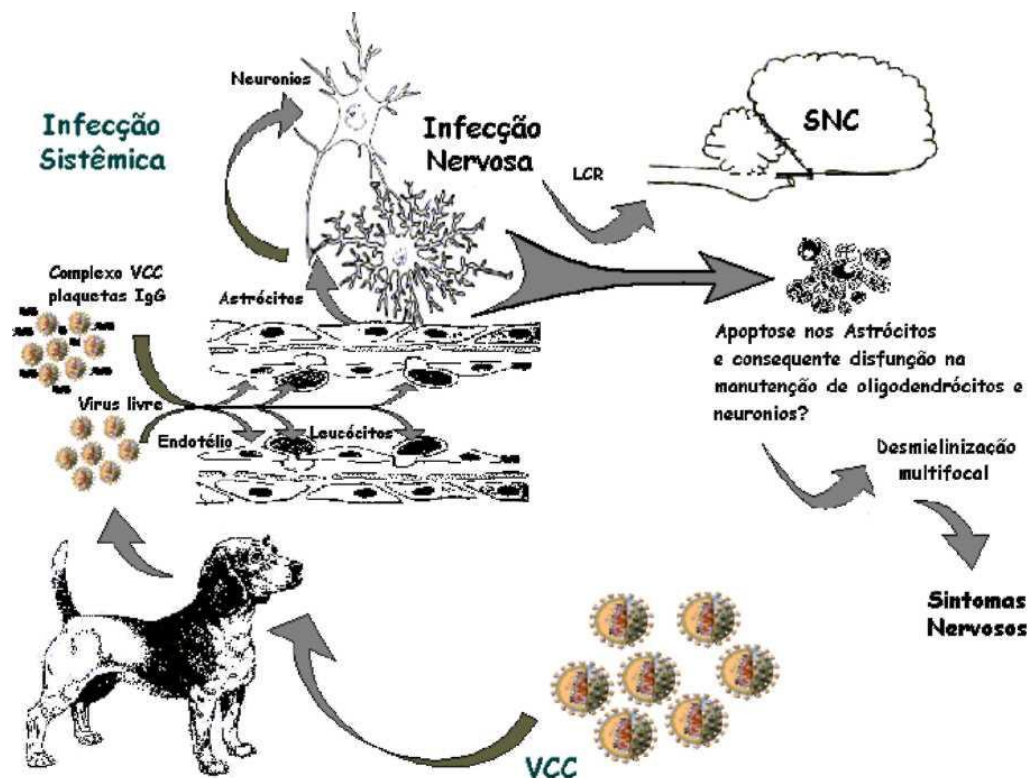


Figura 1 - Esquema ilustrativo da progressão da infecção sistêmica para a infecção nervosa na cinomose canina (MORO et al., 2004).

As áreas com desmielinização aguda e sem inflamação são consideradas uma consequência da replicação viral no interior de oligodendrócitos levando a destruição celular e

a perda de habilidade para manter a bainha de mielina (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Na maioria, ou em todos os casos de infecção pelo VCC, o vírus atinge o encéfalo, mesmo que o animal não apresente manifestações de transtornos neurológicos (SUMMERS et al., 1995). No entanto, alguns estudos sugerem que a infecção do SNC ocorre precocemente, na fase sistêmica da doença. Neste caso, a cinomose progride da forma sistêmica para a neurológica, aparentemente por falha do sistema imune (MANGIA & PAES, 2008).

A frequente ocorrência de lesões periventriculares e subpiaais, e o fato do vírus ser encontrado facilmente nas células do plexo coroide e do epêndima, sugerem que este penetre nos tecidos cerebrais pelo líquido, onde o agente pode ser encontrado em células mononucleares fundidas com células endimárias (VANDEVELDE & ZURBRIGGEN, 2005).

Os sinais clínicos neurológicos incluem mioclonias, convulsão, rigidez cervical, hiperestesia, tremores musculares, paresia, paralisia, ataxia, mudanças comportamentais, depressão e desorientação (NEGRÃO et al., 2007). As mioclonias são constatadas mais comumente nos músculos faciais, mastigatórios e apendiculares (BRAUND, 1994) e foram consideradas como sendo patognômicas da cinomose (GREENE & APPEL, 2006). Distúrbios neurológicos multifocais acompanhados de febre, transtornos respiratórios, diarreia, corrimento ocular, hiperqueratose naso-digital, mioclonias, linfopenia, coriorretinite e história de não vacinação são também indicativos da doença (SUMMERS et al., 1995; TUDURY et al., 1997). Cães com cinomose apresentam leucopenia quatro a seis dias após a infecção. Uma vez que a doença esteja instalada, observar-se linfopenia, monocitose e leve neutrofilia (GREENE & APPEL, 2006), podendo haver leucocitose devido à infecção bacteriana secundária. Cães com encefalomielite por cinomose podem ou não apresentar alterações no líquido. As anormalidades possíveis de serem encontradas são: aumento de proteínas (superior a 25mg/dl) e pleocitose (mais de 10 células/mm³), com predomínio de células mononucleares (BRAUND, 1994). A cinomose pode ser diagnosticada laboratorialmente através da visualização de corpúsculos de inclusão de Lentz em hemácias e leucócitos visualizados a partir de esfregaços sanguíneos (Figura 2), no líquido e em impressões das mucosas nasal, prepucial, vaginal e principalmente conjuntival, corados com corantes tipo Romanowsky, como o panótico rápido, (WEISS & WARDROP, 2010). O encontro destes corpúsculos de inclusão em células das conjuntivas ocular ou vaginal é sinal patognômico de cinomose. Inclusões intracitoplasmáticas e intranucleares podem também

ocorrer em neurônios, astrócitos, células das meninges e epêndima (BRAUND, 1994; TUDURY et al., 1997).

Diferentes técnicas têm sido utilizadas como diagnóstico complementar da cinomose, como o isolamento viral, RT-PCR, hibridização *in situ* e imuno-histoquímica (MASUDA et al., 2006). A imuno-histoquímica permite a detecção de antígenos virais em diferentes tecidos fixados em formol. Como diagnóstico *post mortem* utilizam-se órgãos como estômago, pulmão, bexiga, encéfalo, baço, linfonodos, tonsila, rim, intestino e coxins digitais (DUCATELLE et al., 1980; KOUTINAS et al., 2004; LIANG et al., 2007). A RT-PCR (Reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa) vem sendo empregada na detecção do vírus da cinomose, devido sua rapidez na obtenção dos resultados, a não exigência da infecciosidade da partícula viral e os altos níveis de sensibilidade e especificidade. Seu procedimento requer diferentes tipos de amostras biológicas como sangue, soro, urina e fragmentos de órgãos (GEBARA et al., 2004; CURTI et al., 2012).

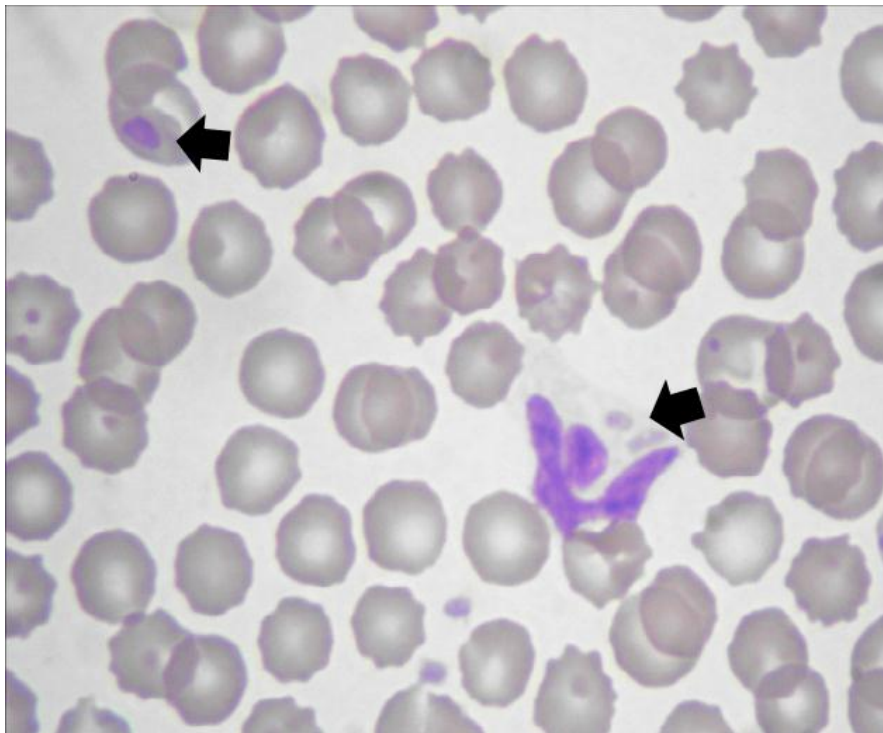


Figura 2 - Esfregaço sanguíneo canino exibindo inclusões patognomônicas da cinomose (Corpúsculos de Lentz) (setas) em hemácia e neutrófilo (Panótico Rápido, 1000x) (MARTINS et al., 2009).

2.2 Radicais livres e estresse oxidativo

O termo radical livre é frequentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos capazes de reagir com qualquer composto situado próximo à sua órbita externa, passando a ter uma função oxidante ou redutora (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Essa configuração faz dos radicais livres espécies altamente instáveis, de meia vida relativamente curta e quimicamente muito reativas. O radical livre mais simples é o átomo de hidrogênio, pois o mesmo tem apenas um elétron que é, portanto, desemparelhado (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres são gerados em muitos processos fisiológicos e exercem funções importantes no organismo. Sua geração é decorrente de uma ação contínua e fisiológica, cumprindo funções biológicas essenciais. São formados em um cenário de reações de oxido-redução, provocando essas reações ou delas resultando. Podem ceder o elétron desemparelhado e serem oxidados ou podem receber outro elétron e serem reduzidos (OKEZIE, 1998). Essas reações ocorrem no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana citoplasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e moléculas de DNA) está relacionado com seu local de formação (MANACH et al., 2004).

As mitocôndrias consomem mais de 90% do oxigênio disponível no organismo, sendo o principal local de formação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres. Durante o processo de obtenção de energia, a enzima citocromo oxidase adiciona quatro elétrons à molécula de oxigênio e a reduz a água, seguindo quatro passos sequenciais, nos quais libera sucessivas espécies reativas (VALKO et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (EROs) incluem radicais livres, como: ânion superóxido (O_2^-), hidroxil (OH), peroxil (RO_2), hidroperoxil (HRO_2^-), assim como espécies não radicais, que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados são muito instáveis, como por exemplo: peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCL). As espécies reativas ao nitrogênio (ERN) incluem radicais livres como o óxido nítrico (ON) e dióxido de nitrogênio (NO_2^-), assim como espécies não radicais, por exemplo: peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitrato (RONOO) (TURKO et al., 2001; EVANS et al., 2002; EDEAS, 2011).

Outra fonte endógena de radicais livres são os fagócitos, que destroem células infectadas por bactérias ou vírus, liberando oxidantes: óxido nítrico, ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Desse modo, os radicais livres também possuem um papel de destaque no organismo, fazendo parte da defesa imune primária (VALKO et al., 2007). Os

radicais livres participam ainda da atividade bactericida, de processos de sinalização celular e estão envolvidos na síntese e regulação de algumas proteínas, em condições fisiológicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O estresse oxidativo é definido como o excesso de formação e/ou remoção insuficiente de moléculas reativas (radicais livres), tais como: espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (SIES, 1993; TURKO et al., 2001; CAROCHO & FERREIRA, 2013). Durante a redução do oxigênio molecular, EROs são formadas e existe a necessidade permanente de inativar estes radicais livres.

As consequências do estresse oxidativo podem ser variadas, de acordo com o tipo celular e com sua intensidade. Segundo HALLIWELL & GUTTERIDGE (2007), os principais efeitos são:

1. Proliferação celular: algumas células podem responder ao estresse oxidativo através do aumento da taxa de divisão celular.

2. Adaptação: aumento das defesas celulares, como catalase, superóxido dismutase e glutatona, deixando a célula totalmente, parcialmente ou superprotegida (a célula estará mais resistente frente a futuros insultos oxidativos mais intensos). Além disto, os alvos de dano oxidativo podem ser redirecionados, ou ainda, a produção basal de EROs pode ser reduzida.

3. Dano celular: pode envolver dano a um ou mais tipos de biomoléculas, como lipídios, proteínas, DNA e carboidratos. Em casos de dano menor, a célula pode sobreviver com algum dano oxidativo persistente e irreparável, ou ainda promover o seu reparo.

4. Senescência: sobrevivência da célula, mas com o sistema de divisão celular comprometido.

5. Morte celular: após o dano a célula pode desencadear o processo de morte celular. Danos oxidativos ao DNA, mitocôndria, ou em outros alvos celulares, podem causar morte celular por apoptose ou por necrose.

O estresse oxidativo pode ser devido à exposição ambiental aos oxidantes; à ingestão insuficiente de antioxidantes na dieta; à produção excessiva de radicais livres durante o metabolismo de fármacos ou substâncias tóxicas; à ativação excessiva do sistema celular que produz radicais livres, como os fagócitos, durante o processo inflamatório; ou ainda devido a alterações enzimáticas, resultando em níveis patológicos de danos oxidativos. Há uma forte evidência de que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese de diversas doenças (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Na cinomose canina, assim como na etiopatogenia de diversas outras doenças neurodegenerativas bem conhecidas em humanos (Parkinson e Alzheimer), o estresse

oxidativo contribui para o surgimento e o desenvolvimento da degeneração neurológica, principalmente no SNC e pode participar da desmielinização (KARADENIZ et al., 2008). As EROs são capazes de induzir tanto a necrose como a apoptose celular, entretanto não parecem ser importantes intermediários da morte neuronal sob condições patológicas. A ruptura das membranas celulares na lipoperoxidação faz com que ocorra uma mudança no gradiente dos íons dos diferentes compartimentos celulares. Já foi demonstrado, em cultura de células, que os neurônios podem sofrer morte celular após a degradação de toda a glutatona (GSH) intracelular, o principal antioxidante endógeno (LEWERENZ et al., 2003).

2.2.1 Peroxidação lipídica

As membranas biológicas são constituídas principalmente por fosfolipídios, os quais possuem uma porção polar e duas hidrofóbicas. Geralmente, as "caudas" hidrofóbicas são compostas por ácidos graxos, que podem diferir no comprimento e na configuração em que se apresentam, e também no grau de insaturação (ALBERTS et al., 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Quando ocorre um desbalanço no status antioxidante, as EROs atacam os ácidos graxos insaturados das membranas celulares num processo chamado de peroxidação lipídica. Este mecanismo resulta em modificações nos lipídeos de membrana, que perde suas características arquitetônicas, tornando-se mais firme e menos flexível. Com isso, criam-se "fendas iônicas" que alteram a permeabilidade da membrana e favorecem o fluxo indiscriminado de metabólitos e detritos celulares. Este desequilíbrio hidroeletrolítico leva à ruptura e lise da membrana, levando à necrose celular (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). A peroxidação lipídica é um mecanismo geral pelo qual os radicais livres podem induzir danos teciduais, e está associada a várias condições patológicas (HALLIWELL & CHIRICO, 1993).

O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado de mensuração é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993). A peroxidação lipídica é considerada um evento fisiopatológico importante no estudo de substâncias farmacológicas, como os estrógenos, em diversas doenças neurodegenerativas, e em danos isquêmicos e traumáticos (BRAUGHLER et al., 1987; VEDDER et al., 1999; MOSSBERG et al., 2009). Assim, o excesso ou acúmulo de EROs e ERNs no organismo, além de iniciar a peroxidação das membranas lipídicas (permitindo o acúmulo de peróxidos de lipídios), também pode

prejudicar as proteínas e o DNA celular, acelerando processos como o envelhecimento e o câncer (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Uma fonte importante de elétrons são os ácidos graxos insaturados encontrados na dupla camada de lipídios das membranas celulares, que são vitais para o funcionamento da célula (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). O SNC é um tecido que consiste substancialmente de membranas e ácidos graxos, o que aumenta a vulnerabilidade dos constituintes da membrana lipídica aos danos oxidativos e à ação direta dos radicais livres (VEDDER et al., 1999). Este processo ocorre em diferentes condições neurotóxicas e/ou neurodegenerativas e, em grau bem menor, nas atividades fisiológicas normais dos circuitos neurais. Os radicais livres podem modificar a produção e o reaproveitamento de neurotransmissores, a atividade dos canais de íons e a função de diversos transportadores de substâncias para a célula e mitocôndrias, além dos receptores de superfície (MATTSON, 1998).

O sistema nervoso e, especialmente, o cérebro são vulneráveis aos danos dos radicais livres por uma série de razões, tais como a forma de consumo do oxigênio, a abundância de ácidos graxos poli-insaturados e lipídios e a capacidade antioxidante relativamente limitada em comparação com outros órgãos (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993). Estudos comprovaram que existe aumento das concentrações de malondialdeído (MDA), acúmulo de EROs e ocorrência de estresse oxidativo em cães infectados com o vírus da cinomose (KARADENIZ et al., 2008).

2.3 Enzimas antioxidantes

Um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Quando o mecanismo de ação do antioxidante for através de sua reação com o radical livre, o novo radical formado deve ser estável e incapaz de propagar a reação (SHAHIDI et al., 1992). As características de um bom antioxidante são: presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical (em função de seu potencial de redução); capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (MANACH et al., 2004).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários. Os antioxidantes primários atuam como doadores de prótons, impedindo o processo de iniciação

desencadeado pelos radicais livres. Nesta classe de antioxidantes são encontrados os compostos fenólicos, tocoferol, aminoácidos, carotenoides e os antioxidantes sintéticos (BRAVO, 1998; EDEAS, 2011; HANAFY & SELIM, 2012).

Os antioxidantes secundários atuam no bloqueio da decomposição dos peróxidos e hidroperóxidos, convertendo-os na forma inativa, por ação de agentes redutores, bloqueando a reação em cadeia através da captação de intermediários reativos, como os radicais peroxila e alcooxila (DONNELLI & ROBINSON, 1995).

A remoção dos radicais livres do organismo ocorre a partir de mecanismos de defesa enzimáticos e não enzimáticos. Os processos não enzimáticos incluem a glutathiona tripeptídeo (GSH) e as vitaminas A, C e E (SIES, 1997; EDEAS, 2011; HANAFY & SELIM, 2012). A ausência ou falha na defesa antioxidante contribui para o aumento da peroxidação lipídica, podendo acelerar reações prejudiciais à célula (RAO et al., 2000).

O conjunto enzimático inclui a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx). As enzimas CAT e GPx agem com o mesmo propósito, ou seja, o de impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio. Tal ação integrada é de grande importância, uma vez que essa espécie reativa, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, mediante a participação dos metais ferro e cobre, culmina na geração do radical (OH), contra o qual não há sistema enzimático de defesa (BARBOSA et al., 2010) (Figura 3).

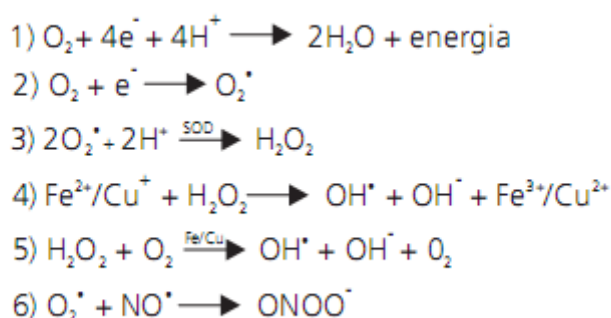


Figura 3- Formação mitocondrial de radicais livres via cadeia transportadora de elétrons. 1) Redução tetravalente do oxigênio, por meio da qual recebe quatro elétrons (e-) e quatro íons de hidrogênio (H⁺), formando duas moléculas de água (H₂O) e liberando energia. 2) Geração do radical superóxido (O₂⁻) pela adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental (O₂). 3) Por meio de um processo denominado dismutação, o radical O₂⁻, ao receber íons de hidrogênio, gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Tal reação é catalisada pela superóxido dismutase (SOD), que acelera a reação na ordem de 10⁴ vezes. 4) Reação de Fenton: quando o H₂O₂ reage com íons ferro (Fe²⁺) ou cobre (Cu⁺) é gerado o radical hidroxila (OH). 5) Reação de Haber-Weiss: os referidos íons também podem catalisar a reação entre H₂O₂ e O₂⁻ gerando, da mesma forma, (OH). 6) O radical O₂⁻ pode também reagir com o óxido nítrico (NO) gerando peroxinitrito (ONOO⁻) (BARBOSA et al., 2010).

O referido radical (OH) vem sendo indicado como o de maior potencial reativo e com extrema instabilidade (vida média de 10^{-9} segundos). Essas características os capacitam como o radical livre mais propício na produção de danos oxidativos. Além de ser o principal iniciador do processo de peroxidação lipídica, tendo como consequência a alteração da função biológica das membranas celulares, esse radical é capaz de agir sobre as proteínas, alterando-as em relação à sua estrutura e/ou função biológica. Seu ataque ao DNA possibilita a ocorrência de mutações (BARBOSA et al., 2010). A GPx também existe sob duas formas: dependente e independente de selênio e pode apresentar-se no citoplasma ou na mitocôndria (BARBOSA et al., 2010).

2.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

A SOD (E.C. 1.15.1.1) é também conhecida como eritrocupreína ou indofenoloxidase (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 2000). É uma metaloenzima amplamente encontrada em organismos eucarióticos e procarióticos (FRIDOVICH, 1995). Constitui-se numa enzima capaz de catalisar a conversão de ânion superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de dois passos reacionais. O primeiro passo consiste na reação do ânion superóxido com o grupo prostético da SOD na sua forma oxidada. Essa ligação conduz à aquisição de um próton e, conseqüente, liberação de oxigênio molecular. A forma reduzida da enzima liga, então, um segundo ânion superóxido e próton, para liberar H_2O_2 e retornar à sua forma oxidada (JOHNSON & GIULIVI, 2005). A concentração da SOD celular varia de 10^{-6} a 10^{-5} M. Nas mitocôndrias se encontra ligada, em seu sítio ativo, ao manganês (MnSOD); no citosol celular, possui cobre e zinco em seu sítio ativo (CuZnSOD) (HALIWELL & GUTTERIDGE, 2007; QIN et al., 2008; BARBOSA et al., 2010). A função catalítica dessa enzima de transformar o radical superóxido em peróxido de hidrogênio foi descoberta por MISRA & FRIDOVITCH, em 1972.

A degradação do superóxido é assegurada pela enzima SOD, enquanto que os hidroperóxidos são destruídos pela CAT, pela glutathione peroxidase ou pela ascorbato peroxidase (KIN et al., 2008). A SOD pode ser encontrada sob duas formas: no citoplasma, é dependente de cobre e zinco (SOD-Cu/Zn), enquanto na mitocôndria, necessita do manganês como cofator (SOD-Mn).

2.3.2 Catalase (CAT)

A CAT (E.C. 1.11.1.6) é uma das enzimas mais abundantes na natureza, encontrando-se amplamente distribuída no organismo humano, nas mitocôndrias e nos peroxissomos; salvo nos eritrócitos, onde é encontrada no citoplasma. Sua atividade varia de acordo com o órgão ou tecido em que se localize, sendo mais elevada no fígado e nos rins e mais baixa nos tecidos conjuntivo e epitelial (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999).

A enzima possui um grupamento heme que é o responsável pela sua atividade catalítica, convertendo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em duas moléculas de água (H_2O) e oxigênio (O_2) (MICHIELS et al., 1994) (Figura 4).

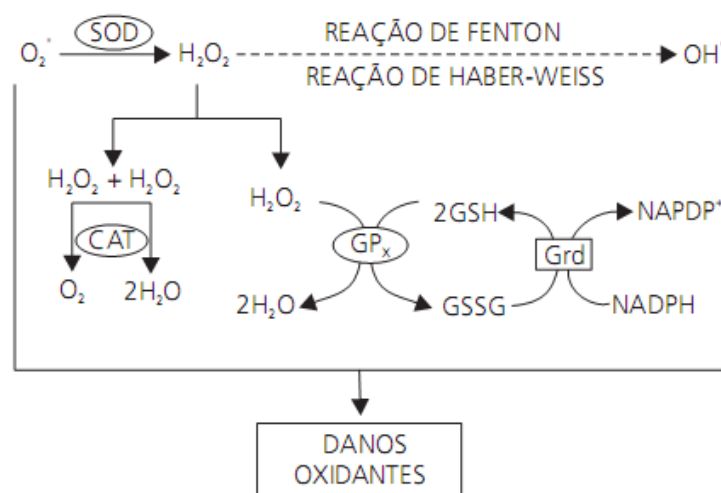


Figura 4 - Integração dos sistemas de defesa enzimático. Por meio da reação de dismutação, a superóxido dismutase (SOD) catalisa a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$). As enzimas catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) se integram para impedir o acúmulo de H_2O_2 que, apesar de não ser um radical livre, é igualmente reativo e capaz de promover danos potenciais. O acúmulo dessa espécie reativa (H_2O_2) possibilita, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, a geração do radical hidroxila (OH^{\cdot}), contra o qual não existe defesa enzimática. A GPx reduz o H_2O_2 à água, no entanto o faz à custa da conversão da glutatona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG), essa última que promove ação oxidante em função da ligação dissulfeto existente em sua estrutura. Assim, é de extrema importância a ação da glutatona redutase (Grd), responsável pela recuperação da glutatona reduzida (GSH), possibilitando a manutenção da integralidade do ciclo redox da glutatona e, conseqüentemente, do equilíbrio adequado entre os sistemas de defesa enzimáticos (BARBOSA et al., 2010).

A CAT desempenha um papel importante na eliminação do H_2O_2 gerado pelas oxidases na oxidação dos ácidos graxos. Apresenta baixa afinidade pelo substrato, portanto possui papel crucial quando o H_2O_2 se encontra em altas concentrações - enquanto a GPx atua em baixas concentrações de H_2O_2 - (CHAUDIÈRE e FERRARI-ILIOU, 1999). O peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila e não existe nenhuma enzima que o remova. Por isso, as enzimas que decompõem o peróxido de hidrogênio, como a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), são de extrema importância para os seres vivos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; BARBOSA et al., 2010).

Em microrganismos patogênicos, a catalase desempenha uma importante função na destoxificação das EROs liberadas por células fagocíticas de defesa do hospedeiro (HAMPTON et al., 1998). Entretanto, os níveis de CAT são baixos na maioria das regiões do encéfalo (no hipotálamo e na substância nigra são um pouco maiores do que no córtex e no cerebelo) (HALLIWELL, 2001). A catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase são consideradas as defesas antioxidantes endógenas mais importantes do organismo no combate à produção dos radicais livres e na degradação destas (BARBOSA et al., 2010).

CAPÍTULO II

3 - ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com formatação de acordo com as orientações da revista ao qual será submetido:

Parâmetros de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados pelo vírus da cinomose

De acordo com as normas para publicação em: Ciência Rural.

1 **Parâmetros de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados com o vírus da**
2 **cinomose**

3 **Oxidative stress parameters in dogs naturally infected with canine distemper virus**

4
5 **RESUMO**

6 A cinomose canina é uma doença multissistêmica grave, que afeta os sistemas
7 respiratório, gastrointestinal e neurológico, causando lesões de desmielinização multifocal na
8 substância cinzenta e branca do sistema nervoso central (SNC). As lesões induzidas pela
9 replicação do vírus da cinomose canina produzem um aumento das espécies reativas de
10 oxigênio (EROs). O objetivo deste trabalho foi verificar alterações clínicas e hematológicas,
11 bem como parâmetros de estresse oxidativo através da mensuração da peroxidação lipídica
12 pela detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e as atividades das
13 enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) em cães naturalmente
14 infectados com o vírus da cinomose. Neste estudo, foram utilizados 33 animais positivos para
15 o vírus, provenientes do atendimento de rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da
16 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e 21 animais clinicamente sadios como
17 controle. Este estudo demonstrou que houve diferença significativa na peroxidação lipídica,
18 atividades da CAT e SOD entre grupos analisados, sugerindo o envolvimento do estresse
19 oxidativo na patogênese desta doença.

20
21 **Palavras-chave:** *Morbillivirus*, peroxidação lipídica, TBARS, catalase, CAT,
22 superóxido dismutase, SOD.

1 **ABSTRACT**

2 Canine distemper is a multisystem disease that is characterized by lesions in the
3 respiratory, gastrointestinal, neurological systems causing multifocal demyelination in the
4 gray and white matter of the central nervous system. The lesions induced by the replication of
5 canine distemper virus produce an increase in reactive oxygen species (ROS), leading to
6 oxidative stress. The objective of this study was to check clinical and hematological
7 alterations as well as parameters of oxidative stress by measuring the lipid peroxidation by the
8 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay and activities of the antioxidants
9 enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and in dogs naturally infected with
10 distemper virus. In this study we used 33 animals positive for canine distemper virus, from
11 the routine of the Veterinary Hospital of the University of Rio Grande do Sul (UFRGS) and
12 21 clinically healthy animals, used as control. This study demonstrated a significant
13 difference in lipid peroxidation (TBARS), CAT and SOD activities between the analyzed
14 groups, suggesting the involvement of oxidative stress in the pathogenesis of this disease.

15

16 **Key words:** *Morbillivirus*, Lipid peroxidation, TBARS, Catalase, CAT, Peroxide
17 dismutase, SOD.

18

19 **INTRODUÇÃO**

20 A cinomose é uma doença viral altamente contagiosa causada pelo vírus da cinomose
21 canina (VCC), um *Morbillivirus* da família Paramyxoviridae (GREENE & APPEL, 2006),
22 que acomete cães de qualquer idade, raça e sexo, com maior predileção por filhotes e cães não
23 vacinados (GREENE & APPEL, 2006). Os cães infectados pelo vírus da cinomose podem
24 manifestar uma combinação de sinais e/ou lesões respiratórias, gastrintestinais, cutâneas e

1 neurológicas que podem ocorrer em sequência ou simultaneamente (GRÖNE et al., 2003;
2 KOUTINAS et al., 2004).

3 Radicais livres são átomos ou moléculas altamente reativas contendo um ou mais
4 elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Normalmente há um
5 equilíbrio entre os mecanismos de defesa antioxidante e os fatores que promovem a formação
6 dos radicais livres, assim sendo, qualquer desequilíbrio que favoreça a formação de radicais
7 livres é definido como um estado de estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE,
8 2007; BARBOSA et al., 2010). O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo
9 sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. As principais enzimas
10 antioxidantes do organismo são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a
11 glutatona peroxidase (GPx) que constituem a primeira linha de defesa endógena
12 (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007, BARBOSA et al., 2010).

13 As espécies reativas de oxigênio (EROs), como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de
14 hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), se formam em condições fisiológicas. Porém, em
15 condições patológicas esta produção pode se elevar, resultando em estresse oxidativo, o qual
16 leva a um aumento na peroxidação lipídica, que é mensurada através das substâncias reativas
17 ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

18 Na cinomose canina, assim como na etiopatogenia de diversas outras doenças
19 neurodegenerativas bem conhecidas em humanos (Parkinson e Alzheimer), o estresse
20 oxidativo contribui para a ocorrência de lesões no SNC, destacando principalmente a
21 desmielinização, sendo que os mecanismos patogênicos de muita destas condições são pouco
22 compreendidos (KARADENIZ et al., 2008; ORSINI & BONDAN, 2008). O SNC parece ser
23 particularmente vulnerável ao estresse oxidativo, visto que as membranas neuronais contêm
24 uma alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados suscetíveis às EROs, por conseguinte,
25 ao dano oxidativo (RAO & BALACHANDRAN, 2002). Estudos realizados por

1 KARADENIZ et al. (2008) comprovaram que existe aumento das concentrações de
2 malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica, e acúmulo de EROs em cães
3 infectados com o vírus da cinomose. Segundo estes autores, existe um aumento das
4 concentrações plasmáticas de marcadores para o dano oxidativo em cães infectados pelo VCC
5 associado à diminuição das concentrações de antioxidantes não enzimáticos. Apesar de esses
6 resultados sugerirem insuficiência dos sistemas antioxidantes não enzimáticos durante a
7 cinomose em cães, não há até o momento estudos associando o estresse oxidativo com
8 alterações no sistema antioxidante enzimático.

9 Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi verificar as alterações clínicas e
10 hematológicas, bem como parâmetros de estresse oxidativo, através da mensuração da
11 peroxidação lipídica e da atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido
12 dismutase (SOD) em cães naturalmente infectados com o vírus da cinomose.

13

14 **MATERIAL E MÉTODOS**

15 Foram utilizados 54 cães, machos e fêmeas, com e sem raça definida, os quais foram
16 divididos em dois grupos: cinomose positivo ($n=33$) e controle ($n=21$). Os animais positivos
17 foram atendidos na rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias da Universidade Federal do
18 Rio Grande do Sul (HCV-UFRGS) e utilizados neste estudo mediante autorização de seu
19 responsável, formalizada pela assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido de
20 Participação em Pesquisa (Apêndice A) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
21 Animais da Universidade Federal de Santa Maria, sob o número 032/2012 (2). Os animais do
22 grupo controle não apresentavam alterações ao exame físico e hemograma, sendo
23 classificados como hígidos.

1 Foi realizada resenha e anamnese onde se registrou idade, sexo, raça, número de
2 imunizações, alterações ao exame físico e presença de sinais clínicos descritos como parte do
3 quadro compatível com cinomose como diarreia, febre, vômito, hiporexia, anorexia, secreção
4 nasal, tosse, dispneia, apatia, hiperkeratose naso-digital (GREENE & APPEL, 2006), além de
5 sinais neurológicos como mioclonias, convulsão, tremores musculares, tetraparesia, ataxia e
6 depressão (Apêndice B) (NEGRÃO et al., 2007). Foi realizado procedimento de colheita de
7 sangue para avaliação do estado geral dos animais através de hemograma completo (Apêndice
8 C e D), além de mensuração de TBARS e atividade de SOD e CAT.

9 A confirmação/exclusão do diagnóstico de cinomose foi realizada através da técnica
10 de RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase pela Transcriptase Reversa) a partir de
11 amostras de swab retal e/ou soro em todos os cães, incluindo os do grupo controle. Para a
12 realização dos exames laboratoriais foram obtidos 6,8 mililitros de sangue total através de
13 punção da veia jugular por sistema a vácuo¹, armazenados em três tubos distintos: um
14 contendo EDTA (hemograma), um sem anticoagulante (TBARS) e outro contendo citrato de
15 sódio (SOD e CAT). O hemograma foi realizado imediatamente após a colheita de sangue e o
16 material para a realização dos demais exames foi congelado a -18°C para determinação
17 posterior dos parâmetros de estresse oxidativo.

18 A quantificação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi realizada
19 em amostras de soro segundo o método de JENTZSCH et al. (1996) modificado e os
20 resultados foram expressos em $\eta\text{mol MDA/mg proteína}$. A atividade da catalase (CAT) foi
21 determinada em amostras de sangue total segundo o método espectrofotométrico de NELSON
22 & KIESOW (1972) e os resultados foram expressos em $\eta\text{mol CAT/mg proteína}$. A
23 determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD) foi efetuada no sangue total pelo
24 sistema de detecção adrenalina–adenocromo (MISRA & FRIDOVICH, 1972) e os resultados
25 foram expressos em UI SOD/mg proteína. O teste t Student's foi utilizado para

¹BD vacutainer®, BD – Brasil. Rua Alexandre Dumas, 1976, Chácara Santo Antônio. Cep: 04717-004 São Paulo -SP

1 avaliar diferenças entre os grupos. A análise estatística foi realizada com o programa SPSS
2 (SPSS 10.0 Chicago, USA). Todos os dados foram expressos como média \pm DP.

3

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

5 Os cães cinomose positivos utilizados neste estudo ($n=33$) foram avaliados
6 clinicamente de acordo com idade, sexo, raça, histórico vacinal, nutrição, apetite, coloração
7 da mucosa, grau de hidratação, temperatura retal, presença de vômitos, diarreia,
8 hiperqueratose naso-digital, secreção ocular, estertor respiratório, secreção nasal, tosse seca,
9 tonsilite, convulsões, tremores, tetraparesia, ataxia e mioclonias. A maior parte dos cães eram
10 filhotes de até seis meses de idade, sendo dezesseis machos e dezesseis fêmeas, com e sem
11 raça definida, a maioria não vacinados ($n=30$). Alguns animais não apresentavam nenhum
12 sinal clínico ($n=2$).

13 As alterações mais frequentemente observadas no exame físico estão representadas na
14 Tabela 1. O leucograma (Tabela 2) foi a característica mais variável. As contagens variaram
15 de leucopenia a leucocitose. Infecções bacterianas oportunistas no trato alimentar e
16 respiratório podem ser observadas em cães com cinomose. Isso justificaria a leucocitose por
17 neutrofilia (SILVA et al., 2005). Neste estudo, a linfopenia foi um achado pouco relevante,
18 contradizendo ETTINGER & FELDMAN (1997) e SILVA et al. (2010) que afirmam que a
19 linfopenia é uma característica consistente. Segundo WEISS & WARDROP (2010) cães
20 filhotes infectados experimentalmente com o vírus da cinomose, desenvolveram marcada
21 linfopenia. A trombocitopenia foi um achado frequente nos cães estudados. Sabe-se que para
22 o gênero *Morbillivirus* já se observou aumento de anticorpos anti-plaquetas (WEISS &
23 WARDROP, 2010; SILVA et al., 2010). Lesões no epitélio intestinal causadas pelo vírus,
24 como consequência da diarreia, além da própria apatia determinada pela doença levam o
25 animal a recusar o alimento. Dessa forma, a diminuição da ingestão proteica bem como o

1 comprometimento intestinal são fatores determinantes na redução dos níveis séricos de
2 albumina na cinomose (KANECO et al., 1997; SILVA et al., 2005), o que justifica a
3 hipoproteinemia observada na maioria dos animais.

4 Anemia também foi um achado importante nos animais deste estudo. A anemia
5 observada nos cães com cinomose pode ser atribuída ao aumento da destruição dos eritrócitos
6 ou à diminuição da sua produção. A destruição é determinada pela presença do vírus no
7 eritrócito ou pela deposição de imunocomplexos na membrana do eritrócito (MENDONÇA et
8 al., 2000; SILVA et al., 2005). A queda na produção pode ser atribuída à falência da medula
9 devido ao estresse desencadeado pela doença (MEYER et al., 1995; SILVA et al., 2005). É
10 importante notar que a membrana dos eritrócitos é rica em ácidos graxos poli-insaturados, um
11 alvo primário para reações envolvendo os radicais livres, e pode permitir que os eritrócitos
12 sejam vulneráveis a danos oxidativos (MAY et al., 1998). Além disso, presença de
13 hemoglobina e ferro, um poderoso catalisador de metal de transição, nos eritrócitos os torna
14 altamente suscetíveis a danos peroxidativos (CLEMENS & WALLER, 1987). A peroxidação
15 dos fosfolipídios causa um aumento da rigidez e deformidade das membranas das hemácias,
16 que por sua vez aumenta a suscetibilidade destes à hemólise (ONGAJOOOTH et al., 1996).

17 O aumento do estresse oxidativo nos cães com cinomose quando comparados ao grupo
18 controle também foi um dado importante observado neste estudo. A quantificação das
19 substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sugestiva da peroxidação lipídica,
20 mostrou-se mais elevada nos animais com cinomose quando comparada ao grupo controle
21 (Figura 1). Em contrapartida, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT (Figura 2)
22 mostrou-se mais elevada nos cães com cinomose, sugerindo uma resposta do organismo frente
23 às EROs formadas.

24 A destruição celular é uma das desagradáveis consequências de reações inflamatórias.
25 Dos vários componentes do processo inflamatório, as EROs têm sido consideradas como a

1 causa da morte celular. As EROs são produzidas pelos neutrófilos sanguíneos, eosinófilos, ou
2 monócitos/macrófagos que estão acumulados nos sítios de inflamação (HIRATA et al., 2004).
3 Durante a ativação imunológica por vírus as EROs são produzidas como um mecanismo de
4 defesa pelos neutrófilos e outras células para a amplificação de sinais (PETERHANS et al.,
5 1997). Sabe-se atualmente que estresse oxidativo está invariavelmente associado com
6 inflamação, particularmente quando o infiltrado inflamatório é dominado por neutrófilos, os
7 quais possuem uma grande capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (TIDÉN et al.,
8 2011).

9 A remoção dos radicais livres do organismo ocorre a partir de mecanismos de defesa
10 enzimáticos e não enzimáticos. A ausência ou falha na defesa antioxidante causa um aumento
11 na peroxidação lipídica e conseqüentemente acelera reações prejudiciais à célula (RAO et al.,
12 2000). A atividade das enzimas antioxidantes é um marcador sensível do estresse oxidativo.
13 Tanto o aumento quanto a diminuição na atividade das enzimas têm sido relatados em
14 diferentes doenças como consequência da produção de EROs. Isso ocorre tanto pelo aumento
15 da regulação da atividade da enzima quanto pela utilização destas enzimas para combater as
16 EROs. No presente estudo, foi observado aumento nas atividades da SOD e CAT (Figuras 2A
17 e 2B) provavelmente devido à síntese compensatória destas enzimas nos cães com cinomose
18 quando comparados ao grupo controle.

19 Assim como na etiopatogenia de doenças degenerativas bem conhecidas em humanos,
20 o estresse oxidativo, na cinomose, acaba contribuindo para a lesão tecidual, principalmente no
21 SNC (KARADENIZ et al., 2008). Além disso, o intenso estresse oxidativo, comprovado pelo
22 aumento da peroxidação lipídica, independente do desenvolvimento de um mecanismo
23 compensatório pelas enzimas antioxidantes, presente nos cães com cinomose quando
24 comparados ao grupo controle (Figura 1) pode contribuir também para o desenvolvimento de
25 anemia e agravamento da desmielinização nos animais infectados pelo VCC.

1 **CONCLUSÃO**

2 O aumento nos níveis do marcador de estresse oxidativo (TBARS) evidencia
3 diretamente o acúmulo de EROs na cinomose. A resposta do sistema antioxidante frente ao
4 estresse oxidativo nos animais positivos para o vírus da cinomose pode ser observada através
5 do aumento da atividade das enzimas SOD e CAT. Estes resultados sugerem que o estresse
6 oxidativo está envolvido na etiopatogenia da cinomose em cães.

7

8 **AGRADECIMENTOS**

9 Ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFRGS, ao Laboratório de
10 Virologia da UFRGS, ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da UFSM e ao
11 Laboratório de Enzimologia Toxicológica da UFSM pelo auxílio no processamento das
12 amostras.

13

14 **COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS**

15 O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da
16 UFSM, nº 032/2012 (2), de acordo com legislação vigente e os Princípios Éticos publicados
17 pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

18

19 **REFERÊNCIAS**

20 BARBOSA, K.B. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.

21 **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

22 CLEMENS, M. R.; WALLER, H. D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chemistry and**

23 **Physics of Lipids**, v.45, p.251-268, 1987

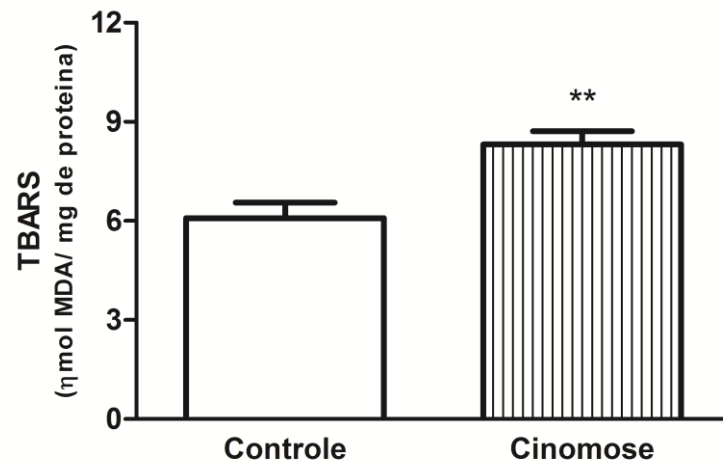
24 ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**. 7th ed.

25 Elsevier. 2010. 2218p.

- 1 GREENE C.E., APPEL M. Canine distemper. In: GREENE C.E. **Infectious Diseases of the**
2 **Dog and Cat**. 3rd.ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, 2006. p. 25-41
- 3 GRÖNE A. et al. Canine distemper virus infection: proliferation on canine footpad
4 keratinocytes. **Veterinary Pathology**., v. 40, p. 574-578, 2003. Disponível
5 em:<<http://vet.sagepub.com/content/40/5/574.full.pdf+html>>. Acesso em 15 mai 2012. doi:
6 10.1354/vp.40-5-574
- 7 HALLIWELL, B.; GUTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th ed. New
8 York: Oxford University, 2007. 851p.
- 9 HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento
10 cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.418-424, 2004.
- 11 JENTZSCH, A.M. et al. Improved analysis of malondialdehyd in human body fluids. **Free**
12 **Radical Biololy & Medicine**., v. 20, p. 251–256, 1996. Disponível em:<
13 [http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8)>. Acesso em: 18 abr 2012. doi:
14 [10.1016/0891-5849\(95\)02043-8](http://dx.doi.org/10.1016/0891-5849(95)02043-8).
- 15 KANECO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of domestic animals.
16 5ed. California:Academic, 1997.
- 17 KARADENIZ, A. et al. Relationship between canine distemper and oxidative stress in dogs.
18 **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 159, p. 462-467, 2008. Disponível em:
19 <http://www.revmedvet.com/2008/RMV159_462_467.pdf>. Acesso em: 19 mar 2012.
- 20 KOUTINAS A.F. et al. Histopathology and immunohistochemistry of canine distemper
21 virus-induced footpad hyperkeratosis (Hard pad disease) in dogs with natural canine
22 distemper. **Veterinary Pathology**, v. 4, p. 2-9, 2004. Disponível
23 em:<<http://vet.sagepub.com/content/41/1/2.full.pdf+html>>. Acesso em: 01 jun 2012. doi:
24 10.1354/vp.41-1-2

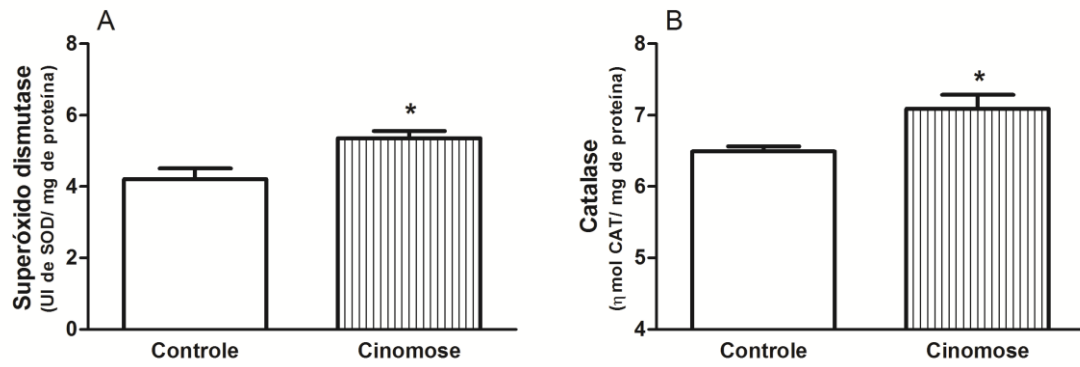
- 1 MAY, J. M.; QU, Z. C.; MENDIRATTA, S. Protection and recycling of alfa-tocopherol in
2 human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. **Archives of Biochemistry and**
3 **Biophysics**, v.349, p.281-289, 1998.
- 4 MENDONÇA, R.B. et al. Respostas hematológicas em cães naturalmente infectados pelo
5 vírus da cinomose: estudo retrospectivo de casos. **Revista Brasileira de Ciências**
6 **Veterinárias**, v.7, p.114, 2000.
- 7 MEYER, D.J.; COLES, E.H.; RICH, L.J. **Medicina de Laboratório Veterinário –**
8 **Interpretação e Diagnóstico**. 1ªed. Rocca: São Paulo, 1995. 308p.
- 9 MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. Role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine
10 and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p.
11 3170-3175, 1972.
- 12 NEGRÃO, F.J. et al. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a
13 detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente
14 infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 59, p. 253-257,
15 2007. Disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000100042>>. Acesso em:
16 13 mai 2012. doi: 10.1590/S0102-09352007000100042
- 17 NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Entalpy of the composition of hydrogen peroxide by catalase
18 at 25°C. **Analytical Biochemistry**, v. 49, p. 474-479, 1972.
- 19 ONGAJOOH, L., et al. Role of lipid peroxidation, trace elements and antioxidant enzymes
20 in chronic renal disease patients. **Journal of the Medical Association of Thailand**, v.79,
21 n.12, p.791- 800, 1996.
- 22 ORSINI, H.; BONDAN, E.F. Participação astrocitária na desmielinização do sistema nervoso
23 central (SNC) de cães com cinomose – revisão de literatura. **Revista do Instituto de Ciências**
24 **da Saúde**, v.26, p.438-442, 2008.

- 1 PETERHANS, E. et al. Virus-induced formation of reactive oxygen intermediates in
2 phagocytic cell. **Free Radical Research Communications**, v. 3, p. 39-46, 1987.
- 3 RAO, A.V.; BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in
4 neurodegenerative diseases. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, p. 291-309, 2002. Disponível
5 em: <<http://dx.doi.org/10.1080/1028415021000033767>>. Acesso em: 10 jun 2012. doi:
6 10.1080/1028415021000033767
- 7 RAO, G.M. et al. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. **Clinica Chimica Acta**, v.
8 296, p. 203-212, 2000. Disponível em: <<http://www.jacn.org/content/19/5/563.full.pdf+html>>.
9 Acesso em: 01 jun 2012.
- 10 SILVA, I.N.G. et al. Perfil hematológico e avaliação eletroforética das proteínas séricas de
11 cães com cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.136-
12 139, 2005.
- 13 TIDÉN, A.K. et al. 2-Thioxanthines are mechanism-based inactivators of myeloperoxidase
14 that block oxidative stress during inflammation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p.
15 37578-37589, 2011. Disponível em
16 <<http://www.jbc.org/content/suppl/2011/08/31/M111.266981.DC1.html>> Acesso em 14 jan
17 2013.
- 18 WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed. Ames, Iowa: Wiley
19 Blackwell, 2010. 1232p.



1

2 Figura 1 - Níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no soro de cães sadios
3 e cães infectados com o vírus da cinomose (**P<0,01).



1

2 Figura 2- A: Atividade da superóxido dismutase (SOD) no sangue de cães sadios e cães
3 infectados com o vírus da cinomose (*P<0,05). B: Atividade da catalase (CAT) no sangue de
4 cães sadios e cães infectados com o vírus da cinomose. (*P<0,05).

- 1 Tabela 1 – Frequência (*f*) das alterações clínicas observadas no exame físico de 33 cães
 2 positivos para o vírus da cinomose.

Alteração no exame físico	<i>f</i>	%
Mau estado nutricional	20	60,60
Desidratação	19	57,57
Diarreia	18	54,54
Prostração	16	48,48
Secreção ocular	16	48,48
Vômito	15	45,45
Hiporexia	15	45,45
Anorexia	12	36,36
Hipertermia	9	27,27
Mucosas pálidas	8	24,24
Hiperkeratose naso-digital	8	24,24
Estertor respiratório	7	21,21
Tosse seca	7	21,21
Tonsilite	7	21,21
Secreção nasal	5	15,15
Ataxia	5	15,15
Tetraparesia	4	12,12
Mioclonia	3	9,09
Convulsão	1	3,03
Tremores	1	3,03

- 1 Tabela 2 – Frequência (*f*) das alterações hematológicas observadas no hemograma de 33 cães
 2 positivos para o vírus da cinomose.

Alteração no hemograma	<i>f</i>	%
Anemia	19	55,88
Normocítica Hipocrômica	(10)*	(52,63)*
Normocítica Normocrômica	(6)*	(31,58)*
Macrocítica Hipocrômica	(2)*	(10,53)*
Microcítica Normocrômica	(1)*	(5,26)*
Hipoproteinemia	15	44,12
Trombocitopenia	12	35,29
Trombocitose	3	8,82
Leucocitose	8	23,53
Leucopenia	4	11,76
Neutrofilia	9	26,47
Neutropenia	2	5,88
Linfopenia	12	35,29
Eosinofilia	5	14,71
Eosinopenia	14	41,18
Monocitose	8	23,53
Monocitopenia	2	5,88

- 3 (*) Parâmetros relativos aos animais anêmicos.

4 – CONCLUSÃO

Animais naturalmente infectados com o vírus da cinomose canina apresentam aumento na concentração de marcadores de estresse oxidativo quando comparados a animais clinicamente saudáveis.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT encontra-se aumentada em animais infectados com o vírus da cinomose quando comparada a animais saudáveis.

Os resultados acima mencionados sugerem que o estresse oxidativo esteja envolvido na etiopatogenia da cinomose em cães.

5 – REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. 5th ed, New York: Garland Science, 2007, 1268p.

BARBOSA, K.B. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.

BEINECKE, A. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.15, p.1-18, 2009

BRAUGHLER, J.M. et al. Novel 21-amino steroids as potent inhibitors of iron-dependent lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.22, p.10438-10440, 1987.

BRAUND, K.G. **Clinical Syndromes in Veterinary Neurology**. 2nded. St. Louis: Mosby, 1994. 477 p.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CHAUDIÈRE, J.; FERRARI-ILIOU, R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, v.37, p.946-962, 1999.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.

CURTI, M.C.; ARIAS, M.V.B.; ZANUTTO, M.S. Avaliação de um kit de imunoenensaio cromatográfico para a detecção do antígeno do vírus da cinomose em cães com sinais sistêmicos ou neurológicos da doença. **Semina: Ciências Agrárias**, v.33, n.6, p.2383-2390, 2012.

DONNELLI, J.K.; ROBINSON, D.S. Free radical in foods. **Free Radical Research**, v.22, n.2, p.147-176, 1995.

DUCATELLE, R.; COUSSEMENT, W. & HOORENS, J. Demonstration of canine distemper viral antigen in paraffin sections, using an unlabeled antibody-enzyme method. **American Journal of Veterinary Research**, v.41, p.1860-1862, 1980.

EDEAS, M. Strategies to target mitochondria and oxidative stress by antioxidants: key points and perspectives. **Pharmaceutical Research**, v.28, p.2771-2779, 2011.

ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.779-785, 1993.

EVANS, J.L. et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocrinology Reviews**, v.23, p.599-622, 2002.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.

GEBARA, C. M. S.; et al. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 480 - 487, 2004.

GREENE C.E.; APPEL M. Canine distemper. In: Greene C.E. (ed.) **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3rd ed. Elsevier, Amsterdam, p.25-41, 2006.

GRÖNE A. et al. Canine distemper virus infection: proliferation on canine footpad keratinocytes. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 574-578, 2003.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.899, p.136-147, 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v.18, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, p.715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. New York: Oxford University Press, 2007. 704p.

HANAFY, A.H.; SELIM, M.H. Antioxidants Strategies in Neurocritical Care. **Neurotherapeutics**, v.9 p.44-55, 2012.

HAMPTON, M.B. et al. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, p.3007-3017, 1998.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, p.418-424, 2004.

JOHNSON, F. & GIULIVI, C. (2005). Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, p.340-352, 2005.

JOSEPHY, P. D. **Molecular Toxicology**, New York: Oxford University Press, 1997, 368 p.

KARADENIZ, A. et al. Relationship between canine distemper and oxidative stress in dogs. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 159, p. 462-467, 2008.

KAPIL, S.; YEARY, T.J. Canine distemper spillover in domestic dogs from urban wildlife. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.41. p.1069-1086, 2011. doi: 10.1016/j.cvsm.2011.08.005.

KIN, K.W. et al. Effect of *Cervus koreanus* TEMMINCK var. *mantchuricus* Swinhoe on proteases activities, antioxidant and free radical damages in rheumatoid arthritis in rats. **Toxicology in Vitro**, v.22, p.80-86, 2008.

KOUTINAS, A.F. et al. Histopathology and immunohisto-chemistry of canine distemper virus-induced footpad hyperkeratosis (hard pad disease) in dogs with natural canine distemper. **Veterinary Pathology**, v.41, p.2-9, 2004.

LEWERENZ, J. et al. Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. **Journal of Neurochemistry**, v.87, n.2, p.522-531, 2003.

LIANG, C.T. et al. A non-biotin polymerized horseradish-peroxidase method for the immunohistochemical diagnosis of canine distemper. **Journal of Comparative Pathology**, v.136, p.57-64, 2007.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MANGIA, S. H.; PAES, A.C. Neuropatologia da cinomose. **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 416-427, 2008.

MARTELLA, V. et al. Canine Distemper Virus. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.38, p.787-797, 2008.

MARTINS, D.B., LOPES, S.T.A., FRANÇA, R. T. Cinomose Canina – Revisão de Literatura. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.2, p.68-76, 2009.

MASUDA, M. et al. Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease**, v. 29, p.157-165, 2006.

MATTSON, M.P. Modification of ion homeostasis by lipid peroxidation: roles in neuronal degeneration and adaptive plasticity. **Trends in Neuroscience**, v.21, n.2, p.53-57, 1998.

MICHIELS, C. et al. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v.17, p. 235-248, 1994.

MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. Role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 3170-3175, 1972.

MORO, L. et al. Apoptose na desmielinização da cinomose canina (revisão de literatura). **Journal of Biosciences**, v.20, n.2, p.171-178, 2004.

MOSSBERG, N. et al. Oxygen radical production in leukocytes and disease severity in multiple sclerosis. **Journal of Neuroimmunology**, v.213, p.131-134, 2009.

NEGRÃO, F.J.; ALFIERI, A.A.; ALFIERI, A.F. Avaliação da urina e de leucócitos como amostras biológicas para a detecção ante mortem do vírus da cinomose canina por RT-PCR em cães naturalmente infectados. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 253-257, 2007.

OKEZIE, I.A. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.75, n.2, p.199-212, 1998.

QIN, Z. et al. Extracellular superoxido dismutase (ecSOD) in vascular biology: update on exogenous gene transfer and endogenous regulators of ecSOD. **Translational Research**, v.51, n.2, p.68-78, 2008.

RAO, G.M. et al. Role of antioxidant enzymes in brain tumours. **Clinica Chimica Acta**, v.296, n.1-2, p.203-212, 2000.

RAO, A.V.; BALACHANDRAN, B. Role of oxidative stress and antioxidants in neurodegenerative diseases. **Nutritional Neuroscience**, v. 5, p. 291-309, 2002.

SHAHIDI, F. et al. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.36, p.67-103, 1992.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v.215, p.213-219, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SILVA, M.C. et al. Neuropatologia da cinomose canina: 70 casos (2005-2008). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.643-652, 2009.

SPITZBARTH, I.; BAUMGÄRTNER, W.; BEINEKE, A. The role of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of spontaneous canine CNS diseases. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.147, p.6-24, 2012.

SUMMERS, B.A.; CUMMINGS, J.F.; LAHUNTA, A. Inflammatory diseases of the nervous system. In: **Veterinary Neuropathology**. Saint Louis: Mosby, 1995. Cap. 3, p. 95-188

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**, 3rd ed, London: Taylor & Francis, 2000, 394p.

TUDURY, E.A. et al. Observações clínicas e laboratoriais e cães com cinomose nervosa. **Ciência Rural**, v.27, p.229-235, 1997.

TURKO, I.V. et al. Diabetes- associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA: 3-oxoacid CoA-transferase. **American Journal of Physiology**. Heart and Circulatory Physiology, v.281, p.H2289-H2294, 2001.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.39, p.44-84, 2007.

VANDEVELDE, M.; ZURBRIGGEN, A. Demyelination in canine distemper virus infection: a review. **Acta Neuropathologica**. v. 109, p. 56-68, 2005.

VEDDER, H. et al. Estrogen hormones reduce lipid peroxidation in cells and tissues of the central nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v.72, n.6, p.2531-2538, 1999.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**, 6th ed. Ames, Iowa: Wiley Blackwell, 2010. 1232p.

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre Esclarecido de Participação em Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO DE PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Eu, _____, RG _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **“PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM CÃES NATURALMENTE INFECTADOS COM O VÍRUS DA CINOMOSE”**.

Declaro que fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data: _____

Nome: _____

Assinatura do responsável: _____

APÊNCIDE B – Sinais clínicos apresentados pelos cães positivos para o vírus da cinomose.

Sinais clínicos apresentados pelos cães positivos para o vírus da cinomose.
(continua)

Animal	Sexo	Idade	Raça	Vacinado	Nutrição	Apetite	Mucosa	Hidratação	Temp. Retal	Vômito
CÃO 01	M	7 MESES	LABRADOR	NS	2	HIPOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 02	M	4 MESES	SRD	N	2	NORMAL	ROSADA	DESIDR. LEVE	NORMAL	NÃO
CÃO 03	F	8 MESES	AKITA	N	3	NORMAL	ROSADA	NORMAL	NORMAL	SIM
CÃO 04	F	6 MESES	SRD	N	2	NORMAL	ROSADA	NORMAL	NORMAL	SIM
CÃO 05	M	4 MESES	SRD	N	2	HIPOREXIA	ROSADA	DESIDR. SEVERA	NORMAL	NÃO
CÃO 06	M	8 MESES	SRD	NS	2	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. SEVERA	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 07	M	5 MESES	SRD	S	2	ANOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. SEVERA	NORMAL	SIM
CÃO 08	F	3 MESES	SRD	N	2	ANOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 09	M	11 MESES	DASHCHUND	N	2	ANOREXIA	ROSADA	DESIDR. MODERADA	HIPERTERMIA	NÃO
CÃO 10	M	3 ANOS	SRD	S	2	ANOREXIA	ROSADA	DESIDR. LEVE	NORMAL	SIM
CÃO 11	M	ADULTO	AKITA	NS	3	ANOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	NORMAL	NÃO
CÃO 12	F	4 ANOS	COCKER	S	4	ANOREXIA	ROSA-PÁLIDA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 13	F	4 MESES	SRD	S	3	ANOREXIA	ROSADA	DESIDR. LEVE	NORMAL	SIM
CÃO 14	M	3 MESES	SRD	N	2	ANOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	HIPERTERMIA	NÃO
CÃO 15	F	7 MESES	SRD	N	2	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. LEVE	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 16	F	ADULTO	SRD	N	3	NORMAL	ROSADA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 17	F	6 MESES	SRD	N	2	NORMAL	ROSADA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 18	F	ADULTO	SRD	N	3	HIPOREXIA	ROSADA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 19	M	6 MESES	SRD	N	3	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. LEVE	NORMAL	SIM
CÃO 20	M	6 MESES	PINSCHER	N	2	HIPOREXIA	ROSADA	DESIDR. LEVE	NORMAL	NÃO
CÃO 21	F	ADULTO	COLLIE	NS	3	ANOREXIA	ROSA-PÁLIDA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 22	F	6 MESES	SRD	N	1	ANOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. SEVERA	NORMAL	SIM
CÃO 23	F	5 MESES	SRD	N	2	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. LEVE	NORMAL	SIM
CÃO 24	M	4 MESES	SRD	N	2	HIPOREXIA	ROSADA	DESIDR. LEVE	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 25	F	4 MESES	SRD	N	3	HIPOREXIA	ROSADA	DESIDR. LEVE	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 26	M	5 MESES	PINSCHER	NS	3	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. LEVE	NORMAL	NÃO
CÃO 27	F	4 MESES	YORK SHIRE	SIM	2	HIPOREXIA	PÁLIDA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 28	M	2 ANOS	SRD	NÃO	2	HIPOREXIA	ROSA-PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	NORMAL	NÃO
CÃO 29	M	3 ANOS	PINSCHER	SIM	3	HIPOREXIA	ROSADA	NORMAL	NORMAL	NÃO
CÃO 30	F	5 MESES	SCHNAUZER	NÃO	3	HIPOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	NORMAL	NÃO
CÃO 31	F	5 MESES	PEQUINÊS	SIM	2	ANOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	NORMAL	NÃO
CÃO 32	M	6 ANOS	SRD	NÃO	2	ANOREXIA	PÁLIDA	DESIDR. MODERADA	HIPERTERMIA	SIM
CÃO 33	F	6 MESES	YORK SHIRE	SIM	3	NORMAL	ROSADA	NORMAL	NORMAL	NÃO

M: macho; F: fêmea; 1: caquético; 2: magro; 3: bom estado; 4: sobrepeso; S: sim; N: não; NS: sem informação.

Sinais clínicos apresentados pelos cães positivos para o vírus da cinomose.

(continuação)

Animal	Diarreia	Hiperkeratose	Secreção Ocular	Estertor Respiratório	Secreção Respiratória	Tosse Seca	Tonsilite	Pneumonia	Tosse Produtiva
CÃO 01	DISCRETA	COXINS	AUSENTE	SIM	AUSENTE	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 02	AUSENTE	NARIZ	PRESENTE	SIM	AUSENTE	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 03	DISCRETA	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 04	GRAVE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 05	DISCRETA	NARIZ	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 06	SANGUINOLENTA	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 07	GRAVE	NARIZ	PRESENTE	SIM	SEROSA	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 08	GRAVE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 09	DISCRETA	AUSENTE	ABUNDANTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 10	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 11	AUSENTE	NARIZ	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 12	AUSENTE	NARIZ	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 13	DISCRETA	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	SEROSA	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 14	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 15	DISCRETA	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 16	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 17	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 18	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 19	SANGUINOLENTA	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 20	AUSENTE	NARIZ	ABUNDANTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 21	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 22	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	SEROSA	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 23	GRAVE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 24	DISCRETA	NARIZ	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 25	GRAVE	AUSENTE	AUSENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 26	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	SIM	AUSENTE	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 27	DISCRETA	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 28	GRAVE	AUSENTE	AUSENTE	SIM	AUSENTE	SIM	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 29	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 30	DISCRETA	AUSENTE	ABUNDANTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 31	AUSENTE	AUSENTE	AUSENTE	SIM	MUCOPURULENTA	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
CÃO 32	GRAVE	AUSENTE	AUSENTE	SIM	MUCOPURULENTA	SIM	SIM	NÃO	NÃO
CÃO 33	AUSENTE	AUSENTE	PRESENTE	NÃO	AUSENTE	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO

Sinais clínicos apresentados pelos cães positivos para o vírus da cinomose.

(conclusão)

Animal	Consciência	Convulsões	Tremores	Tetraparesia	Ataxia	Mioclonia
CÃO 01	A	N	N	N	N	N
CÃO 02	D	N	S	N	N	S
CÃO 03	A	N	N	N	N	N
CÃO 04	A	N	N	N	N	N
CÃO 05	P	N	N	N	N	N
CÃO 06	P	N	N	N	N	N
CÃO 07	P	N	N	N	N	N
CÃO 08	P	N	N	N	N	N
CÃO 09	P	N	S	N	N	S
CÃO 10	C	N	S	S	S	S
CÃO 11	D	N	N	S	S	N
CÃO 12	A	N	N	S	S	N
CÃO 13	P	N	N	N	N	N
CÃO 14	P	N	N	N	N	N
CÃO 15	P	N	N	N	N	N
CÃO 16	A	N	N	N	N	N
CÃO 17	A	N	N	N	N	N
CÃO 18	P	N	N	N	N	N
CÃO 19	A	N	N	N	N	N
CÃO 20	P	N	N	N	N	N
CÃO 21	C	S	S	S	S	N
CÃO 22	P	S	N	N	N	N
CÃO 23	P	S	N	N	N	N
CÃO 24	A	S	N	N	N	N
CÃO 25	P	N	N	N	N	N
CÃO 26	A	N	N	N	N	N
CÃO 27	A	N	N	N	N	N
CÃO 28	P	N	N	N	N	N
CÃO 29	A	N	N	N	N	N
CÃO 30	A	N	N	N	N	N
CÃO 31	P	N	N	N	S	N
CÃO 32	P	N	N	N	N	N
CÃO 33	A	N	N	N	N	N

A: alerta; D: deprimido. P: prostrado; C: comatoso; S: sim; N: não

APÊNDICE C – Eritrograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.

Eritrograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.

Animal	Eritrócitos (x10 ⁶ /μL)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	Plaquetas (x10 ³ /μL)	Proteína Total (g/L)
CÃO 1	↓ 4,51	↓ 8,9	↓ 28	● 62,08	↓ 31,78	...	↓ 52
CÃO 2	↓ 4,02	↓ 8,7	↓ 27	● 67,16	● 32,22	↓ 190	● 64
CÃO 3	● 6,73	● 12,1	● 39	↓ 57,45	↓ 31,02	↓ 129	↓ 58
CÃO 4	● 5,81	● 12,2	● 38	● 65,40	● 32,10	● 343	● 60
CÃO 5	↓ 3,06	↓ 6,0	↓ 19	● 62,09	↓ 31,58	↑ 539	↓ 44
CÃO 6	● 5,61	● 12,4	● 39	● 69,51	↓ 31,79	↓ 166	↓ 50
CÃO 7	↓ 4,22	↓ 10,1	↓ 32	● 75,82	↓ 31,56	...	● 62
CÃO 8	● 7,48	● 16,5	● 50	● 66,80	● 33,00	● 460	● 64
CÃO 9	↓ 4,60	↓ 11,2	↓ 37	↑ 80,43	↓ 30,27	↓ 118	↓ 52
CÃO 10	↓ 4,60	↓ 10,7	↓ 33	● 71,70	● 32,42	● 207	↓ 58
CÃO 11	↓ 3,70	↓ 7,2	↓ 23	● 62,13	↓ 31,30	↓ 55	● 68
CÃO 12	● 7,06	● 13,6	● 42	● 60,90	● 32,38	● 444	● 72
CÃO 13	● 5,75	↓ 11,7	● 37	● 64,30	↓ 31,60	● 237	↓ 50
CÃO 14	● 5,57	↓ 10,7	↓ 33	↓ 59,20	● 32,40	↑ 756	↓ 46
CÃO 15	● 7,15	↓ 11,5	● 39	↓ 54,54	↓ 23,48	● 239	↓ 52
CÃO 16	● 6,08	● 13,9	● 43	● 70,72	● 32,32	↓ 168	↓ 56
CÃO 17	● 5,74	↓ 11,8	● 37	● 64,45	↓ 31,89	● 288	↓ 54
CÃO 18	● 8,19	● 16,9	● 51	● 62,27	● 33,13	↓ 197	● 66
CÃO 19	↓ 5,22	↓ 10,8	↓ 36	● 68,96	↓ 30,00	● 263	● 64
CÃO 20	● 5,86	● 13,0	● 40	● 68,26	● 32,50	● 383	● 62
CÃO 21	↓ 2,98	↓ 7,2	↓ 20	● 67,11	↑ 36,00	↓ 129	● 68
CÃO 22	● 7,49	● 17,2	● 52	● 69,42	● 33,07	↑ 652	● 76
CÃO 23	● 5,86	● 12,0	↓ 36	● 61,43	● 33,33	↓ 100	↓ 50
CÃO 24	↓ 4,57	↓ 9,3	↓ 29	● 63,45	● 32,60	● 248	● 60
CÃO 25	↓ 3,36	↓ 6,8	↓ 25	● 72,25	↓ 27,20	...	↓ 34
CÃO 26	● 6,40	● 13,4	● 44	● 68,10	↓ 30,40	● 209	● 78
CÃO 27	↓ 4,32	↓ 10,5	↓ 35	↑ 80,30	↓ 30,30	↓ 103	● 76
CÃO 28	● 7,42	● 17,6	● 54	● 72,30	● 32,50	...	● 78
CÃO 29	● 7,11	● 14,7	● 43	● 60,40	● 34,10	● 206	● 78
CÃO 30	↓ 4,35	↓ 10,8	↓ 33	● 75,90	● 32,70	↓ 144	● 78
CÃO 31	↓ 4,66	↓ 10,0	↓ 32	● 68,70	↓ 31,20	● 350	● 78
CÃO 32	↓ 3,37	↓ 8,5	↓ 26	● 69,00	● 32,00	↓ 153	● 78
CÃO 33	● 6,73	● 15,5	● 51	● 75,50	↓ 30,50	● 396	● 72
Valores de referência	5,5 - 8,5	12,0 - 18,0	37 - 55	60 - 77	32 - 36	200 - 500	60 - 80

APÊNDICE D – Leucograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.

Leucograma dos cães positivos para o vírus da cinomose.

Animal	Leucócitos Totais	Bastonetes		Neutrófilos Seg.		Eosinófilos		Monócitos		Linfócitos	
		R* (%)	A** (/μL)	R* (%)	A** (/μL)	R* (%)	A** (/μL)	R* (%)	A** (/μL)	R* (%)	A** (/μL)
CÃO 1	↑ 18500	0	● 0	88	↑ 18.280	2	● 370	9	↑ 1665	1,0	↓ 185
CÃO 2	● 9000	0	● 0	65	● 5850	6	● 540	7	● 630	22,0	● 1980
CÃO 3	● 12400	0	● 0	42	● 5208	10	● 1240	10	● 1240	38,0	● 4712
CÃO 4	● 11000	0	● 0	68	● 7480	2	● 220	10	● 1100	20,0	● 2200
CÃO 5	↑ 41700	1	↑ 417	79	↑ 32943	0	↓ 0	14	↑ 5838	6,0	● 2502
CÃO 6	● 14700	0	● 0	89	↑ 13083	1	● 147	5	● 735	5,0	↓ 735
CÃO 7	● 6800	0	● 0	75	● 5100	15	● 1020	6	● 408	4,0	↓ 272
CÃO 8	↓ 3300	0	● 0	18	↓ 594	1	↓ 33	24	● 792	57,0	● 1881
CÃO 9	● 13200	1	● 132	87	● 11484	4	● 528	6	● 192	2,0	↓ 264
CÃO 10	● 11700	0	● 0	84	● 9828	5	● 585	5	● 585	6,0	↓ 702
CÃO 11	↑ 33600	0	● 0	86	↑ 28896	1	● 336	5	↑ 1680	8,0	● 2688
CÃO 12	● 8500	0	● 0	76	● 6460	5	● 425	10	● 850	9,0	↓ 765
CÃO 13	↑ 17400	0	● 0	72	↑ 12528	0	↓ 0	20	↑ 3480	8,0	● 1992
CÃO 14	↓ 5400	0	● 0	62	● 3348	6	● 324	17	● 918	15,0	↓ 810
CÃO 15	↓ 2400	1	● 24	43	↓ 1032	0	↓ 0	23	● 552	33,0	↓ 792
CÃO 16	● 13000	0	● 0	58	● 7540	16	↑ 2080	5	● 650	21,0	● 2730
CÃO 17	● 9100	0	● 0	48	● 4368	4	● 364	6	● 546	42,0	● 3822
CÃO 18	↑ 18600	0	● 0	44	● 8184	28	↑ 5208	10	↑ 1860	18,0	● 3348
CÃO 19	● 12300	0	● 0	88	● 10824	1	● 123	3	● 369	8,0	↓ 984
CÃO 20	● 10500	0	● 0	65	● 6825	12	↑ 1260	4	● 420	19,0	● 1995
CÃO 21	↑ 19800	0	● 0	91	↑ 18018	0	↓ 0	8	↑ 1584	1,0	↓ 198
CÃO 22	● 10800	1	● 108	87	● 9396	0	↓ 0	7	● 756	0,5	↓ 540
CÃO 23	● 8600	0	● 0	91	● 7826	1	↓ 86	3	● 258	0,5	↓ 430
CÃO 24	● 10000	0	● 0	40	● 4000	37	↑ 3700	8	● 800	15,0	● 1500
CÃO 25	● 14400	1	● 144	65	● 9360	0	↓ 0	15	↑ 2160	19,0	● 2736
CÃO 26	● 11400	0	● 0	67	● 7638	10	● 1140	6	● 684	17,0	● 1938
CÃO 27	● 14600	0	● 0	80	↑ 11680	1	● 146	1	↓ 146	18,0	● 2628
CÃO 28	● 9700	0	● 0	90	● 8730	1	↓ 97	5	● 485	4,0	↓ 388
CÃO 29	● 10300	0	● 0	73	● 7519	6	● 618	9	● 927	12,0	● 1236
CÃO 30	↓ 4700	0	● 0	94	● 4418	1	↓ 47	2	↓ 94	3,0	↓ 141
CÃO 31	↑ 20700	0	● 0	89	↑ 18423	0	↓ 0	1	● 207	10,0	● 2070
CÃO 32	↑ 61400	3	↑ 1842	91	↑ 55874	5	↑ 3070	1,0	↓ 614
CÃO 33	● 11900	0	● 0	62	● 7378	12	↑ 1428	6	● 714	20,0	● 2380
Valores de Referência	6000 - 17000		0 - 300		3000 - 11500		150 - 1250		150 - 1350		1000 - 4800

*Relativo ; **Absoluto

