

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

NATÁLIA CARNEVALLI DE MIRANDA

“Avaliação dos componentes hematológicos, perfil proteico sérico e concentração da IgA salivar e sérica, em cães com gastroenterite canina”

UBERLÂNDIA
2014

NATÁLIA CARNEVALLI DE MIRANDA

“Avaliação dos componentes hematológicos, perfil proteico sérico e concentração da IgA salivar e sérica, em cães com gastroenterite canina”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Foued Salmen Espindola

UBERLÂNDIA
2014

Dedico aos meus pais e irmãos que sempre me incentivaram, confiaram, apoiaram e acreditaram em mim durante os dois anos do meu mestrado e em toda a minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Á Deus pela família que ele me concedeu, por minha saúde e por ter me capacitado a chegar até aqui.

Sou filha de dois professores, meu pai - Antônio Carlos Carneiro de Miranda – professor universitário do curso de Medicina Veterinária, aposentado por esta instituição e minha mãe - Maria Anita Carnevalli de Miranda – professora do ensino fundamental de Educação Física. Então, sempre tive o exemplo e a referência do valor da educação para as nossas vidas, além de todo o amor, carinho, atenção e educação. Então, meus sinceros agradecimentos a essas duas pessoas tão importantes, especiais e essenciais em minha vida. Amo muito vocês! Agradeço aos meus irmãos, Frederico Carnevalli de Miranda e Patrícia de Miranda Emrick, o incentivo e apoio para realizar o meu mestrado acadêmico. Também os meus queridos sobrinhos, que amo tanto, Isabel Sofia (Bebel), Gisele Gabriela (Gigi) e Hugo Cesar (Huguinho) por me fazerem tão feliz!

Agradeço ao prof. Dr. José Carlos Nogueira, que tenho grande orgulho de fazer parte da minha família, chamado carinhosamente como “Tio Carlinhos” que assim como meus pais, foi referência na minha para seguir na profissão de pesquisador e se Deus abençoar, na carreira acadêmica.

Agradeço ao meu namorado, Adriano de Almeida Prado, por estar sempre ao meu lado. Te Amo!

Agradeço ao professor Foued Salmen Espindola, por ter aceitado me orientar, acreditado em mim e me guiar academicamente nesses 2 anos de mestrado.

Agradeço também, ao Sr. Amado da Silva Nunes Junior, diretor administrativo do Hospital Veterinário da UFU, por ter deixado o hospital a disposição para realizar minhas coletas e também pelo apoio financeiro na realização dos exames que necessitei realizar no laboratório de patologia clínica do hospital. Quero agradecer também ao Felipe Cesar Gonçalves, por ter me ajudado na realização dos exames. E a todos os colegas da residência em clínica de pequenos animais.

Gostaria de agradecer também o Dr. Diego Fernando de Ávila da clínica TRIOVET, por ter sido tão receptivo e também por deixar as portas abertas da clínica. Muito Obrigada mesmo! Foi muito importante sua ajuda! Esse agradecimento se estende a Dra. Priscila que sempre foi muito atenciosa e educada comigo, me ajudou quando precisei. A Raquel,

recepcionista da clínica, que sempre me atendia e tinha a total paciência em verificar se havia ou não cães no perfil que eu precisava.

E a todos os meus colegas do LABIBI, em especial a Dra. Renata Roland Teixeira, Helen Lara, Adriele Vieira e a Zúlmária Freitas, que me ajudaram com o conhecimento técnico, me deram força nos momentos de tristeza e também pelos nossos bons momentos de conversas e boas risadas nesses 2 anos da minha vida.

RESUMO

A saliva é um fluido oral que contém uma abundância de moléculas, sendo não-invasiva, de fácil coleta e com o mínimo de desconforto para o animal, com grande potencial para o monitoramento geral da saúde e doença, com enormes valores de prognósticos. A imunoglobulina A é a primeira na linha de ataque imunológico do tecido mucoso.

A Gastroenterite Canina é uma das casuísticas mais comuns na clínica médica veterinária em cães e a origem desta pode se dar através de varias fontes, sendo que a viral é a mais comum.

O objetivo do presente estudo e a análise da presença e quantificação da IgA salivar e sérica de cães acometidos com gastroenterite e compará-la com cães saudáveis e verificar assim, se esta biomolécula pode ser de eleição para o diagnóstico desta doença, além analisar os padrões hematológicos e bioquímicos séricos, confirmando se estes representam como padrões de diagnóstico diferencial para estas doenças.

O grupo GEV apresentou eosinopenia, neutropenia, monocitopenia, hipoproteinemia sérica, hypoalbuminemia sérica e hiperproteinemia salivar. A IgA sérica apresentou diminuição ao comparar com o grupo controle. Para o grupo GEG apresentou eosinopenia, neutrofilia com desvio para esquerda. Apresentou também microcitose, hipoproteinemia, hypoalbuminemia sérica e hiperproteinemia salivar, porém sem apresentar diferença estatística para estes parâmetros.

Concluimos que as quantificações dos leucócitos totais juntamente com os dos neutrófilos segmentados, os eosinófilos, a dosagem da PT e albumina sérica e também com a dosagem da PT salivar apresentou aumentada e a quantificação da IgA diminuída, sugerindo parâmetros para o diagnóstico da doença. Porém, devido a falta definição de valor de referência, mais estudos dosando IgA canina devem ser realizadas.

Palavras – chaves: Saliva, Gastroenterite Canina, IgA

ABSTRACT

Saliva is an oral fluid abundant with molecules, being non-invasive, easy collection and with minimal discomfort to the animal, with great potential for the overall monitoring of health and disease, with huge prognostic values. The Immunoglobulin A is the first in line of immunological attack of mucosal tissue.

The Canine Gastroenteritis is the most common case series in medical veterinary clinic originating through various sources, as the viral the most common.

The main objective of the present study is the quantification of IgA in the saliva of dogs affected by gastroenteritis and to compare the results with the amounts found in healthy dogs as well as quantifies the hematologic and serum biochemistry, confirming if they represent standards of differential diagnosis for the disease here investigated.

The GEV group presented eosinopenia, neutropenia, monocytopenia, serum hypoproteinemia, hypoalbuminemia serum and salivary hyperproteinemia. The serum IgA showed a decrease when comparing with the control group. For group GEG presented eosinopenia, neutrophilia with left shift. Also showed microcytosis, hypoproteinemia, hypoalbuminemia and salivary hyperproteinemia but with no statistical difference for these parameters.

We conclude that the measurements of total leukocytes along with the segmented neutrophils, eosinophils, dosage and serum albumin PT and also the determination of PT showed increased salivary IgA and quantification decreased, suggesting parameters for diagnosing disease. However, because the definition of reference value missing, most studies dosing canine IgA should be performed.

Keywords: Saliva, Canine Gastroenteritis, IgA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Tubo coleta saliva - Salimetrics®	29
Figura 02 – Proteína total (Bradford)	31
Figura 03 – Proteína total (Biureto)	31
Figura 04 – Albumina (Verde-Bromocresol)	32
Figura 05 – Gel Eletroforese	33
Figura 06 – Membrana Nitrocelulose corado com Ponceau	33
Figura 07 – Western Blotting	34
Figura 08 – Microplaca (ELISA) após incubar o TMB	35
Figura 09 – Microplaca (ELISA) após colocar a solução STOP.....	35
Figura 1 – Comparação entre os valores das médias de cada grupos: leucócitos totais (A), bastonetes (B), eosinófilos (C), neut. segmentados (D), monócitos (E), plaquetas (F), hemáceas (G), HGB (H) e VG (I). *Diferença entre GEV e GEG (t-student $p > 0,05$)	36
Figure 11 - Comparação entre a proteína total da saliva e soro (A). Relação entre a proteína total, globulina e albumina do soro (B). C - Controle; GEV - Gastroenterite Viral; GEG - Gastroenterite Geral. * Diferença entre GEV e GEG comparados com o grupo controle. * t-student (A) and ANOVA (B) $p \geq 0.05$ respectivamente	37
Figure 12 - Comparação entre IgA salivar e sérica (A); IgA e proteína total salivar (B), e de IgA e a proteína total sérica (C). C - Controle; GEV - Gastroenterite Viral; GEG - Gastroenterite Geral. * Diferença entre GEV e GEG comparados com o grupo controle. * t-student (A) and ANOVA (B) $p \geq 0.05$ respectivamente	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Albumina
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
CEUA	Comitê de Ética na Utilização de Animais
ECL	Eletroquimioluminescência
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
G	Globulina
GRAF.	Gráfico
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HGB	Hemoglobina
HRP	Horseradish Peroxidase
IgA	Imunoglobulina A
LABIBI	Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular
NaCl	Cloreto de sódio
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline</i> + Tween 20
PT	Proteína total
SDS-PAGE	<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAB.	Tabela
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TRIS	Trisaminometano
VG	Volume globular
WB	<i>Western Blotting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Medicina Veterinária e Saúde Pública	12
2.2. Gastroenterite canina	13
2.3. Saliva.....	15
2.3.1. Processo de Secreção	16
2.3.2. Aspectos de desenvolvimento e morfologia das glândulas salivares	16
2.3.3. Funções	18
2.3.4. Componentes salivar	19
2.3.4.1. IgA	19
2.3.5. Biotecnologia em diagnóstico pela saliva na medicina humana.....	20
2.3.5.1. Biomarcadores salivares para doenças crônicas.....	22
2.3.5.2. Biomarcadores salivares para estresse.....	23
2.3.6. Biotecnologia Diagnóstico pela saliva na medicina veterinária.....	25
2.3.6.1. Biomarcadores salivares para estresse nos animais.....	25
2.3.6.2. Canino	26
3. MATERIAL E MÉTODO	28
3.1. Animais	28
3.2. Coleta da saliva	29
3.3. Coleta do sangue	29

3.4.	Coleta dos dados hematológicos	30
3.5.	Dosagem para concentração de proteína total na saliva	30
3.6.	Dosagem para concentração de proteína total no soro	31
3.7.	Dosagem para concentração de albumina no soro.....	31
3.8.	Dosagem para concentração de globulina no soro.....	32
3.9.	Eletroforese unidimensional	32
3.10.	Western blotting	33
3.11.	Determinação da concentração de IgA na saliva e no soro	34
3.12.	Análise Estatística	35
4.	RESULTADOS	36
5.	DISCUSSÃO	38
6.	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
	ANEXOS	54
	APÊNDICES	55