

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

FERNANDA CAMPOS MANSUR

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO IMUNOTURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
DO PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CÃES E GATOS**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

FERNANDA CAMPOS MANSUR

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO IMUNOTURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
DO PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CÃES E GATOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*

Orientador: José Dantas Ribeiro Filho

Coorientadores: Marcel F. Bastos Avanza
Waleska de Melo F. Dantas

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M289v
2022 Mansur, Fernanda Campos, 1996-
Validação do método imunoturbidimétrico para determinação do
proteínograma sérico em cães e gatos / Fernanda Campos Mansur. -
Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (51 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: José Dantas Ribeiro Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2022.

Referências bibliográficas: f. 39-49.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.405>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Imunoturbidimetria. 2. Cães. 3. Gatos. 4. Proteínas. I. Ribeiro
Filho, José Dantas, 1961-. II. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.0890756

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

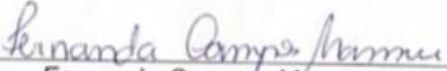
FERNANDA CAMPOS MANSUR

VALIDAÇÃO DO MÉTODO IMUNOTURBIDIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO
DO PROTEINOGRAMA SÉRICO EM CÃES E GATOS

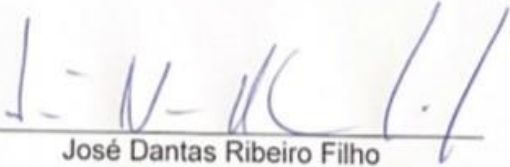
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 10 de junho de 2022

Assentimento:



Fernanda Campos Mansur
Autora



José Dantas Ribeiro Filho
Orientador

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

À Professora Waleska Ferreira Dantas, agradeço pelos ensinamentos e pela maneira com a qual conduziu toda elaboração do nosso trabalho. Ao professor José Dantas Ribeiro Filho pela competência, disponibilidade e ajuda.

Agradeço em especial a Felipe pelo amor e companheirismo.

Agradeço sincera e profundamente Lorena e Caio que muito me encorajaram e me apoiaram na realização do experimento e na vida.

À Camila Eckstein por toda ajuda durante a interpretação dos resultados e estatística. Aos familiares pelo apoio e compreensão nas ausências, em especial meu pai e minha mãe que são a minha base.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos. E Bioclin que tornou possível o experimento.

RESUMO

MANSUR, Fernanda Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2022. **Validação do método imunoturbidimétrico para determinação do proteinograma sérico em cães e gatos.** Orientador: José Dantas Ribeiro Filho. Coorientadores: Waleska de Melo Ferreira Dantas e Marcel Ferreira Bastos Avanza.

Um dos exames laboratoriais de importância para caninos e felinos é o de mensuração das proteínas, já que possibilita o diagnóstico e prognóstico de doenças que acometem esses animais. O presente estudo possui como objetivo validar o método imunoturbidimétrico, para determinação da concentração da proteína C reativa, alfa glicoproteína ácida, ferritina, transferrina, imunoglobulina A, imunoglobulina G e imunoglobulina M em cães e gatos. Foram selecionados 163 animais, 76 cães e 87 gatos hípidos, de diferentes raças, sexo e idade. As análises foram realizadas em analisador bioquímico automático, utilizando os kits comerciais que utilizam a imunoturbidimetria para determinação das proteínas. Concluiu-se que o método de imunoturbidimetria tem validação para a mensuração das seguintes proteínas séricas: proteína C reativa, alfa 1-glicoproteína ácida, imunoglobulinas M e G em cães e gatos, ferritina em cães e transferrina em gatos e os resultados encontrados no presente estudo para as proteínas validadas, podem ser consideradas como valores de normalidade para cães e gatos.

Palavras-chave: Caninos. Felinos. Imunoturbidimetria. Proteína.

ABSTRACT

MANSUR, Fernanda Campos, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2022. **Validation of the immunoturbidimetric method to determine the serum proteinogram of cats and dogs.** Advisor: José Dantas Ribeiro Filho. Co-advisors: Waleska de Melo Ferreira Dantas and Marcel Ferreira Bastos Avanza.

One of the important laboratory tests for canines and felines is the measurement of proteins, since it allows the diagnosis and prognosis of diseases that affect these animals. The present study aims to validate the immunoturbidimetric method to determine the concentration of C-reactive protein, alpha acid glycoprotein, ferritin, transferrin, immunoglobulin A, immunoglobulin G and immunoglobulin M in dogs and cats. 163 animals, 76 dogs and 87 healthy cats, of different selected animals, sex and ages, were selected in an automatic biochemical study, using commercial kits that use immunobidimetry for the research of the researches. It was concluded that the immunoturbidimetry method has validation for the measurement of the following serum proteins: C-reactive protein, alpha 1-acid glycoprotein, immunoglobulins M and G in dogs and cats, ferritin in dogs and transferrin in cats and the results found in the present study as validated proteins, can be used as normal values for dogs and cats.

Keywords: Canines. Felines. Immunoturbidimetry. Protein.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança de proteínas séricas em cães 27

Tabela 2 – Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança de proteínas séricas em gatos..... 28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de proteína c reativa em cães e gatos.	32
Figura 2 – Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de alfa-1 glicoproteína ácida em cães e gatos.	32
Figura 3 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de ferritina em cães e gatos	33
Figura 4 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de transferrina em cães e gatos.	34
Figura 5 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de imunoglobulina A em cães e gatos.	35
Figura 6 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de imunoglobulina G em cães e gatos.	36
Figura 7 – Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de imunoglobulina M em cães e gatos.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGP – Alfa 1 Glicoproteína ácida
ALT – Alanina aminotransferase
ANOVA – Análise de variância
AST – Aspartato aminotransferase
CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária
COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPS – Eletroforese de proteínas séricas
FeLV – Vírus da Leucemia felina
FIV – Vírus da imunodeficiência felina
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
PCR – Proteína C reativa
PIF – Peritonite infecciosa felina
PFA – Proteínas de fase aguda
pH – Potencial hidrogeniônico
PS – Proteínas séricas
SAA – Amiloide sérica A
UFV – Universidade Federal de Viçosa

LISTA DE SÍMBOLOS

α – Alfa

β – Beta

γ – Gama

% – Porcentagem

μ - Micro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Objetivos	13
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos	14
1.2 HIPÓTESE	14
1.3 JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Proteínas totais	16
2.2 Globulinas	16
2.3 Resposta de fase aguda	16
2.4 Proteínas de fase aguda (PFA)	16
2.4.2 Transferrina	17
2.4.3 Proteína C Reativa (PCR)	18
2.4.4 Alfa 1 Glicoproteína Ácida (AGP)	19
2.4.5 Ferritina	19
2.4.6 Imunoglobulina A	20
2.4.7 Imunoglobulina G	20
2.4.8 Imunoglobulina M	20
2.5. Imunoturbidimetria	21
2.6. Validação de kit bioquímico	21
2.6.1 Seletividade	22
2.6.2 Sensibilidade	23
2.6.3 Repetibilidade	23
2.6.4 Reprodutibilidade	23
2.6.5 Exatidão	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Aspectos Éticos	24
3.2 Delineamento experimental	24
3.3 Análise bioquímica	24
3.4 Análise dos dados	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÃO	39

SUMÁRIO

ANEXO A.....	49
--------------	----

1. INTRODUÇÃO

No último levantamento de 2018 feito no Brasil pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), as populações de cães e gatos correspondiam a 54 e 24 milhões, respectivamente. E segundo a projeção do estudo, ocorrerá um significativo aumento nos próximos 10 anos. Sendo assim, a preocupação com a saúde dos mesmos tem crescido também de forma exponencial e as empresas privadas vêm apoiando pesquisas direcionadas a melhoria de métodos de diagnóstico e tratamento das enfermidades, a fim de personalizar e abranger esse mercado em ascensão.

Neste universo, ressalta-se a importância da clínica Médica Veterinária que pode diagnosticar doenças, por meio de exames laboratoriais, de imagem, dentre outros. A clínica médica de cães e gatos é uma área que evolui a cada ano, com novos estudos e conceitos sobre diagnóstico, tratamento e prognóstico de doenças que acometem esses animais. Um dos exames de suma importância tanto para caninos como para felinos é o exame para proteínas séricas (PS).

Entende-se por PS, aquela proteína que é a mais abundante no plasma, correspondendo a 60% da concentração total de proteínas. Essas proteínas são sintetizadas exclusivamente no fígado e possui importantes funções no organismo, como por exemplo, transporte de várias substâncias e manutenção da pressão oncótica (SANTOS e ALBERTO, 2014).

A avaliação dessas proteínas é significativa para o bom funcionamento do organismo, visto que atuam no sistema imune, no processo de coagulação e reações metabólicas e, quando detectada alguma alteração nas suas concentrações há uma grande possibilidade de indicativo de doenças. Dentre as proteínas avaliadas estão a albumina, alfa-glicoproteínas, beta-glicoproteínas e gama-glicoproteína (MUNHOZ et al., 2016).

As PS possuem importante função nos mecanismos de regulação e transporte de fluidos intra e extracelulares. As proteínas de fase aguda são proteínas sanguíneas plasmáticas, que permite avaliar a resposta do sistema imunológico a determinado estímulo, seja ele infecção, traumatismo, cirurgias, neoplasias. Nas situações crônicas, também se verifica o seu aumento, mas de uma forma mais moderada (PETERSEN et al., 2004, ECKERSALL, 2006)

As concentrações dos níveis de proteínas de fase aguda (PFAs) não constituem por si um exame complementar de diagnóstico, visto que suas alterações

apenas indicam a presença de uma doença inflamatória ou infecciosa. Portanto, ao comparar os níveis das PFA junto com outros achados clínicos e laboratoriais, auxiliam na detecção de inflamação subclínica, na distinção entre doença aguda e crônica, e no prognóstico da doença (HORADAGODA et al., 1999). O grau de alteração na concentração das PFA correlaciona-se com a gravidade da doença. Como a resposta de fase aguda acontece antes de qualquer resposta imunológica, esta pode ser utilizada como marcador precoce de doença (CÉRON et al., 2005; PETERSEN et al., 2004).

Para determinação laboratorial das proteínas de fase aguda utilizam-se métodos imunológicos de diagnóstico por apresentarem materiais relativamente simples, alta precisão e boa amplitude de detecção, porém resultados inconclusivos ainda podem ser evidenciados (HERMENS, 2000). Técnicas como as espectrofotométricas baseadas na turbidimetria, tem como base a quantificação da energia dissipada por soluções que contenham o complexo antígeno-anticorpo (MARTINEZ et al., 2003).

A realização dos exames bioquímicos automatizados aumentou a capacidade de produção nos laboratórios, realizando um maior número de amostras por dia, permitindo maior agilidade na entrega dos resultados, assim como facilita a rotina laboratorial. Porém, a dosagem das proteínas de fase aguda não é rotineiramente utilizada na Medicina Veterinária. Isso se deve ao fato da escassez de testes disponíveis comercialmente, pois os que existem são de alto custo e falta de estudos sobre a sua sensibilidade e especificidade (FAILACE e PRANKE, 2004).

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Sabendo da importância da realização de exames laboratoriais para a identificação precoce de processos inflamatórios, o presente trabalho teve como objetivo geral, validar o método imunoturbidimétrico para determinar a concentração da proteína C reativa, alfa glicoproteína ácida, ferritina, transferrina, imunoglobulina A, imunoglobulina G e imunoglobulina M em cães e gatos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar se existe reação cruzada canina e felina com o anticorpo anti-soro humano presente nos kits avaliados, bem como as características de detecção, imprecisão, repetibilidade, reprodutibilidade e limites de detecção
- Validar kits humanos para mensuração de proteínas de fase aguda em cães e gatos hígidos e, a partir dos dados obtidos, estabelecer valores de referência para a população de animais avaliados.

1.2 HIPÓTESE

O método de imunoturbidimetria pode ser utilizado na aferição dos valores de proteína C reativa, alfa-1 glicoproteína ácida, ferritina, transferrina, imunoglobulina A, imunoglobulina G e imunoglobulina M em cães e gatos hígidos, onde kits comerciais humanos, podem ser utilizados por permitir reação cruzada com anti-soro humano.

1.3 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que a determinação do proteinograma sérico em cães e gatos é importante, pois os seus componentes expressam precocemente a presença de processos inflamatórios e/ou infecciosos, além de ser um bom sinalizador de prognóstico, se justifica a validação de uma metodologia automatizada rápida, eficaz, de fácil execução e baixo custo, como o método imunoturbidimétrico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas são macromoléculas formadas por aminoácidos, com ligações covalentes entre si. Elas podem ser polares ou apolares, conforme o seu potencial hidrogeniônico (pH), graças à distribuição elétrica resultante das ligações covalentes ou iônicas de seus grupos estruturais (SILVA et al., 2008).

Elas são substâncias essenciais à vida e se caracterizam por ser um grupo considerável de macromoléculas que se encontram dentro e fora das células. Suas funções são catálise de reações químicas, transporte de outras moléculas, transmissão de impulsos nervosos, proteção imunitária e função hormonal, dentre outras (REGO, 2017).

Assim, elas são a base da estrutura de células, tecidos e órgãos, e a avaliação dos seus teores séricos e de suas frações representa um importante auxílio para o diagnóstico clínico (RIZZOLI et al., 2006; KANEKO, 2008).

As proteínas mantêm a pressão osmótica, são catalisadoras em reações bioquímicas na forma de enzimas, mantêm o equilíbrio ácido-base, são reguladoras como hormônios, atuam na coagulação sanguínea, na defesa humoral como anticorpos, são nutritivas e servem de carreadores e transporte a muitos constituintes plasmáticos (BIONDO et al., 2007).

Representam 7% do plasma e são divididas em três grupos: a albumina, as globulinas e o fibrinogênio. A albumina corresponde a 55% das proteínas plasmáticas, as globulinas representam 38,5% e o fibrinogênio a 6,5% das proteínas plasmáticas totais (COMPRI-NARDI et al., 2009).

Neste cenário, tem-se que as proteínas de fase aguda são uma classe de proteínas na qual a concentração plasmática aumenta ou diminui em resposta a inflamações. Essa resposta é denominada de resposta de fase aguda (QUEIROZ, 2016).

Ressalta-se que a hiperproteinemia, ou seja, o excesso de elementos proteicos no sangue pode ser relacionado a casos de desidratação e processos inflamatórios. Casos de hipoproteinemia envolvem hemorragias, jejum alimentar prolongado, má absorção de nutrientes pelo trato gastrointestinal, menor ingestão de proteínas incluindo a inanição. Além disso, a menor produção de proteínas, pode ser observada em casos de insuficiência hepática ou perdas evidenciadas nos casos de glomerulonefropatia e enteropatia (COMPRI-NARDI et al., 2009; THRALL et al., 2017).

Neste contexto, insere-se a Eletroforese de Proteínas Séricas (EPS) que é um método laboratorial, que possibilita a separação das proteínas presentes no plasma em frações, conforme suas respectivas cargas elétricas. É um teste de triagem muito usado para investigar anormalidades proteicas presentes no sangue e de suma importância para a investigação diagnóstica. Nessa metodologia, os resultados devem sempre ser fornecidos sob forma percentual e de concentração das várias frações e em forma gráfica (SILVA et al., 2008).

Observa-se um número elevado de proteínas identificadas no soro e que se diferenciam entre si estruturalmente, participando de vários processos fisiológicos, como por exemplo, anticorpos, carregadores de moléculas e íons, enzimas, inibidores enzimáticos, fatores de coagulação, dentre outros. Assim, a análise das proporções

de suas frações é um fator relevante para apontar desordens agudas e crônicas, oferecendo informações de grande valia clínica (CRAY et al., 2009).

2.2 GLOBULINAS

A globulina é uma proteína que entra na composição do plasma sanguíneo. Ela se classifica em três frações: alfa, beta e gama, que são identificadas através da eletroforese. Cada uma dessas frações, em especial a gama, possui anticorpos que protegem contra infecções e possuem funções no transporte de metais, lipídeos e bilirrubina, assim como também exerce um importante papel na imunidade (fração gama). Essas proteínas são indicadores limitados do metabolismo proteico, sendo de vital importância como indicadores de processos inflamatórios (SILVA et al., 2008).

As globulinas séricas totais representam a soma das imunoglobulinas e das não imunoglobulinas. As não imunoglobulinas são sintetizadas e armazenadas no fígado, que correspondem em sua maioria, a proteínas de fase aguda e têm a sua produção hepática aumentada em resposta a uma doença inflamatória sistêmica. As imunoglobulinas não são sintetizadas no fígado e podem estar aumentadas em índices elevados nas doenças inflamatórias e infecciosas (SCOTT e STOCKHAM, 2011).

2.3 RESPOSTA DE FASE AGUDA

A resposta de fase aguda é uma reação complexa, sistêmica, não específica, que ocorre de forma hiperaguda ou aguda no organismo em resposta a injúrias locais ou sistêmicas causadas por infecções, lesão tecidual, traumatismo, cirurgia, proliferação neoplásica ou outras alterações inflamatórias (GRUYS et al., 2005).

A resposta de fase aguda é induzida por citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6, que leva a aumento da síntese proteica nos hepatócitos, linfonodos, baço e leucócitos. Essas proteínas são chamadas de proteínas de fase aguda (PFAs) (CÉRON et al., 2005; ECKERSALL, 2008; GRUYS et al., 2005; MURATA et al., 2004; TIZARD, 2013) e tem como função modular a eficiência do sistema imune, agindo na defesa do organismo durante o processo inflamatório (PETERSEN et al., 2004).

2.4 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFA)

As proteínas de fase aguda são glicoproteínas produzidas pelos hepatócitos (JACOBSEN e ANDERSEN, 2007) e são consideradas biomarcadores quantitativos

de doenças. Podem ser usadas no diagnóstico, prognóstico e no monitoramento da resposta à terapia. Esses biomarcadores são indicadores altamente sensíveis de inflamação e existem importantes diferenças entre as espécies na resposta de fase aguda (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CÉRON et al., 2005).

As PFA são constantemente removidas do organismo por meio do catabolismo, das perdas urinárias e pelo trato gastrointestinal (THOMAS, 2000). Mas, possuem uma meia vida curta (LASSEN e WEISER, 2007), o que torna necessária a reposição das mesmas por meio da produção pelo fígado ou pelos plasmócitos (THOMAS, 2000).

Outra característica importante das PFA é o fato de se dividirem em cadeias alfa (α), beta (β) e gama (γ), de acordo com seu peso molecular e densidade de cargas elétricas (MURATA et al. 2004; PETERSEN et al. 2004; CERÓN et al. 2005). A alfa 1 glicoproteína ácida representa as proteínas da cadeia α 1 e elevam-se rapidamente logo após a infecção ou injúria tecidual, sendo assim, sua concentração é rapidamente normalizada após o fim do estímulo inflamatório. As proteínas que integram a fração β são ferritina, fibrinogênio, proteína C reativa e amiloide sérica A e se elevem entre sete e dez dias, após o início do estímulo inflamatório, e seus valores podem continuar elevadas por várias semanas (MURATA et al. 2004; KANEKO et al., 2008).

A fração γ compreende as imunoglobulinas IgA, IgM, IgG e IgE. Essas proteínas são sintetizadas por células do sistema imunológico na presença de estímulo antigênico, principalmente viral (MURATA et al. 2004; KANEKO et al., 2008).

As alterações nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda estão relacionadas com a gravidade da doença e com a extensão do tecido lesado. São consideradas positivas quando elevam sua concentração sérica e negativa quando diminuem suas concentrações em resposta ao processo inflamatório. Desta forma, as concentrações das PFAs proporcionam informações importantes sobre o diagnóstico e prognóstico de doenças (ALVES et al., 2010; SERIN e ULUTAS, 2010).

2.4.1 TRANSFERRINA

A transferrina é uma PFA negativa e seus valores diminuem de acordo com a enfermidade apresentada. Seus níveis são afetados durante insuficiência hepática, inflamação, insuficiência cardíaca e alterações no metabolismo do ferro. Sua capacidade em se ligar ao ferro pode ser avaliada por meio da mensuração de sua concentração sérica (FUHRMAN et al., 2004).

A mensuração sérica da transferrina é usada para avaliar o metabolismo do ferro no organismo em geral. Níveis diminuídos de transferrina podem ser consequência da sua produção inadequada por lesão nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica. Ao contrário, os níveis elevados podem indicar deficiência grave de ferro, desnutrição ou gestação (JAIN, 1993).

2.4.2 PROTEÍNA C REATIVA (PCR)

A PCR tem maior interesse clínico como proteína de fase aguda na espécie humana e canina, apresentando um padrão semelhante, contudo pode também ser identificada na corrente sanguínea de outras espécies. As concentrações basais dessa proteína variam em função do método utilizado para a sua detecção e dos indivíduos testados (HIRVONEN, 2000).

O aumento da PCR em cães é descrito na literatura em várias doenças infecciosas, incluindo Babesiose, Leishmaniose, Leptospirose, Parvovirose, Tripanossomíase, sepse por *Escherichia coli* e infecções por *Bordetella bronchiseptica* e *Ehrlichia canis* (CERÓN et al., 2005).

Na medicina humana, essa proteína é bem definida como marcador de inflamação e lesão tecidual. Se examinada em um microscópio eletrônico, a PCR canina possui características semelhantes a humana (CERÓN et al., 2005) e tem como função se ligar ao agente bacteriano patogênico e ativar a via clássica do complemento, fazendo com que seja conduzida a opsonização da bactéria. Ao contrário dos cães, a PCR não é o marcador ideal de inflamação nos felinos e nos bovinos. Devido ao estresse que os felinos exibem durante visitas ao veterinário ou nas doenças, influencia as concentrações de PCR, resultando em níveis aumentados. Deve-se, nestes casos, utilizar outras proteínas de fase aguda, como por exemplo, a alfa glicoproteína ácida sérica e a proteína amiloide sérica A, respectivamente (HIRVONEN, 2000; ECKERSALL, 2006).

Em Medicina Veterinária, a detecção da PCR baseia-se na utilização de testes imunológicos, onde os mais utilizados são: o eletroimunoensaio, a imunodifusão, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), a imunoturbidimetria e a aglutinação em látex capilar reversa passiva (CRPLA, do inglês, *Capillary Reversed Passive Latex Agglutination*) e a imunocromatografia (PARRA, 2009).

2.4.3 ALFA-1 GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

A AGP pertence à classe das alfa-1 globulinas e foi descrita pela primeira vez em 1920 (FOURNIER et al., 2000). Assim como a maioria das proteínas de fase aguda, é sintetizada em maior parte no fígado e secretada pelos hepatócitos e sua expressão é regulada por citocinas pró-inflamatórias (SCHÖNFELD et al., 2008).

Também foi demonstrado que os linfócitos produzem AGP, o que pode explicar suas concentrações séricas elevadas em cães e gatos com linfoma. A produção extra-hepática da alfa glicoproteína em humanos tem sido descrita em órgãos como rim, intestino, coração e em diferentes tipos de glóbulos brancos. A AGP também pode ser produzida pela próstata, estando presente no líquido seminal (CERÓN et al., 2005).

Em gatos, a melhor expressão das PFAs é Amiloide sérica A (SAA) e Alfa 1 Glicoproteína Ácida (SANTOS e ALBERTO, 2014). A SAA é reconhecida como uma das principais PFAs positiva na espécie felina, considerada a proteína que responde mais rapidamente a um estímulo inflamatório e/ou infeccioso aumentando sua concentração (CERÓN et al., 2005), já a AGP apresenta um aumento mais tardio (KAJIKAWA et. al., 1999).

A AGP aumenta em situações de peritonite infecciosa felina (PIF), infecções por Calicivírus, Clamidiose até dez vezes seu valor basal, enquanto na Leucemia felina (FeLV) e no Vírus da Imunodeficiência felina (FIV), ocorre aumento em menor escala (TIZARD, 2013).

2.4.4 FERRITINA

A ferritina é uma proteína de armazenamento de ferro que está presente em todos os mamíferos. É encontrada no fígado, baço e medula óssea. Salienta-se que na Medicina Veterinária, foi relatado que os níveis séricos de ferritina canina aumentam no sarcoma histiocítico, anemia hemolítica imunomediada e linfoma (CHIKAZAWA e DUNNING, 2016).

Apesar de ser uma proteína de fase aguda positiva, a ferritina sérica correlaciona-se com as reservas de ferro tecidual em animais domésticos. Seus níveis podem estar aumentados quando ocorre aumento das reservas de ferro associadas à anemia hemolítica crônica e transfusões de sangue repetidas. Outras causas incluem distúrbios hemofagocitários benignos e histiocitose maligna. A ferritina sérica diminui em animais com deficiência de ferro (WEISS e WARDROP, 2010).

2.4.5 IMUNOGLOBULINA A

A imunoglobulina A (IgA) é encontrada em altas concentrações em doenças infecciosas (KANEKO et al., 2008). Atua como anticorpo originário de células secretórias do trato intestinal e dos pulmões, tem a capacidade de neutralizar vírus e prevenir aderências de bactérias aos tecidos alvo (GERSHWIN, 2008).

Lágrima, saliva, secreções respiratórias, gastrintestinais e geniturinárias de muitas espécies animais contém IgA. Sendo assim, possui função de defesa localizada e de proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral a essa proteína (JAIN, 1993).

Cães com deficiência de IgA podem ter doenças das mucosas, como doença inflamatória intestinal ou supercrescimento bacteriano do intestino delgado (BATT et al., 1991).

2.4.6 IMUNOGLOBULINA G

A imunoglobulina G (IgG) é a globulina com maior concentração no soro. São responsáveis pela imunidade humoral do organismo e desempenham atividades como opsonização, aglutinação e fixação do complemento (JAIN, 1993).

É o principal anticorpo formado em resposta a agentes infecciosos e toxinas. Aumenta seus níveis em doenças infecciosas, doenças do tecido conjuntivo, doença hepática, mielomas e outros tumores linfoides. E seus valores se encontram diminuídos em animais recém-nascidos antes da ingestão de colostro e doença de deficiência imunológica (KANEKO et al., 2008).

2.4.7 IMUNOGLOBULINA M

A IgM é a primeira imunoglobulina a ser sintetizada, estando presente apenas no soro (THOMAS, 2000). No soro, a IgM está presente na segunda maior concentração, possui grande capacidade de se ligar a antígenos, é um anticorpo eficiente na aglutinação, precipitação, opsonização, fixação do complemento e neutralização de vírus (KANEKO et al., 2008).

Aumento do título de IgG pode apenas indicar um contato antigo com o antígeno e a análise das IgM pode evidenciar uma infecção recente (HALL e GERMAN, 2005; MCCAWE e HOSKINS, 2006).

2.5. IMUNOTURBIDIMETRIA

A imunoturbidimetria é um ensaio imunométrico, no qual é utilizado a imunoprecipitação e a dispersão da luz para quantificar os analitos presentes no soro ou plasma. A formação desses imunoprecipitados provoca turvação do meio, levando a diminuição da intensidade do feixe de luz incidente que atravessa essa solução (BOCHENEK, 2007).

O tampão é um reagente que proporciona condições ótimas de reação, os anticorpos ou antígenos, ligados ou não às partículas de látex, determinam a sensibilidade e a especificidade do método. Os calibradores estabelecem a relação entre concentração e a resposta em absorbância, e os controles verificam desvios da calibração. Esses são os componentes essenciais para a realização do método da imunoturbidimetria (BOCHENEK, 2007).

Os métodos imunoturbidimétricos automatizados são considerados rápidos, específicos e precisos, requisitos importantes na rotina laboratorial, uma vez que permitem rapidez na liberação de resultados contribuindo para tomada de decisão rápida na prática clínica (SILVA, 2003).

As leituras são feitas em unidades de absorbância, que refletem a relação entre luz incidente e transmitida (ÁVILA, 2001). Nesta técnica, a lipemia, hemólise e bilirrubina que interferem na turbidez do meio, podem gerar resultados falsamente aumentados ou diminuídos. Deve-se considerar também a possibilidade de ocorrer reação cruzada com outros componentes, pois nem sempre os anticorpos utilizados nos reagentes têm sensibilidade e especificidade a um tipo específico de antígeno, que pode ocasionar erros (SELBY, 1999; BRUGTS et al., 2009).

2.6 VALIDAÇÃO DE KIT BIOQUÍMICO

O processo chamado de validação é o desenvolvimento de um método analítico, a adaptação ou implementação de método conhecido que envolve processo de avaliação que prove sua eficiência na rotina do laboratório. O objetivo da validação é demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (WALSH, 1999).

O número de animais por espécie foi estabelecido em no mínimo, 40 amostras por espécie, além dos testes de repetibilidade, reprodutibilidade e acurácia de acordo com as normas estabelecidas por Oliveira e Mendes, no *ControlLab* (2012) e

Guidelines para validação e verificação de métodos de teste quantitativos e qualitativos (2012).

As proteínas de fase aguda podem ser medidas através de métodos como a imunoturbidimetria e ELISA, que são técnicas específicas, pouco invasivas e precisas o que é uma vantagem na rotina laboratorial, permitindo maior agilidade na liberação dos resultados e contribuindo para tomada de decisão na prática clínica (AVILA, 2001; MARTINEZ e SIMON, 2003; NERI, 2007).

Entretanto, nenhuma destas técnicas é específica para uso em veterinária, uma vez que utilizam anticorpos policlonais humanos (GHYS et al., 2014). Sendo assim, para que testes laboratoriais com Kits humanos possam ser realizados em espécies animais a fim de serem utilizados na prática clínica, torna-se necessária a realização de procedimentos que verifiquem a precisão e confiabilidade dos resultados (BERLITZ, 2010; HILSTRON et al., 2014).

Os principais parâmetros a serem considerados nesse processo depende da natureza do método e da variedade dos tipos de amostra que serão analisados. Um número estatisticamente significativo de amostras deve ser usado em o processo de avaliação e estes devem abranger toda a gama de resultados para o uso pretendido (AMARANTE et al., 2001).

Quando se realizam medidas numa mesma amostra em circunstâncias idênticas, nem sempre os resultados são idênticos, devido aos erros gerados por fatores como operadores, diferentes equipamentos, diferenças de calibração. Em estudos de precisão de sistemas analíticos deve-se considerar dois componentes de variação: repetitividade e reprodutibilidade (WALSH, 1999).

Os parâmetros de validação de métodos analíticos envolvem seletividade, sensibilidade, repetibilidade, reprodutibilidade e exatidão (GALORO, 2009).

2.6.1. SELETIVIDADE

A seletividade de um método é a precisão de sua medição na presença de interferências como como microrganismos concorrentes não-alvo, impurezas, degradantes e componentes da matriz. Métodos que empregam procedimentos como cromatografia e espectrometria de massa, têm a capacidade de ser muito seletivos. Mas, métodos baseados em medições colorimétricas podem ser afetados pela presença de co-extratos de amostras coloridas ou compostos com propriedades químicas semelhantes ao analito estudado (HUBER, 1998; GALORO, 2009).

2.6.2. SENSIBILIDADE

A sensibilidade é a capacidade do método em distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas. Quanto maior a sensibilidade melhor o método é capaz de distinguir pequenas mudanças na concentração do analito (WALSH, 1999).

2.6.3. REPETIBILIDADE

Repetibilidade é a aproximação entre os resultados de medições sucessivas da mesma mensurada, efetuadas nas mesmas condições de medição no mais curto espaço de tempo, incluindo o mesmo laboratório, o mesmo analista, o mesmo equipamento, o mesmo tipo de reagentes (HUBER, 1998).

2.6.4 REPRODUTIBILIDADE

Reprodutibilidade representa a aproximação entre resultados das medições da mesma amostra mensurada, com alteração de pelo menos uma das condições de medição, ou seja: o mesmo laboratório ou diferentes laboratórios; diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes épocas. A repetibilidade e a reprodutibilidade podem exprimir-se quantitativamente em termos das características da dispersão dos resultados (AMARANTE, 2001).

2.6.5 EXATIDÃO

A exatidão, definida como a concordância entre o valor real do analito na amostra e o estimado pelo processo analítico, é um dos pontos mais cruciais para o propósito da validação. Pode ser estabelecida mediante comparação entre os valores obtidos pelo método proposto com os valores obtidos para as mesmas amostras com outro método validado (GALORO, 2009).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

A realização do presente estudo experimental seguiu as Normas de Conduta para o Uso de Animais no Ensino e Pesquisa, atendendo às resoluções do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com emprego de animais do Centro Universitário de Viçosa (UNIVIÇOSA) 039.2019-2 e pela Universidade Federal de Viçosa (UFV) 70/2021.

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Animal do Centro Universitário de Viçosa – UNIVIÇOSA.

3.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

180 animais da cidade de Viçosa, em Minas Gerais, submetidos a cirurgias de orquiectomia e ovariectomia eletiva, participaram da pesquisa.

Como critério de inclusão para o estudo, permaneceram aqueles animais cujo estado de saúde se enquadrava como hígidos, por meio de avaliação clínica (FEITOSA, 2014) e realização de exames laboratoriais pré-operatórios, como hemograma, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, fosfatase alcalina e ureia e cujos tutores concordaram com a participação por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A).

Após os critérios de inclusão, foram selecionados 163 animais, 76 cães e 87 gatos hígidos, de diferentes raças, sexo e idade.

As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular externa após a antissepsia local com álcool 70 por meio de seringas de 5 mL e agulhas hipodérmicas 25 x 0,8mm descartáveis.

O sangue foi acondicionado em tubos contendo gel ativador de coágulo e tubos com agente quelante ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA).

Já o processo de validação de kit bioquímico, seguiu as normas do guideline Gestão da Fase Analítica do Laboratório: como assegurar a qualidade na prática (OLIVEIRA e MENDES, 2010).

3.3 ANÁLISE BIOQUÍMICA

As amostras coletadas sem anticoagulantes foram centrifugadas, separadas em alíquotas de soro para, posteriormente, serem realizadas a mensuração sérica das

proteínas, que foram dosadas em triplicatas para caninos e duplicatas para felinos. As análises foram realizadas em um analisador bioquímico automático Bioclin 2200 (Bioclin®), utilizando os kits comerciais do mesmo fabricante.

Para a validação das proteínas de fase aguda, foi empregado o método imunoturbidimétrico, os quais contém anti-soro humano para a reação de imunoprecipitação, respeitando as particularidades de cada proteína em sua análise.

A determinação quantitativa da Proteína C Reativa ocorre por uma reação que permite quantificar, a concentração as partículas de poliestireno recobertas com anti-PCR, que se misturam com a amostra formando agregados em presença de PCR. O processo de aglutinação que se forma, provoca um aumento do tamanho das partículas e, conseqüentemente, um aumento da absorbância, que é medida por comparação com o calibrador de concentração conhecida.

A mensuração da ferritina foi realizada por medição fotométrica da reação antígeno-anticorpo, entre partículas de látex marcadas com anticorpo anti-ferritina e ferritina presente na amostra.

A determinação da alfa1 glicoproteína ácida, transferrina, imunoglobulinas A, G e M, permite a determinação quantitativa dessas proteínas no soro por imunoprecipitação, na presença de um polímero ativador que aumenta a sensibilidade e a velocidade do ensaio imunoturbidimétrico. Após, formam com o anti-soro (anticorpo) específico um complexo insolúvel, produzindo turbidez, cuja absorbância é proporcional à concentração do analito na amostra.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva para obtenção das médias, desvio padrão, coeficiente de variação e intervalo de confiança. Além disso, eles também foram submetidos à Análise de variância (ANOVA) para que as médias fossem comparadas por meio do teste t de *Student*, utilizando-se o *software SigmaPlot 11.0 (Systac Software Inc., San Jose, USA)*, ao nível de 5% de significância.

Realizou-se a avaliação de repetibilidade nos dados brutos e na detecção dos *Outliers* usando o site *QuickCalcs*. Posteriormente, as variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de normalidade e homogeneidade de variância, aplicando-se a sua respectiva análise.

As análises estatísticas foram realizadas no programa *Sigma Plot 11.0*, considerando-se o nível de significância de 5% para todas as variáveis.

Foi realizada a avaliação de reprodutibilidade nos dados brutos entre os valores de replicata do mesmo animal. Valores muito discrepantes indicaram falha de leitura e não foram incluídos na avaliação. Após, foi calculada a média das replicatas de cada animal.

Para a detecção de Outliers foi utilizado o site QuickCalcs. Após, foi realizada estatística básica descritiva para obtenção dos valores de normalidade de cada espécie, no GraphPad Prima.

Foi realizado o cálculo dos valores superior e inferior dos limites de referência pelo método não paramétrico. Para determinar os valores de percentil foi realizado o cálculo:

1. Percentil 2,5% = $0,025 \cdot (n+1)$

2. Percentil 97,5% = $0,975 \cdot (n+1)$

Os valores resultantes indicaram o limite inferior (percentil 2,5%) e superior (percentil 97,5%) do valor de referência.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram compilados e os dados obtidos das proteínas séricas nos animais avaliados, encontram-se na tabelas 1, valores referentes aos cães e tabela 2, valores referentes aos gatos.

Já foi comprovado que algumas doenças infecciosas levam a um aumento da PCR no cão, dentre elas estão a babesiose, leishmaniose, leptospirose, parvovirose, tripanossomíase e erliquiose (PANICKER et al., 2014). A proteína C reativa, tem sido amplamente estudada em cães, associada à diversos processos inflamatórios e patológicos (GALEZOWSKI et al., 2010). Nos felinos, a mensuração de proteínas séricas também se faz importante em diversos estados patológicos. Porém, a maioria dos autores classificam a alfa glicoproteína ácida como um dos principais marcadores de resposta de fase aguda (PALTRINIERI et al., 2007; WINKEL et al., 2015).

Os valores encontrados de PCR e Ferritina (Tabelas 1 e 2), se apresentaram inferiores quando comparados a literatura de referência para cães e gatos (KANEKO et al., 2008; CORNELL, 2016), não existe na literatura nacional, outros valores de normalidade para ambas as espécies.

Tabela 1 – Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança das proteínas séricas em cães.

Parâmetro	Cães				
	N	Média	CV (%)	IC (95%)	
				Mínimo	Máximo
Proteína C reativa (mg/dL)	75	0,59±0,50	85,39	0,03	1,83
Alfa 1 glicoproteína ácida (mg/dL)	76	3,54±1,75	49,52	0	6
Ferritina (µg/L)	76	21,61±15,5	71,72	0	79,21
Transferrina (mg/dL)	71	0,10±0,18	178,09	0	0,67
Imunoglobina A (mg/dL)	76	0,43±0,54	124,27	0	2
Imunoglobina G (mg/dL)	76	263,2±54,46	20,69	120,67	345,33
Imunoglobina M (mg/dL)	76	89,65±19,33	21,56	51,76	127,5

N= Corresponde ao número de animais utilizados na pesquisa em triplicata

Vale salientar que, as demais proteínas estudadas, não dispõe de valores de normalidade na literatura consultada, onde são utilizadas principalmente, para avaliar a resposta inflamatória aguda em diversas patologias que envolvem cães e gatos (YUKI, 2010; COELHO, 2015; DINALLO, 2019), além da utilização de metodologias distintas.

Estudo realizado por Kuribayashi et al. (2003), encontraram valores de PCR médios de 1,8 mg/dL em cães hípidos, da raça beagle, divididos por sexo e idade, diferindo do presente estudo, que obteve valores médios de 0,59 mg/dL. Acredita-se que essa diferença pode ter ocorrido devido ao estudo realizado em uma raça específica, o que não foi realizado nesse ensaio experimental. Do mesmo modo, Carvalho et al. (2008), avaliando a resposta de fase aguda em cadelas saudáveis e com piometra, encontrou valores médios de 0,11 mg/dL nas fêmeas saudáveis,

valores menores ao que foi verificado no presente ensaio e sem separação por raça estudada.

Yamamoto (1994), afirmou em seu estudo que, quando se avaliam animais de diferentes raças, podem ser encontrados valores de metabólitos sanguíneos distintos, devido as características genéticas individuais.

Estudos mostraram que a concentração de PCR aumenta em felinos que possuem neoplasias localizadas ou benignas (MOURA, 2014) e, apesar da amiloide sérica A (SAA) e a Alfa 1 glicoproteína (AGP) serem consideradas as principais PFA em gatos, ainda faltam estudos sobre PCR em felinos hígidos e com processos patológicos (CERON et al., 2005).

Tabela 2 – Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança das proteínas séricas em gatos

Parâmetro	Gatos				
	N	Média	CV (%)	IC (95%)	
				Mínimo	Máximo
Proteína C reativa (mg/dL)	87	2,29±0,28	12,22	1,6	2,85
Alfa 1 glicoproteína (mg/dL)	87	3,75±1,18	31,46	1,43	6,07
Ferritina (µg/L)	85	4,98±17,87	358,83	0	41,98
Transferrina (mg/dL)	87	4,88±1,22	25,0	2,49	7,28
Imunoglobina A (mg/dL)	87	2,60±2,05	124,27	0	7
Imunoglobina G (mg/dL)	87	205,03±85,69	78,84	21,0	285,0
Imunoglobina M (mg/dL)	87	48,92±11,22	22,93	26,83	70,91

N= Corresponde ao número de animais utilizados na pesquisa em duplicata

Segundo Yuki, (2010) a AGP é um bom marcador da presença de infecções em cães e gatos e, nesses casos, seus valores se encontram aumentados. A média dos

valores encontrados de AGP no presente estudo, foi de 3,46 mg/dL (Tabela 1) em cães e 3,75 mg/dL em gatos (Tabela 2), os quais correspondem a valores de normalidade frente a diversos estudos que avaliaram suas concentrações em cães e gatos com algum tipo de patologia (KOGIKA et al., 2003; GIORDANO et al., 2004; PIRES et al., 2011; MUNHOZ, 2012; ANZILEIRO et al., 2013; ROSA, 2018; SCHMIDT et al., 2018; DINALLO, 2019). Os valores de normalidade nos estudos acima citados, foram baseados em seus grupo controles, utilizando metodologias distintas ao do presente estudo e com um número de animais restrito.

Giordano et al. (2004) registraram valores de 2,72 mg/dL em gatos com infecção por coronavírus felino, Selting et al. (2000) média de 7,6 mg/dL e Winkel et al. (2015), resultados de 8,3 mg/dL na mensuração de AGP. Como exposto, os ensaios citados avaliaram diferentes tipos de patologias, com intuito de estimar o grau de resposta inflamatória, evidenciando resultados superiores ao do presente estudo, por se tratar de animais hígidos.

Estudo conduzido por KogiKa et al. (2003), avaliando a resposta inflamatória aguda em filhotes de cães, utilizou um grupo controle (hígidos) e outro com gastroenterite hemorrágica, encontraram valores superiores ao presente estudo, quando comparados os resultados ao grupo controle. Pode-se inferir que filhotes tenham valores de proteínas séricas maiores que adultos, devido ao alto grau de desafio, aos quais são submetidos pelo processo de desenvolvimento imunológico.

Nunes (2019) encontrou valores de 217,9 a 241,7 mg/dL de transferrina obtido da medula óssea em gatos. Ao compararmos os valores de Nunes (2019) com os do presente ensaio, percebe-se uma discrepância entre eles. Essa diferença pode ter sido ocasionada pelo fato de os gatos clinicamente saudáveis fazer depósito de ferro na medula óssea, sem ter qualquer relação com síndromes ou doenças, sejam elas agudas ou crônicas, diferente das outras espécies (JAIN, 1993).

Não foi possível correlacionar as concentrações encontradas de transferrina sérica ou plasmática em felinos hígidos com outros estudos, devido à escassez de literatura dessa proteína na espécie felina.

As imunoglobulinas, por sua vez, são amplamente utilizadas para avaliar a resposta imune humoral, na verificação do *status* imunológico de cães e gatos (GERMAN et al., 1998; PAPANOTTO, 2007; SILVA, 2020).

Na avaliação das imunoglobulinas, pode-se perceber que ocorreu um alto coeficiente de variação na Imunoglobulina A, com resultados bem inferiores quando

comparado a estudos anteriores em animais sadios (KIKKAWA et al. 2005; TAKEDA e AKIRA 2005; VIEIRA, 2009). Esse fato pode ocorrer, devido a IgA ter sua maior concentração no epitélio dos tecidos mucosos (ABBAS et al., 2008) e trabalhos consultados, relataram suas concentrações em maior quantidade na saliva (GERMAN et al., 1998).

Já a IgM de cão e gato apresentaram valores semelhantes (Tabela 1 e 2) aos referidos por Cornell (2016). A IgM é a primeira imunoglobulina secretada pelos linfócitos B sendo assim, estão sempre presentes em maiores quantidades na fase aguda da infecção (MURPHY, 2012).

Até o presente momento, não foram encontrados registros na literatura consultada valores de IgM em felinos hígidos. Entretanto, Silva (2020) encontrou aumento de IgM anti-Leishmania em felinos portadores da doença, quando comparado a felinos hígidos.

Os resultados obtidos pela IgG em cães, se mostraram superiores (Tabela 1), quando comparado ao estudo de Vieira (2016) em cães hígidos. Porém, ocorreu seu aumento em cães com linfoma nesse mesmo estudo. Em gatos, não foi encontrado, na literatura consultada, valores de referência para a espécie, entretanto, estudos apontam para seu aumento diante de infecções pelo vírus da Imunodeficiência Felina (PAPAROTTO, 2007). A elevação desses valores pode indicar a presença de infecções, vacinação recente e neoplasias (LEAL e COELHO, 2014).

Para avaliação da metodologia aplicada neste estudo, foram aplicados gráficos bloxplot para verificação da distribuição das análises realizadas, levando-se em consideração a repetibilidade, reprodutibilidade e amplitude dos dados obtidos, assim como a identificação dos outliers.

O método utilizado para determinação das proteínas de fase aguda no presente trabalho foi o de imunoturbidimetria, o qual utiliza a imunoprecipitação e a dispersão da luz para quantificar os analitos presentes no soro (BOCHENEK, 2007).

Na observação dos resultados obtidos da PCR, pode-se verificar que houve uma boa distribuição dos dados tanto em cães quanto em gatos, evidenciando assimetria positiva nos cães e simetria em gatos. Também foi demonstrado amplitude, repetibilidade e reprodutibilidade dos dados. Ao compararmos os resultados entre as espécies analisadas, foi possível perceber que houve um índice superior de repetibilidade e reprodutibilidade em gatos que nos cães (Figura 1) e os mesmos apresentaram um outlier.

Para mensuração da PCR em cães e gatos, existem várias técnicas disponíveis no mercado de imunocromatografia, as quais tem sido aplicada em diferentes estudos, com apresentação de testes rápidos, para detecção de PCR em sangue total. A desvantagem desses testes em relação ao método imunotubimétrico é o alto custo, porém esses testes utilizam antissoro e/ou anticorpos específicos para as espécies canina e felina, o que os torna mais específicos e sensíveis.

Não é possível estabelecer uma correta relação entre a quantidade de PCR detectada nos diferentes estudos, que utilizam métodos diferentes de mensuração da proteína. Sabe-se que a aglutinação em látex apresenta sensibilidade inferior ao teste imunoenzimático (ELISA) e ao ensaio de imunoturbidimetria. (NDUNG'G et al., 1991; RIKIHISA et al., 1994; SHIMADA et al., 2002; PARRA et al., 2005).

Estudos realizados por Munhoz (2012), com cães infectados experimentalmente com *Ehrlichia canis* e por Anzileiro et al. (2013), avaliando cães infectados experimentalmente com *Micrococcus luteus*, observaram aumento nas concentrações de PCR. Esses resultados demonstram a necessidade de se conhecer valores fisiológicos de PFA em cães, utilizando-se metodologias rápidas, específicas, eficazes e de fácil execução.

Por sua vez, Schmidt et al. (2018) utilizaram kit comercial ELISA validado para uso em cães. Os referidos autores ao utilizar 17 fêmeas registraram valores entre 5 a 10 mg/L, os quais foram superiores aos de presente ensaio experimental (Tabela 1 e Figura 1). Possivelmente essa discrepância de valores ocorreu devido a diferença de metodologias, ao número de animais e fatores como raça, idade, sexo, alimentação e ambiente onde os animais viviam.

Já a alfa glicoproteína ácida apresentou comportamento semelhante em cães e gatos, onde a metodologia aplicada se mostrou com boa repetibilidade, reprodutibilidade e amplitude dos dados. Porém, pode-se verificar que, do total de cães avaliados, 15,8% deles, obtiveram resultados igual a zero. A distribuição dos dados se mostrou de forma assimétrica negativa em cães e assimétrica positiva em gatos (Figura 2).

Figura 1 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de PCR em cães e gatos.

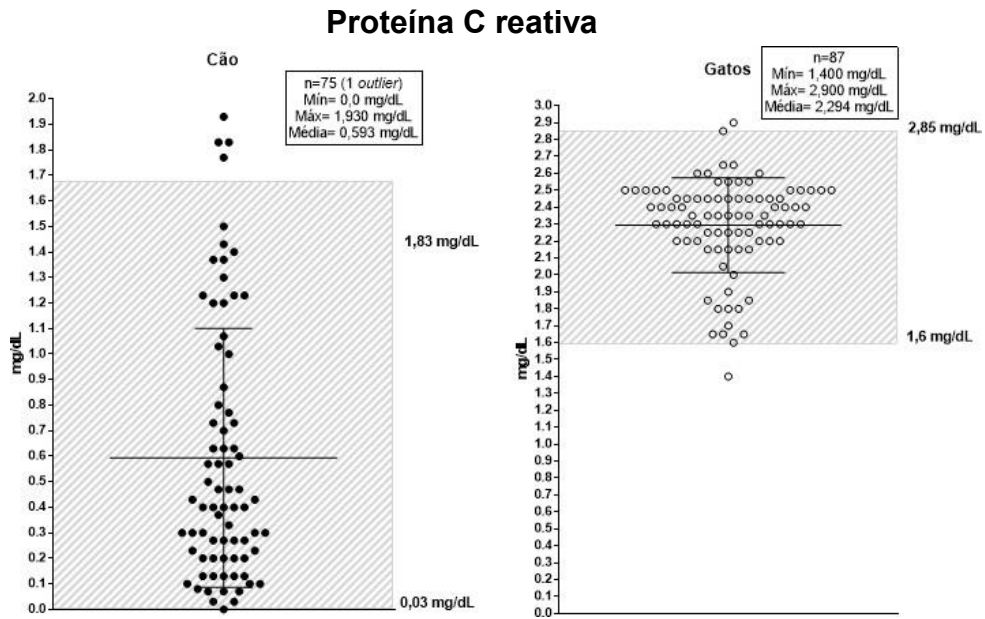
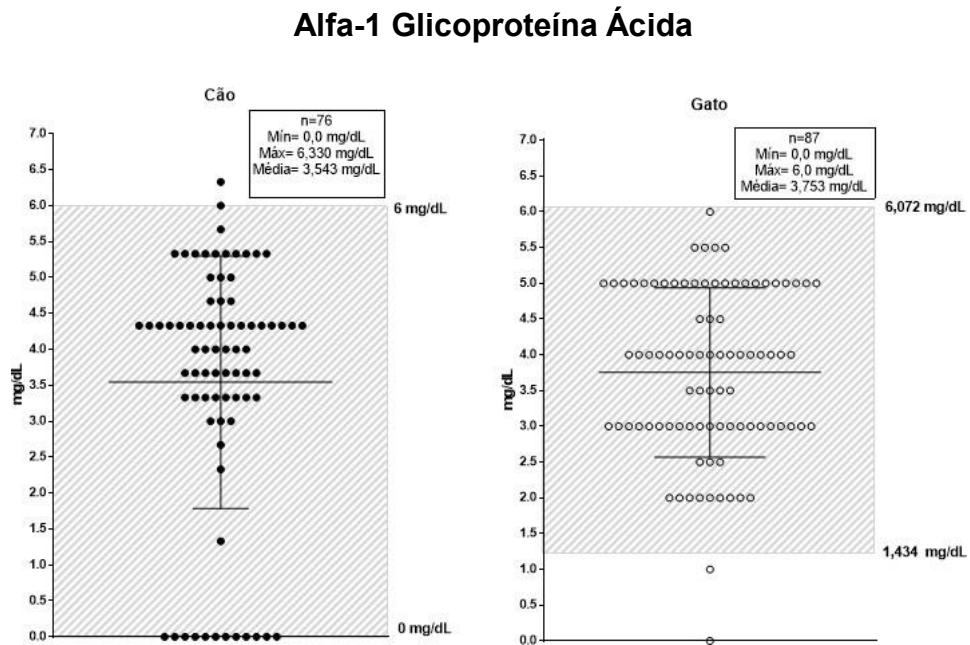


Figura 2 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Alfa glicoproteína ácida em cães e gatos.

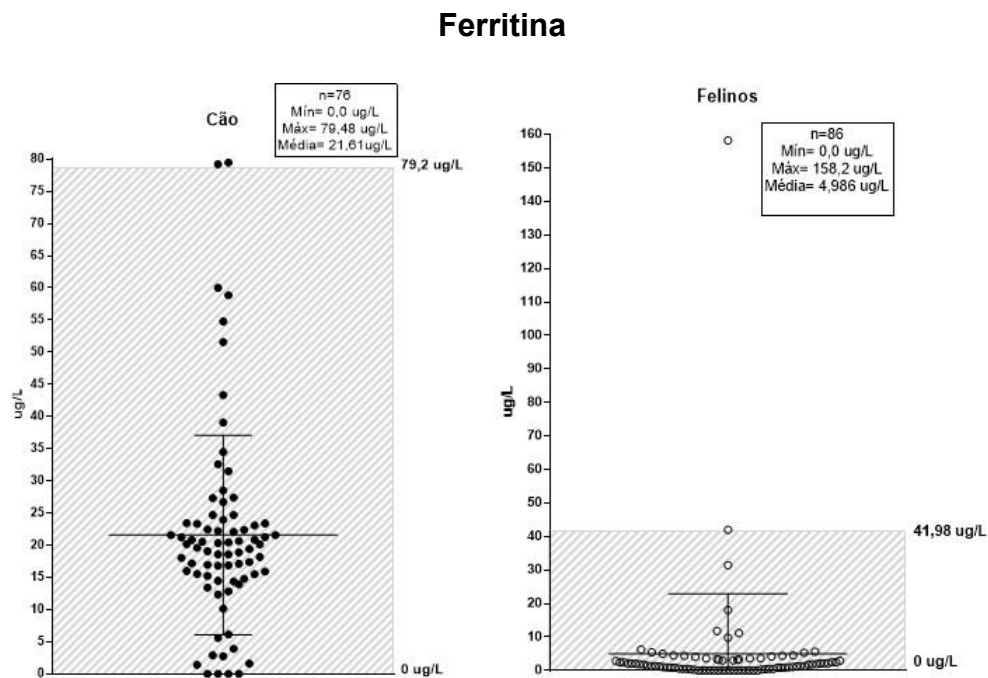


A avaliação do bloxplot da mensuração de ferritina, revelou resultados com baixa amplitude e distribuição de dados nos gatos e assimetria positiva nos cães. Quanto aos parâmetros de repetibilidade e reprodutibilidade, pode-se afirmar que, em

cães, os valores se apresentaram dentro do padrão de leitura aceitável pelo método proposto. Em contrapartida, esse fato não ocorreu nos valores obtidos nos gatos do presente estudo, onde 88% dos resultados foram próximos a zero (Figura 3).

Os resultados encontrados da transferrina em cães foram semelhantes aos observados na ferritina (Figura 3), onde notou-se má distribuição dos dados com 73% dos valores iguais a zero e cinco resultados outliers. Diferentemente, os gatos revelaram uma distribuição simétrica, repetibilidade e reprodutibilidade dos dados avaliados (Figura 4).

Figura 3 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Ferritina em cães e gatos.



A transferrina é considerada uma PFA negativa e pode ter seus níveis séricos diminuídos por problemas cardíacos e hepáticos, e alterações no metabolismo do ferro (FUHRMAN et al., 2004). Estudo de Coelho (2015) em cães hígdos, obteve concentrações médias da transferrina de 181,4 mg/dL, utilizando o método de Eletroforese de proteínas, divergindo do presente estudo, levando-se em consideração os valores e a metodologia.

O aumento de concentração de transferrina pode ser observado em casos de anemia ferropriva e na gestação. Já sua redução, pode ocorrer em casos de doenças

hepáticas, infecções agudas e crônicas, leucemia (PIRES et al., 2011) e nas anemias hemolíticas, onde os níveis de ferro sérico estão elevados (TIZARD, 2008).

Ao avaliarmos os valores encontrados da IgA, pode-se perceber que não houve dispersão de forma uniforme dos dados em cães e verificou-se baixa amplitude dos resultados, assim como observado na transferrina em cães (Figura 4). Porém, os resultados demonstrados nos gatos apresentaram uma distribuição simétrica, com boa dispersão dos dados, amplitude, repetibilidade e reprodutibilidade (Figura 5).

Figura 4 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Transferrina em cães e gatos.

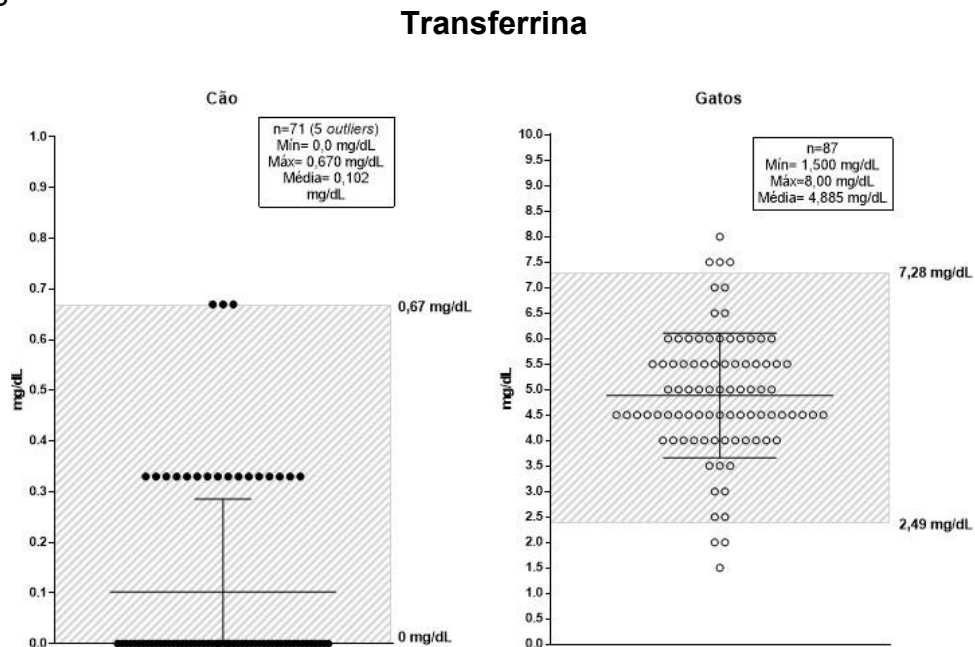
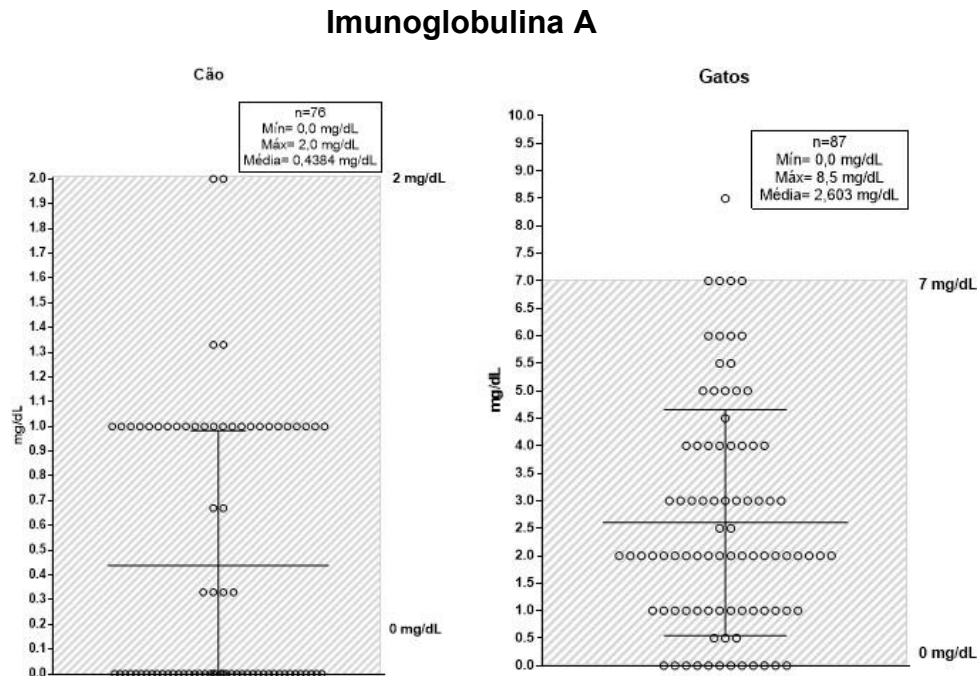


Figura 5 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Imunoglobulina A em cães e gatos.



A IgG demonstrou comportamento diferente da IgA (Figura 5), pois os dados revelaram uma boa dispersão dos dados, tanto em cães quanto em gatos, com grande amplitude, repetibilidade e reprodutibilidade. A distribuição dos dados se mostrou de forma assimétrica negativa em ambas as espécies (Figura 6),

Comportamento semelhante foi verificado nos valores da IgM em cães e gatos, onde observou-se boa amplitude, dispersão, reprodutibilidade e repetibilidade nos animais avaliados. É importante ressaltar que, em felinos, foi encontrado apenas um outlier. Porém nos cães, não foi observada essa variável (Figura 7).

No estudo realizado por German et al. (1998) foram determinados os níveis séricos médios de IgA, IgG e IgM para cães adultos de 1, 17,2 e 1,5 mg/mL, respectivamente. No entanto, no referido estudo foi utilizado o método de Western Blotting que, segundo Harlow e Lane (1988), possui baixa sensibilidade e também os resultados não se correlacionaram com os encontrados no presente estudo.

Há muitos trabalhos na literatura, mensurando IgG específicos em doenças como, IgG anti-leishmaniose. Entretanto, na literatura consultada, apenas o estudo de Vieira (2016) indicou valores de normalidade para IgG em cães saudáveis (100,47mg/dL), utilizando o método de eletroforese, diferindo do presente estudo.

Figura 6 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Imunoglobulina G em cães e gatos.

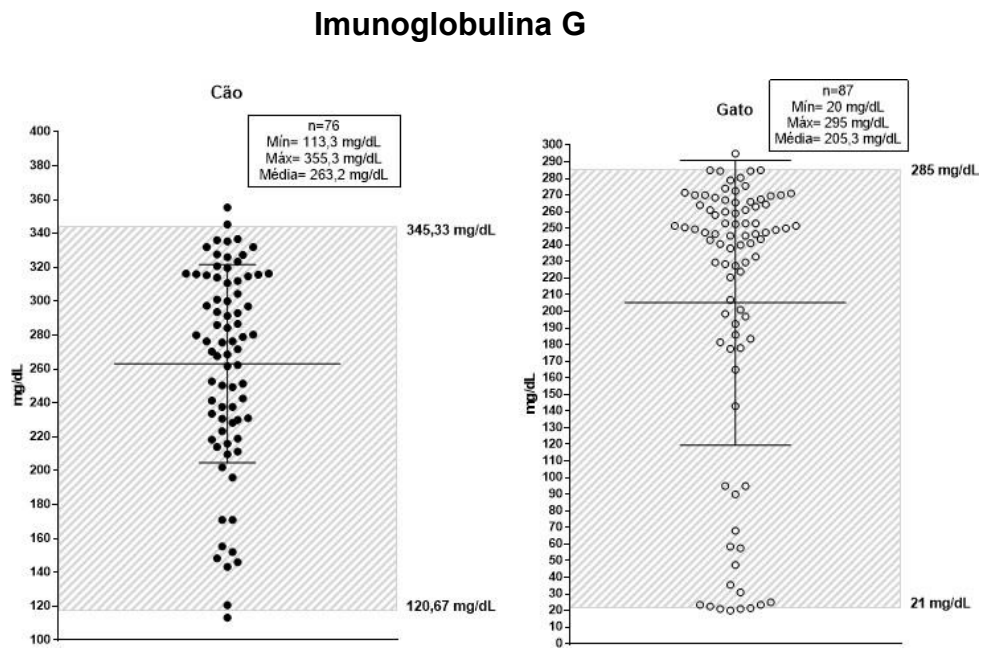
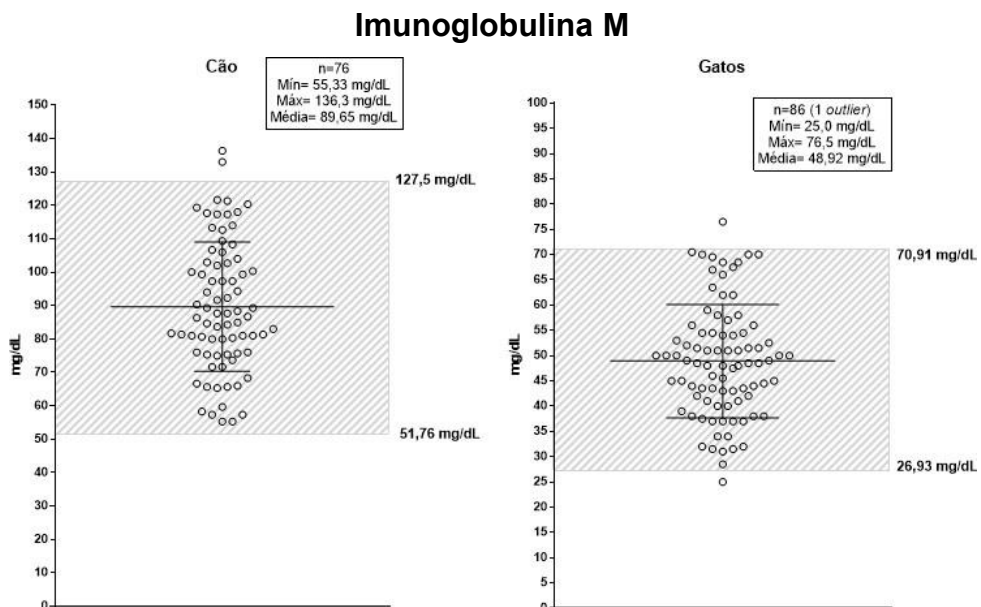


Figura 7 - Gráficos bloxplot de distribuição dos valores obtidos de Imunoglobulina M em cães e gatos.



Na literatura consultada, percebe-se a escassez de estudos sobre essas proteínas utilizando métodos mais modernos como a imunoturbidimetria e também seus respectivos valores de normalidade. Ademais, não foram encontrados valores de

referência ou estudos experimentais utilizando a mesma metodologia do presente trabalho.

Após a obtenção e avaliação dos resultados, observou-se que, a maioria das proteínas estudadas, apresentaram limites de detecção para sua mensuração pelo método proposto, mesmo com a utilização de kits comerciais humanos.

Porém, a metodologia possuiu uma desvantagem quando aplicada em Medicina Veterinária, nem sempre os anticorpos utilizados nos reagentes possuem especificidades e afinidades para somente um tipo específico de antígeno, principalmente quando se avalia diferentes espécies. Nesses casos, precisaríamos de muitos tipos de anticorpos específicos para cada analito e cada espécie estudada.

Entretanto, apesar dessa desvantagem, quando se compara o método imunoturbidimétrico com os métodos de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e Eletroforese, é considerado o método mais rápido por ser totalmente automatizado, disponibilizando o resultado dos exames rapidamente para o Médico Veterinário, além de ser considerado de bom custo-benefício (ÁVILA, 2001).

Não foi possível estabelecer valores de normalidade com a metodologia proposta no presente estudo, para as seguintes variáveis: IgA em cães e gatos, ferritina em gatos e transferrina em cães (Tabelas 1 e 2).

Esse fato foi verificado nos valores de IgA nas duas espécies, onde acredita-se que não houve reação cruzada entre os anticorpos humanos em contato com amostras de cão e gato (Figura 5), nas quais não houve leitura de absorbância das amostras.

A principal hipótese para esse achado, pode ser atribuída a metodologia utilizada, pois estudos desenvolvidos por Abreu (2010) detectaram valores de IgA no soro de cães da raça Golden Retriever e encontrou valores médios de 20,15 mg/dL, diferindo dos resultados encontrados nesse estudo (Tabela 1). Da mesma forma, Vieira (2009) encontrou concentrações de IgA em cães saudáveis variando entre 0 e 0,2 g/dL e Takeda e Akira (2005), estabeleceram valores de referência para a concentração sérica de IGA, em cães, e encontraram valores entre 0,02 a 0,15 g/dL. Todos os resultados supracitados diferiram do presente estudo tanto nos resultados encontrados como na metodologia, no qual utilizaram a técnica de Eletroforese de proteínas.

Outra hipótese para o fato, é que a IgA possui sua maior concentração na saliva, com sua produção é realizada em tecidos mucosos, onde é ativamente

transportada através dos epitélios, neutralizando microrganismos que entram pelos órgãos mucosos (ABBAS et al, 2008). Kikkawa et al. (2005) utilizando a técnica de ELISA obtiveram resultados satisfatórios em seu estudo na avaliação da resposta imunológica em cães hípidos, porém na mensuração da IgA salivar.

Estudo feito por German et al. (1998), com a utilização do método de ELISA, demonstrou grau de correlação entre a secreção salivar e imunoglobulina A em cães, mas não mensurou a imunoglobulina no soro.

Além da IgA, também não se observou reação adequada das amostras de ferritina em gatos (Figura 3), resultando em concentrações quase igual a zero (Tabela 2). Um estudo realizado por Andrews et al. (1994) mensurando a ferritina sérica em gatos saudáveis, obteve-se uma média de 7,6 µg/L. Porém, nesse ensaio experimental foram utilizados kits comerciais com anticorpo de fígado de felinos, diferindo do presente estudo que utilizou anticorpo humano.

Algumas dosagens de ferritina utilizadas no Brasil para cães e gatos são realizadas por meio de kits reagentes comerciais para humanos e esses não apresentam capacidade de leitura para algumas amostras e especificidade para seus antígenos (PIRES et al., 2011). Reagentes comerciais de ELISA para a dosagem de ferritina sérica em cães já foram desenvolvidos nos Estados Unidos (WEEKS et al., 1988; ANDREWS et al., 1992) e no Japão (WATANABE et al., 2000), porém, não são comercializados no Brasil devido ao alto custo para a produção inviabilizando sua importação.

Apesar de existirem kits comercialmente disponíveis para dosar as PFA felinas, será necessária uma padronização de ensaios no sentido da melhoria da sua simplicidade técnica, da sua especificidade para o gato e com menores custos associados, para que sejam utilizados de forma rotineira, tal como são utilizados em medicina humana (ROSA e MESTRINHO, 2019).

Os resultados da transferrina em cães apresentaram o mesmo comportamento das variáveis acima citadas (Tabela 1 e Figura 4). Acredita-se que houve falha na reação de imunoprecipitação do método imunoturbidimétrico, apenas na espécie canina, quando comparado a outros métodos já validados para determinação das concentrações de transferrina. Segundo Hilstron et al. (2014) quando se utiliza kit humano para dosagem em outras espécies, pode haver esse tipo de erro na validação.

Abreu (2010) ao dosar transferrina em cães adultos normais evidenciou concentração sérica média de 83,84 mg/dL. Utilizando a mesma metodologia de

eletroforese, Pereira et al. (2010) relataram concentração sérica média de transferrina, em cães adultos normais de 51,60 mg/dL. Os trabalhos de acima citados, quando comparado os valores do presente trabalho, confirmaram que o método de imunoturbidimetria não foi eficaz para determinação de transferrina em cães.

5 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- O método de imunoturbidimetria tem validação para a mensuração das seguintes proteínas séricas: proteína C reativa, alfa 1-glicoproteína ácida, imunoglobulinas M e G em cães e gatos, ferritina em cães e transferrina em gatos.
- Os resultados encontrados no presente estudo para as proteínas validadas, podem ser consideradas como valores de normalidade para cães e gatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLA1, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 207-234. 2008

ABREU, D. K. **Padronização do perfil hematológico, bioquímico, proteinograma sérico imunofenotipagem de linfócitos de cães da raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

ALVES, A. E.; RIBEIRO, A. P. C.; FAGLIARI, J. J. et al. Leucogram and acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.1, p. 86-91, 2010.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cadernos de Pesquisa**, v. 12, p. 116-131, 2001.

ANDREWS, G.A. et al. An improved ferritin assay for canine sera. **Veterinary Clinical Pathology**. v.21, p.57-60, 1992.

ANDREWS, G. A. et al. Enzyme-linked immunosorbent assay to measure serum ferritin and the relationship between serum ferritin and nonheme iron stores in cats. **Veterinary Pathology**. v.31, p.674–678, 1994.

ANZILIERO, D.; BASSI, E.; PAIN, K. M.; VALLE, E. de F.; KREUTZ, L. C. Determinação dos níveis séricos de proteína C-reativa (CRP) em cães com alterações dos parâmetros hematológicos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.2, p.265-272, 2013.

AMARANTE Jr., O. P. de; CALDAS, E. P. A.; BRITO, N. M.; SANTOS, T. C. R. dos; VALE, M. L. B. F. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Caderno de Pesquisa**, v. 12, p. 116-131, 2001.

ÁVILA, M. L. S. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2001.

BATT, R.M., BARNES, A., RUTGERS, H.C., CARTER, S.C. Relative IgA deficiency and small intestinal bacterial overgrowth in German shepherd dogs. **Research in Veterinary Science**., v.50, p. 106-111, 1991.

BIONDO, A. W.; LOPES, S. T. A.; SANTOS, A. P. Proteínas plasmáticas. In: BIONDO, A. W.; LOPES, S. T. A.; SANTOS, A. P. **Manual de patologia clínica veterinária**. Santa Maria. 3 ed, p. 79-80, 2007.

BOCHENEK, D. P. **Comparação entre os métodos de Imunoturbidimetria e Quimioluminescência para dosagem sérica de ferritina**. Novo Hamburgo: Centro Universitário Fevale. 2007.

BRUGTS, M. P.; LUERMANS J. G. L. M.; LENTJES, E. G. W. M. et al. Heterophilic antibodies may be a cause of falsely low total IGF1 levels. **European Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 4, p. 561-565, out. 2009.

BERLITZ, F. A. Controle da qualidade no laboratório clínico: alinhando melhoria de processos, confiabilidade e segurança do paciente. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 353-363, 2010.

CARVALHO, C. D. D.; RÊGO, E. W.; QUEQUE M. et al. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. **Medicina Veterinária**, v.2, p. 1-8, 2008.

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

CHIKAZAWA, S.; DUNNING, M. A review of anaemia of inflammatory disease in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**. v. 57, n. 7, p. 348-353, 2016.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: A review. **Comparative Medicine**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.

COMPRI-NARDY, M.; OLIVEIRA, C.; STELLA, M. B. Eletroforese de proteínas. In: COMPRI-NARDY, M.; OLIVEIRA, C.; STELLA, M. B. **Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1 ed., p. 13-16, 2009.

COELHO, S. B. **Eletroforese das proteínas séricas e urinárias de cães com Erliquiose subclínica**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, 2015.

CORNELL UNIVERSITY COLLEGE OF VETERINARY MEDICINE. 2016. Disponível em: <https://www.vet.cornell.edu/departments/population-medicine-and-diagnostic-sciences>. Acesso em 20 de janeiro de 2022.

DINALLO, H. R. **Perfil das proteínas de fase aguda em gatos com doença do trato urinário inferior obstrutiva**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2019.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J. G.; HARVIE, J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. **Veterinary Research Communications**, v. 15, p. 17-24, 1991.

ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins: form, function and analysis. **Livro de resumos do congresso anual do American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology**, Tucson, EUA, 2006.

ECKERSALL, P. D. **Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias**. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. Clinical biochemistry of domestic animals. 6ed. Burlington: Academic Press, p. 117-155, 2008.

FAILACE, R.; PRANKE, P. Avaliação dos critérios de liberação direta dos resultados de Hemogramas através de contadores eletrônicos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 3, p.159, 2004.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária**. 3ª ed. Ed. Roca, São Paulo, 2014.

FOURNIER, T. et al. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1482, p.157-71, 2000.

FUHRMAN, M. P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C. M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **Journal of the American Dietetic Association**. v. 104, n. 8, p. 1258-1264, 2004.

GALEZOWSKI, A. M.; SNEAD, E. C.; KIDNEY, B. A.; JACKSON, M. L. C-reactive protein as a prognostic indicator in dogs with acute abdomen syndrome. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 3, p. 395-401, 2010.

Galoro, C. A. O.; Mendes, M. E.; Burattini, M. N. Applicability and potential benefits of benchmarking in Brazilian clinical laboratory services. **Benchmarking: An International Journal**, v.16, p.817-830, 2009.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 107-121, 1998.

GERSHWIN LJ. **Clinical veterinary immunology**. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical biochemistry of domestic animals. 6 ed. Academic Press, San Diego, p. 157-172, 2008.

GHYS, L. F.; PAEPE, D.; SMETS, P. Cystatin C: a new renal marker and its potential use in small animal medicine. **Journal Veterinary Medicine**, v. 4, n. 28, p. 1152-1164, 2014.

GIORDANO, A., SPAGNOLO, V., COLOMBO, A. & PALTRINIERI, S. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. **The Veterinary Journal**, v.167, p. 38-44, 2004.

GONZÁLEZ, F.H.D, CARVALHO, V., MÖLLER, V.A, DUARTE, F.R. Perfil bioquímico sanguíneo de cães e gatos na cidade de Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS**, v.29, n.1, p1-6, 2001.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SCHEFFER, J. F. S. **Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional**. In: Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil 1, 2003, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003. p. 73-89.

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

Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods. Technical Note 17. June 2012. 32p.

HALL, E. J.; GERMAN, A. J. Diseases of the Small Intestine. In: ETTINGER, S. J. e FELDMAN, E. C. **Veterinary Internal Medicine**. Philadelphia, U.S.A.: W.B. Saunders Company, 6ed, p.1333 – 1378, 2005.

HARLOW, E., LANE, D. Immunoassays. In **Antibodies: a laboratory- manual**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. pp 553-612, 1988.

HERMENS, A. A. M. Dilution protocols for detection of Hook effects and prozone phenomenon. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 1719-1721, 2000.

HIRVONEN, J. **Acute Phase Response in Dairy Cattle**. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – University of Helsinki, Finland, 2000.

HILSTRON, A.; HAGMAN, R.; TVEDTEN, H. et al. Validation of commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 2, p. 235-242, 2014.

HORADAGODA, N.; KNOX, K. M.; GIBBS, H. A. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. **Veterinary Record**, v. 144, n. 16, p.437–441, 1999.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **Liquid chromatography, gas chromatography international**, v.8. p. 96-105, 1998.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 417, 1993.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 1, p. 38-46, 2007

KAJIKAWA, T.; FURUTA, A.; SUGII, S. et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α_1 -acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 68, n. 1, p. 91-98, 1999.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6 ed. Academic Press, San Diego, 916p, 2008.

KIKKAWA, A.; UCHIDA, Y.; SUWA, Y.; TAGUCHI, K. A novel method for estimating the adaptive ability of guide dogs using salivary sIg A. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 7, p. 707-712, 2005.

KOGIKA, M. M. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e alfa-glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. **Ciência Rural**. v. 33, n. 3, p. 513-517, 2003.

KURIBAYASHI, T., SHIMADA, T., MATSUMOTO, M., Kawato, K., HONJYO, T., FUKUYAMA, M., Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals**, v.52, n.5, p.387-390, 2003.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. **Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo**. In: THRALL, M. A. et al. Hematologia e bioquímica clínica veterinária. cap. 26, p. 3-36. 2007.

LEAL, P. D. S., COELHO, C. D. Toxoplasmose em cães: uma breve revisão. **Coccidia**, v. 2, n.1, p. 22-39, 2014.

MARTINS, R. T.; FADEL-PICHETH, M. T.; ALCANTARA, V. M. et al. Cistatina C: um novo marcador para filtração glomerular comparada ao clearance da creatinina e a creatinina sérica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 35, n. 4, p. 207-2013, 2003.

MARTINEZ, I. K. H.; SIMON, D. J. J. Utilidad clínica de la cistatina C como marcador de función renal. **Anales Médicos de la Asociación Médica del Centro Médico** v. 48, n. 4, p. 216-222, 2003.

MCCAWE, D. L.; HOSKINS, J. D. Canine Viral Enteritis. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Philadelphia, PA, U.S.A.: Saunders Elsevier, 5ed, p.63 – 70, 2006.

MESTECKY, J.; LUE, C.; RUSSEL, M. W. Selective transport of IgA. Cellular and molecular aspects. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 441-471, 1991.

MOURA, A. V. C. **Avaliação dos Parâmetros Clínicos e da Concentração Sérica da Proteína C Reativa em Cadelas com Piometra**. Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural. Patos, 2014

MUNHOZ, T.D.; FARIA, J.L.M.; HERNANDES, G.V.; JOÃO, C.F.; PEREIRA, W.A.B.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R.Z.; TINUCCI-COSTA, M. Mensuração da proteína c-reativa na infecção experimental por *Ehrlichia canis* (amostra Jaboticabal) e após o tratamento com cloridrato de doxiciclina em cães. **Veterinária Notícias**, v.15, p.65-79, 2012.

MUNHOZ, T. D.; MARTINS, M. R.; PINTO, M. L. et al. Mieloma múltiplo num cão - Relato de caso. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 38, n. 3, p. 231-234, 2016.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, N. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**. v. 168, n. 1, p.28–40, 2004.

MURPHY, K. **Janeway's immunobiology**. 8 ed. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2012.

NERI, L.A. **Validação do método de imunonefelométrico para dosagem de cistatina C, como marcador de função renal**. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina São Paulo. São Paulo. 2007.

NDUNG'U, J.M.; ECKERSALL, P.D.; JENNINGS, F.W. Elevation of the acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. **Acta Tropica**, v.49, p. 77-85, 1991.

NUNES, N. J. S. **Avaliação citológica e de estoques de ferro na medula óssea de gatos jovens clinicamente saudáveis: determinação de valores de referência**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Porto Alegre. 2019.

OLIVEIRA, A.; MENDES, M. E. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1. ed. Rio de Janeiro: **ControlLab**, 2010.

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

PAPAROTTO, T. **Acompanhamento clínico-laboratorial de gatos naturalmente infectados com o vírus da imunodeficiência (FIV) tratados com zidovudina (azt)**. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2007.

PANICKER, V. P.; GOPALAKRISHNAN, A.; GEORGE, S. Acute phase proteins of veterinary importance - review. **World Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences, Mannuthy**, v. 3, n. 9, p.188-195, 2014.

PARRA, M. D.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.K. C-reactive protein measurement in canine saliva. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.139-144, 2005.

PARRA, A. C. **Investigação diagnóstica de doença concomitante babesiose e anaplasmose em rebanho equino, por técnicas de Nested PCR e c- ELISA ou**

ELISA indireto. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Universidade de São Carlos, São Paulo, 2009.

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

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 2, p.163–187, 2004.

PIRES, L. S. A. et al.. Parâmetros utilizados na avaliação do metabolismo do ferro em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 272- 277, 2011.

QUEIROZ, L. L.; CASTRO, L. T. S.; SANTOS, M. Proteínas de fase aguda (PFA) em cães. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, p. 1085-1096, 2016.

REGO, P. C. S. **Determinação de proteínas totais em suplementos proteicos advindos do soro do leite.** 39 f. Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, Pernambuco, 2017.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIBA, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with Ehrlichia canis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 912-917, 1994.

RIZZOLI, F. W; FAGLIARI, J. J; SILVA, D. G; JORGE, R. R. L. Proteinograma e teores séricos de cálcio, fósforo, magnésio e ferro de bezerros recém-nascidos que mamam colostro diretamente na vaca ou em mamadeira. **ARS Veterinária**, v. 22, p. 10-17, 2006.

ROCHA, M. C. P. **Avaliação prognóstica de proteínas de fase aguda e dosagem de vitamina d de cães com linfoma multicêntrico submetidos ao tratamento quimioterápico.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2021.

ROSA, R. M. **O papel da alfa-1 glicoproteína ácida na monitorização clínica da gengivoestomatite crônica no gato: um estudo exploratório.** Dissertação (Mestrado integrado em Medicina Veterinária) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2018.

ROSA, R. M., MESTRINHO, L. A. P. Acute phase proteins in cats. **Ciência Rural**, v.49, n.4, 2019.

SANTOS, I. F. C.; ALBERTO, D. S. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 17, n. 1, p. 55-62, 2014.

SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. Proteínas In: SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. **Fundamentos de patologia clínica veterinária**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

SERIN, G.; ULUTAS, P. A. Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. **Veterinary Record**, v.166, p. 20-22, 2010.

SCHMIDT, E. M.S. et al. Acute phase proteins in bitches subjected to conventional and minimally invasive ovariohysterectomy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n. 11, p.2124- 2128, 2018.

SCHÖNFELD, D.; RAVELLI, R. B. G.; SKERRA, A. et al. A crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomuroid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. **Journal Molecular Biology**, v. 384, n. 2, p. 393-405, 2008.

SELBY, C. Interference in immunoassay. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 704-721, 1999.

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

SHIMADA, T.; ISHIDA, Y.; SHIMIZU, M.; NOMURA, M.; KAWATO, K.; IGUCHI, K.; JINBO, T. Monitoring C-reactive Protein in Beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Research Communication**, v. 26, p.171-177, 2002.

SILVA, W. D. A interação antígeno-anticorpo In: SILVA, W. D.; MOTA, B. **Imunologia básica e aplicada**, 5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2003.

SILVA, R. O. P.; LOPES, A. F.; FARIA, R. M. D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**. v. 18, n. 2, p. 116-122, 2008.

SILVA, D. T. **Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por Leishmania (*Leishmania*) infantum**. Tese – Doutorado em Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

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

TECLES, F. et al. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.21, p.214-219. 2009.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W. et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

TIZARD, I. Innate Immunity: Proinflammatory and Antimicrobial Mediators/Systemic Responses to Inflammation. **Veterinary Immunology**, v. 9, p. 21-74, 2013.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5ed. cap. 134, p. 891-898, 2000.

THOMAS, J.; ROBINSON, W. Infección por el virus de la inmunodeficiencia felina. **Waltham Focus**. v.5, n.2, p.24-30, 1995.

VIEIRA, M. C. **Eletroforetograma de proteínas séricas em cães linfomatosos, submetido ao protocolo quimioterápico de Madison-Winsconsin**. Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Campus Jaboticabal. Dissertação, 91p. Jaboticabal, 2009.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. Iron and Cooper Deficient and Disorders of Iron Metabolism. In: WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Iowa. 6ed. p.161-171. 2010.

WALSH, M. C. Moving from official to traceable methods. **Trends in Analytical Chemistry**. v.18, p.616-623, 1999.

WATANABE, K. et al. Characterization of ferritin and ferritin binding proteins in canine serum. **BioMetals**, v.13, p.57-63, 2000.

WEEKS, B.R. et al. Relationship of serum ferritin and iron concentrations and serum total iron-binding capacity to nonheme iron stores in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.50, n.2, p.198-200, 1989.

WINKEL, V., PAVAN, T., WIRTHL, V., ALVES, A. & LUCAS, S. Serum α -1 acid glycoprotein and serum amyloid A concentrations in cats receiving antineoplastic treatment for lymphoma. **American Journal Veterinary Research**, v.76, p. 983-988, 2015.

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

YAMAMOTO, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M. e Naiki, M. Determination de proteína C-reativa em soro e plasma de cães saudáveis e cães com pneumonia por ELISA e teste de aglutinação passiva em látex reverso em lâmina. **Veterinary Quarterly**, v.16, p. 74-77, 1994.

YAMAMOTO, J. K., E. Sparger, E. W. Ho, P. R. Andersen, T. P. O'Connor, C. P. Mandeli, L. Lowenstine, R. Munn, N. C. Pedersen. Pathogenesis of experimentally induced feline immunodeficiency virus infection in cats. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1246-1258, 1988.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar do estudo “Validação de reagentes comerciais para testes bioquímicos em cães e gatos”. Acreditamos que ela seja importante para avaliação da saúde do seu animal.

PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

A minha participação no referido estudo será de autorizar coletas de amostras de sangue, por venopunção na veia jugular do animal.

RISCOS E BENEFÍCIOS

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como a leitura do hemograma do meu animal. Recebi também informações que é possível que aconteçam desconfortos ao realizar a coleta de sangue. Diante disso, medidas serão tomadas para sua redução, tais como coletar apenas a quantidade necessária para fazer o cultivo, minimizando o estresse do animal.

SIGILO E PRIVACIDADE

Estou ciente de que minha privacidade será respeitada, ou seja, meu nome ou qualquer outro dado ou elemento que possa, de qualquer forma, me identificar, será mantido em sigilo. Os pesquisadores se responsabilizam pela guarda e confidencialidade dos dados, bem como a não exposição dos dados de pesquisa.

AUTONOMIA

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da minha participação. Também fui informado de que posso me recusar a participar do estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que venho recebendo.

RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO

De igual maneira, caso ocorra algum dano decorrente da minha participação no estudo, serei devidamente indenizado, conforme determina a lei.

CONTATO

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Waleska Ferreira Dantas – FAVIÇOSA e Fernanda Campos Mansur – FAVIÇOSA, e com elas poderei manter contato pelos telefones (31) 991344068 e (31) 996527162, respectivamente.

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) é composto por um grupo de pessoas que estão trabalhando para garantir que seus direitos como participante de pesquisa sejam respeitados. Ele tem a obrigação de avaliar se a pesquisa foi planejada e se está sendo executada de forma ética. Se você achar que a pesquisa não está sendo realizada da forma como você imaginou ou que está sendo prejudicado de alguma forma, você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UNIVICOSA (CEP) pelo telefone (31) 3899-8033 entre segunda e sexta-feira das 08h00 às 12:00 e das 14:00 às 18:00 ou pelo e-mail cep@univicosa.com.br

DECLARAÇÃO

Declaro que li e entendi todas as informações presentes neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tive a oportunidade de discutir as informações deste termo. Todas as minhas perguntas foram respondidas e eu estou satisfeito com as respostas. Entendo que receberei uma via assinada e datada deste documento e que outra via assinada e datada será arquivada nos pelo pesquisador responsável do estudo.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em participar, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, por minha participação.

Dados do participante da pesquisa	
Nome:	
Telefone:	
e-mail:	

Local, _____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do Pesquisador