

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**THIAGO AUGUSTO TELES DE SOUZA**

**VALIDAÇÃO DE KITS BIOQUÍMICOS COMERCIAIS HUMANOS PARA  
MENSURAÇÃO DO PROTEINOGRAMA E ELETRÓLITOS  
SÉRICOS EM EQUINOS**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**THIAGO AUGUSTO TELES DE SOUZA**

**VALIDAÇÃO DE KITS BIOQUÍMICOS COMERCIAIS HUMANOS PARA  
MENSURAÇÃO DO PROTEINOGRAMA E ELETRÓLITOS  
SÉRICOS EM EQUINOS**

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

Co-orientadores: Waleska M. Ferreira Dantas  
Rinaldo Batista Vianna  
Marcel F. Bastos Avanza

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2024**

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

T

S729v  
2024 Souza, Thiago Augusto Teles de, 2024-  
Validação de kits bioquímicos comerciais humanos para mensuração do proteinograma e eletrólitos séricos em equinos / Thiago Augusto Teles de Souza. – Viçosa, MG, 2024.  
1 dissertação eletrônica (55 f.): il.

Inclui anexo.

Orientador: José Dantas Ribeiro Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Veterinária, 2024.

Referências bibliográficas: f. 48-53.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2024.029>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cavalos - Doenças - Diagnóstico. 2. Proteínas - Medição. 3. Eletrólitos - Medição. 4. Imunoturbidimetria. 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. 636.10896075

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

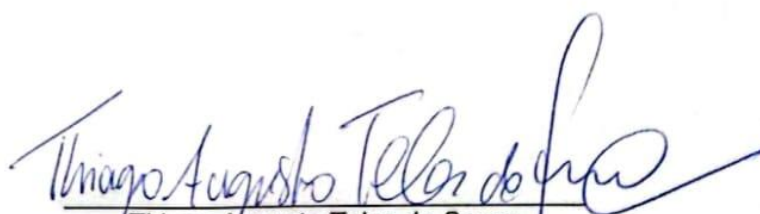
THIAGO AUGUSTO TELES DE SOUZA

VALIDAÇÃO DE KITS BIOQUÍMICOS COMERCIAIS HUMANOS PARA  
MENSURAÇÃO DO PROTEINOGRAMA E ELETRÓLITOS  
SÉRICOS EM EQUINOS

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: 19 de janeiro de 2024.

Assentimento:

  
Thiago Augusto Teles de Souza  
Autor

  
José Dantas Ribeiro Filho  
Orientador

*“E conhecereis a verdade, e a verdade vos  
libertará.”*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, família, saúde e todas as bênçãos que me confiou e honrou.

Aos meus pais, pelo berço, sustento e apoio que muito me dão.

À Luciana, minha amada, pelo amor, carinho e cuidado, fundamentais para a conclusão desta etapa.

À Universidade Federal de Viçosa, minha eterna *alma mater*, pela formação que me conferiu, momentos e lições ímpares, mas sobretudo por me capacitar como um ser humano a contribuir com a sociedade, e de forma mais sublime, cuidar da vida dos animais.

Aos meus eternos orientadores, Professor José Dantas Ribeiro Filho e Prof. Marcel Ferreira Bastos Avanza, por todas as valiosas lições, técnicas e pessoais, as quais levarei comigo por toda minha vida.

À Professora Waleska de Melo Ferreira pela co-orientação, pelos ensinamentos e pela ajuda imensurável.

À Bioclin e Camila Eckstein, pela parceria e grande ajuda que proporcionou este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

E por fim, aos cavalos, razão maior da minha profissão, paixão tenra e eterna de minha vida.

*“É mais importante que se conheça o paciente que tem a doença do que a doença que tem o paciente.”*

(Sir William Osler)

## RESUMO

SOUZA, Thiago Augusto Teles, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2024. **Validação de kits bioquímicos comerciais humanos para mensuração do proteinograma e eletrólitos séricos em equinos.** Orientador: José Dantas Ribeiro Filho. Co-orientadores: Waleska de Melo Ferreira Dantas; Rinaldo Batista Vianna, Marcel Ferreira Bastos Avanza.

O proteinograma e a mensuração dos eletrólitos são exames de extrema importância para a espécie equina, e os métodos convencionais de mensuração das proteínas de fase aguda demandam muito tempo para fornecerem resultados úteis na prática clínica. Nesse intuito e tendo como objetivo também fornecer subsídio científico para comercialização de novos produtos para diagnóstico em medicina laboratorial veterinária, este trabalho objetivou realizar a validação de kits bioquímicos comerciais de proteinograma e eletrólitos séricos para equinos, através da mensuração da concentração sérica de proteína total, albumina, alfa-1 glicoproteína ácida, ferritina, transferrina, imunoglobulina G, imunoglobulina M, bem como sódio, potássio, cloreto, cálcio total, magnésio e fósforo. Foram selecionados 90 equinos hípidos, de diferentes idades e sexo. As amostras foram processadas de forma automatizada através de kits e equipamento disponibilizado pela empresa Bioclin®, sendo comparadas com os padrões de referência pré-estabelecidos pelo fabricante bem como literatura específica. Dos analitos avaliados, apenas o sódio apresentou valor de referência demasiadamente discrepante comparado à literatura consultada. Todos os demais parâmetros mensurados apresentaram-se dentro dos intervalos de confiança estabelecidos e limiares de normalidade para a espécie. Conclui-se que os kits avaliados para os analitos proteína total, albumina, alfa-1-glicoproteína ácida, imunoglobulina G, imunoglobulina M, bem como cloreto, cálcio total, potássio, magnésio e fósforo têm validação para mensuração dos analitos supracitados e os resultados encontrados no presente estudo podem ser considerados como valores de referência para a espécie equina.

**Palavras-chave:** Equinos. Bioquímica. Imunoturbidimetria. Valores de Referência.

## ABSTRACT

SOUZA, Thiago Augusto Teles, M.Sc. Federal University of Viçosa, January 2024. **Validation of human commercial biochemical kits for measuring proteinogram and serum electrolytes in horses.** Adviser: José Dantas Ribeiro Filho. Co-advisers: Waleska de Melo Ferreira Dantas; Rinaldo Batista Vianna, Marcel Ferreira Bastos Avanza.

The proteinogram and measurement of electrolytes are extremely important exams for the equine species and conventional methods for measuring acute phase proteins require a lot of time to provide useful results in clinical practice. With this aim and with the objective of also providing scientific support for the commercialization of new products for diagnosis in veterinary clinical pathology, this work aimed to validate commercial biochemical proteinogram and serum electrolyte kits for horses, through measurement of serum concentration of total protein, albumin, alpha acid glycoprotein, ferritin, transferrin, immunoglobulin G, immunoglobulin M, as well as sodium, chloride, total calcium, potassium, magnesium and phosphorus. Ninety healthy horses of different ages and sex were selected. The samples were processed automatically using kits and equipment made available by the company Bioclin®, being compared with the reference standards pre-established by the manufacturer as well as specific literature. Of the analytes evaluated, only sodium presented a reference value that was too discrepant compared to the literature consulted. All other parameters measured were within the established confidence intervals and normality thresholds for the species. It is concluded that the methodologies evaluated for the analytes total protein, albumin, alpha-1-acid glycoprotein, immunoglobulin G, immunoglobulin M, as well as chloride, total calcium, potassium, magnesium and phosphorus are validated for measuring the aforementioned analytes and the results found in the present study can be considered as reference values for the equine specie.

**Keywords:** Equine. Biochemistry. Immunoturbidimetry. Reference values.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de proteína total em equinos hígidos. ....	29
Figura 2. Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de albumina em equinos hígidos. ....	31
Figura 3. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de transferrina em equinos hígidos. ....	32
Figura 4. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de ferritina em equinos hígidos. ....	33
Figura 5. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de IgG em equinos hígidos. ....	35
Figura 6. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de IgM em equinos hígidos. ....	36
Figura 7. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de alfa-1glicoproteína ácida em equinos hígidos. ....	38
Figura 8. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de sódio em equinos hígidos. ....	40
Figura 9. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de potássio em equinos hígidos. ....	42
Figura 10. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de cloreto em equinos hígidos. ....	43
Figura 11. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de cálcio em equinos hígidos. ....	44
Figura 12. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de fósforo em equinos hígidos. ....	45
Figura 13. Gráficos boxplot de distribuição dos valores obtidos de magnésio em equinos hígidos. ....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança dos parâmetros proteicos avaliados em equinos hígidos.

.....27

Tabela 2. Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança dos eletrólitos avaliados em equinos hígidos.

..... 39

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Proteínas totais (PT's).....	14
2.2. Globulinas.....	15
2.3. Resposta de fase aguda.....	16
2.4. Proteínas de fase aguda (PFAs).....	16
2.4.1 Albumina.....	16
2.4.2. Transferrina (TRF).....	17
2.4.3. Alfa-1-Glicoproteína Ácida (AGP).....	18
2.4.4. Ferritina.....	18
2.5.1 Sódio (Na <sup>+</sup> ).....	19
2.5.2. Cloreto (Cl <sup>-</sup> ).....	19
2.5.2. Cálcio (Ca <sup>++</sup> ).....	20
2.5.3. Potássio (K <sup>+</sup> ).....	20
2.5.4. Magnésio (Mg <sup>++</sup> ).....	21
2.5.5. Fósforo (P).....	21
2.6. Descrição metodológica para dosagem proteica e eletrólitos séricos.....	22
2.6.1. Imunoturbidimetria.....	22
2.6.2. Método do Biureto.....	22
2.6.2. Método de Bromocresol.....	22
2.6.3. Método de Ponto Final.....	23
2.7. Validação de kit bioquímico.....	23
3.7.1. Seletividade.....	24
3.7.2. Sensibilidade.....	24
3.7.3. Repetibilidade.....	24
3.7.4. Reprodutibilidade.....	24
3.7.5. Exatidão.....	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. Aspectos éticos.....	25
3.2. Delineamento experimental.....	25
3.3. Análise bioquímica.....	26
3.4. Análise dos dados.....	26
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	27
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	47

<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>ANEXO A</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

A equinocultura participa ativamente da atividade pecuária brasileira devido a magnitude econômica e social que o setor expressa. Segundo dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2023), o Brasil detém o maior rebanho de cavalos da América Latina e o quarto maior rebanho mundial, o qual é liderado pelos Estados Unidos da América, China e México, respectivamente.

Mediante a expansão do interesse pela criação de cavalos como animais de companhia, prática de esportes, trabalho, equoterapia dentre outras atividades, também houve aumento nos cuidados com a saúde e manejo desses animais, além do fomento de empresas privadas a pesquisas que certifiquem a acurácia de testes diagnósticos, promovendo melhorias nos métodos de avaliação, monitoramento e tratamento das enfermidades (MANSUR, 2022).

Nesse sentido, na prática da clínica veterinária laboratorial, sobretudo no que concerne às terapias intensivas, é fundamental fornecer ao clínico, parâmetros laboratoriais - biomarcadores hemáticos, imunológicos e bioquímicos – para orientar decisões pertinentes ao diagnóstico, tratamento e prognóstico do paciente. *Exempli gratia*, a resposta de fase aguda dos processos mórbidos que afetam a saúde dos equinos consiste em um conjunto complexo de reações inflamatórias, mediante infecção ou lesão tecidual deflagrada pela produção de mediadores inflamatórios pelas células ou tecidos lesionados (JACOBSEN, 2007).

Neste raciocínio, dentre as diversas modificações orgânicas, o fígado tem sido responsabilizado pela produção exacerbada de algumas proteínas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (KOJ, 1996). O padrão de resposta das PFA é espécie-específico, e em equinos elas podem ser classificadas como negativas, (quando se encontram abaixo do intervalo padrão diante de um quadro inflamatório) ou positivas (quando seus valores se encontram acima daqueles considerados normais para espécie) (MURATA et al., 2004; SAQUETTI et al., 2008).

Outrossim, os eletrólitos constituem elementos importantes para a abordagem clínica do paciente equino, pois seus valores séricos podem refletir alterações provocadas por doenças que resultem em perda de água e eletrólitos específicos, como as doenças gastrointestinais e renais (ESTELL, 2017). Os intervalos de referência para eletrólitos variam entre espécies e são influenciados por diversos fatores tais como pela metodologia laboratorial empregada na sua mensuração; as

PFAs, por sua vez, além da variabilidade, apresentam custo e tempo relativamente elevados para sua mensuração na rotina clínica (SAQUETTI et al., 2008).

Tendo em vista que a mensuração destes parâmetros em cavalos é realizada utilizando-se kits bioquímicos desenvolvidos para avaliação em humanos, o presente trabalho visa realizar a validação de kits comerciais para determinação dos teores séricos em equinos hígidos de proteína total, albumina, alfa-1-glicoproteína ácida, ferritina, transferrina, imunoglobulina A, imunoglobulina G, imunoglobulina M, bem como sódio, potássio, cloreto, cálcio total, magnésio e fósforo. Além disso, os métodos utilizados especificamente para mensuração de proteínas de fase aguda em animais demoram em torno de três dias para liberação dos seus resultados, impedindo a intervenção do clínico de forma rápida frente a doença que acometa o paciente. Por isso, o desenvolvimento de metodologia específica para a linha veterinária se faz necessário a fim de minimizar falhas na detecção de metabólitos sanguíneos e agilizar o processo de liberação dos resultados.

### **1.1. Objetivo Geral**

Validar kits bioquímicos comerciais da linha humana para a mensuração sérica de proteínas totais, albumina, imunoglobulinas e eletrólitos em equinos hígidos.

### **1.2. Objetivos Específicos**

- Validar kits bioquímicos comerciais da linha humana para determinar a concentração de alfa-1-glicoproteína ácida, imunoglobulinas G e M, transferrina e ferritina séricas em equinos;
- Validar kits bioquímicos comerciais da linha humana para determinar a concentração sérica de proteínas totais e albumina.
- Validar kits bioquímicos comerciais da linha humana para aferição do sódio, potássio, fósforo, cálcio, cloreto e magnésio.

### **1.3. Hipótese**

Os kits comerciais já disponíveis no mercado para utilização na medicina humana com suas respectivas metodologias, serão validados para uso confiável na medicina veterinária.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Proteínas totais (PT's)

As proteínas compõem a base estrutural das células, tecidos e órgãos e suas frações expressam auxílio fundamental no diagnóstico clínico, mensuradas através do soro sanguíneo (KANEKO et al., 2008). São definidas como macromoléculas, constituídas por aminoácidos, que estabelecem ligações covalentes entre si, em que a distribuição elétrica dessas ligações, associadas ao seu pH podem classificá-las como polares ou apolares (SILVA et al., 2008).

Essas substâncias são fundamentais a vida e desempenham funções como a transmissão de impulsos nervosos, catalisam reações químicas, são ferramentas carreadoras de outras moléculas, além de participarem ativamente da proteção imunológica e síntese e atuação dos hormônios no organismo (HOWORD et al., 2008; REGO, 2017).

As proteínas representam cerca de 7% do plasma sanguíneo e podem ser divididas em três grupos: a albumina, as globulinas e o fibrinogênio, que correspondem a 55%, 38,5% e 6,5% da concentração de proteínas plasmáticas, respectivamente (KANEKO et al., 2008).

Sua mensuração visa determinar a concentração dessas PTs no sangue, em que situações de elevados teores de PT (hiperproteinemia), que pode estar relacionada à desidratação, ou diminuição (hipoproteinemia) que pode estar relacionada com hemorragias, jejum alimentar prolongado, má absorção de nutrientes pelo trato gastrintestinal, bem como menor produção de proteínas, observada em casos de insuficiência hepática, ou perdas devido a nefropatias e enteropatias (THRALL et al., 2017).

Sob essa perspectiva, obtêm-se as proteínas de fase aguda (PFA), que recebem essa denominação por constituírem uma classe de proteínas a qual aumentam ou diminuem a concentração plasmática em virtude a uma inflamação, gerando a resposta de fase aguda (QUEIROZ, 2016). Em função dessas respostas, essas PFA são lançadas na corrente sanguínea e sua concentração dependerá da severidade da causa (XAVIER, 2011). Entretanto, quando a inflamação não é detectada através dos sinais clínicos, pode evoluir a infecções subclínicas, ocasionando prejuízos ao desenvolvimento e desempenho do animal (CRISMAN et al., 2008).

Neste sentido, a utilização do método laboratorial de Eletroforese de Proteínas Séricas (EPS) permite o fracionamento das proteínas presentes no sangue conforme suas cargas elétricas (SILVA et al., 2008). Esse teste é comumente aplicado na investigação de anormalidades proteicas e são essenciais a confiabilidade do diagnóstico, em que seus resultados são expressos de forma percentual e a concentração das frações mensuradas é ilustrada de forma gráfica (MANSUR, 2022).

Segundo Cray et al. (2009), nas coletas de sangue, ao realizar a separação do soro, é possível observar uma elevada quantidade e diversidade de proteínas atuando em vários processos fisiológicos, carreando outras moléculas, íons e enzimas, auxiliando na defesa do organismo pelas respostas imunológicas, além de participar dos fatores de coagulação, e entre outras atividades. Mediante a essa essencialidade da proteína às atividades normais do organismo, a clínica depende das avaliações de suas frações, a fim de obter informações precisas sobre possíveis desordens agudas e crônicas que podem estar acometendo o paciente.

## **2.2. Globulinas**

Compreende-se por globulinas séricas totais, a fração constituinte da proteína plasmática, que pode ser obtida através do cálculo de diferença entre as concentrações de proteínas totais e albumina (CARDOSO, 2008). Essas globulinas são formadas pelas imunoglobulinas (Igs) e as não-imunoglobulinas, em que a síntese e armazenamento das não-imunoglobulinas ocorrem no fígado, que, majoritariamente, correspondem às PFA, cuja aumento da produção hepática ocorrerá em resposta a uma doença inflamatória sistêmica. Enquanto, as Igs não são produzidas no fígado, e seu teor aumentado no plasma sanguíneo pode ser decorrente de elevados índices de doenças inflamatórias e infecciosas (SCOTT E STOCKHAM, 2011).

Além da classificação dos seus constituintes, a globulina pode ser classificada como alfa, beta e gama, cujo fracionamento é identificado através da eletroforese proteica, e cada uma dessas frações possuem anticorpos que desempenham funções específicas na proteção contra infecções, além do transporte de lipídeos, metais e bilirrubina, exercendo também funções primordiais à imunidade, essas colocações estão diretamente associadas à fração gama (CARDOSO, 2008).

O conhecimento dessas proteínas é de extrema importância, visto que são indicadores limitados do metabolismo proteico, bem como evidenciam a intercorrência

de processos inflamatórios, auxiliando na leitura das análises clínicas, e na obtenção de diagnósticos e tratamentos mais efetivos para cada situação (SILVA et al., 2008).

### **2.3. Resposta de fase aguda**

A resposta de fase aguda consiste em um conjunto complexo de reações inflamatórias, mediante infecção ou lesão tecidual deflagrada pela produção de mediadores inflamatórios pelas células ou tecidos lesados (JACOBSEN, 2007).

Dentre as diversas modificações orgânicas, o fígado tem sido responsabilizado pela produção exacerbada de algumas proteínas, denominadas proteínas de fase aguda (KOJ, 1996) e têm como função modular a ação do sistema imune, agindo na defesa do organismo durante uma resposta inflamatória (PETERSEN et al., 2004).

### **2.4. Proteínas de fase aguda (PFAs)**

As proteínas de fase aguda são glicoproteínas produzidas pelos hepatócitos (JACOBSEN E ANDERSEN, 2007) e que podem ser utilizadas como biomarcadores espécie-específicos quantitativos de doenças, no diagnóstico, prognóstico e no monitoramento da resposta à terapia (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CERON et al., 2005).

A magnitude das alterações nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda pode ser relacionada com a gravidade da doença e com a extensão do tecido lesado. São consideradas positivas quando elevam sua concentração sérica e negativas quando diminuem suas concentrações em resposta ao processo inflamatório. Desta forma, as concentrações das PFAs proporcionam informações importantes sobre o diagnóstico e prognóstico da doença (SERIN e ULUTAS, 2010).

#### **2.4.1 Albumina**

Considerada a proteína mais abundante do plasma sanguíneo, a albumina corresponde a cerca de 50% do total de proteínas, contribuindo em 80% na osmolaridade do plasma (CARDOSO, 2008). Entre as funcionalidades dessa proteína, é possível destacar a atuação na manutenção do pH, reserva proteica, realizando também, o transporte de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio e hormônios (GONZALES E SCHEFFER, 2002).

A albumina é classificada como uma proteína globular hidrossolúvel que é sintetizada no fígado pelos hepatócitos, e, posteriormente catabolizada nos tecidos periféricos. Apenas um terço da sua concentração corporal encontra-se no compartimento

intravascular, sendo a principal responsável pela homeostase da pressão osmótica, enquanto dois terços concentram-se no compartimento extravascular (FENNER, 2003).

Segundo Cardoso (2008), a albumina apresenta alta capacidade de ligação com outras substâncias, o que permite que ela atue na desintoxicação e inativação de compostos que possam ser tóxicos ao organismo animal. O autor ainda apresenta que a albumina equivale a cerca de 40 a 60% das proteínas séricas totais em animais sadios.

Apesar de as mudanças no organismo acontecerem lentamente, o nível de albumina pode servir como indicador do conteúdo proteico na dieta dos animais. Para que a detecção de alterações significativas nas concentrações de albumina no organismo seja realizada com exatidão, faz-se necessário que a avaliação de pelo menos um mês, em virtude da baixa velocidade de síntese e degradação dessa substância (BROMERSCHENKEL & MARTINS, 2017).

A deficiência de albumina (hipoalbuminemia), dificilmente é identificada, pela razão dos processos hemostáticos operarem com o intuito de minimizar as alterações na concentração plasmática. A hipoalbuminemia, pode estar relacionada a deficiência de absorção proteica, baixa síntese de albumina ou perda dessa substância e/ou degradação excessiva desta (CARDOSO, 2008; ALMEIDA, 2011). Ainda, animais parasitados podem apresentar diminuição nos teores de albumina sérica, podendo estar diretamente associadas a danos hepáticos, causados por parasitos gastrointestinais, doenças renais, hemorragias, síndrome da má absorção e sobreidrataação (KANEKO et al., 1997; GONZÁLES E SCHEFFER, 2002; CARDOSO, 2008).

Devido ao fígado ser o único sítio sintetizador de albumina, a hipoalbuminemia é considerada uma característica evidente de alguma doença hepática crônica. A baixa concentração de albumina no organismo também acarreta A prejuízos ao metabolismo de outras substâncias devido ao seu papel transportador (KANEKO et al., 2008). Em contrapartida, a albumina em concentrações aumentadas é proveniente de possíveis quadros de desidrataação e perda elevada de fluídos (CARDOSO, 2008).

#### 2.4.2. Transferrina (TRF)

A transferrina é uma glicoproteína responsável pelo transporte de íons ferro na circulação, cujo teor sérico tende a decrescer na presença de condição inflamatória.

(proteína de fase aguda negativa transportadora de ferro). Seu valor diagnóstico está relacionado à avaliação de enfermidades que interferem no metabolismo deste elemento (ECKERSALL, 2008).

A interleucina-1 produzida por macrófagos estimula a secreção de transferrina pelos hepatócitos e há aumento da incorporação de ferro dentro do fígado. Isso reduz a disponibilidade de ferro, retardando a invasão bacteriana (TIZARD, 2008). Di Filippo et al. (2011) encontram níveis de transferrina diminuídos no pré e pós-operatório de laparotomia em equinos acometidos por síndrome cólica.

Resultados semelhantes foram observados por Saquetti et al. (2008), em equinos submetidos à obstrução experimental do cólon maior. Entretanto, a TRF se mostrou aumentada no líquido amniótico de éguas com placentite (LOUX e BALL, 2018), no soro de cavalos de salto submetidos a treinamento de alta intensidade (ASSENZA et al., 2016), líquido peritoneal de asininos submetidos a ovariectomia (BARROS et al., 2018) e em equinos com obstrução intestinal (NOGUEIRA et al., 2014).

#### 2.4.3. Alfa-1 Glicoproteína Ácida (AGP)

A alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) é uma proteína glicosilada sintetizada e secretada principalmente por hepatócitos, importante no metabolismo e na imunomodulação. Possui afinidade de ligação às substâncias endógenas e exógenas, como serotonina, esteroides, heparina e a alguns fármacos (FOURNIER et al., 2000).

A AGP tecidual contribui com a manutenção da homeostase, pois protege as células epiteliais e endoteliais durante processos inflamatórios. Ela também inibe a ativação de neutrófilos, aumenta a secreção do antagonista do receptor de IL-1 por macrófagos e atua na neutralização de lipopolissacarídeos provenientes de bactérias Gram-negativas (MOORE et al., 1997).

Na espécie equina, os níveis basais da AGP se encontram entre 70 e 90 mg/L (JACOBSEN, 2007) ocorrendo aumento nas concentrações séricas da mesma após orquiectomia, jejunostomia e na laminite por sobrecarga de carboidratos (TAIRA et al., 1992; FAGLIARI et al., 1998). Acredita-se que essa proteína esteja mais associada a processos inflamatórios crônicos do que agudos (CRISMAN et al., 2008).

#### 2.4.4. Ferritina

A ferritina é considerada tanto uma proteína de armazenamento de ferro no organismo quanto como proteína de fase aguda (FRIEDRICHS et al., 2010). Ela está

presente nos tecidos (tissular) e no soro (sérica). No entanto, o seu significado clínico em cavalos ainda carece de maiores estudos (SMITH et al., 1986; HYYPPÄ et al., 2002) e entende-se que seu papel deve ser estudado conjuntamente com o estado/função do ferro (Fe) no organismo. A presença de processos inflamatórios pode induzir sequestro de ferro, condição na qual se observa hipoferrêmia, apesar do seu estoque estar adequado (SMITH et al., 1986; BORGES et al., 2007). Esse fenômeno é denominado de pseudodeficiência de ferro. Nesses casos, a ferritina sérica apresenta-se normal.

Em um estudo sobre seu comportamento em equinos acometidos por síndrome cólica, Dondi et al. (2015), observaram que 14 de 54 cavalos apresentaram diminuição na concentração de ferritina, e a hipoferritinemia foi considerada leve em seis deles. Nesse estudo foi detectada correlação entre concentração sérica de ferritina e contagem global de leucócitos, suscitando um possível papel da ferritina como proteína de fase aguda em cavalos, como sugerido anteriormente por Smith et al. (1986).

## **2.5. Eletrólitos**

### **2.5.1 Sódio ( $\text{Na}^+$ )**

A concentração de sódio e o balanço hídrico corporal estão intimamente ligados e, portanto, ao considerar as razões para anormalidades nas concentrações séricas de  $\text{Na}^+$ , é preciso também levar em consideração o equilíbrio hídrico (ESTELL, 2017). A hipernatremia ocorre se houver excesso de  $\text{Na}^+$  (raro) ou diminuição do conteúdo de água, contudo a administração inadequada de fluidos hipertônicos também pode levar ao excesso de  $\text{Na}^+$ . A maioria das causas de hipernatremia inclui perda de água pura ou perda de fluidos hipotônicos, onde a perda de água é maior que a perda de eletrólitos. A hiponatremia ocorre mais comumente com perda de líquido isotônico e subsequente reposição hídrica ou, possivelmente, com perda de líquido hipertônico, mais  $\text{Na}^+$  perdido do que água (BOHN, 2014).

### **2.5.2 Cloreto ( $\text{Cl}^-$ )**

Cloreto, juntamente com o sódio ( $\text{Na}^+$ ) são os principais íons encontrados no líquido extracelular. Para manter a neutralidade elétrica, o  $\text{Cl}^-$  normalmente se move com o  $\text{Na}^+$  ou em oposição para com o bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ). Quando aumentos ou diminuições no cloreto ocorrem independentemente das alterações no sódio, o status

ácido base deve ser avaliado. Cloreto e sódio são os principais íons responsáveis pela diferença de íons fortes e tem um impacto significativo no pH de acordo com a teoria dos Íons Fortes de Stewart (ESTELL, 2017).

Os fatores que levam à hipernatremia e hiponatremia de forma semelhante afetam os níveis de  $\text{Cl}^-$ . A hiperclóremia pode estar associada à acidose metabólica ou ao metabolismo de compensação para alcalose respiratória. A hipocloremia pode estar associada à alcalose metabólica ou compensação metabólica da acidose respiratória (BOHN, 2014).

### 2.5.2. Cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ )

O cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) é um eletrólito muito importante que está sob rígido controle hormonal, com a calcitonina, vitamina D e o paratormônio atuando para manter uma estreita concentração plasmática de  $\text{Ca}^{++}$ . Desempenha um papel importante em muitos sistemas orgânicos diferentes, incluindo transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e homeostasia, além de atuar como um segundo mensageiro para comunicação celular. Cálcio total representa tanto a forma ionizada ativa do cálcio quanto cálcio que está ligado à albumina (40-50% do  $\text{Ca}^{++}$ ). Portanto, alterações na concentração de proteínas podem resultar em aumentos ou diminuições na concentração de cálcio, embora o cálcio ionizado normalmente não seja alterado (ESTELL, 2017).

A hipercalcemia é comum em cavalos com insuficiência renal crônica e acredita-se que esteja associada a alto teor de  $\text{Ca}^{++}$  na dieta. A hipocalcemia só é relevante fisiologicamente se afetar o cálcio ionizado, e quando aguda, pode estar associada a flutter diafragmático sincrônico, tetania ou íleo. A hipocalcemia crônica pode causar anormalidades esqueléticas (BOHN, 2014).

### 2.5.3. Potássio ( $\text{K}^+$ )

O potássio ( $\text{K}^+$ ) é um íon intracelular importante e menos de 2% do  $\text{K}^+$  está livre no plasma. Portanto, as concentrações plasmáticas de  $\text{K}^+$  muitas vezes não são um reflexo preciso de todo o conteúdo corporal de  $\text{K}^+$ . A principal fonte de potássio dos equinos é a dieta e, em condições saudáveis, os rins são muito eficientes na excreção do excesso (BOHN, 2014). As causas da hipercalemia incluem insuficiência renal, uroabdômen e obstrução do fluxo urinário. Diminuições leves a moderadas na concentração de potássio são comuns cavalos com apetite reduzido. A perda de

potássio também pode ocorrer através do trato gastrointestinal como resultado de diarreia ou nos rins devido à administração de diuréticos ou hiperidratação (poliúria) (ESTELL, 2017).

#### 2.5.4. Magnésio ( $Mg^{++}$ )

O magnésio é principalmente um cátion intracelular, que como o cálcio, existe tanto na forma livre ionizada quanto ligada a albumina. A hipermagnesemia ocorre com pouca frequência em cavalos, mas é mais comumente iatrogênica como resultado de administração excessiva de sulfato de magnésio por via nasogástrica. A hipomagnesemia é comumente encontrada em cavalos com diminuição da ingestão de alimentos e é mais comumente subclínica (ESTELL, 2017).

Estudos têm mostrado a importância do magnésio em equinos com abdome agudo que são submetidos à cirurgia. Segundo Dart et al. (1992), Garcia-Lopez et al. (2001) e Delesalle et al. (2005) esses animais apresentam maior possibilidade de desenvolver decréscimo nos valores de magnésio e cálcio. Este evento ocorre possivelmente por inapetência ou anorexia, administração intravenosa de fluidos pobres em cálcio e magnésio, ressecção intestinal, íleo adinâmico e sepses. As alterações nos valores desses dois eletrólitos podem predispor contribuir para a piora do quadro de íleo adinâmico devido a sua importante participação na contração da musculatura lisa. Daí a importância da aferição desses dois eletrólitos nos casos de abdome agudo em animais da espécie equina.

#### 2.5.5. Fósforo (P)

O fósforo é encontrado principalmente nos ossos e dentes, mas também desempenha um papel no armazenamento de energia intracelular e metabolismo na forma de fosfatos de adenosina (ATP, ADP, AMP) e extracelularmente como tampão. No plasma, o fosfato existe como uma forma inorgânica que é ionizado, complexado com cátions ou ligado a proteínas, enquanto o fósforo intracelular é orgânico e não mensurado (ESTELL, 2017). Causas de hiperfosfatemia incluem insuficiência renal aguda, intoxicação por vitamina D, e hipoparatiroidismo primário. Embora a insuficiência renal aguda esteja mais comumente associada à hiperfosfatemia, a hipofosfatemia ocorre frequentemente com insuficiência renal crônica e hipercalcemia (BOHN, 2014).

## 2.6. Descrição metodológica para dosagem proteica e eletrólitos séricos

### 2.6.1. 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).

Os métodos imunotubidimétricos 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 (HERMES, 2000; SILVA, 2003; NERI, 2007; KRIMER, 2011).

As leituras são feitas em unidades de absorvância, 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).

### 2.6.2. Método do Biureto

Essa metodologia é utilizada a fim de identificar a concentração de PTs. As proteínas presentes no soro sanguíneo formam com base em suas ligações peptídicas, complexos corados com íons cúpricos em meio alcalino contidos no reagente de biureto. A intensidade da cor que será formada, é proporcional a concentração de proteínas no meio, em que os complexos excedentes apresentam absorção máxima de 545 nm. Essa metodologia pode ser realizada de maneira automatizada e adapta-se a todos os analisadores automáticos do mercado (LIMA et al., 1975; CARDOSO, 2008).

### 2.6.2. Método de Bromocresol

A albumina forma um complexo com o corante verde de bromocresol em pH ácido, realizando a modificação da absorção espectral do mesmo, tornando-se o princípio do erro proteico dos indicadores. A absorção apresentada por esse complexo (630 nm),

será proporcional as concentrações de albumina presentes na amostra coletada (KANEKO et al., 1997; CARDOSO, 2008).

### 2.6.3. Método de Ponto Final

Para a realização da técnica de ponto final as amostras são dispostas em cubetas de amostras. Os reagentes necessitam de preparação prévia, além da necessidade de utilização de um padrão (substância com valores pré-definidos), que, comumente são fornecidos pelos fabricantes, junto ao programa e o teste de qualidade que será utilizado, que por sua vez, também apresenta valores pré-estabelecidos por lote pelo fabricante (CARDOSO, 2008).

Após a aprovação da metodologia para todos os parâmetros, os testes são iniciados conforme a rotina descrita e realizados separadamente para cada analito. De modo que a leitura espectrofotométrica é realizada com base no comprimento de onda, sendo dependente da capacidade de absorção de luz de cada parâmetro mensurado (CARDOSO, 2008).

O processo é automático, em que o equipamento efetua as pipetagens das amostras e de seus respectivos reagentes, de acordo com as calibrações específicas que foram efetuadas inicialmente no programa utilizado. Ainda, realiza o cálculo das concentrações, baseando-se nas informações dos valores padrões e suas absorvâncias pertencentes. Por fim, o resultado é liberado após a amostra ter sido avaliada em todos os seus parâmetros, disponibilizando também, as unidades de medidas a serem utilizadas (CARDOSO, 2008).

## 2.7. Validação de kit bioquímico

O processo denominado 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 (WALSH, 1999). Um número estatisticamente significativo de amostras deve ser usado no 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 e diferenças de calibração (CARDOSO, 2008).

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).

#### 2.7.1. 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).

#### 2.7.2. 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).

#### 2.7.3. 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).

#### 2.7.4. 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 (HUBER, 1998).

#### 2.7.5. 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**

Este trabalho foi realizado conforme as Normas de Conduta para o uso de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão do Centro Universitário de Viçosa – UNIVIÇOSA (nº 034.2019-2) e pela Universidade Federal de Viçosa, *Campus Viçosa*.

O experimento foi conduzido no experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa Animal do Centro Universitário de Viçosa – UNIVIÇOSA e no Laboratório de Pesquisa em Medicina Interna Veterinária (LPMIV) do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob orientação dos Médicos Veterinários, Prof. Dr. José Dantas Ribeiro Filho (CRMV-MG 5316) e Waleska de Melo Ferreira Dantas (CRMV-MG 5317).

#### **3.2. Delineamento Experimental**

Foram selecionados 102 equinos adultos, da raça Mangalarga Machador, de ambos os sexos e diferentes faixas etárias, sem alterações clínicas, provenientes de três haras da região de Viçosa – MG, Zona da mata Mineira, latitude 20° 45' 14" S, longitude 42° 52' 53" W, durante o mês de fevereiro de 2020, com média de temperatura de 24°C.

Como critério de inclusão para o estudo, permaneceram aqueles animais cujo estado de saúde se enquadrou 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), totalizando 90 animais.

As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia jugular externa após a antissepsia local com álcool 70 por meio de coleta a vácuo, utilizando agulhas hipodérmicas 25x0,8mm descartáveis acopladas a adaptador de coleta à vácuo (agulha e adaptador Vacutainer BD®).

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

As amostras coletadas sem anticoagulantes foram centrifugadas, separadas em alíquotas de soro para, posteriormente, serem realizadas a mensuração sérica dos analitos, que foram dosados em triplicatas. As análises foram realizadas em um analisador bioquímico automático Bioclin 2200 (Bioclin®), utilizando os kits comerciais do mesmo fabricante.

### **3.3. Análise Bioquímica**

Para avaliação e validação do sódio e potássio, utilizou-se o método enzimático, fósforo (método UV de Ponto Final) cálcio total (método colorimétrico de ponto final), cloreto (método colorimétrico) e magnésio (método MANN YOE colorimétrico). O método de biureto foi utilizado para determinar a concentração sérica de proteínas totais e o Verde Bromocresol para mensuração de albumina.,

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

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 alfa-1-glicoproteína ácida, transferrina, imunoglobulinas G e M, permite a determinação quantitativa dessas proteínas no soro por imunoprecipitação, na presença de um polímero ativador que aumenta a sensibilidade 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.

Todas as análises foram realizadas em Analisador Bioquímico Automático Bioclin 2200 (Bioclin®), utilizando os kits comerciais do mesmo fabricante.

### **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.

Foi realizada 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. Realizou-se também a avaliação de reprodutibilidade nos dados brutos entre os valores de replicata do mesmo animal. Valores muito discrepantes indicam falha de leitura e não foram incluídos na avaliação. Após, calculou-se a média das replicatas de cada animal. Para a detecção de *Outliers* será utilizado o site *QuickCalcs*. Após, os dados foram submetidos a estatística básica descritiva para obtenção dos valores de normalidade de cada espécie, no *GraphPad Prima*.

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

1. Percentil 2,5% =  $0,025 \cdot (n+1)$
2. Percentil 97,5% =  $0,975 \cdot (n+1)$

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

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Proteinograma

Os resultados do processamento sérico de proteínas foram tabelados e estão dispostos na tabela 1 a seguir e nas figuras de 1 a 7. Os valores considerados *outliers*, após análise estatística, não estão expostos na tabela a seguir.

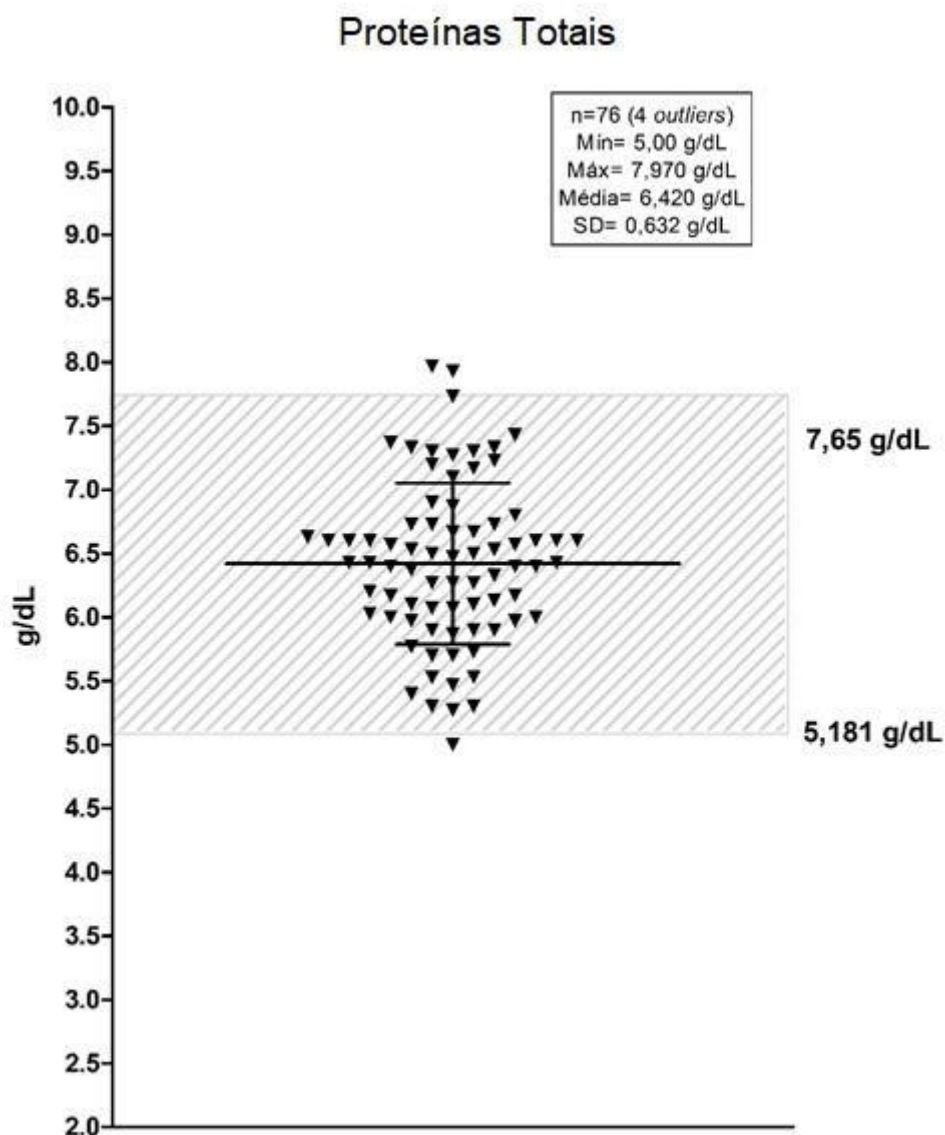
**Tabela 1.** Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança dos parâmetros proteicos avaliados em equinos hígdos.

Parâmetro	N	Média	CV	IC (95%)	
				Mínimo	Máximo
Proteínas totais (g/dL)	76	6,42±0,63	0,09	5,00	7,97
Albumina (g/dL)	79	2,62±0,33	0,12	2,00	3,70
Transferrina (mg/dL)	80	1,45±0,71	0,48	0,33	3,67
Ferritina (mg/dL)	80	8,35±15,53	1,85	0,00	124,2
Imunoglobulina G (mg/dL)	80	380,3±36,72	0,09	260,7	463,3
Imunoglobulina M (mg/dL)	80	66,74±19,4	0,29	27,67	105,3
Alfa-1glicoproteína ácida (mg/dL)	80	0,86±0,56	0,65	0,00	2,67

\*N = número de amostras avaliadas. \*CV = Coeficiente de variação. \*IC = Intervalo de confiança.

Ao analisar o intervalo de confiança estabelecido pelo programa estatístico, é possível constatar que todos os analitos apresentaram-se dentro dos valores de referência existentes na literatura consultada. Com base na média de 76 amostras avaliadas, a concentração de proteínas totais no presente estudo foi de  $6,42 \pm 0,63$  g/dL (Tabela 1). Resultado semelhante também foi encontrado por Mundim et al. (2004), ao avaliarem a amplitude de variação dos constituintes sanguíneos em equinos utilizados para trabalho nos centros urbanos, chegando em média de concentração de PTs de 7,67 g/dL, também apresentando-se dentro dos padrões de referência estabelecidos no estudo em questão. Ainda, comparando as médias apresentadas das amostras entre machos e fêmeas, os autores não observaram diferenças estatísticas na concentração proteica em virtude do sexo do animal, dado que não foi avaliado no presente estudo

**Figura 1.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de proteína total em equinos hígados.



Na avaliação do boxplot pode-se observar que a distribuição dos dados foi uniforme, ou seja, os resultados obtidos se encontraram de forma semelhante entre o primeiro e terceiro quartil, próximos a mediana. Esse resultado demonstrou que a análise empregada foi efetiva e que o kit utilizado foi capaz de determinar os valores de proteínas totais, como descrito por outros autores utilizando kits comerciais diferentes, porém com a mesma metodologia (Mundin, 2006; Cardoso, 2008).

É importante ressaltar que, quanto mais uniforme a distribuição dos resultados ao redor da mediana, maior será a acurácia dos resultados, dando ao clínico segurança

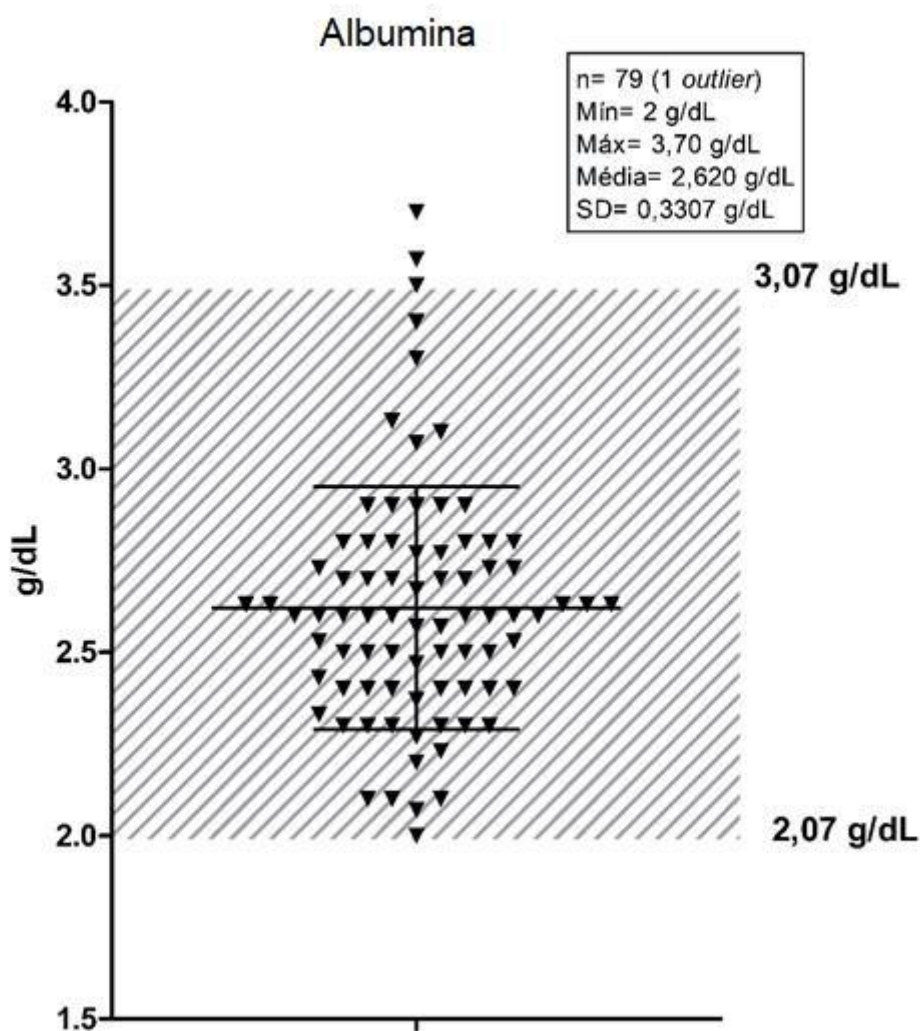
para interpretação dos resultados e, conseqüentemente, melhores diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico em animais enfermos.

Veiga et al. (2004), estudando população de cavalos da raça Crioula na região sul brasileira, encontrou resultados superiores aos obtidos neste trabalho, com médias de 8,38 g/dL e 8,15 g/dL, respectivamente. Esses valores podem ser justificados com base na metodologia utilizada (refratometria) diferir da utilizada no presente trabalho, bem como da população e condições de manejo e clima.

Segundo estudo promovido por Bromerschenkel e Martins (2017), a concentração de proteínas totais pode variar conforme a idade, níveis de estresse e/ou estado de saúde em que o animal se encontra. No presente estudo, os animais foram avaliados em seu habitat natural, sob mínimas condições de estresse, demonstrado pela mínima amplitude dos resultados e todos se encontravam saudáveis.

Nesse estudo, a albumina também se manteve dentro do limiar inferior e superior definidos em 2 g/dL e 3,10 g/dL, respectivamente, apresentando média de 2,62 g/dL (Tabela 1).

**Figura 2.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de albumina em equinos hígdos.

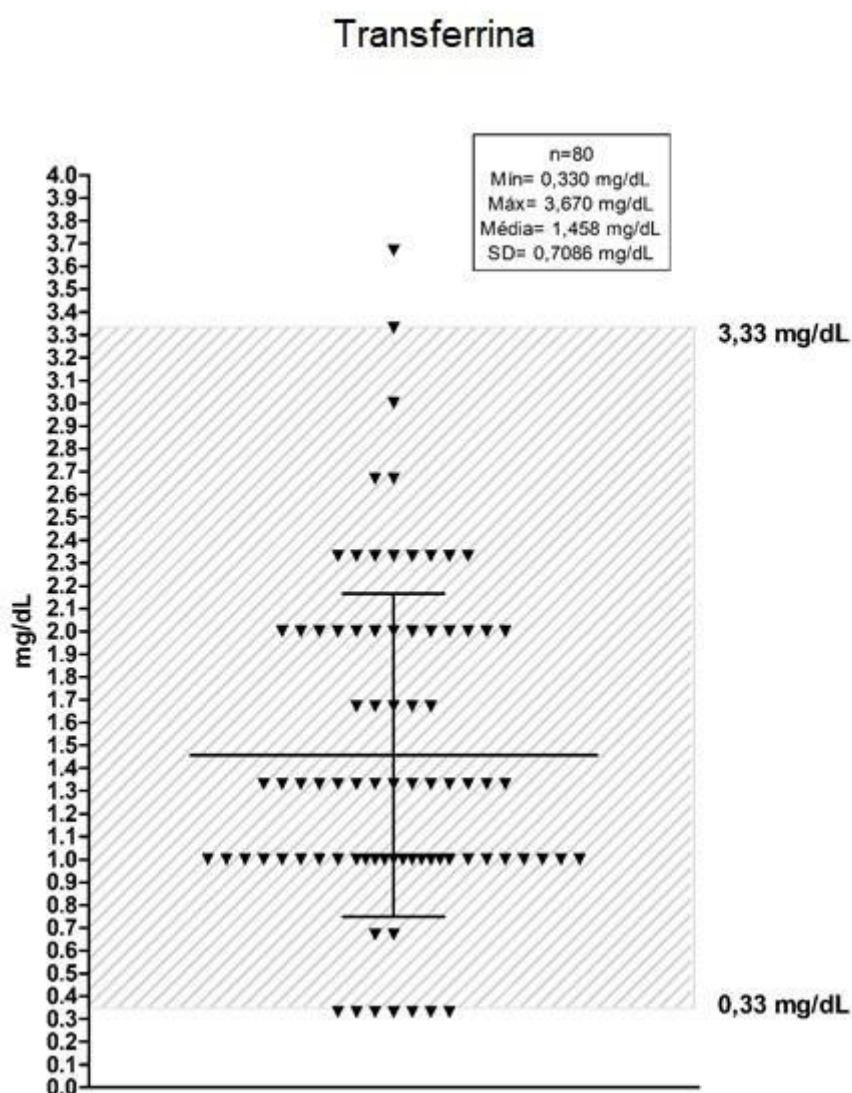


Utilizando kit do fabricante Bioclin como base para a determinação de albumina, Cardoso (2008), obteve resultado semelhante (2,78 g/dL), comparando-a com médias obtidas por outras técnicas para mensuração de albumina por distintos fabricantes (In-Vitro Human e Labtest). Tal similaridade de resultados também foi constatada por Kaneko et al. (1997) e Radosiits (2002), que encontraram médias de 3,15 e 3,3 g/dL de albumina no plasma sanguíneo de equinos adultos, apresentando-se dentro do intervalo de confiança estabelecidos pelo fabricante. Ainda, Souza et al. (2019), ao realizarem a avaliação do proteinograma sérico para equinos da raça Campeiro, observaram médias similares (2,5 g/dL). Entretanto, não foi possível comparar os

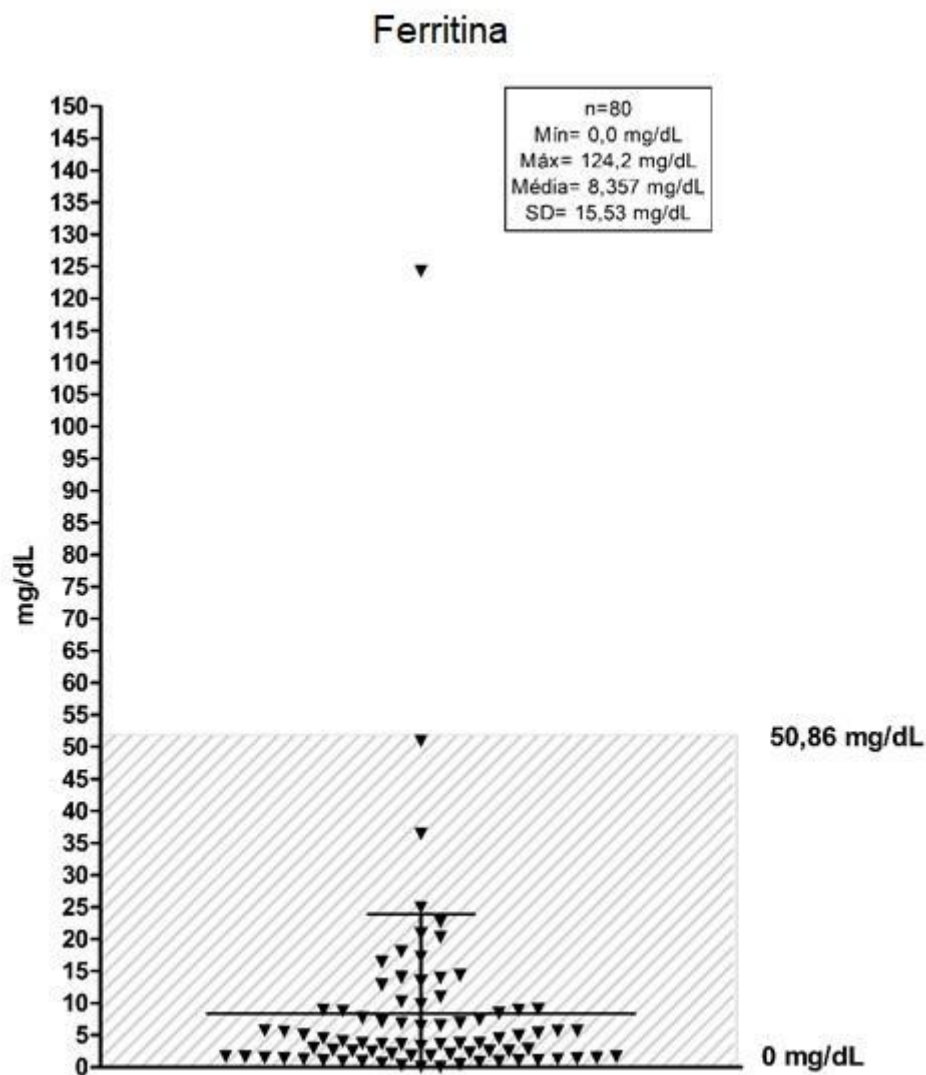
valores de referência, visto que o estudo não descreveu a metodologia para mensuração de albumina e o fabricante do kit comercial adotado.

Com base nos dados da tabela 1, reforçados na figura 3, as médias obtidas através do processamento de 80 amostras dos parâmetros transferrina e ferritina foi de 1,45 mg/dL e 8,35 mg/dL respectivamente. Entretanto, não foi possível realizar a comparação com os intervalos de confiança de outros kits, em virtude da ausência de informações para esses analitos nos kits comerciais trazidos como base comparativa.

**Figura 3.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de transferrina em equinos hígdos.



**Figura 4.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de ferritina em equinos hígidos.



Na avaliação da transferrina foi possível observar que a distribuição dos resultados não foi homogênea. Os resultados apresentados não se encontraram próximos a mediana, onde foi verificada a dispersão dos dados obtidos com várias repetições de valores abaixo do terceiro quartil, como acima do primeiro quartil. Baseado nos resultados obtidos, pode-se inferir que houve interferência da imunoprecipitação por utilização de anticorpos humanos, não demonstrando, de fato, valores compatíveis com a normalidade para essa espécie. Em contrapartida, os valores encontrados de ferritina se apresentaram, em sua maioria, com valores zerados. Além da influência dos anticorpos humanos utilizados, também pode-se

inferir que os limites inferiores de detecção do kit, podem ter influenciado nesse resultado.

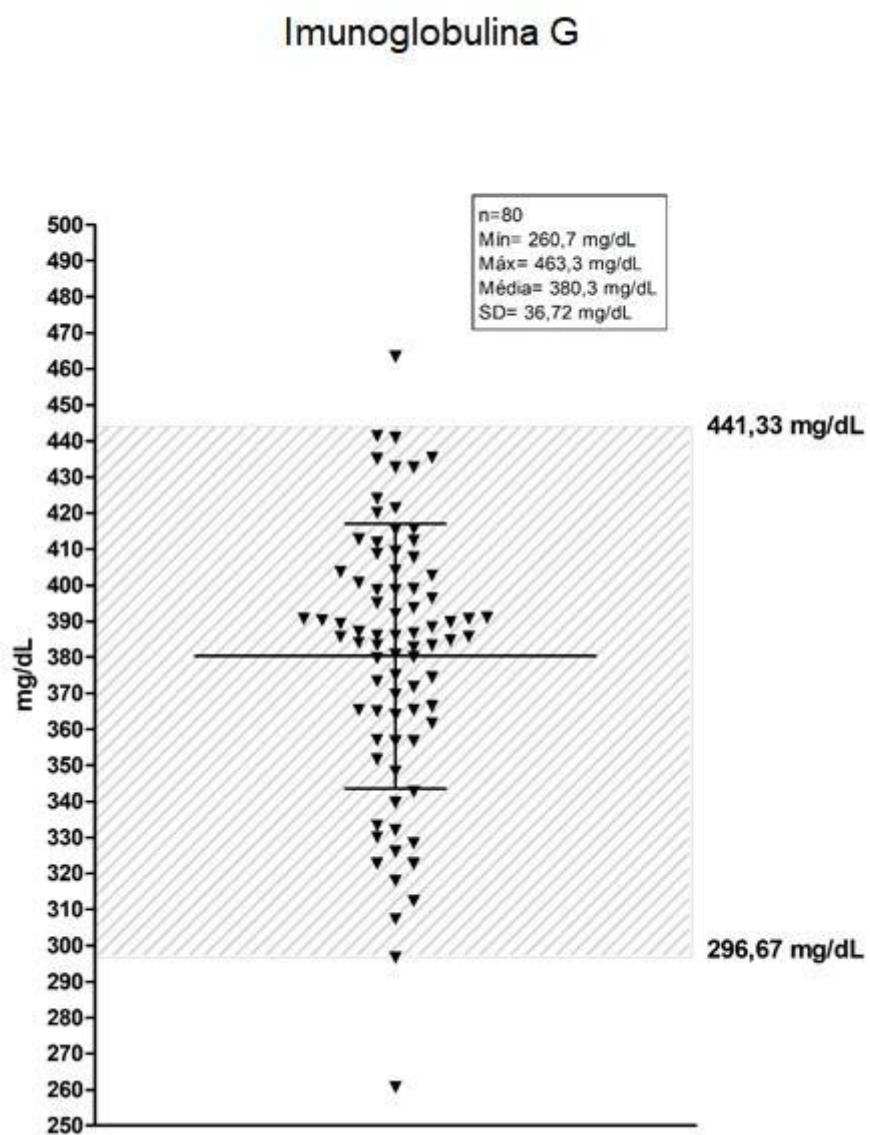
De acordo com Machado et al. (2010), a transferrina é considerada uma PFA negativa, cuja síntese é realizada nos hepatócitos e macrófagos, sendo responsável pelo transporte de ferro no plasma e nos fluidos extracelulares. Essa proteína promove a entrada de ferro nas células, garantindo que este permaneça de forma solúvel e não tóxica (PEELING et al., 2008).

Segundo Di Fillipo et al. (2011) a transferrina é uma glicoproteína responsável pelo transporte de íons ferro na circulação, cujo teor sérico tende a decrescer na presença de condição inflamatória por ação da interleucina-1 produzida por macrófagos. Esta estimula a secreção de transferrina pelos hepatócitos e há aumento da incorporação de ferro dentro do fígado, reduzindo a disponibilidade de ferro e retardando a invasão bacteriana (TIZARD, 2008). Essas observações concordam com a hipótese levantada por Kaneko et al. (1997), de que a transferrina é uma proteína de fase aguda negativa, que diminui sua concentração no soro.

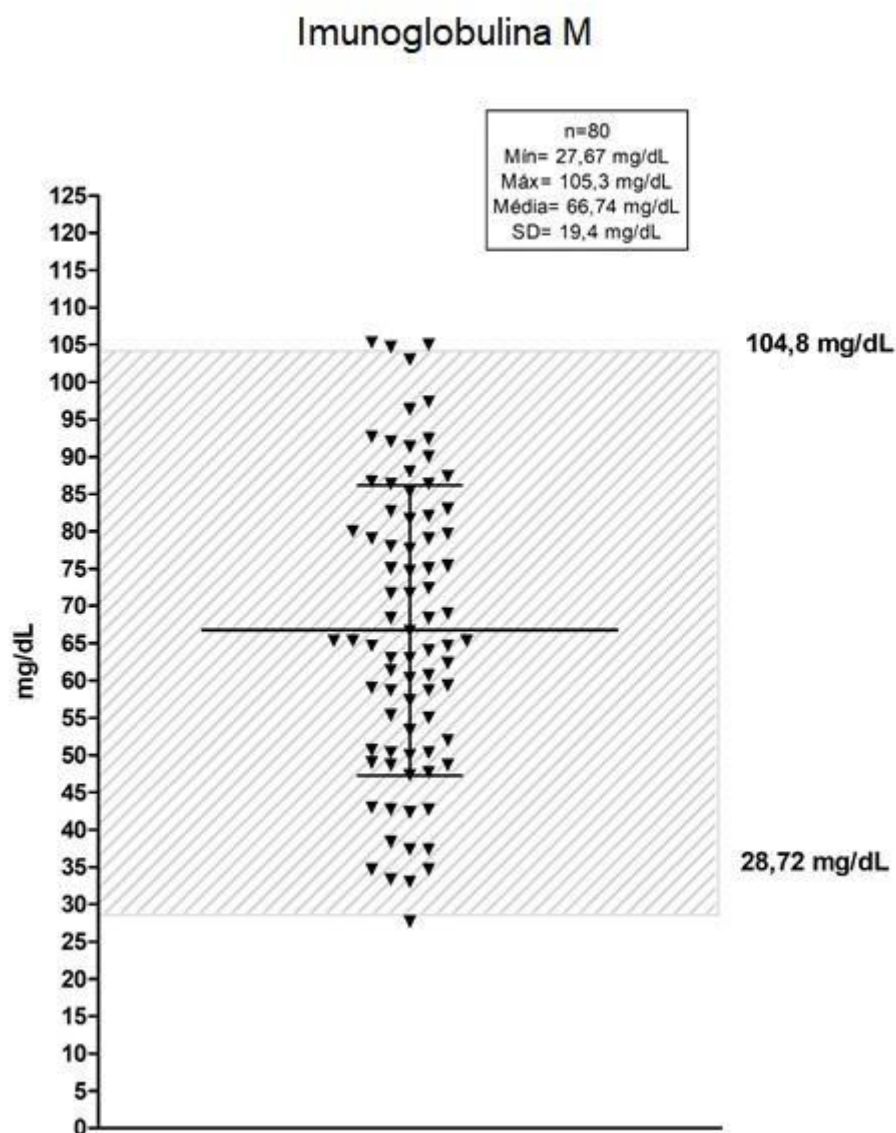
No que se refere à ferritina, o número de resultados com valor zero inviabilizaram a avaliação de repetibilidade. Sabe-se que seu papel como proteína de fase aguda em equinos carece de maiores estudos e a presença de processos inflamatórios pode induzir sequestro de ferro, condição na qual se observa hipoferremia, apesar do seu estoque estar adequado (SMITH et al., 1986; BORGES et al., 2007). Esse fenômeno é denominado de pseudodeficiência de ferro. Nesses casos, a ferritina sérica apresenta-se normal.

As figuras 5 e 6 trazem a distribuição e os valores médios, superiores e inferiores da mensuração das imunoglobulinas G e M em equinos hígidos.

**Figura 5.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de imunoglobulina G em equinos hígdos.



**Figura 6.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de imunoglobulina M em equinos hígados.



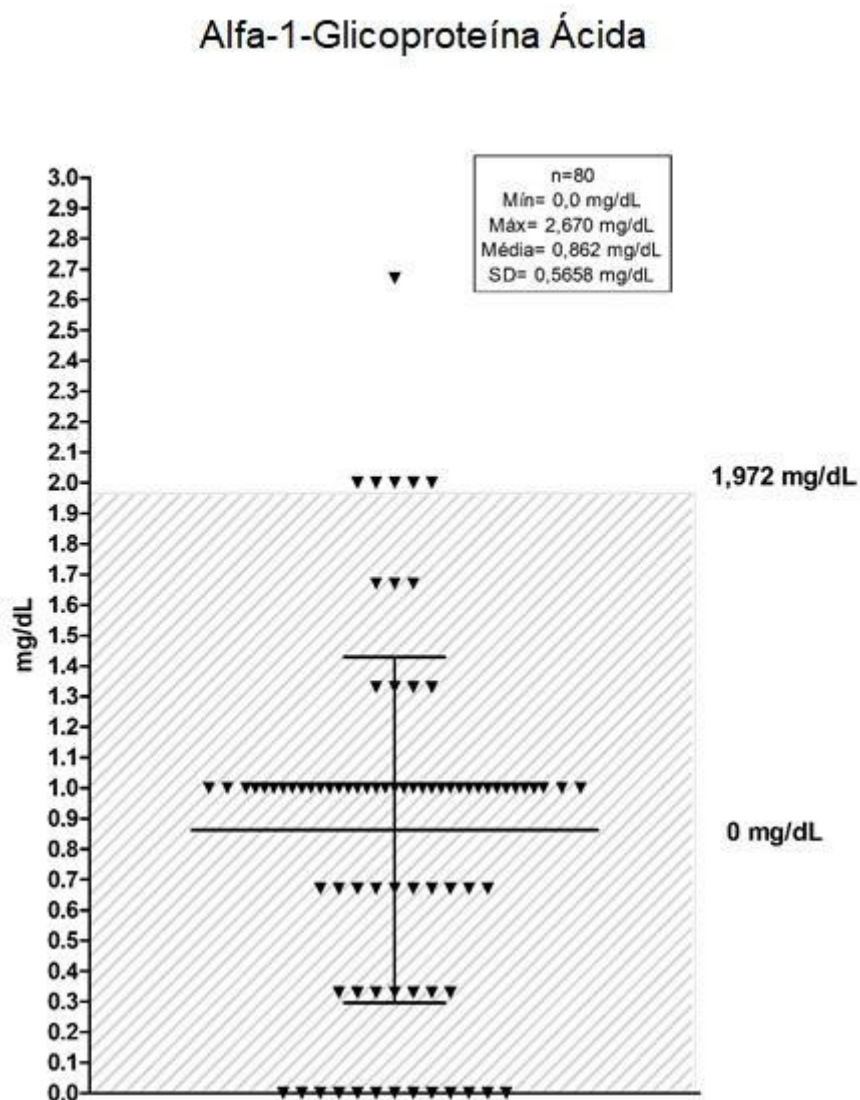
Na avaliação de ambos boxplots pode-se observar que a distribuição dos dados foi aproximadamente uniforme, com os resultados de mensuração obtidos se encontrando majoritariamente entre o primeiro e terceiro quartil, próximos a mediana. Os resultados dispersos abaixo do primeiro quartil e acima do terceiro quartil para ambas imunoglobulinas se mostraram equivalentes, contribuindo para uma maior amplitude no intervalo de referência, bem como maior variabilidade ao redor da média, semelhante a resultados encontrados com metodologia eletroforética, permanecendo dentro do intervalo de confiança. Esse resultado demonstrou que a análise empregada foi efetiva e que o kit utilizado foi capaz de determinar com

confiabilidade a amplitude dos valores das imunoglobulinas G e M. Souto (2019), ao comparar o proteinograma sérico de equinos acometidos por cólica e animais sadios, pôde constatar que no momento zero de avaliação (chegada na clínica), os animais hígidos (grupo controle) apresentaram maiores concentrações séricas de IgG de cadeia pesada (média de  $764 \pm 404$ ), contudo o trabalho supracitado realizou a mensuração de imunoglobulinas por método eletroforético (SDS-PAGE). Kaneko et al. (2008), expõe que a IgG corresponde a classe de imunoglobulinas encontradas em maior concentração no soro, sendo responsáveis pela resposta humoral e produzidas pelo sistema imune em resposta a estímulos antigênicos. A IgG é a imunoglobulina padrão-ouro para determinar o sucesso ou a falha na transferência de imunidade passiva via colostro em equinos. Bromerschenkel e Martins (2017) puderam inferir que equinos neonatos manifestaram maiores concentrações de PTs após a ingestão do colostro. Kuhl e colaboradores (2011), também chegaram a essa conclusão, ao avaliarem os parâmetros proteicos de potros após o nascimento e nas 12 horas e 72 horas após a ingestão do colostro, sendo possível observar que os maiores teores de PTs se deram após as 72h de vida e, conseqüentemente, mamada do colostro

Por sua vez, a IgM é um pentâmero cíclico que atua na imunidade antecedendo a produção de IgG (KANEKO et al., 2008). Perkins et al. (2003), avaliando as concentrações de IgG e IgM em equinos adultos hígidos encontrou valores semelhantes para IgM aos observados no presente trabalho. Segundo esses autores, em equinos adultos hígidos a IgM é a imunoglobulina inicialmente produzida, e a exposição contínua ao antígeno induz aumentos em outros isotipos, principalmente IgG, sem provocar aumento adicional nas concentrações séricas de IgM. Esta representa aproximadamente 10% da imunoglobulina sérica total e, em contraste com a IgG sérica, a IgM materna tem uma meia-vida mais curta (5 a 16 dias). Os mesmos autores observaram que concentrações de IgM sérica menores que 60 mg/dL ocorrem em cavalos com linfoma entre outras doenças, e as concentrações aumentam na maioria dos cavalos com doenças não neoplásicas assim que a queixa clínica inicial é resolvida.

A média sérica encontrada de alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) foi de 0,65 mg/dL. (Figura 7).

**Figura 7.** Gráfico boxplot de distribuição do valor obtido de alfa glicoproteína ácida (AGP) em equinos hígidios.



Na avaliação da alfa-1-glicoproteína ácida foi possível observar que, semelhante aos gráficos das proteínas transferrina e ferritina, a distribuição dos resultados não foi homogênea, não estando os resultados apresentados próximos a mediana, verificando-se a dispersão dos dados obtidos com várias tendências de repetições de valores, tanto abaixo do primeiro quartil quanto acima do terceiro quartil. Baseado nos resultados obtidos, pode-se inferir que houve interferência da imunoprecipitação por utilização de anticorpos humanos, não demonstrando, de fato, valores compatíveis com a normalidade para essa espécie. Além da influência dos anticorpos humanos utilizados, também pode-se inferir, dado o número de repetições

de valor zero, que os limites inferiores de detecção do kit podem ter influenciado nesse resultado.

Souto (2019), utilizando metodologia de eletroforese SDS-PAGE encontrou média de  $57,1 \pm 11,34$  mg/dL em animais hígidos (grupo controle) e discute que a alfa-1-glicoproteína ácida demonstrou ser uma PFA interessante a ser analisada mesmo não tendo apresentado diferença estatística nos momentos avaliados devido sua concentração ter se mantido elevada nos animais acometidos tanto por cólicas diagnosticadas como de resolução clínica quanto cirúrgica.

Ainda em relação a alfa-1-glicoproteína ácida, Di Filippo et al. (2011), constataram maiores teores dessa proteína em animais dos grupos 2 e 3 (equinos com cólica submetidos a laparotomia para correção da torção de cólon e equinos com cólica submetidos a laparotomia para correção de íleo, de forma respectiva), em todos os momentos de avaliação pré e pós-operatório. Os autores justificam esse ocorrido com base na teoria de Murata et al. (2004), que aponta que a AGP desempenha duas funções fisiológicas, em que, na primeira apresenta afinidade e ligação com fármacos e metabólitos endógenos, tais como a heparina, histamina, serotonina, esteroides e catecolaminas e a imunomodulação. Ademais, auxilia na remoção de lipopolissacarídeos (LPS) da circulação através da ligação direta estabelecida com os mesmos, neutralizando sua toxicidade, como esclarecido por MOORE et al. (1997).

Ainda segundo Souto (2019), a  $\alpha$ -glicoproteína ácida demonstrou ser uma PFA interessante a ser analisada mesmo não tendo apresentado diferença estatística nos momentos avaliados devido sua concentração ter se mantido elevada nos animais acometidos tanto por cólicas diagnosticadas como de resolução clínica quanto cirúrgica.

## 4.2. Eletrólitos

Os resultados do processamento sérico dos eletrólitos foram tabelados e estão dispostos na tabela a seguir e nas figuras de 8 a 13. Os valores considerados *outliers*, após análise estatística, não estão expostos na tabela a seguir.

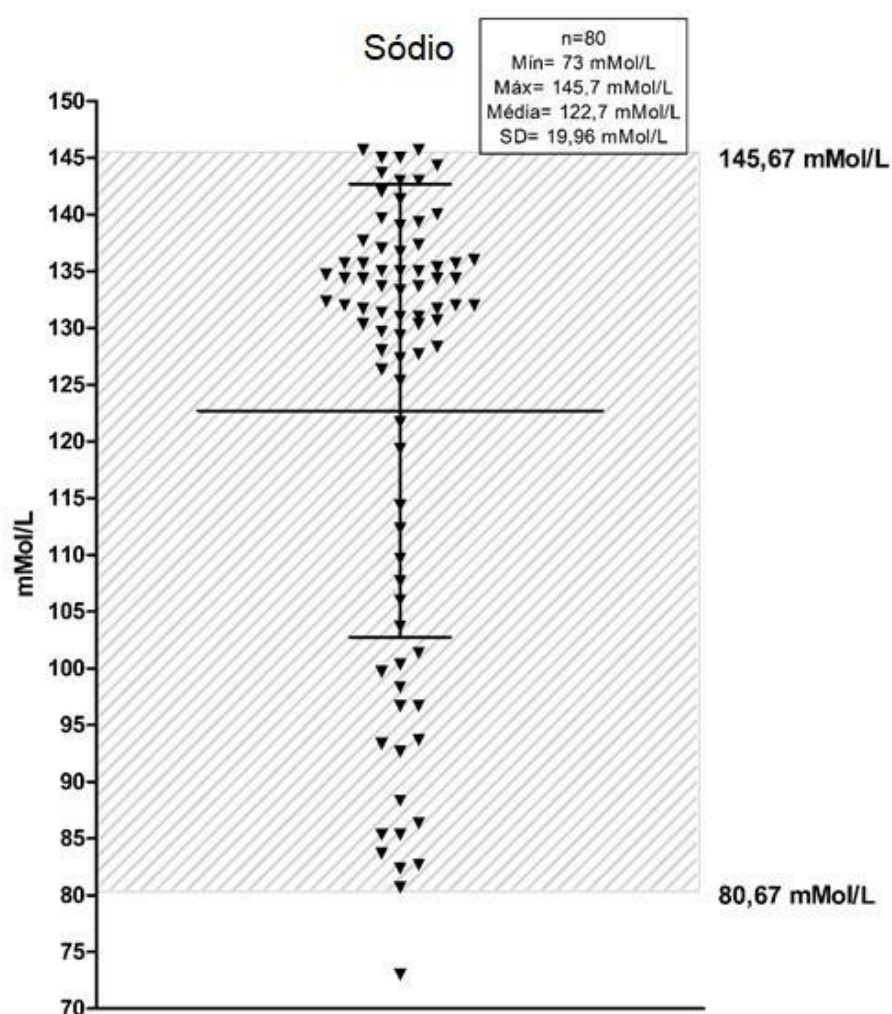
**Tabela 2.** Coeficiente de variação, valor mínimo, valor máximo, média, desvio padrão e intervalo de confiança dos eletrólitos avaliados em equinos hígidos.

Parâmetro	N	Média	CV	IC (95%)	
				Mínimo	Máximo
Sódio (mMol/L)	80	122,70±19,96	0,16	73,0	145,7

Potássio (mMol/L)	80	3,75±0,53	0,14	2,50	4,90
Cloreto (mEq/L)	80	89,03±2,76	0,03	80,67	94,33
Cálcio total (mg/dL)	75	10,41±0,76	0,07	8,03	12,70
Fósforo (mg/dL)	79	3,03±0,82	0,27	2,03	6,30
Magnésio (mg/dL)	80	1,58±0,56	0,35	0,17	3,33

\*N = número de amostras avaliadas. \*CV = Coeficiente de variação. \*IC = Intervalo de confiança.

**Figura 8.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de sódio (Na) em equinos hípidos.



Na avaliação do sódio, foi possível verificar no gráfico boxplot que a maior parte dos resultados obtidos estavam concentrados no primeiro quartil. Esses resultados demonstraram que, apesar de estarem em consonância com os valores de referência encontrados na literatura, os demais resultados encontrados abaixo do terceiro quartil não se apresentaram compatíveis com a vida em equinos saudáveis. Tendo em vista

que a média de  $\text{Na}^+$  verificada foi de 122,70 mMol/L, resultados encontrados por Mundim et al. (2004) definiram concentrações médias de 132 mMol/L em equinos hígidos utilizado para trabalho em centros urbanos. Coelho et al. (2011), ao avaliar cavalos atletas em repouso, antes da atividade e depois da atividade atlética, também constatou médias parecidas de 141,5 mMol/L, 154,5 mMol/L e 139,4 mMol/L, respectivamente. Os autores justificaram que o aumento significativo de  $\text{Na}^+$  antes da prova pode ser consequência do transporte dos animais até o local da prova, em que durante o percurso há restrição de alimento e água.

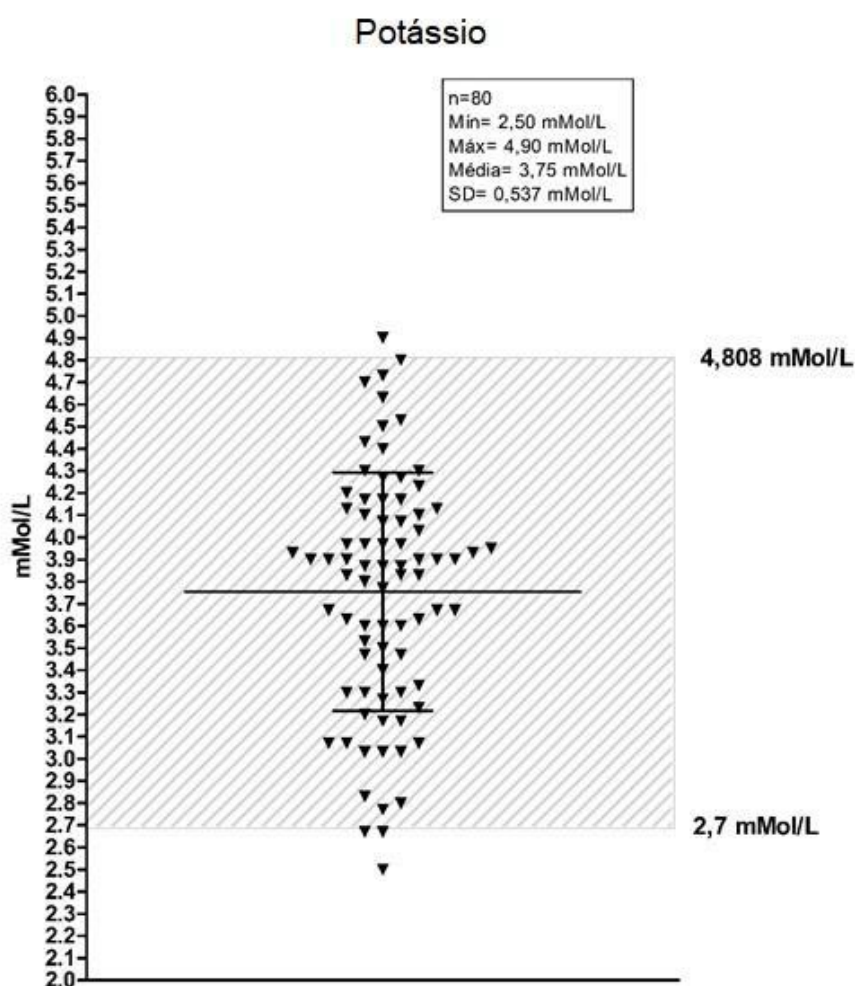
Hughes e Bardell (2019) avaliando 139 equinos hígidos sistemicamente e referenciados para cirurgias eletivas encontram valores de referência entre 133 e 141 mMol/L para o sódio. Diferindo do presente estudo, esses autores utilizaram amostras de sangue arterial e a metodologia de íons seletivos mensurados por aparelho de hemogasometria. Os valores de limite inferior encontrados na avaliação do kit Bioclin não encontram paralelo nas outras referências comparadas na imagem, bem como na literatura consultada. Como a metodologia enzimática ainda não é amplamente estudada para análise desse eletrólito, acredita-se que há necessidades de novos estudos para melhor composição dos reagentes nos kits com essa finalidade.

Segundo Ribeiro Filho et al. (2020), a hiponatremia é condição de desequilíbrio eletrolítico comum em equinos adultos e potros acometidos por refluxo enterogástrico e colites, e seu tratamento requer correção cautelosa para restabelecimento da concentração do sódio com o intuito de evitar a síndrome desmielinizante. Esta última pode ocorrer em pacientes com hiponatremia acentuada ( $<120$  mEq/L) dependendo da velocidade com a qual o sódio é administrado.

De acordo com Santos (2006), alterações de elevação na concentração sérica de sódio (hipernatremia) são decorrentes do déficit hídrico em relação a concentrações de solutos corporais. Esse fator pode ser causado principalmente pela saída intracelular de sódio, bem como, por uma redução proporcional na taxa de excreção desse eletrólito por urina e suor. De maneira reversa, a diminuição de  $\text{Na}^+$  pode ser observada em animais com excessiva sudorese, visto que o suor dos equinos contém consideráveis quantidades de sódio, potássio e cloreto.

Com isso, pode-se inferir que o método enzimático utilizado nesse estudo não foi efetivo, possivelmente devido a sua composição química, para mensuração do sódio em equinos. É recomendável, nesse caso, que o fabricante reveja a composição do kit e realize adaptação para a espécie em estudo.

**Figura 9.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de potássio (K) em equinos hígidos.

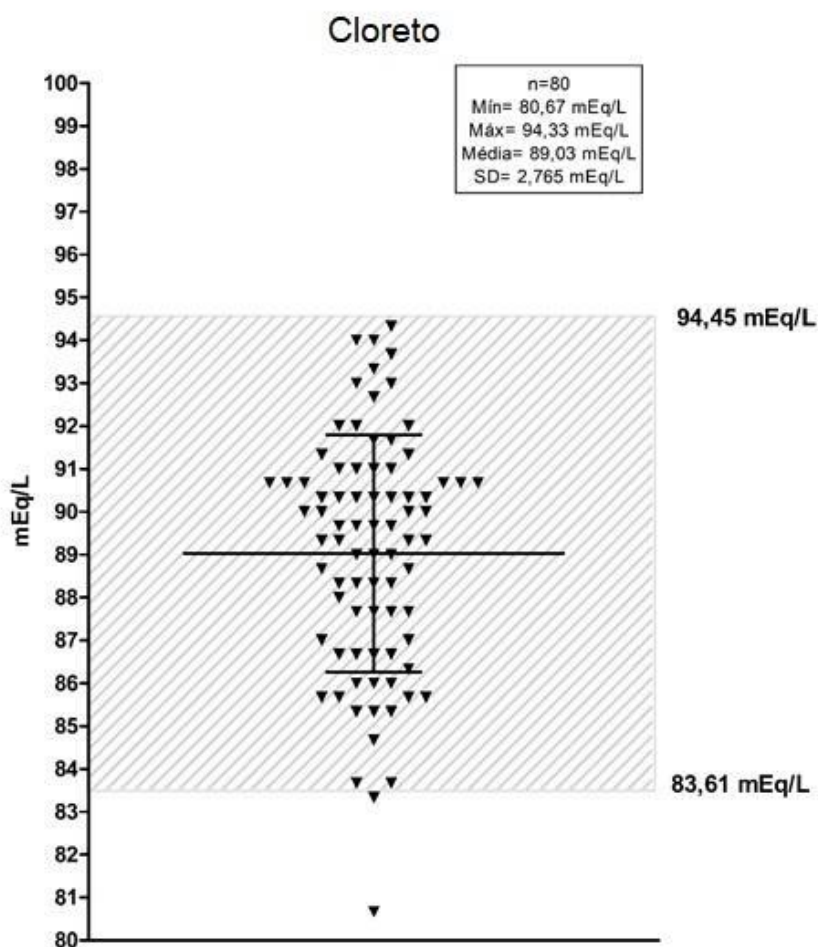


Na avaliação do boxplot pode-se observar que a distribuição dos dados para o potássio foi uniforme, ou seja, os resultados obtidos se encontraram de forma semelhantes entre o primeiro e terceiro quartil, próximos a mediana. Esse resultado demonstra que a análise empregada foi efetiva e que o kit utilizado foi capaz de determinar os valores do eletrólito potássio. Em pesquisa conduzida por Cardoso (2008), essa conformidade também pôde ser observada ao compará-las as médias obtidas pela metodologia do kit Bioclin ao de dois outros fabricantes. Essa similaridade de resultados pode ser explicada pela utilização de técnicas de avaliação semelhantes. Segundo Art e Lekeux (2005), as concentrações de  $K^+$  estão diretamente ligadas a intensidade de esforço e exercício que o animal desempenha, em que,

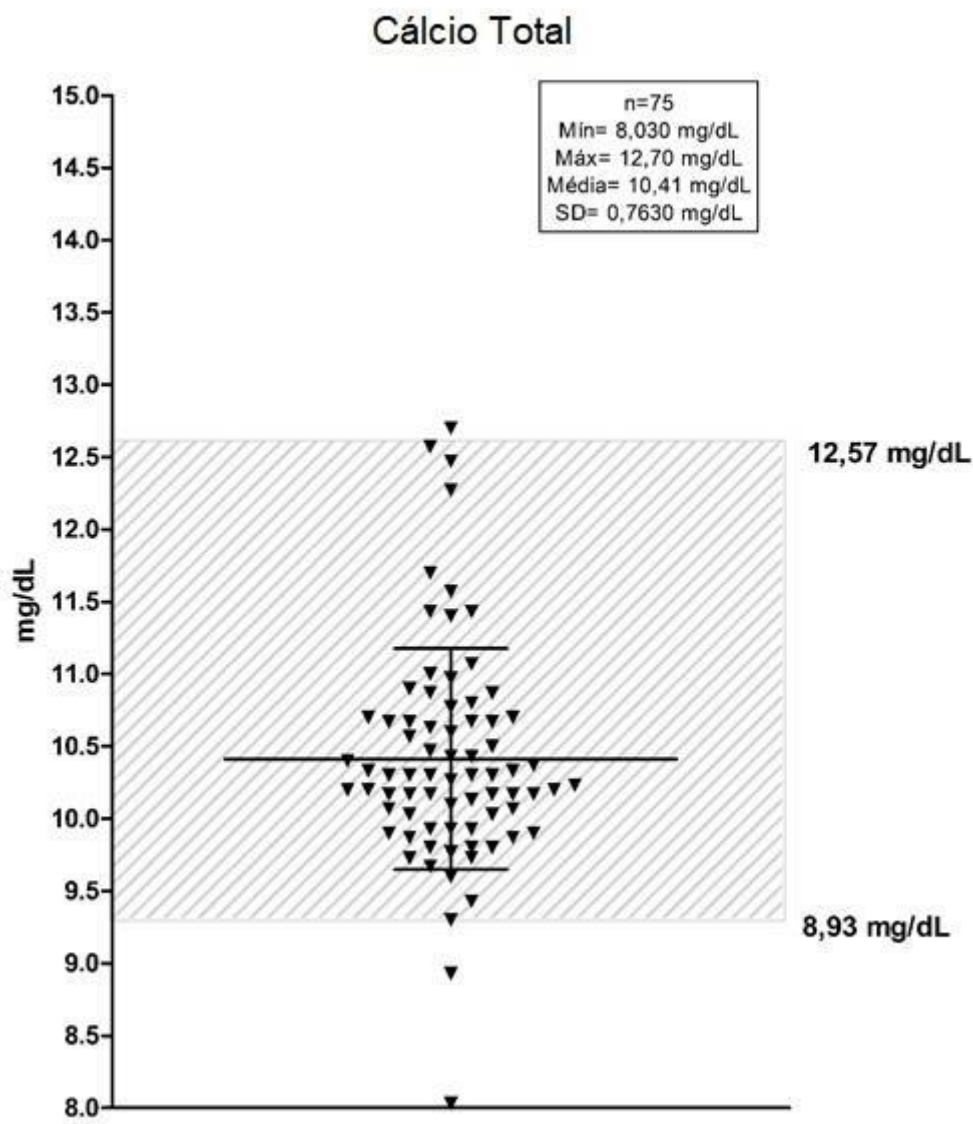
quanto mais intensa for a quantidade desse movimento, maior será o número de fibras musculares em atividade liberando potássio ao meio extracelular. Neste caso, está relacionada com a distância percorrida pelos animais desde a baia ao local de realização das provas de laço, gerando um maior esforço físico.

Os eletrólitos cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) também foram mensurados e apresentaram médias séricas de 89,03 mEq/L e 10,41 mg/dL, de forma respectiva. Os resultados estão ilustrados nas figuras 10 e 11.

**Figura 10.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de cloreto (Cl) em equinos hígidos.



**Figura 11.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de cálcio total em equinos hígdos.



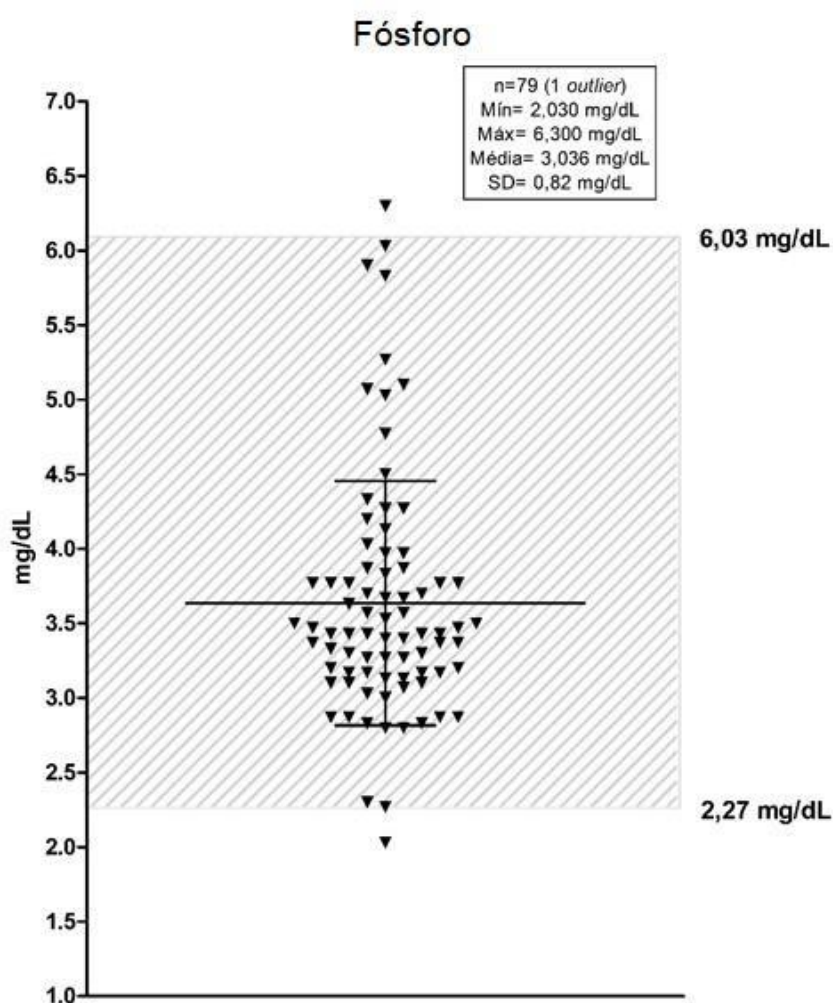
Na avaliação de ambos os boxplots anteriores, pode-se observar que a distribuição dos dados para o cálcio e o cloreto apresentaram resultados distribuídos de forma semelhante entre o primeiro e terceiro quartil, próximos a mediana, demonstrando que a análise empregada foi efetiva e que o kit utilizado foi capaz de determinar os valores para ambos os eletrólitos. Em pesquisa conduzida por Cardoso (2008), essa conformidade também pôde ser observada, encontrando médias semelhantes e ao compará-las pela metodologia do kit Bioclin ao de dois outros fabricantes.

Respostas semelhantes foram obtidas por Mundim et al. (2004), com média de 82,43 mEq/L de  $\text{Cl}^-$  e 10,01 mg/dL de Ca total. Os autores ressaltaram que embora os resultados estejam dentro da amplitude de variação normal do experimento, valores de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{++}$  abaixo do estimado, podem ser reflexo de uma suplementação mineral inadequada, bem como, podendo ser atribuída também a perdas por sudorese (KANEKO et al., 1997).

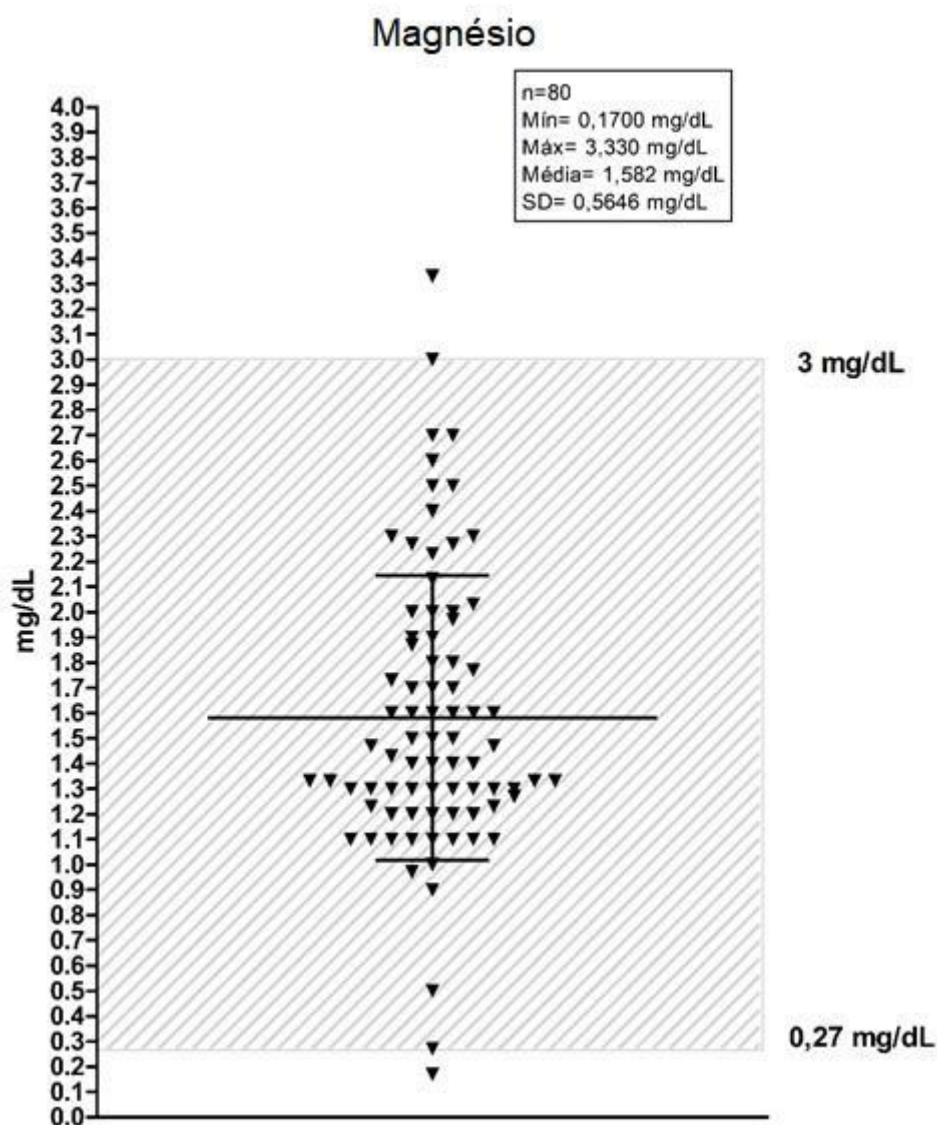
Ribeiro et al. (2004), avaliando os constituintes séricos de equinos atletas antes e após provas de corrida de longa distância, observou quedas significativas nas concentrações séricas de  $\text{Ca}^{++}$  entre o final do primeiro dia e início do segundo dia de competição, que pode estar associada aos atributos mencionados.

As médias encontradas para os parâmetros fósforo (P) e magnésio (Mg), foram 3,03 mg/dL e 1,58 mg/dL, respectivamente. Os resultados estão ilustrados nas figuras 12 e 13.

**Figura 12.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores obtidos de fósforo em equinos hígidos.



**Figura 13.** Gráfico boxplot de distribuição dos valores de magnésio obtidos em equinos hípidos.



Do mesmo modo, na avaliação de ambos os boxplots anteriores, pode-se observar que a distribuição dos dados para o fósforo e o magnésio apresentou resultados distribuídos de forma semelhante entre o primeiro e terceiro quartil, próximos a mediana, demonstrando que a análise empregada foi efetiva e que o kit utilizado foi capaz de determinar os valores para ambos os eletrólitos. Para a concentração de fósforo, Mundim et al. (2004), obteve médias similares entre 3,0 mg/dL e 3,1 mg/dL, estando dentro dos padrões estabelecidos como normais para equinos citados por Duncan e Prasse (1982) e Kaneko (1989). A diferença desses parâmetros com os demais fabricantes apresentados pode ser justificada pela

diferenciação das técnicas de avaliação adotadas, que, conseqüentemente, maximiza as diferenças entre os kits comparados.

Cardoso (2008), encontrou valores semelhantes de Mg para o kit Bioclin (1,70 mg/dL. Estudo de Alves et al. (2005), também constataram médias semelhantes com concentrações de 1,0 mg/dL de magnésio, apresentando-se dentro das conformidades estabelecidas pelo mesmo fabricante. Em contrapartida, Costa et al. (2002), observaram hipomagnesemia em cavalos com obstrução simples de intestino grosso, que, possivelmente, estariam acompanhadas de deficiência de outros eletrólitos.

Garcia-Lopez et al. observaram que equinos acometidos por doença gastrointestinal e submetidos à cirurgia correm o risco de desenvolver desequilíbrios de magnésio e cálcio. Ainda observaram também que as concentrações séricas de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> totais foram menos sensíveis do que Mg e Ca ionizados na detecção de cavalos com hipomagnesemia e hipocalcemia, que a detecção precoce dessas alterações pode ajudar a reduzir a taxa de mortalidade em equinos com cólica.

Contudo, todos os resultados trazidos poderão ser utilizados como referência para outros trabalhos científicos e contribuir com novas investigações sobre a validação de kits bioquímicos de proteinograma e eletrólitos séricos para equinos.

## 5. CONCLUSÕES

A hipótese postulada para esse estudo foi parcialmente comprovada, uma vez que os kits comerciais já disponíveis no mercado para mensuração dos analitos avaliados, com suas respectivas metodologias, têm validação para utilização em medicina veterinária. Os kits utilizados para a mensuração da proteína total, albumina, imunoglobulinas M e G e da alfa-1 glicoproteína ácida podem ser utilizados em equinos.

Para a mensuração de transferrina e ferritina, os kits não demonstraram efetividade, devido às limitações quanto à especificidade e limite de detecção inferior.

Os kits para mensuração de magnésio, cálcio, fósforo, cloreto e potássio em equinos foram validados. Entretanto, o kit para mensuração do sódio não é adequado para a utilização em equinos devido incompatibilidade com os valores de normalidade para a espécie equina.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, B. F. M. Efeito da hemólise sobre o perfil bioquímico sérico canino, bovino e equino. **Medicina Veterinária** (UFRPE), v. 5, p. 12-17, 2011.
- ALVES, G. E. S., RIBEIRO FILHO, J. D., OLIVEIRA, H. P., ABREU, J. M. G. Tratamento da compactação experimental do cólon maior em equinos: resultados de laboratório e exames bioquímicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 281-287.
- 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.
- ART, T., LEKEUX, P: Exercise-induced physiological adjustments to stressful conditions in sports horses. **Livest Prod Sc**, v. 72, p. 101-111. 2005.
- ASSENZA, A.; CONGIU, F.; GIANNETTO, C.; FAZIO, F. Serum iron, ferritin, transferrin and haptoglobin concentration variations during repeated show jumping competition in horse. **Acta Veterinaria Brno**, v.85, p. 343-347, 2016.
- ÁVILA, S. L. M.; FERREIRA, A. W. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes, 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001, 443p.
- BARROS, I. O.; FONSECA, N. B. S.; NUNES, T. L. et al. Resposta inflamatória peritoneal de asininos (*Equus asinus*) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v. 70, p. 1468-1476, 2018.
- BOCHENEK, D. P. **Comparação entre os métodos de Imunoturbidimetria e Quimioluminescência para dosagem sérica de ferritina**. Novo Hamburgo: Centro Universitário Fevale. 2007.
- BOHN, A.A. Acid-base and electrolytes. In: WALTON, R.M. **Equine Clinical Pathology**. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 2014. p.103-116.
- BORGES, A. S.; DIVERS, T. J., STOKOL, T, MOHAMMED, O. H. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 3, p. 489-394, 2007.
- BROMERSCHENKEL, I.; MARTINS, C. B. Proteinograma sérico em neonatos equinos. **Revista Científica em Medicina Veterinária-UNORP**, v. 1, p. 56-62, 2017.
- BRUGTS, M. P.; LUERMAN, J.; LENTJES, E. et al. Heterophilic antibodies may be a cause of falsely low total IGF1 levels. **European Journal of Endocrinology**, v.161, p.561-565, 2009.
- CARDOSO, Carlos Antônio. **Comparação de kits comerciais na dosagem de constituintes bioquímicos do sangue em equinos hípidos**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia, diagnóstico e controle de doenças) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.
- CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85-99,

2005.

COELHO, C. S., LOPES, P. F. R., PISSINATI, G. L. et al. Influência do exercício físico sobre sódio e potássio séricos em equinos da raça Quarto de Milha e mestiços submetidos à prova de laço em dupla. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 18, p. 32-35, 2011.

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

CRISMAN, M. V.; SCARRAT, W. K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 2, p. 285-297, 2008.

DART, A.J.; SNYDER, J.R.; SPIER, S.J. et al. Ionized calcium concentration in horses with surgically managed gastrointestinal disease: 147 cases (1988-1990). **J Am Vet Med Assoc**, v. 201, p. 1244-1248, 1992.

DELESALLE, C.; DEWULF, J.; LEFEBVRE, R.A. et al. Use of plasma ionized calcium levels and Ca<sup>2+</sup> substitution response patterns as prognostic parameters for ileus and survival in colic horses. **Vet Q**, v. 27, p. 157-172, 2005.

DI FILIPPO, P. A.; NOGUEIRA, A. F. DA S.; SANTANA, A. E. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, transferrina e  $\alpha$ 1-antitripsina, em equinos com cólica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2108–2113, 2011.

DONDI, F.; LUKACS, R. M.; GENTILINI, F.; RINNOVATI, R.; SPADARI, A.; ROMAGNOLI, N. Serum amyloid A, haptoglobin, and ferritin in horses with colic: association with common clinicopathological variables and short-term outcome. **The Veterinary Journal**, v. 205, p. 50–55, 2015.

DUNCAN, J. R.; PRASSE, K. W. Valores normais. **Patologia clínica veterinária**. UFSM, Santa Maria, 1982, p. 165-170.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6<sup>a</sup> ed. Burlington: Academic Press, 2008, p.117-155.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23-27, 2010.

ESTELL, K. E. Electrolytes. In: PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. **Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics**. 1.ed. New York: John Wiley & Sons, 2018. p.67-74.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de equinos acometidos por abdômem agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 559–567, dez. 2002.

FAGLIARI, J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 10, p. 1234-1237, 1998.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Food and agriculture data**. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 12 de dez. de 2023.

FENNER, W. R. Consulta rápida em clínica veterinária. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, v.370, p. 371, 2003.

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

GALORO, C. A. O. Applicability and potential benefits of benchmarking in Brazilian clinical laboratory services. **Benchmark International Journal** v. 16, p. 817-830, 2009.

GARCIA-LOPEZ, J. M. Prevalence and prognostic importance of hypomagnesemia and hypocalcemia in horses that have colic. **American Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 1, p. 7-12, 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.

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

HOWARD, D. L., FERNANDES, W. R., SOUZA, A. T., LEAL, M. L. D. R., MIRANDOLA, R. M. S., & BENESI, F. J. Proteína total, albumina e globulinas no plasma de potras sadias da raça brasileiro de hipismo em crescimento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 24, n. 2, p. 77-82, 2008

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC International**, v. 8. p. 96-105, 1998.

HUGHES, J.; BARDELL, D. Determination of reference intervals for equine arterial blood blood-gas, acid-base and electrolyte analysis. **Veterinary Anaesthesia and Analgesia**, v. 46, n. 6, p. 765-771, 2019.

HYYPPA, S.; HOYHTYA, M.; NEVALAINEN, M. Effect of exercise on plasma ferritin concentrations: implication for the measurement of iron status. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 186-190, 2002.

JACOBSEN, S. Review of equine acute-phase proteins. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 230-235, 2007.

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

KANEKO, J. J. et al. Clinical biochemistry of domestic animals. 6ed. **New York: Academic Press**, 2008. 896p.

KANEKO, J. W.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic animals, 1997. **J Vet Res Commun**, v. 22, n. 4, p. 293-294, 1997.

KANEKO, J. J. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 4th Edition, **Academic Press**, San Diego, 932. 1989.

KOJ, A. Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 2, p. 84-94, 1996.

KUHL, J.; WINTERHOFF, N.; WULFF, M. et al. Changes in faecal bacteria and metabolic parameters in foals during the first six weeks of life. **Veterinary Microbiology**, v. 151, n. 3-4, p. 321-328, 2011.

LOUX, S. C.; BALL, B. A. The proteome of fetal fluids in mares with experimentally induced placentitis. **Placenta**, v. 64, p. 71-78, 2018.

MACHADO, L. P., KOHAYAGAWA, A., YONEZAWA, L. A., SILVEIRA, V. F.; SAITO, M. E. Metabolismo do ferro em equinos atletas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 703-711, 2010.

MANSUR, Fernanda Campos. **Validação do método imunoturbidimétrico para determinação do proteinograma sérico em cães e gatos**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Departamento de Veterinária, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2022.

MOORE, D. F.; ROSENFELD, M. R.; GRIBBON, P. M. et al. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: Interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. **Inflammation**, v.21, n.1, p.69-82, 1997.

MOREIRA, D. O., LEME, F. D. O. P., MARQUES, M. M. et al. Concentrações de proteínas totais, glicose, cálcio, fósforo, lactato, ureia e creatinina em equinos de cavalaria militar antes e após trabalho de patrulhamento urbano. **Ciência Animal Brasileira**, v. 16, p. 73-80, 2015.

MUNDIM, A. V.; TEIXEIRA, A. A.; GALO, J. A.; et al. Perfil bioquímico e osmolalidade sanguínea de equinos utilizados para trabalho em centros urbanos. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 1, 2006.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v. 168, n. 1, p. 28-40, 2004.

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.

NOGUEIRA, A. F. S.; DI FILIPPO, P. A.; ANAI, L. A. et al. Establishment of peritoneal liquid electrophoretogram from healthy horses and horses submitted to experimentally induced intestinal obstruction. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.66, p.665-671, 2014.

OLIVEIRA, A.; MENDES, M. E. Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática. 1. ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2012.

OVERMANN, J. Blood Proteins and Acute Phase Proteins. In: PUSTERLA, N.; HIGGINS, J. (Eds.). **Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics**. Hoboken, NJ: Wiley Blackwell, 2018. p. 133–138.

PEELING, P.; DAWSON, B.; GOODMAN, C. et al. Athletic induced iron deficiency: new insights into the role of inflammation, cytokines and hormones. **European Journal of Applied Physiology**, v. 103, p. 381- 391, 2008.

PERKINS, G. A.; NYDAM, D. V.; FLAMINIO, M. J. B. F.; AINSWORTH, D. W. Serum IgM concentrations in normal, fit horses and horses with lymphoma or other medical conditions. **J Vet Intern Medicine**, v. 17, p. 337-342, 2003.

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

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.

RADOSTITS, O., MAYHEW, I., & HOUSTON, D. Exame clínico e diagnóstico em veterinária. **Guanabara Koogan–R**, 1. ed, 2002, p. 231-269.

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.

RIBEIRO, M. D. **Parâmetros hematológicos de potros da raça Crioula suplementados com um hematínico**. 2004. 52f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

RIBEIRO FILHO, J. D.; CARVALHO, A. M.; PIMENTA, E. L. M. et al. Diretrizes terapêuticas para o restabelecimento do equilíbrio eletrolítico e ácido base em equinos com síndrome cólica nas condições brasileiras de atendimento. **Revista Brasileira de Medicina Equina**, ano XIV, n. 87, p. 4-14, 2020.

SANTOS, V. P. **Variações hemato-bioquímicas em equinos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercício físico**. 2006. 94 f. Tese (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

SAQUETTI, C. H. C.; FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 4, p. 794-99, 2008.

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.

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

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.

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

SMITH, J. E et al. Iron deficiency and pseudo-iron deficiency in hospitalized horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 285-287, 1986a.

SMITH, J. E. et al. Exogenous corticosteroids increase serum iron concentration in mature horses and ponies. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 188, p. 1296-1298, 1986b.

SOUTO, P. C. **Proteinograma sérico de equinos sadios e acometidos naturalmente pela síndrome cólica**. 2019. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2019.

SOUZA, A. F., SCHADE, J., RAMOS, A. F., ALBUQUERQUE, M. S. M., FONTEQUE, G. V., COSTA, D., MULLER, T. R.; FONTEQUE, J. H. Serum proteinogram of the campeiro horse. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 363-368, 2019.

TAIRA, T.; FUJINAGA, T.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; ITOH, H.; TSUNODA, N.; YAMASHITA K.; OKUMURA, M.; MIZUNO, S. Isolation and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reactive protein in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 961-965, 1992.

THRALL, M. A. et al. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, 2017. 688p.

TIZARD, I.R. **Veterinary immunology: an introduction**. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p.147.

VEIGA, A. P. M.; LOPES, S. T. A.; FRANCISCATO, C.; OLIVEIRA, L. S. S.; MERINI, L. P. Hematological values, plasma protein and fibrinogen of Criollo horse – their variation with sex, age and management. **Acta Science Veterinary**. v. 34, p. 275-279. 2006.

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

XAVIER, Patrícia Maria Braga Baptista Soares et al. **Estudo Clínico e Laboratorial da Enteropatia Proliferativa Equina**. Dissertação (Mestrado) – Apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2011.

## ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E**

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 José Dantas Ribeiro Filho – UFV e Thiago Augusto Teles de Souza – UFV, e com eles poderei manter contato pelos telefones (31) 994685866 e (32) 984043705, 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 UNIVIÇOSA (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@univicoso.com.br](mailto:cep@univicoso.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.

<b>Dados do participante da pesquisa</b>	
Nome:	
Telefone:	
e-mail:	

Local \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_