

POLLYANNA CORDEIRO SOUTO

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE EQUINOS SADIOS E ACOMETIDOS
NATURALMENTE PELA SÍNDROME CÓLICA**

Dissertação apresentada junto ao programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2019

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S728p
2019

Souto, Pollyanna Cordeiro, 1988-

Proteínoograma sérico de equinos saudáveis e acometidos naturalmente pela síndrome cólica / Pollyanna Cordeiro Souto. – Viçosa, MG, 2019.

xi, 60 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 46-51.

1. Cavalos - Doenças. 2. Fase aguda. 3. Proteínas. 4. Inflamação. 5. Dor abdominal. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.10896

POLLYANNA CORDEIRO SOUTO

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE EQUINOS SADIOS E ACOMETIDOS
NATURALMENTE PELA SÍNDROME CÔLICA**

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: 21 de fevereiro de 2019.


Yara Fabrice R. Sanchez da Silva


Fabricio Luciani Valente


Leandro Licursi de Oliveira


Leandro Abreu da Fonseca
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A vida é feita de escolhas, cada escolha tem um preço e muitas vezes se paga alto por elas. No entanto, por mais que não se saiba ao certo o que te espera por ter escolhido certos caminhos, o fato de ter a certeza que seja a 1800 km de distância ou mais, existem pessoas torcendo por você e que te deixam mais confortáveis para que, independente desse preço a ser pago, “se você julgar que é o melhor a ser feito, que faça”, isso sim, não tem preço. Obrigada ao meu Deus por uma família (Sr. Paulo, D. Diva e Priscila) tão maravilhosa.

Aos amigos que torcem a distância. Aos amigos que Viçosa me proporcionou, uma mistura tão perfeita, tem baiano, capixaba, pernambucano, mineiro, paulista e paulistano, paraense, cearense, gaúcho, fluminense e até colombiano, quanto aprendido. Várias conversas, risos, lágrimas e muito canto “Tempo perdido_Legião Urbana”. Muito obrigada, sem dúvida vocês tornaram tudo mais leve.

Ao meu amigo e orientador. Obrigada pela troca de conhecimento, confiança, sinceridade e por sempre descomplicar qualquer situação.

A banca por ter aceitado a contribuir com o nosso trabalho.

A Universidade Federal de Viçosa pela infraestrutura disponibilizada para que fosse possível realizar do nosso estudo (Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária, Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, Núcleo de Análises de Biomoléculas e Clínica de Grandes Animais).

Ao Departamento de Zootecnia por ceder os funcionários e os animais.

Ao Departamento de Medicina Veterinária: professores, alunos, técnicos e demais funcionários, cada um fez contribuições importantes nessa etapa da minha formação. Um agradecimento especial a Rosinéia Cunha (famosa Rosi) se existe disponibilidade e atenção igual eu desconheço. Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 SÍNDROME CÓLICA	2
2.2 INFLAMAÇÃO - RESPOSTA DE FASE AGUDA.....	5
2.3 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA (PFAs)	7
2.3.1 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA POSITIVAS	7
2.3.1.1 Amilóide sérica A (ASA)	8
2.3.1.2 Proteína C reativa (PCR)	10
2.3.1.3 α 1 glicoproteína ácida (GPA)	10
2.3.1.4 Haptoglobina (Hp).....	12
2.3.1.5 α 1-antitripsina (α 1-antitrip) e α 2-macroglobulina (α 2-macro).....	13
2.3.1.6 Ceruloplasmina (Cp)	14
2.3.1.7 Fibrinogênio (Fb)	14
2.3.2 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA NEGATIVAS	15
2.4 IMUNOGLOBULINAS (Ig).....	16
2.5 QUANTIFICAÇÃO DAS PFAs	16
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
5. ARTIGO: PROTEINOGRAMA SÉRICO DE EQUINOS SADIOS E NATURALMENTE ACOMETIDOS PELA SÍNDROME CÓLICA	27
1. Introdução	27
2. Resultados e discussão.....	28
3. Conclusão	44
6. CONCLUSÕES GERAIS	45
7. REFERÊNCIAS	46
ANEXO	52

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
Alb	albumina
ANOVA	análise de variância
Apo A1	apolipoproteína A1
ASA	amilóide sérica A
AST	aspartatoaminotransferase
bpm	batimento por minuto
CK	creatina quinase
Cp	ceruloplasmina
DTT	ditiotreitól
DZO	Departamento de Zootecnia
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
Fb	fibrinogênio
FC	frequência cardíaca
FR	frequência respiratória
G1	grupo 1
G2	grupo 2
GC	grupo controle
GD	grupo doente
GGT	gamaglutamiltransferase
GPA	glicoproteína ácida
Hb	hemoglobina
HCCA	<i>alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HOVET	Hospital Veterinário
Hp	haptoglobina
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
KD	kilodalton

LPCV	Laboratório de Patologia Clínica Veterinária
LPPCV	Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária
M	momento
m/z	massa/carga
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight</i>
mgf	<i>mascot generic format</i>
min	minuto
mL	mililitro
mmol	milimolar
MS	espectrometria de massa
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NuBioMol	Núcleo de Biomoléculas
PAM	proteína de fase aguda maior
PBS	tampão-fosfato
PCR	proteína C reativa
PFA	proteína de fase aguda
PT	proteína total
rpm	rotações por minuto
SDS-PAGE	gel de poli(acrilamida-dodecilsulfato de sódio)
TNF- α	fator de necrose tumoral
TPC	tempo de preenchimento capilar
TPCK	<i>trypsin from porcine pancreas</i>
Trf	transferrina
UFV	Universidade Federal de Viçosa
V	volt
VG	volume globular
α 2-macro	α 2-macroglobulina
α1-antitrip	α 1-antitripsina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Componentes básicos da resposta inflamatória aguda	6
Figura 2.	Sistema vertical de eletroforese	21
Figura 3.	Separação dos spots no gel para realizar a digestão.....	24
Figura 4.	Espectrômetro de massa (MS) modelo UltraFlex III	25
Figura 5.	Bandas das PFAs e Ig e seus respectivos picos, encontradas na eletroforese, identificadas nominalmente	32
Figura 6.	Bandas da albumina (alb) e amilóide sérica A (ASA) e seus respectivos picos identificados na eletroforese.....	32
Figura 7	Comportamento da Apolipoproteína A1 nos momentos avaliados	43
Figura 8	Comportamento da amilóide sérica A nos momentos avaliados	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Proteínas de fase aguda positiva em várias espécies.....	8
Tabela 2.	Média e desvio-padrão dos valores de referência e exames admissionais (hematócrito, leucograma e bioquímica sérica) do grupo controle e animais com abdômen agudo	29
Tabela 3.	Concentração média das proteínas de fase aguda em equinos acometidos pela cólica e grupo controle no momento de chegada (M0)	33
Tabela 4.	Concentração média das proteínas de fase aguda em equinos hígidos e acometidos por abdômen agudo com indicação de tratamento clínico (G1) e com indicação de tratamento cirúrgico (G2) em diferentes momentos de coleta. M0 = chegada ao hospital, imediatamente antes de ser instituído o tratamento; M1 = 24h após o início do tratamento; M2 = 48h após o início do tratamento; M3 = 72h após o início do tratamento	37

RESUMO

SOUTO, Pollyanna Cordeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Proteinograma sérico de equinos sadios e acometidos naturalmente pela síndrome cólica.** Orientador: Leandro Abreu da Fonseca.

A síndrome cólica é uma das maiores causadoras de óbito na espécie equina. A busca por marcadores precoces da inflamação, como as proteínas de fase aguda (PFAs), a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico é de suma importância. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar o proteinograma sérico, identificando e quantificando as proteínas de fase aguda de equinos sadios e acometidos naturalmente pela síndrome cólica. Foram colhidas amostras de sangue em nove animais hígidos e 17 animais com cólica clínica (G1) ou cirúrgica (G2), no momento da chegada ao Hospital Veterinário (M0) e 24 (M1), 48 (M2) e 72 (M3) horas após o início do tratamento. As PFAs foram separadas por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e suas concentrações determinadas por densitometria computadorizada. A identificação das PFAs foi feita por meio da espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF e os resultados obtidos foram confrontados com o banco de dados de proteínas dos táxons Equidae e Metazoa depositados no UNIPROT, usando o aplicativo MASCOT. Foram identificadas onze proteínas: α 2-macroglobulina (182 kD), ceruloplasmina (157 kD), transferrina (89 kD), albumina (66 kD), α 1-antitripsina (60 kD), IgG de cadeia pesada (54 kD), haptoglobina (45 kD), α 1-glicoproteína ácida (42 kD), IgG de cadeia leve (30 kD), apolipoproteína A1 (27 kD) e amilóide sérica A (14 kD), com elevação das concentrações da α 2-macroglobulina, ceruloplasmina (Cp) e amilóide sérica A (ASA) no grupo dos animais doentes (GD). A Cp apresentou elevação no M0 do G2 em relação ao G1 e grupo controle (GC). A ASA apresentou elevação com diferença estatística no M3 do G1 e G2 quando comparados ao GC. Na comparação feita entre os momentos dentro de cada grupo (G1 e G2), foi evidenciado o aumento da ASA no G2 com diferença estatística nos M1, M2 e M3. Apesar da ASA não apresentar diferença estatística nos momentos analisados dentro de cada grupo (M0-M3), manteve-se mais elevada no G2 em relação ao G1. O comportamento das PFAs encontradas nesse estudo foi variável. A elevação da concentração de algumas proteínas no GD indica que houve

uma resposta das PFAs induzida pelo processo inflamatório. A Cp e a ASA foram favoráveis na avaliação da resposta de fase aguda em cavalos com cólica. A Cp foi um indicador de cólica com resolução cirúrgica e a ASA apresentou comportamento favorável para sua utilização como biomarcador para estabelecer prognóstico em cavalos com cólica. A mensuração seriada dessas proteínas foi útil na diferenciação do tratamento clínico ou cirúrgico e prognóstico de cavalos com esta enfermidade.

ABSTRACT

SOUTO, Pollyanna Cordeiro, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Proteinogram of healthy horses and naturally affected by colic syndrome.** Advisor: Leandro Abreu da Fonseca.

Colic syndrome is one of the major causes of death in the equine species. The search for early markers of inflammation, such as the acute phase proteins (APPs), in order to support in diagnosis and prognosis is a matter of great importance. The aim of this study was to evaluate and compare the serum proteinogram, identifying and quantifying the acute phase proteins of healthy horses and naturally affected by the colic syndrome. Blood samples were collected in nine healthy animals and 17 animals with clinical (G1) or surgical (G2) colic at moment of arrival at the Veterinary Hospital (M0) and 24 (M1), 48 (M2) and 72 (M3) hours after initiation of treatment. The APPs were separated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and their concentrations determined by computerized densitometry. The APPs were identified using MALDI-TOF / TOF mass spectrometry and the results obtained were compared to the Equidae and Metazoa taxa database deposited at UNIPROT using the MASCOT application. Eleven proteins were identified: α 2-macroglobulin (182 kD), ceruloplasmin (157 kD), transferrin (89 kD), albumin (66 kD), α 1-antitrypsin (60 kD), heavy chain IgG (54 kD), haptoglobin (45 kD), α 1-acid glycoprotein (42 kD), light chain IgG (30 kD), apolipoprotein A1 (27 kD) and serum amyloid A (14 kD), with increased concentrations of α 2-macroglobulin, ceruloplasmin (Cp) and serum amyloid A (ASA) in the sick animals (GD) group. The Cp increased in M0 of G2 in relation to G1 and GC. The ASA increased with statistical difference in M3 of G1 and G2 when compared with the control (GC). In the comparison made between the moments within each group (G1 and G2), it was verified the increase of ASA in G2 with statistical difference in M1, M2 and M3. Although the ASA did not present statistical difference at the moments it was analyzed within each group (M0-M3), it remained higher in G2 than in G1. The behavior of APPs found in this study was variable. The increase of the concentration of some proteins in the GD indicates that there was a response of the PFAs induced by the inflammatory process. The Cp and ASA were favorable in the evaluation of

the acute phase response in horses with colic. The Cp was an indicator of colic with surgical resolution and the ASA presented favorable behavior for its use as a biomarker to establish prognosis in horses with colic. The serial measurement of these proteins was useful in differentiating the clinical or surgical treatment and prognosis of horses with this disease.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo, com cinco milhões de cabeças de cavalo (animais de lida, raça, lazer e competição). O faturamento do agronegócio do cavalo movimentava anualmente R\$ 16,15 bilhões e é responsável por três milhões de postos de trabalho, gerando 610 mil empregos diretos e 2.4 milhões empregos indiretos (LIMA e CINTRA, 2016).

Com a modernização da equideocultura, os equídeos foram desafiados a mudanças no manejo principalmente quanto à composição e ao fornecimento do alimento, em consequência, distúrbios digestivos, como a síndrome cólica, tornou-se uma das enfermidades mais comuns na clínica desses animais. Dentre os fatores predisponentes que cursam com as alterações gastrointestinais, a alimentação de má qualidade (fenos ressecados, capim velho e fibroso, cana triturada e silagem) e a disponibilidade de água reduzida, relacionada ou não a mudança de manejo, são os mais importantes. Na impossibilidade da produção de forragens de alta qualidade durante todo o ano principalmente devido mudanças climáticas, a utilização de alimentos através de processos como fenação ou ensilagem é uma condição básica na produção desses animais (THOMASSIAN, 2005).

As principais alterações orgânicas apresentadas pelo paciente são manifestações hemodinâmicas em razão das alterações circulatórias e injúria tecidual que o organismo sofre. Sinais sistêmicos da inflamação como hipertermia, leucocitose ou leucopenia, elevação da concentração de cortisol e alterações metabólicas podem ser observados. Além disso, antecedendo estes sinais, alterações nas concentrações de componentes imunes inespecíficos como as proteínas de fase aguda (PFA) podem estar presentes (CONTIN et al., 2015). Estas proteínas, de forma precoce, antecedendo a resposta leucocitária no hemograma, são rapidamente liberadas na circulação em resposta ao processo inflamatório e suas concentrações são proporcionais à gravidade do mesmo (CRISMAN et al., 2008).

O conhecimento acerca dos mecanismos que geram inflamação e afetam as concentrações séricas destas proteínas são de extrema importância, uma vez que são proteínas cuja concentração pode aumentar ou diminuir pelo menos 25% em resposta

à inflamação. Dessa forma, sua utilização como marcadores quantitativos é valiosa para determinar diagnóstico, prognóstico e monitorar a terapia instituída (ECKERSALL, 2008).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Síndrome Cólica

A síndrome cólica é considerada emergência na clínica de equinos, sendo uma das maiores causas de óbito nesta espécie. É caracterizada por dores abdominais intensas, de origem gastrointestinal (cólica verdadeira) e/ou outros órgãos da cavidade abdominal (cólica falsa). As peculiaridades anatômicas e fisiológicas do trato digestório tornam esta espécie predisposta ao desenvolvimento de alterações morfofisiológicas graves (WHITE e EDWARDS, 1999).

O equino possui um estômago com capacidade média para 18 a 20 L, um intestino delgado que mede cerca de 22 m de comprimento com capacidade para 64 L e um intestino grosso (ceco, cólon maior, cólon menor e reto) que pode chegar até 12 m de comprimento com capacidade média para 125 L. A musculatura bem desenvolvida do cárdia associada ao centro do vômito pouco desenvolvido e o ângulo formado entre o esôfago, cárdia e estômago desses animais, faz com que haja um fluxo unidirecional impedindo o vômito e dificultando o esvaziamento gástrico podendo levar a ruptura do mesmo, quando há sobrecarga alimentar. O cólon maior desses animais apresenta um lúmen amplo em sua maior parte, associado à presença de curvaturas que predispõe o desenvolvimento de impactiones. O íleo apresenta um diâmetro reduzido e uma musculatura mais espessa, favorecendo o espasmo, e possui uma ligação direta com o ceco, com uma musculatura diferente, favorecendo impactiones nessa transição (THOMASSIAN, 2005).

Nesta espécie, o ceco é bem desenvolvido e sua posição anatômica com pequenas válvulas de entrada e saída da ingesta, presente na porção dorsal do órgão, dificulta o esvaziamento favorecendo o desenvolvimento de impactiones podendo levar a obstrução e ruptura, ou deslocamento do órgão. A capacidade de

armazenamento gastrointestinal elevada, juntamente com a presença de esfíncteres e válvulas presentes no intestino, associado ao peristaltismo mais acelerado (BENTZ, 2004; THOMASSIAN, 2005; WHITE et al., 2009), bem como, redução ou variação nos níveis de atividades físicas, estabulação excessiva, mudanças bruscas da alimentação, alimentação de má qualidade e rica em concentrado, alterações dentárias, privação de água e o transporte, são alguns fatores associados ao desenvolvimento da síndrome cólica (HILLYER et al., 2002).

A cólica pode ser desenvolvida através de mecanismos etiopatogênicos variados, dentre os quais podem ser citados principalmente: cólicas espasmódicas de origem idiopática ou por hematozoário (*Babesia sp.*) que cursa com desconforto abdominal leve a moderado, sem maiores prejuízos para o organismo; obstruções intraluminais com ou sem estrangulamento vascular, que podem ter origem fisiológica ou mecânica; obstrução vascular, devido a processos tromboembólicos ou por compressões extravasculares por tumores ou abscessos; enterites; úlceras; colites e peritonites; iatrogênica, normalmente causada por drogas com ação farmacológica no sistema nervoso autônomo (atropina, neostigmina, imidazol e amitraz); e dor em outros órgãos da cavidade abdominal que não estejam envolvidos com o trato gastrointestinal (RIET-CORREA et al., 2001; WHITE, 2009).

Durante um episódio de cólica, eventos fisiopatológicos estão presentes e incluem distensão das alças intestinais, por acúmulo de ingesta e fluidos, e acúmulo de gás. Em casos mais severos, danos na parede intestinal devido a processos inflamatórios, isquemia e necrose, também podem ser observados (PEDROSA, 2008). Os sinais clínicos apresentados pelos animais com cólica são: apatia, inapetência, deitar com frequência, patear o solo, rolar ou escoicear o abdômen, olhar para o flanco, exposição do pênis, mímica de micção, desidratação, taquicardia, taquipnéia e distensão abdominal. No exame físico, além dos sinais já mencionados, é possível observar através da sondagem nasogástrica, refluxo gastrointestinal e na palpação transretal a presença excessiva de gás nas alças, conteúdo ressecado e em grande volume ou mesmo o deslocamento de alça (WHITE, 2006).

As principais modificações orgânicas apresentadas por estes animais estão situadas na esfera de alterações hemodinâmicas, podendo levar a consequências deletérias aos tecidos e órgãos. A estase ocorrida nos pequenos e grandes vasos leva

a um processo isquêmico com micro hemorragias e conseqüente necrose intestinal, além de diminuição da filtração glomerular levando a um quadro de acidose metabólica e em caso de persistência acarretando o desenvolvimento de insuficiência renal. A desidratação causa hemoconcentração e leva a um desequilíbrio hidroeletrólítico podendo desenvolver uma alcalose ou acidose metabólica e/ou respiratória. Também são observadas leucocitose ou leucopenia e alterações bioquímicas como, hiperlactacidemia, cetonemia, hiperglicemia ou hipoglicemia, aumento dos ácidos graxos, bem como alterações eletrólíticas. Sobrecarga cardíaca devido ao aumento da resistência vascular periférica e diminuição do retorno sanguíneo podem estar presentes (THOMASSIAN, 2005).

Diagnosticar um cavalo com cólica é relativamente fácil uma vez que estes animais exibem sinais clássicos da doença, relatados anteriormente. O desafio é o diagnóstico etiológico ou o diferencial. O conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos nas alterações fisiológicas do organismo que levam ao desenvolvimento de sinais clínicos é fundamental na determinação do tipo de cólica e da sua severidade (WHITE, 2006). De acordo com apresentação clínica, esta enfermidade pode ser categorizada como uma cólica de resolução através do tratamento médico ou que necessita de intervenção cirúrgica (PARRY et al., 1983). A tomada de decisão pode ser facilmente realizada caso se chegue a um diagnóstico definitivo, no entanto, isto nem sempre é possível uma vez que a causa da cólica só é determinada em 20 % dos casos (PEDROSA, 2008). A habilidade do clínico na tomada de decisão tornará possível o planejamento da terapêutica a ser instituída. A celeridade na tomada de decisão é de fundamental importância para o prognóstico do paciente (PIHL et al., 2016).

O tratamento a ser instituído tem como base o histórico do animal, os achados no exame físico e achados laboratoriais. No entanto, esses parâmetros nem sempre serão consistentes com um diagnóstico específico e já pode existir um comprometimento grave da saúde do paciente. Por se tratar de uma síndrome complexa, seu reconhecimento precoce e diferenciação acurada são fundamentais para o estabelecimento de uma abordagem adequada (PEDROSA, 2008).

Mesmo com avanços relacionados aos métodos de diagnóstico, técnicas anestésicas e cirúrgicas e acompanhamento intensivo no pós-operatório, a

mortalidade permanece alta (DI FILIPPO et al., 2009). Complicações e mortalidade relacionadas ao procedimento cirúrgico são comuns e podem estar associadas à gravidade da doença subjacente, do tempo percorrido entre o início dos sinais clínicos e tratamento, e da manifestação de sinais sistêmicos tais como, hipovolemia, endotoxemia e septicemia por exemplo (MAIR et al., 2007).

Alterações nos parâmetros físicos e hematológicos, antes e após a laparotomia, foram observadas por Fagliari e Silva (2002) em equinos com cólica, tais como, elevação da temperatura retal, taquicardia e taquipnéia, elevação do volume globular e do número de hemácias, hiperproteinemia e leucocitose. Entretanto, as alterações hematológicas não apresentaram correspondência clínica apesar de compatíveis com um quadro inflamatório agudo. Muitas vezes, no curso inicial da doença, os sinais da inflamação podem não ser identificados, caracterizando uma inflamação subclínica. No entanto, a busca por marcadores precoces da inflamação vem se destacando ao longo das últimas décadas a fim de auxiliar no diagnóstico e prognóstico desses pacientes (CRISMAN et al., 2008).

2.2. Inflamação - Resposta de fase aguda

A inflamação é uma resposta imune essencial que permite a sobrevivência durante a infecção ou lesão mantendo a homeostase dos tecidos sob uma variedade de condições adversas, para isso a resposta inflamatória evolui de forma adaptativa buscando restabelecer a homeostase (CERÓN et al., 2005). As variadas reações do hospedeiro à lesão tecidual, ou infecção, são conhecidas coletivamente como a resposta de fase aguda e engloba uma ampla gama de respostas fisiopatológicas com efeitos locais e sistêmicos a fim de minimizar danos ao tecido e aprimorar o processo de reparação (JAIN et al., 2011).

A resposta inflamatória de fase aguda é composta por quatro componentes básicos, sendo os indutores (infeccioso ou não infeccioso) os que iniciam a inflamação; os sensores, receptores de membrana expressos por células sentinelas especializadas que reconhecem os indutores e desencadeiam a produção dos mediadores inflamatórios; os mediadores inflamatórios (citocinas, quimiocinas,

aminas bioativas, eicosanóides, e produtos de cascatas proteolíticas) que atuam sobre os tecidos alvo provocando alterações em seu estado funcional como aumento da permeabilidade vascular permitindo a migração das células de defesa, principalmente os neutrófilos, para o local da lesão; e os tecidos alvo (Figura1) (MEDZHITOV, 2010).

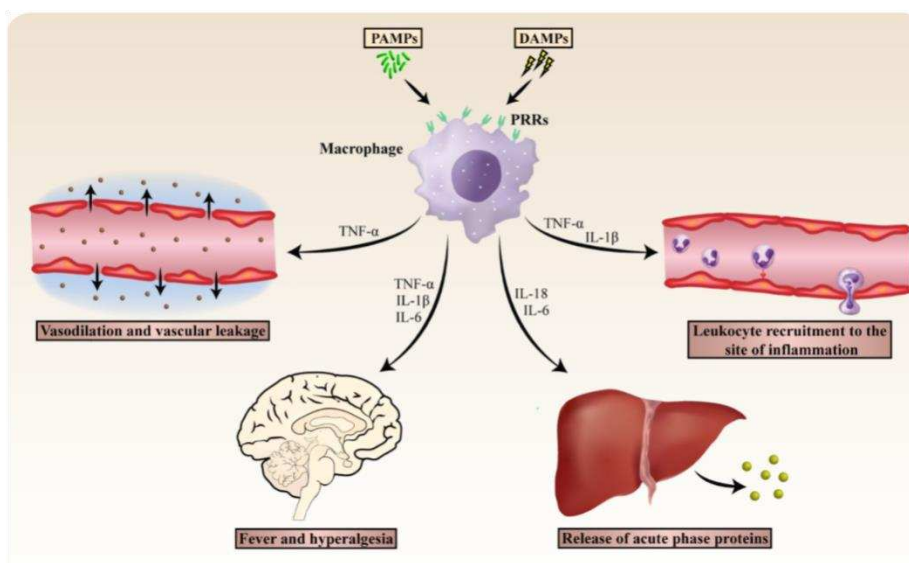


Figura 1. Componentes básicos da resposta inflamatória aguda.

Fonte: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005973.g001>.

Em decorrência desse esforço para restabelecer a homeostase, efeitos locais e sistêmicos podem ser observados. Os efeitos locais são caracterizados pelos sinais cardinais da inflamação (tumor, calor, rubor, dor e perda de função), e efeitos sistêmicos incluem alterações como hipertermia, elevadas concentrações de cortisol, leucocitose, leucopenia, alteração metabólica e alteração nas concentrações de proteínas plasmáticas denominadas de proteínas de fase aguda (PFA) (ECKERSALL, 2000).

2.3. Proteínas de fase aguda (PFAs)

As proteínas de fase aguda são consideradas componentes da resposta imune inata de caráter inespecífico. Suas concentrações estão diretamente relacionadas à gravidade do dano tecidual, dessa forma, a quantificação dessas proteínas pode fornecer informações diagnósticas e prognósticas em processos inflamatórios (MURATA et al., 2004). Essas proteínas são sintetizadas pelo hepatócitos através da sinalização por mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IL-6) (MEDZHITOV, 2010) e em resposta a uma injúria tecidual estas proteínas são rapidamente liberadas para a circulação estando suas concentrações diretamente relacionadas à gravidade da doença subjacente (CRISMAN et al., 2008).

As PFAs podem ser classificadas de acordo com sua resposta frente ao desequilíbrio homeostático, sendo assim, quando ocorre um aumento das concentrações dessas proteínas no soro ou no plasma, elas são denominadas proteínas de fase aguda positiva, bem como, quando há diminuição em suas concentrações, elas são denominadas proteínas de fase aguda negativas (CONTIN et al., 2015). A concentração destas proteínas ocorre de maneira variada nas diferentes espécies. De acordo com Cywińska et al. (2012) a proteína C reativa (PCR), a haptoglobina (Hp) e a amilóide sérica A (ASA) são as PFAs que apresentam uma maior sensibilidade em seres humanos e animais.

2.3.1. Proteínas de fase aguda positivas

As PFAs, dependendo da espécie, podem apresentar uma resposta maior, moderada ou reduzida (Tabela 1). Em animais saudáveis, estas proteínas apresentam-se em baixas concentrações. Dependendo do insulto, no caso das proteínas que apresentam uma resposta exacerbada, essa concentração pode aumentar mais de 100 ou 1000 vezes, na corrente sanguínea, atingindo o pico em 24 a 48 horas após a injúria e decresce rapidamente durante o processo de recuperação. As PFAs de resposta moderada, após o estímulo, aumentarão sua concentração em cinco a dez vezes atingindo o pico em dois a três dias após o insulto e diminuirão de forma mais

lenta. As PFAs com resposta reduzida apresentam apenas um discreto aumento (CRAY, 2012; ECKERSALL, 2008).

Tabela 1. Proteínas de fase aguda positivas em várias espécies.

Espécie	Maior resposta	Resposta moderada e baixa
Felina	ASA, GPA	Hp, Fb,
Bovina	Hp, ASA	GPA, Cp, PCR, Fb
Canina	PCR, ASA	Hp, GPA, Cp, Fb
Equina	ASA	Hp, GPA, Cp, Fb
Suína	PAM, ASA, Hp	GPA, Cp, PCR, Fb

ASA – Amilóide Sérica A; Hp – Haptoglobina; GPA – α 1 Glicoproteína ácida; PCR – Proteína C reativa; Cp – Ceruloplasmina; Fb – Fibrinogênio; PAM – Proteína de fase aguda maior. **Fonte:** adaptado do (CRAY, 2012).

2.3.1.1 Amilóide Sérica A (ASA)

A ASA é uma proteína com alta densidade lipoprotéica, pesando cerca de 9 a 14 k Da em sua forma desnaturada. Diferentes isoformas tem sido descrita em suínos, equinos, bovinos e humanos. A ASA apresenta produção hepática (ASA 1 e 2) e extra-hepática (ASA 3). Durante a resposta de fase aguda, a produção da ASA 3 aumenta em diferentes órgãos tais como, pulmão, tecido adiposo, ovário e glândula mamária (ECKERSALL, 2008). Em bovinos leiteiros com mastite foi identificada uma isoforma específica da ASA (“milk-ASA”, M-ASA3) em concentrações elevadas no leite (PETERSEN et al., 2004). No colostro de bovinos, equinos e ovinos saudáveis, a M-ASA3 também foi identificada com função associada à adaptação do recém-nascido a sua vida extra-uterina e também a uma possível remodelação do tecido mamário (MCDONALD et al., 2001).

Dentre as funções atribuídas a ASA, estão o transporte de colesterol das células teciduais para os hepatócitos, inibição da ativação plaquetária, efeito quimiotático em monócitos e polimorfonucleares, atividade imunomodulatória, inibição da resposta oxidativa por fagócitos e opsonização (ECKERSALL, 2008; PETERSEN et al., 2004).

A ASA apresenta uma grande importância diagnóstica principalmente para as espécies onde a resposta da PCR não é tão intensa. Sendo assim, a concentração dessa proteína na resposta de fase aguda em equinos, ruminantes e felinos, pode ser utilizada como marcador em processos inflamatórios/infecciosos (ECKERSALL, 2008). Em ruminantes a ASA apresenta uma resposta satisfatória como marcador inflamatório em bovinos com mastite subclínica (HUSSEIN et al., 2018), infecções pelo vírus respiratório sincicial bovino (HEEGAARD et al., 2000), amiloidose uterina em cabras (GAFFNEY et al., 2015), estresse, inflamações agudas, intervenções cirúrgicas e doenças do trato respiratório (PETERSEN et al., 2004).

Em equinos, a ASA é uma PFA de grande, sendo considerada a de maior relevância, seguida da manifestação moderada da Hp e PCR. Valores elevados dessa proteína foram relatados em procedimentos cirúrgicos, doenças articulares, sepse, pneumonia, diarreias (PETERSEN et al., 2004) exercício de longa duração (CYWIŃSKA et al., 2012), trauma em tecido mole, feridas extensas, infecção intra-articular (ROBINSON et al., 2017) e cólica com causa inflamatória primária (peritonite, enterite, colite ou abscesso abdominal) (VANDENPLAS et al., 2005).

O comportamento da ASA em gatos é semelhante ao das espécies já citadas. Estes animais também não apresentam uma resposta satisfatória da PCR. A ASA apresenta uma resposta mais rápida mediante os vários processos infecciosos nesta espécie. Os cães, por sua vez, possuem a PCR como PFA de maior importância, sendo assim, a utilização da ASA como coadjuvante no monitoramento da resposta de fase aguda torna-se mais interessante (ECKERSALL, 2008). Em suínos, o aumento da concentração da ASA foi relatado em procedimentos cirúrgicos e infecções experimentais com *Actinobacillus pleuropneumoniae* (PETERSEN et al., 2004).

2.3.1.2. Proteína C reativa (PCR)

A PCR foi à primeira proteína de fase aguda descrita. Possui cerca de 20 subunidades com 20 kDa cada (PEPYS, 1981). Esta proteína liga-se aos patógenos levando a opsonização das bactérias causando a interação com receptores específicos

em fagócitos, induzindo dessa forma, a produção de citocinas inflamatórias e modulando a função dos neutrófilos. Existe uma variação fisiopatológica no comportamento da PCR nas diferentes espécies (ECKERSALL, 2008). Em humanos, é descrita como um marcador sistêmico de extrema sensibilidade a processos inflamatórios com eventuais danos teciduais (CERÓN et al, 2005), sendo considerado um importante marcador inflamatório cardiovascular com valor preditivo positivo nesta espécie (SANTOS et al., 2013).

Em cães e suínos a PCR também apresenta uma sensibilidade maior, podendo apresentar uma concentração maior que 10 mg/dL (ECKERSALL, 2008). Cerón et al. (2005) relatam, em cães, o aumento da PCR em variadas doenças infecciosas, incluindo babesiose, leishmaniose, leptospirose, parvovirose, tripanossomíase, sepsis por *Escherichia coli* e infecções por *Bordetella bronchiseptica* e *Ehrlichia canis* (CERÓN et al., 2005). Em suínos, o aumento dessa proteína foi observado em infecção por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (LAURITZEN et al., 2003). Em bovinos, gatos e equinos a resposta da PCR é reduzida em relação a espécies já mencionadas (ECKERSALL, 2008).

2.3.1.3 α 1 Glicoproteína ácida (GPA)

A GPA é uma PFA de resposta moderada nas diferentes espécies. Seu peso molecular equivale a aproximadamente 43 kDa (ECKERSALL, 2008). Apesar de ser sintetizada e secretada principalmente pelos hepatócitos, sua produção extra-hepática e expressão gênica já foram descritas. É uma proteína com grande teor de carboidratos e possui algumas funções fisiológicas tais como, atividade imunomoduladora e capacidade de se ligar e transportar substâncias endógenas (heparina, histamina, serotonina, esteroides e catecolaminas) e exógenas (compostos farmacológicos) (FOURNIER; MEDJOUBI; PORQUET, 2000). A capacidade de ligar-se a fármacos pode trazer implicações terapêuticas, uma vez que, durante a resposta de fase aguda haverá um aumento da concentração da GPA que por sua vez se ligará a fração metabolicamente ativa do fármaco (fração livre) podendo afetar a farmacocinética do mesmo (ECKERSALL, 2008). Atividades anti-inflamatórias

como inibição da proliferação de linfócitos e da atividade das células “natural killer”, e a capacidade de se ligar a lipopolissacarídeos, também são atribuídas a GPA (MURATA et al., 2004).

Como já mencionado, a GPA apresenta uma resposta moderada, aumentando de forma mais lenta e permanecendo elevada por mais tempo. Essa característica é vantajosa na utilização dessa PFA como marcador de evolução do processo inflamatório, sendo possível observar a progressão do processo inflamatório agudo ao crônico (ECKERSALL, 2008). Em ruminantes estudos demonstram a resposta da GPA em processos mais crônicos. Ovelhas com linfadenite caseosa em um modelo experimental, apresentaram o pico da Hp e ASA em uma semana e o decréscimo em 14 dias, seguidos pela elevação de forma mais lenta da GPA que perdurou por cerca de um mês (ECKERSALL et al., 2007). Em um estudo realizado por Horadagoda et al. (1999) em bovinos com processos inflamatórios crônicos, a resposta da GPA foi superior à da ASA e Hp. Em doenças como mastite, metrite, abscesso hepático e doença do trato respiratório, a elevação da GPA também foi observada nesta espécie (ECKERSALL e BELL, 2010). Nos felinos a GPA mostrou-se como marcador eficiente em animais com peritonite infecciosa felina (SAVERIO et al., 2007) e animais com câncer (POCACQUA et al., 2005; SELTING et al., 2000). A resposta da GPA também tem sido observada em cães com parvovirose, babesiose, erliquiose, linfoma, carcinoma e sarcoma (CERÓN, et al. 2005).

A concentração da GPA em suínos recém-nascidos deve ser interpretada com cautela uma vez que estes animais apresentam uma elevada concentração dessa proteína nos primeiros 20 dias, quando atingem a concentração média de um adulto saudável. Outra particularidade dessa espécie é que, embora a GPA seja considerada uma PFA positiva, animais submetidos a infecções experimentais e inflamação asséptica, foi observado um decréscimo na concentração da GPA, demonstrando neste caso, um comportamento de PFA negativa nesta espécie (HEEGAARD et al., 2013).

Em potros até o sétimo dia de vida, os valores da GPA são praticamente indetectáveis, apresentando valores mensuráveis em 14 dias atingindo valores médios de adultos em um ano. Em fêmeas gestantes, a concentração da GPA apresentou-se reduzida dois a três meses antes do parto, aumentando

progressivamente até um dia pós-parto com uma posterior redução e um novo aumento após duas semanas e dois a quatro meses pós-parto. Em animais submetidos à jejunostomia e castração, a concentração sérica da GPA atingiu seu pico em dois a três dias após os procedimentos cirúrgicos retornando aos valores basais em 14 – 28 dias (TAIRA et al., 1992). Fagliari et al.(2008) observaram que equinos com cólica submetidos à laparotomia apresentaram valores mais elevados da GPA sérica no sétimo dia após o procedimento cirúrgico, sugerindo que esta proteína associadas a outras PFAs com resposta mais rápidas para esta espécie, podem ser utilizadas para prognosticar a evolução do quadro clínico desses animais. Valores aumentados dessa proteína sérica e em líquido peritoneal também foram observados por Di Filippo et al. (2010) em equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior.

2.3.1.4 Haptoglobina (Hp)

A haptoglobina é uma glicoproteína ácida com peso molecular variável entre as espécies. É formada por duas subunidades alfa (16 a 23 kDa) e duas betas (35 a 40 kDa) formando um tetrâmero. Em humanos existem três subtipos da Hp (Hp 1-1, Hp 1-2, Hp 2-2), os subtipos Hp 1-1 e Hp 2-2 possuem similaridades coma Hp canina e bovina, respectivamente. Os ruminantes possuem particularidades que os diferem das outras espécies, os tetrâmetros de Hp formam polímeros originando um complexo macromolecular. Além disso, esta proteína só está presente no soro dos animais que apresentam uma resposta de fase aguda (MORIMATSU et al., 1991).

A Hp possui capacidade de se ligar a fração de hemoglobina (Hb) livre no plasma sanguíneo evitando o dano oxidativo aos tecidos (ECKERSALL, 2008; JAIN, et al., 2011). O complexo Hp-Hb também possui atividade antibacteriana de forma indireta, uma vez que indisponibiliza o ferro do grupo heme para estes microrganismos, além disso, este complexo é reconhecido por um receptor de superfície em macrófagos facilitando sua remoção da circulação (ECKERSALL, 2008).

Nos ruminantes, a Hp é a principal proteína de fase aguda, seus níveis circulantes apresentam-se abaixo de 0,2 mg/dL e pode atingir 0,2 g/dL em alguns dias após o estímulo. Estudos apontam a Hp como marcador eficaz durante processo inflamatórios/infecciosos até a sua resolução em bovinos com mastite, peritonite, pneumonia, endocardites, abscesso e monitoramento de processos cirúrgicos (MURATA et al., 2004).

Em outras espécies como cão, gato, suínos e equinos, a Hp apresenta resposta moderada. Os níveis circulantes encontram-se entre 0,1 – 0,2 g/dL podendo atingir 5 g/L ou mais, durante o estímulo (ECKERSALL, 2008). Em cães a associação da Hp com uma PFA que apresente uma resposta mais rápida, como a PCR, tem sido recomendado (CERÓN et al., 2005). Em suínos, a Hp tem sido utilizada para o monitoramento de processos inflamatórios de ocorrência natural ou experimental (PETERSEN et al., 2004). Em equinos a resposta da Hp tem sido associada a processos inflamatórios sistêmicos e procedimentos cirúrgicos (FAGLIARI et al., 2008).

2.3.1.5 α 1-Antitripsina (α 1-antitrip) e α 2-Macroglobulina (α 2-macro)

A α 1-antitripsina (60 kDa) e α 2-macroglobulina (180 kDa) apresentam resposta de fase aguda moderada e possuem atividade antiprotease, ou seja, têm como principal função neutralizar a atividade de enzimas proteolíticas liberadas por células do sistema imunológico durante o processo inflamatório, minimizando assim danos aos tecidos sadios. O aumento da concentração da α 2-macro tem sido descrito em síndrome nefrótica e lesão hepática crônica (ECKERSALL, 2008). Fagliari e Silva (2002) relatam a elevação da concentração da α 1-antitrip em equinos acometidos por abdômen agudo. Apesar disso, estas proteínas ainda não possuem fins diagnósticos esclarecidos (ECKERSALL, 2008).

2.3.1.6 Ceruloplasmina (Cp)

A ceruloplasmina é uma α_2 -glicoproteína que apresenta resposta moderada, pesando 100 e 155 kDa dependendo da espécie. Possui ligação com a maior parte do cobre sérico livre, contendo assim a maior parte do cobre circulante, cerca de 95 % em todas as espécies estudadas, excetuando-se o cão, onde a Cp representa apenas 40 % do cobre no plasma (KANEKO et al., 2008). Apresenta atividade enzimática e antioxidante, protegendo o organismo contra os danos causados pelo ferro livre. Também possui uma importante função no processo de cicatrização de feridas e produção de colágeno (JAIN et al., 2011). Em processos inflamatórios, infecciosos virais e parasitários a Cp apresenta concentrações elevadas. Já em casos de desnutrição, pós-parto, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e doenças infecciosas associadas à intoxicação por cobre ocorre uma diminuição da sua concentração (CONTIN et al., 2015).

2.3.1.7 Fibrinogênio (Fb)

O fibrinogênio é considerado uma PFA de resposta moderada com alto peso molecular pesando cerca de 340 kDa. Constitui quase 5 % do plasma sanguíneo (ECKERSALL, 2008) e é de suma importância na cascata de coagulação, fornecendo substratos para formação da fibrina, e uma matriz para migração de células inflamatórias, auxiliando no reparo tecidual (WEISS e WARDROP, 2010). Através da ligação nas integrinas presentes na superfície celular dos macrófagos, o Fb desencadeia uma série de respostas intracelular capazes de aumentar a degranulação, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e retardo da apoptose (RUBEL et al., 2001).

Durante a resposta inflamatória, o Fb apresenta uma resposta mais consistente em equinos e bovinos do que em cães e gatos (ECKERSALL, 2008). Apesar de já se ter estabelecidos outras proteínas de fase aguda com resposta mais rápida e de maior intensidade nas variadas espécies, como já descrito anteriormente, a dosagem do fibrinogênio plasmático como procedimento diagnóstico e prognóstico nos processos

inflamatórios ainda é o mais utilizado devido à facilidade de mensuração (WEISS e WARDROP, 2010).

2.3.2 Proteínas de fase aguda negativas

Como já mencionado, as PFAs negativas apresentam uma redução de 25% da sua concentração mediante a um processo de resposta de fase aguda, inflamação, infecção ou trauma. O mecanismo pelo qual se observa esta diminuição ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que este decréscimo pode se apresentar de forma mais rápida, em um período de 24 horas, ou de maneira gradual, em um período de dias (ECKERSALL, 2008).

Em todas as espécies a PFA negativa mais relevante e presente em maior abundância é a albumina (alb). Possui peso molecular de 66 kDa e constitui 60 % da proteína plasmática total em animais saudáveis. É responsável pela manutenção da pressão coloidosmótica, transporte de ácidos graxos, colesterol, bilirrubina e óxido nítrico. A interpretação da diminuição da concentração dessa proteína torna-se difícil, uma vez que sua concentração pode ser afetada por fatores relacionados à sua síntese, perdas protéicas ou desnutrição. Como PFA negativa, a alb apresenta uma redução de forma gradual na sua concentração, sendo mais perceptível em quadros crônicos (CERÓN et al., 2005; CRAY, 2012; ECKERSALL, 2008).

Em mamíferos, a transferrina (Trf), uma glicoproteína com peso molecular de 76 kDa é considerada uma PFA negativa (ECKERSALL, 2008). Sua concentração tende a reduzir diante de um processo inflamatório. Essa PFA é responsável pelo transporte de ferro circulante. Em situações onde a absorção de ferro esteja prejudicada, a síntese da transferrina é estimulada e o ferro livre acaba sendo indisponibilizado para os microorganismos invasores, o que confere a esta proteína características, antibacteriana e antiviral. Em caso de deficiência de ferro, um aumento na concentração plasmática da transferrina pode ser observado (CONTIN et al., 2015).

2.4 Imunoglobulinas (Ig)

As imunoglobulinas são glicoproteínas sintetizadas pelo sistema imune que atuam como anticorpos sendo produzidas, de maneira específica, em resposta a presença de antígenos. Em animais domésticos, quatro tipos de Ig tem sido identificadas com mais evidência (IgG, IgA, IgM, e IgE).

A IgG, classe de imunoglobulina em maior concentração no soro, são responsáveis pela resposta humoral no organismo. Apresenta duas subunidades, a de cadeia leve com peso molecular de 35 kDa e a de cadeia pesada com peso molecular de 58 kDa. Dentre as funções apresentadas pela IgG a opsonização, aglutinação e fixação de complemento podem ser citadas. A IgA, anticorpo que atua como defesa localizada, possui peso molecular de 150 kDa. É secretada pelas células do trato respiratório, geniturinário e gastrointestinal com capacidade de neutralizar os microrganismos invasores. A IgE, presente na membrana de superfície dos basófilos e mastócitos apresenta baixas concentrações séricas e está relacionada a reações alérgicas e anafilática. A IgM é um pentâmero cíclico (componentes “M”) que atua na imunidade antecedendo a produção de IgG (KANEKO et al., 2008).

2.5 Quantificação das PFAs

Na rotina clínica a mensuração da proteína total e da albumina pode ser realizada por métodos colorimétrico em analisadores bioquímicos automatizados ou semi automatizados e a globulina calculada a partir desses valores. A quantificação das PFAs das mais variadas espécies já foi documentada utilizando diversos métodos como radioimuno ensaio, nefelometria e imunoturbidimetria, testes de imunodifusão, Western blot, análises de mRNA, ELISA e eletroforese mono e bidimensional com espectrometria de massa. Devido à grande variação de espécies a maioria desses métodos torna-se dispendioso, poucos reagentes de reação cruzada estão disponíveis e muitas vezes requerem reagentes espécie-específicos. Apesar de alguns kits de ELISA estarem disponíveis comercialmente para mensurar PFAs específicas (PCR,

ASA e haptoglobina), a maior parte destes testes não possui automação e são caros (CRAY, 2012; CRAY et al., 2009; JAIN et al., 2011).

Nos últimos 40 anos a resposta de fase aguda vem sendo avaliada através da técnica de eletroforese. Esta técnica consiste na migração de moléculas ionizadas, imersas em uma matrix de gel (agarose ou acrilamida), sob influência de um campo elétrico, permitindo a separação de diferentes componentes do sangue, urina ou líquido. A escolha da matrix depende do tamanho da proteína que se quer obter (OLIVEIRA et al., 2015). O gel de agarose é um polissacarídeo que permite a separação de 4 a 6 grupos principais de proteínas. O grau de migração é baseado na carga elétrica, na massa e na forma da proteína. No soro de animais domésticos, a albumina migra mais rapidamente por ser pequena e muito aniônica, no entanto, proteínas menores podem não migrar tão longe, pois falta a elas uma carga acentuadamente negativa (STOCKHAM e SCOTT, 2011). Já na eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), o SDS (dodecilsulfato de sódio) impede o efeito de cargas das moléculas proteicas nativas. Neste caso, as separações se dão segundo o peso molecular, e a migração é consequência tão somente das cargas negativas do SDS, causando efeito de peneiramento molecular. Quanto maior a molécula, menor a mobilidade (WILSON e WALKER, 2010).

Na medicina veterinária, a eletroforese é um importante método para identificação de proteínas presentes em diversos tipos de amostras, auxiliando no diagnóstico, prognóstico e curso de diversas doenças. É um método eficiente na detecção de processos inflamatórios agudos e crônicos e estimulação da imunidade humoral considerado mais barato. Mais de 200 proteínas do sangue já foram identificadas através dessa técnica. Basicamente, a eletroforese das proteínas envolve aplicação do plasma ou soro (preparados) em uma malha de gel que é submetida a uma corrente elétrica para que ocorra a migração das proteínas de acordo com a matriz utilizada no gel, formando bandas que podem ser quantificadas por densitometria (CRAY, 2012; CRAY et al., 2009; ECKERSALL, 2008).

3. OBJETIVOS

Geral: Avaliar o proteinograma sérico, identificando e quantificando as proteínas de fase aguda por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de equinos saudáveis e acometidos pela síndrome cólica.

Específicos: Identificar e quantificar o perfil das PFAs; avaliar os parâmetros hematológicos (leucograma e volume globular) e bioquímica sérica (AST, GGT, ureia, creatinina, fibrinogênio e CK) e identificar possíveis biomarcadores inflamatórios associados à síndrome cólica

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente delineamento foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa – UFV, tendo sido aprovado sob o protocolo 76/2017.

O processamento das amostras ocorreu no Laboratório de Pesquisa em Patologia Clínica Veterinária (LPPCV), Laboratório de Patologia Clínica Veterinária (LPCV) e Núcleo de Análises de Biomoléculas (NuBioMol), localizados na Universidade Federal de Viçosa - UFV.

4.1. Delineamento experimental

4.1.1. Animais

O estudo foi composto por equinos atendidos no Hospital Veterinário da UFV (HOVET-UFV), no ano de 2017 e primeiro semestre de 2018, diagnosticados com cólica e com ausência de doença concomitante e por animais sem cólica e/ou outra enfermidade aparente, pertencentes ao Setor de Equideocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (DZO-UFV). Amostras de sangue foram coletadas de 26 equinos Mangalarga Machador, sendo

17 amostras provenientes dos animais atendidos no HOVET-UFV e nove amostras dos animais pertencentes ao DZO-UFV. A idade variou de seis meses a oito anos nos animais com cólica, sendo sete fêmeas e dez machos. Nos animais hígdos a variação foi de quatro a dez anos, sendo sete fêmeas e dois machos.

4.1.2. Coletas

Após a admissão, os animais foram submetidos ao exame físico realizado pelos responsáveis do setor de clínica do HOVET e os seguintes parâmetros foram avaliados: apetite (presente, ausente), frequência de defecação (normal, diminuída, aumenta), características das fezes (normal, amolecidas, ressecadas, com muco, presença de sangue, fétidas), frequência cardíaca (FC) (bpm), frequência respiratória (FR) (mpm), dor (ausente, leve, moderada, intensa), coloração da mucosa (rósea, hipocorada, hiperorada, cianótica), tempo de preenchimento capilar (TPC), temperatura retal (°C), sondagem nasogástrica (positiva, negativa, espontânea, gás, líquido), auscultação abdominal (atonia, hipomotilidade, hiperomotilidade), palpação transretal (sem alteração, gás, compactação, deslocamento), distensão abdominal (ausente, uni ou bilateral).

Foram realizadas coletas de sangue para realização de hemograma e análises bioquímicas. A coleta foi realizada através da venopunção da jugular externa, com prévia antissepsia, executada por meio do sistema de coleta a vácuo com agulhas estéreis descartáveis, em tubos de 4 mL com EDTA 10 % e 8 mL em tubos sem nenhum adicional ao frasco. As amostras de sangue sem EDTA foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, em seguida congeladas a -20°C para posterior análise no laboratório.

Após a obtenção das informações coletadas no exame clínico, o diagnóstico provável foi estabelecido e instituído o tratamento (clínico ou cirúrgico). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais, sendo o grupo 1 (G1) composto por animais com indicação ao tratamento clínico; grupo 2 (G2) animais com indicação ao tratamento cirúrgico; grupo controle (GC), animais sem sinais de cólica ou outro tipo

de enfermidade aparente e grupo doente (GD), onde os animais do G1 e G2 foram agrupados .

Nos animais com cólica, a coleta do sangue foi realizada em quatro momentos, a saber:

- M0 – chegada ao HOVET-UFV, imediatamente antes de ser instituído o tratamento;
- M1 – 24 h após o início do tratamento;
- M2 – 48 h após o início do tratamento;
- M3 – 72 h após o início do tratamento.

No grupo controle realizou-se apenas uma coleta.

Por se tratar de casuística, os momentos supracitados foram estabelecidos de acordo com o tempo de permanência mínima dos pacientes no HOVET. No entanto, essa permanência foi variável de acordo com a evolução clínica do paciente, podendo ter sido estendida ou sofrido antecipação (alta ou óbito), levando o impedimento da coleta em alguns momentos.

4.1.3. Análises laboratoriais

4.1.3.1 Hemograma e bioquímica sérica

O hemograma foi realizado com o auxílio de um contador automático de células (URIT 3000[®], EUA). Para contagem diferencial dos leucócitos, foram realizados esfregaços sanguíneos corados pelo método de coloração tipo Romanowsky, com posterior leitura realizada no microscópio óptico 1000x. Os parâmetros bioquímicos séricos, proteína total (PT), aspartatoaminotransferase (AST), gamaglutamiltransferase (GGT), ureia, creatinina e creatina quinase (CK), foram obtidos por espectrofotometria em analisador bioquímico automático (HumaStar 300[®], EUA) com reagentes comerciais específicos. A concentração do fibrinogênio foi determinada pelo método de precipitação pelo calor e a leitura realizada em refratômetro.

4.1.3.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para o fracionamento dos diferentes constituintes proteicos do soro, foi realizada a eletroforese das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada. A corrida foi realizada no sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI - VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS[®] BIO-RAD, EUA) (Figura 2).

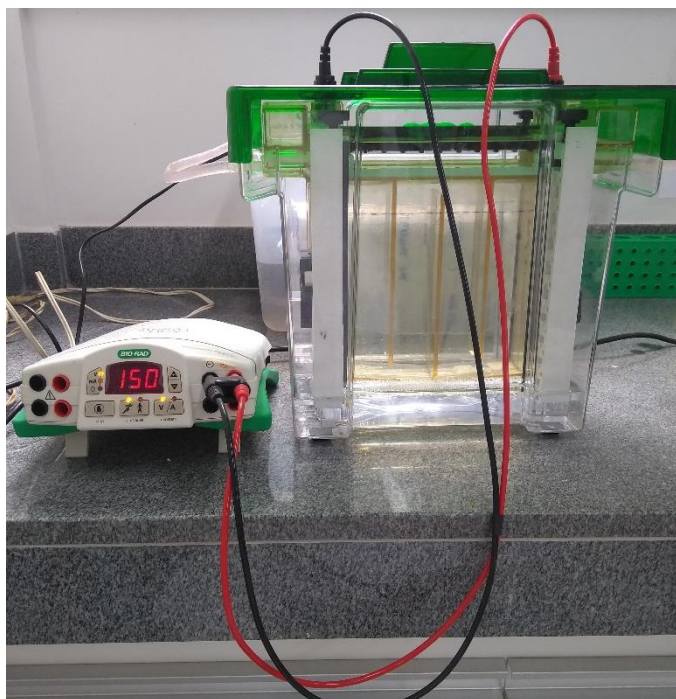


Figura 2. Sistema vertical de eletroforese. Fonte: arquivo pessoal.

Utilizou-se o gel de empilhamento a 4% e o gel de separação a 10 %. Para o preparo das amostras e fracionamento das proteínas, foi adicionado 10 μL de soro sanguíneo diluídos em 30 μL de tampão-fosfato (PBS) e 20 μL de tampão de amostra posteriormente aquecidos em água em ebulição por 10 minutos. Para o preparo do marcador de peso molecular, foram adicionados 3 μL do marcador de peso molecular (Broad Range, Bio-Rad[®] 6,5 – 200 kD) juntamente com 27 μL de tampão de amostra. O preparado foi centrifugado em rotação de 2000 rpm. Uma alíquota de 10 μL de cada preparado foi depositado em uma determinada cavidade do gel, além da

amostra de soro controle e o padrão de peso molecular como referência, colocada em cavidades pré-estabelecidas em cada gel.

Depois de colocadas as amostras, o conjunto da cuba foi submetido à corrente elétrica inicial de 100 V, fornecido por uma fonte de energia apropriada. Após 1 hora (as amostras do gel já migraram para o gel de separação), a corrente elétrica foi aumentada em 50 % do valor inicial (150 V), e após mais 1 hora foi aumentada para 200 V, permanecendo assim até o término da corrida.

Terminada a corrida, o gel foi retirado da placa e corado durante 30 min em solução de azul de Coomassie[®] R-250 0,2 % sob agitação horizontal constante, para uma coloração uniforme e em seguida, submerso em solução descorante à base de metanol e ácido acético para retirar excesso de corante até obtenção da nitidez das bandas proteicas no gel.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (LabImage 1D, Locus[®]), a partir do escaneamento das bandas nos géis. Para o cálculo do peso molecular, foram utilizados marcadores de pesos moleculares de 200, 116.2, 97.4, 66.2, 45, 31, 21.5, 14.4 e 6.5 kDa (Broad Range, Bio-Rad[®]), além de um soro controle espécie específico cujas proteínas presentes foram previamente identificadas por meio de espectrometria de massa (MALDI-TOF). Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

Para a separação de proteínas com peso molecular abaixo de 20 kDa, foram colocados 100 µL das amostras em 600 µL de solução de precipitação (acetona 100 % + ácido tricloroacético 10 % + DTT 1 mmol) durante 12 horas. Transcorrido o tempo, as amostras foram centrifugadas a 4°C durante 30 min a 13000 rpm. Após centrifugação, os pellets formados foram ressuspensos em 1 ml de acetona gelada e centrifugado nas mesmas condições anteriores (4°C durante 30 min a 13000 rpm), repetindo este passo 4 vezes. Após a última centrifugação com acetona, os pellets foram ressuspensos em 1 mL de etanol 80% e centrifugados novamente a 4 °C durante 30 min a 13000 rpm. Em seguida os pellets foram submetidos à secagem no speedvac (Eppendorf[®], Alemanha) e ressuspensos em solução de solubilização (chapps 2 % ureia 7 mmol + tiourea 2 mmol + DTT 40 mmol). Depois de

solubilizados, 5 μL das amostras foram misturados com 6 μL de tampão de amostra e 13 μL de água milli-Q e submetidos a separação eletroforética em gel de poliacrilamida 14 % a 80 V durante 4 horas.

4.1.3.3. Digestão enzimática das bandas no gel e preparo da amostra para análise por espectrometria de massas

Após a separação das proteínas por SDS-PAGE, as bandas mais evidentes foram escolhidas e excisadas para a realização da digestão enzimática, a qual foi efetuada com tripsina pancreática suína, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência T-6567 (Sigma Aldrich, EUA) (Figura3). A digestão das proteínas foi realizada conforme descrito anteriormente por Shevchenko et al. (2006), com uma solução de tripsina na concentração de 25 ng/ μL , da qual foram adicionados 40 μL em cada amostra. Após a digestão, os peptídeos tripticos foram secos em centrífuga a vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha) e ressuspensos em 10 μL de solução de ácido trifluoracético 0,1 % e dessalinizado em ZIPTIP (Millipore, USA), os quais foram eluídos em 3 μL de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. Foram aplicados 1 μL da solução de peptídeoeluído com 1 μL de matriz ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico – HCCA (BrukerDaltonics, Alemanha), a qual foi solubilizada na mesma solução de eluição dos peptídeos, na concentração de 10 mg/mL. Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (Peptide Calibration Standard II) (Bruker Daltonics, Alemanha), aplicados junto com a matriz nas mesmas condições.

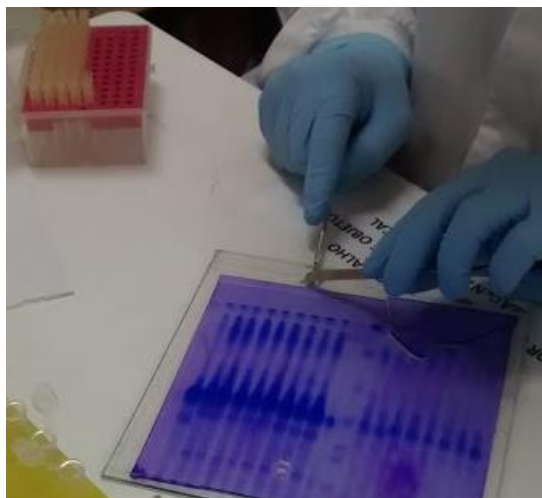


Figura 3. Separação dos spots no gel para realizar a digestão. Fonte: arquivo pessoal.

4.1.3.4. Aquisição de espectros de massas de MS e MS/MS por MALDI TOF/TOF

Após a secagem das amostras, os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro MALDI-TOF/TOF, modelo Ultraflex III (Bruker Daltonics, GER) (Figura 4). Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga (m/z).

Todos os dados obtidos foram gerenciados pelo software Flex control, versão 3.3 (Bruke Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do aplicativo Flex Analysis, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato mascotgenericformat (mgf) pelo aplicativo BioTools, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).



Figura 4. Espectrômetro de massa (MS) modelo UltraFlex III.
Fonte: arquivo pessoal.

A identificação das proteínas foi confirmada com o Software BioTools versão 3.2 (Bruker Daltonics) e Mascot Daemon (Matrix Science, Londres, Reino Unido) contra a base de dados de proteínas para a família de equídeos obtida do banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

4.1.3.5. Identificação das proteínas

As listas de massas foram confrontadas contra os bancos de dados de proteínas dos táxons Equidae (download em 20/11/2017, com 29.339 entradas) e Metazoa (download em 22/09/2016, com 8.585.752 entradas) ambos depositados no UNIPROT, usando o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

O resultado obtido pelo MASCOT foi validado estatisticamente pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC, Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet (KELLER et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet (NESVIZHSKII et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os

parâmetros com o mínimo de 90% de probabilidade para a identificação tanto das proteínas quanto dos peptídeos, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

As proteínas identificadas pelo MASCOT e validadas pelo SCAFFOLD, denominadas “Uncharacterized” foram analisadas usando o software BLAST, versão 2.4.0 (ALTSCHUL et al., 1990). Nessa análise, foi possível identificar quais as proteínas depositadas no banco de dados protein non-redundant (nr) do NCBI apresentaram maior identidade com as sequências das proteínas “Uncharacterized”.

4.2. Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Levene para a verificação da normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias, respectivamente. A análise de variância (ANOVA) de medidas repetidas foi utilizada para a avaliação do efeito do tempo/momento nos grupos clínico e cirúrgico. A avaliação entre os grupos de animais acometidos e o grupo controle, em cada tempo, foi realizada por meio da one-way ANOVA. As comparações múltiplas resultantes da ANOVA foram realizadas pelo teste de Tukey. Quando os dados não atendiam às premissas da ANOVA, foi empregado o teste de Kruskal-Wallis com *post hoc* de Dunn. Os dados do momento 0 dos grupo 1 e 2 foram agrupados e comparados com os do grupo controle para avaliação do efeito da afecção, independente da classificação (clínica ou cirúrgica), por meio do teste t-Student para amostras independentes. Os dados que não apresentaram homogeneidade e foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas no pacote estatístico MINITAB 17 (Minitab Inc. EUA) considerando $p < 0,05$.

5. ARTIGO

PROTEINOGRAMA SÉRICO DE EQUINOS SADIOS E NATURALMENTE ACOMETIDOS PELA SÍNDROME CÓLICA

1. Introdução

A síndrome cólica é uma das enfermidades mais comum na clínica de equídeos. Possui caráter emergencial e consiste em uma das maiores causas de óbito nesta espécie. Caracterizada por dores abdominais intensas, as principais modificações orgânicas apresentadas por estes animais são alterações hemodinâmicas devido a injúrias teciduais sofridas em decorrência do processo inflamatório/infeccioso (THOMASSIAN, 2005).

Diagnosticar um cavalo com cólica é relativamente fácil para o médico veterinário, já o diagnóstico etiológico ou o diferencial torna-se um desafio (WHITE, 2006). A habilidade do clínico na realização do diagnóstico e instituição do tratamento é de fundamental importância para o prognóstico do paciente (PIHL et al., 2016).

Com a progressão da doença, sinais da inflamação sistêmica e alterações laboratoriais podem ser observados, porém, alterações nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda e outros achados laboratoriais que precedem os sinais sistêmicos ou que sofrem modificações durante o curso da enfermidade precisam ser melhores investigados para se estabelecer um prognóstico mais adequado da síndrome e melhor monitoramento terapêutico (CONTIN et al., 2015).

O conhecimento acerca dos mecanismos que geram inflamação e afetam as concentrações séricas das proteínas de fase aguda são de extrema importância, uma vez que são proteínas cuja concentração pode aumentar ou diminuir pelo menos 25 % em resposta à inflamação. Dessa forma, sua utilização como marcadores quantitativos é valiosa para determinar diagnóstico, prognóstico e monitorar a terapia instituída (ECKERSALL, 2008).

O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar o proteinograma sérico, identificando e quantificando as proteínas de fase aguda de equinos saudáveis e acometidos pela síndrome cólica.

2. Resultados e Discussão

Dos 26 equinos utilizados no presente estudo, 17 animais foram diagnosticados com cólica e ausência de doença concomitante. Dentre esses animais, 9 (53 %) tiveram indicação de tratamento clínico e 8 (47 %) indicação de tratamento cirúrgico.

Os animais chegaram ao hospital com $36,6 \pm 22,9$ horas (média \pm desvio padrão) após o início dos sinais clínicos. A determinação da duração da cólica nos animais incluídos neste estudo foi uma estimativa baseada em informações dos proprietários, o que dificilmente revela de fato o momento exato em que os animais começaram a demonstrar algum sinal de desconforto abdominal, porém, reflete a realidade da rotina de atendimento médico veterinário. Todos os animais com indicação de tratamento clínico receberam alta, sendo distribuídos da seguinte forma: 1 (11 %) no mesmo dia; 5 (55 %) após 24 horas de internamento e 3 (34 %) após 72 horas de internamento. Dentre os animais com indicação de tratamento cirúrgico, 6 (62,5 %) vieram a óbito, 2 (25 %) receberam alta e 1 (12,5 %) o proprietário optou por não realizar o procedimento e retirou o animal do hospital após 24 horas. Dos 62,5 % que vieram a óbito, 2 (25 %) morreram no mesmo dia; 2 (25 %), 24 horas após a chegada no hospital e 1 (12,5%), 48 horas após a chegada no hospital. Em 13 animais foi possível identificar o local e o tipo de lesão: compactação de cólon maior (6); compactação de cólon maior com ruptura (1); compactação de cólon maior com deslocamento (2); compactação de cólon menor (3); compactação de estômago com ruptura (1); indefinido (4).

O processo e a duração da doença são importantes e devem ser levados em consideração na interpretação da concentração de biomarcadores em processos inflamatórios. Em um estudo realizado por Pihl et al. (2015), todos os biomarcadores avaliados (Hp, ASA e Fb) em animais com cólica foram significativamente

associados ao processo e duração da doença, apresentando elevação com a progressão da cólica.

Os resultados do hematócrito, leucograma e bioquímica sérica obtidos com as respectivas médias, desvios-padrão e valores de *p* estão expressos na tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio-padrão dos valores de referência e exames admissionais (hematócrito, leucograma e bioquímica sérica) do grupo controle e animais com abdômen agudo.

	Valores de referência	GC (n=9)	GD (n=17)	p
VG (%)	24 – 53*	29,20 ± 5,59	32,43±8,21	0,26
Leucócitos (/mm³)	6.000 – 12.000*	9488 ± 1862	9247 ± 4225	0,87
Neutrófilos (/mm³)	2.100 – 9.000*	4870 ± 1139,5	4538,3 ± 3244,6	0,72
Linfócitos (/mm³)	900 – 6.000*	3828 ± 2457	3777 ±1862	0,95
Monócitos (/mm³)	120 – 1.200*	417 ± 353	541 ± 576	0,58
Eosinófilos (/mm³)	120 – 1.440*	806 ± 415,4	77,94 ± 148,9	0,00
Basófilos (/mm³)	0 – 360*	93 ± 153	10,9 ± 32,7	0,04
Bastonetes (/mm³)	0 – 240*	11,6 ± 32,9	308 ± 479	0,09
AST (U/L)	226 -366**	204± 17,6	192 ± 31,4	0,74
GGT (U/L)	4,3 – 13,4**	24,3 ± 3,5	19,8± 11	0,21
CK (U/L)	2,4 – 23,4**	240,3 ± 50,9	236,4 ± 45,3	0,95
Ureia (mg/dL)	21 – 51**	50± 8,4	41,7 ± 21,7	0,02
Creatinina (mg/dL)	1,2 – 1,9**	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,01

Volume globular (VG); aspartatoaminotransferase (AST); gama glutamiltransferase (GGT); creatinaquinase (CK). Valores de *p*<0,05 (em negrito) indicam diferença estatística entre o grupo controle (GC) e grupo doente (GD) pelo teste de Tukey. *(WEISS e WARDROP, 2010) e **(KANEKO et al, 2008).

O volume globular (VG) manteve-se dentro do intervalo de referência para a espécie e não foi observada diferença estatística entre os grupos avaliados (GC e GD). Na avaliação do VG alguns fatores devem ser levados em consideração uma vez que pode ocorrer variação dos resultados em função da raça, condição física, treinamento, histórico de parasitas e grau de excitação. Na rotina clínica, os parâmetros laboratoriais mais empregados para determinar o grau de desidratação do paciente é o VG associado à proteína total (PT) (GRONDIN e DEWITT, 2010). Em pacientes

como cólica a desidratação é um sinal clínico comum, levando ao aumento do VG. O intenso fluxo de líquido exigido para o interior da alça acometida pode levar a distensão da mesma, lesionando a parede intestinal e impedindo a absorção do líquido podendo desencadear quadro de hipovolemia (THOMASSIAN, 2005). Diferindo da literatura citada acima, o VG dos animais com cólica no nosso estudo, não apresentaram elevação. A maior parte dos pacientes recebeu algum tipo de tratamento antes de ser encaminhado ao HOVET, esse tratamento inclui a administração intravenosa de soluções hidratantes capazes de reestabelecer a volemia. É uma prática comum realizada pelos proprietários e pode justificar os nossos achados.

No leucograma, os valores observados nos grupos avaliados estão dentro do intervalo de referência para a espécie, com exceção dos eosinófilos, estes apresentaram valores inferiores as referências citadas, no entanto, a diminuição dessas células em processos inflamatórios não possui nenhum significado clínico. Houve diferença estatística entre os eosinófilos e basófilos, com valores mais elevados no GC. O GC composto por animais criados extensivamente pode apresentar uma carga parasitária maior que o grupo dos animais doentes, justificando a elevação dessas células. Houve um discreto desvio nuclear neutrofílico à esquerda nos animais do GD. Este achado corrobora Weiss e Wardrop (2010), que afirmam que a presença de neutrófilos bastonetes pode ser observada em processos infecciosos em que há um aumento da demanda funcional dos neutrófilos para os tecidos, como no caso da cólica.

Dos resultados obtidos na bioquímica, apenas a ureia e a creatinina apresentaram diferença estatística, no entanto, os valores obtidos no nosso estudo encontram-se dentro do intervalo de referência proposto por Kaneko et al.(2008) para a espécie. A elevação desses compostos pode ser observada em quadros de cólica com hipovolemia ou endotoxemia em que a função renal possa ter sido alterada, o que não foi observado no nosso estudo. Nos dois grupos avaliados, a GGT e a CK apresentaram elevação quando comparados aos valores de referência. A dor abdominal pode ter como origem processos localizados no fígado (THOMASSIAN, 2005), a dosagem da AST e GGT são importantes para a avaliação do envolvimento hepático, no entanto, neste ensaio não foi diagnosticado doença hepática como foco

do desenvolvimento da cólica. Davis et al. (2003) relatam o aumento da atividade sérica da GGT em cavalos com enterite proximal, podendo envolver infecção biliar ascendente, absorção de endotoxina ou mediadores inflamatórios, tendo como consequência a inflamação e/ou hipóxia hepática, diferindo dos nossos achados em que os animais apresentaram lesão de estômago e intestino grosso.

Diferindo dos nossos achados, o aumento da atividade enzimática da CK foi relatado por Di Filippo et al. (2012) em cavalos com cólica. Estes autores supõem que essa elevação pode estar associada a lesões da musculatura esquelética (administração de fármacos, deitar e rolar dos animais com dor abdominal), administração de anestésicos, a própria alteração intestinal e aos fatores relacionados à laparotomia (THRALL et al., 2015). Por fim, é importante salientar que os diferentes valores de referência descritos na literatura servem como base, porém, variam de acordo com a localização geográfica, instrumento de análise, metodologia utilizada entre outros. Portanto, em nosso estudo optou-se por utilizar um grupo controle que serviu como parâmetro de saúde para comparação com o grupo doente.

Os resultados obtidos para os constituintes do proteinograma sérico com as respectivas médias, desvios-padrão e estatística estão expressos nas tabelas 3 e 4. As proteínas de fase aguda e imunoglobulinas (Ig) encontradas na eletroforese, de importância para este estudo, foram: α 2-macroglobulina (182 kD), ceruloplasmina (157 kD), transferrina (89 kD), albumina (66 kD), α 1-antitripsina (60 kD), IgG de cadeia pesada (54 kD), haptoglobina (45 kD), α 1-glicoproteína ácida (42 kD), IgG de cadeia leve (30 kD), apolipoproteína A1 (27 kD) e amilóide sérica A (14 kD) (Figuras 5 e 6).

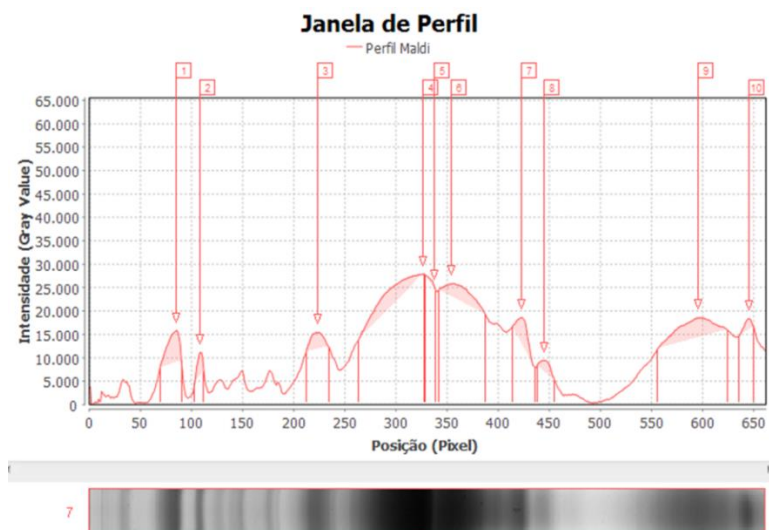


Figura 5. Bandas das PFAs e Ig e seus respectivos picos, encontradas na eletroforese, identificadas nominalmente. 1 – alfa 2-macroglobulina; 2 – ceruloplasmina; 3 – transferrina; 4 – albumina; 5 – Alfa 1-antitripsina; 6 – IgG de cadeia pesada; 7 – haptoglobina; 8 – glicoproteína ácida; 9 – IgG de cadeia leve; 10 – apolipoproteína A1.

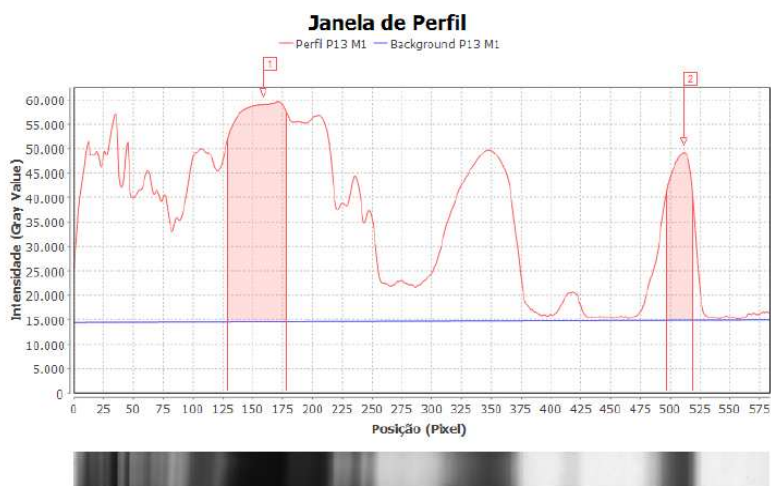


Figura 6. Bandas da albumina (alb) e amilóide sérica A (ASA) e seus respectivos picos identificados na eletroforese. 1 - alb; 2 - ASA.

Tabela 3. Concentração média das proteínas de fase aguda em equinos acometidos pela cólica e grupo controle no momento de chegada (M0).

Proteínas (mg/dL)	GC (n=9)	GD (n=17)	p
PT	7500 ± 500	6400 ± 700	0,00
Fb (340 kD)	286 ± 157	407 ± 209	0,19
$\alpha 2$ – macro (182 kD)	122 ± 51,8	223 ± 110	0,02
Cp (157 kD)	74,8 ± 18,18	113,7 ± 39,3	0,01
Trf (89 kD)	499, 7 ± 168,8	635 ± 136	0,04
Alb (66 kD)	2174 ± 806	2661 ± 493	0,07
$\alpha 1$ – antitrip (60 kD)	493,1 ± 115,5	300 ± 153	0,00
IgGcp (60 kD)	764 ± 404	749 ± 389	0,92
Hp (45 kD)	170,9 ± 67,7	157,4 ± 84,9	0,69
GPA(42 kD)	57,1 ± 11,34	76,4 ± 55,1	0,34
IgG cl(30 kD)	2789 ± 378	1343 ± 577	0,00
Apo A1(27 kD)	417,7 ± 98	317 ± 129	0,06
ASA (14 kD) ($\mu\text{g/ml}$)	1,32 ± 0,31	2,42 ± 1,18	0,00

Proteína total (PT); fibrinogênio (Fb); $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ –macro); ceruloplasmina (Cp); Trf (transferrina); albumina (alb); $\alpha 1$ – antitripsina ($\alpha 1$ –antitrip); IgG de cadeia pesada (cp); haptoglobina (Hp); glicoproteína ácida (GPA); IgG de cadeia leve; apolipoproteína A1 (Apo A1); amilóise sérica A (ASA). Valores de $p < 0,05$ (em negrito) indicam diferença estatística entre o grupo controle (GC) e grupo doente (GD) pelo teste de Tukey.

Notou-se que os valores de proteína total sérica (PT) encontrados no grupo dos animais acometidos por cólica (GD) foram mais baixos e diferiram estatisticamente quando comparado ao grupo controle (GC) no momento da chegada ao HOVET, apesar disso, os valores encontram-se dentro do intervalo de referência proposto por Weiss e Wardrop (2010) para a espécie. Valores normais da PT podem ser encontrados nas fases iniciais da cólica ou em casos mais brandos onde não ocorra grandes alterações na volemia e perda dessas proteínas para a cavidade abdominal (THOMASSIAN, 2005). Essa afirmação pode justificar nossos achados considerando que o período de evolução da cólica nestes pacientes é variável e não foi possível determinar com precisão a severidade do quadro clínico. Valores mais baixos da PT podem ser justificados pela diminuição do apetite, o que é comum em animais com cólica.

Quando avaliados os valores das concentrações de PFAs nos animais com cólica em relação ao GC, houve diferença estatística com elevação das concentrações da α 2-macroglobulina, ceruloplasmina (Cp), transferrina e amiloide sérica A (ASA). Excetuando-se a transferrina, todas as PFAs citadas são consideradas PFAs positivas, ou seja, apresentam elevação da sua concentração mediante processos inflamatórios, como na cólica. O aumento dessas proteínas no nosso estudo indica uma resposta inflamatória devido a uma injúria tecidual ocorrida no intestino desses animais como observado por Crisman et al.(2008).

A α 2-macroglobulina é uma proteína com função antiprotease, ou seja, durante um processo inflamatório agudo tem como papel neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas produzidas pelo sistema imune, minimizando os danos aos tecidos normais. De acordo com Contin et al. (2015), a Cp é uma proteína de resposta moderada em equinos apresentando concentrações elevadas em processos inflamatórios, indo de encontro aos nossos achados.

Como já mencionado, a transferrina, assim como a albumina, é uma PFA negativa, o mecanismo pelo qual se observa esta diminuição ainda não está totalmente esclarecido. Sabe-se que este decréscimo pode se apresentar de forma mais rápida, em um período de 24 horas, ou de maneira gradual, em um período de dias, sendo mais evidenciada em doenças crônicas (ECKERSALL, 2008) não sendo o caso nesse estudo, por se tratar de um processo inflamatório agudo, onde os animais apresentaram evolução e resolução do caso em um período de no máximo duas semanas.

A amilóide sérica A é a principal PFA para a espécie equina. A elevação da sua concentração nos animais do GD condiz com os achados dos estudos realizados por Dondi et al.(2015), Pihl et al. (2013, 2015) e Westerman et al.(2016), que observaram o aumento da ASA em equinos com cólica médica ou cirúrgica. Outros estudos descrevem ainda, que esta PFA é um valioso marcador inflamatório em equinos com diarreias (PETERSEN et al., 2004), pneumonia por *Rhodococcus equi* (HULTÉN e DEMMERS, 2002), artrite não infecciosa (HULTÉN et al., 2002), exercício de longa duração (CYWIŃSKA et al., 2012), trauma em tecido mole, feridas extensas e infecções intra-articulares (ROBINSON et al., 2017). A ASA é a PFA de maior interesse para a espécie equina e diante de um dano tecidual sua

concentração eleva rapidamente apresentando uma importância diagnóstica e prognóstica (CRAY, 2012).

Nessa mesma comparação, foi observada diferença estatística com redução das concentrações de $\alpha 1$ -antitripsina e IgG de cadeia leve. Diferindo desse ensaio, Nogueira et al. (2013) observaram oscilações positivas nas concentrações das imunoglobulinas IgA e IgG, tanto no soro como no líquido peritoneal de equinos hípidos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental, ambos submetidos à laparotomia. Nossos achados, no entanto, corroboram Overmann (2018) já se trata de uma resposta inflamatória aguda e o referido autor enfatiza o aumento das Ig em processos inflamatórios crônicos. Segundo Kaneko et al. (2008) a IgG é a classe de imunoglobulina em maior concentração no soro, são responsáveis pela resposta humoral sintetizadas pelo sistema imunológico em resposta a estímulos antigênicos. O comportamento $\alpha 1$ -antitripsina a princípio não teve importância clínica na avaliação feita entre os grupos (GD e GC) uma vez que, por se tratar de uma PFA positiva, essa importância se dá a partir do momento em que ocorre sua elevação em 25 % ou mais (ECKERSALL, 2008).

O valor do fibrinogênio plasmático (Fb) manteve-se dentro do intervalo de referência para a espécie (200 – 400 mg/ml) (ECKERSALL, 2008), corroborando os achados de Daniel et al. (2016). Os autores relatam que esta proteína não apresentou aumento significativo em 24 horas após a laparotomia em cavalos com cólica, relatam ainda que o pico do fibrinogênio quantitativo ocorreu apenas entre 76 e 92 horas pós-operatório, momentos de coleta que não foram contemplados no nosso estudo que avaliou os animais até 72 horas, uma vez que esses animais podem ter vindo a óbito ou recebido alta hospitalar nesse período. A resposta tardia do Fb também foi relatada por Pihl et al. (2015, 2016) onde os autores associaram o aumento da concentração do Fb à duração mais prolongada da doença. No nosso estudo, a imprecisão na determinação da duração da doença pode justificar nossos achados. O comportamento observado do fibrinogênio assemelha-se aos resultados encontrados por Pihl et al. (2017) onde os autores relatam a análise das PFAs como marcadores de prognóstico em cavalos com cólica, e a elevação do Fb não foi associada aos animais que vieram a óbito. O fibrinogênio é uma PFA de resposta moderada, seu período de resposta de fase aguda prolongado associado ao intervalo

de referência amplo para esta espécie torna o fibrinogênio uma PFA menos interessante. Apesar de seu uso comum, esta proteína pode ter valor limitado no cenário clínico (CRISMAN et al., 2008).

Tabela 4. Concentração média das proteínas de fase aguda em equinos hígidos e acometidos por abdômen agudo com indicação de tratamento clínico (G1) e com indicação de tratamento cirúrgico (G2) em diferentes momentos de coleta. M0 = chegada ao hospital, imediatamente antes de ser instituído o tratamento; M1 = 24h após o início do tratamento; M2 = 48h após o início do tratamento; M3 = 72h após o início do tratamento.

PROTEÍNA (mg/dL)	CONTROLE	GRUPO	MOMENTO DA COLETA			
			M0	M1	M2	M3
PT	7500 ± 500	1	6500 ± 800*	5900 ± 700	5800 ± 600	6000 ± 700*
		2	6300 ± 600*	5500 ± 400	5500 ± 300	5100 ± 900*
$\alpha 2$ – macro (182 kD)	122 ± 51,8	1	235,9 ± 109,8	254,8 ± 95,2	237,1 ± 51,5	216,9 ± 96,5
		2	209,3 ± 115,6	253,0 ± 70,0	260,5 ± 91,5	221,1 ± 30,8
Cp (157 kD)	74,8 ± 18,18	1	108,5 ± 39,4	103,3 ± 38,6	117,0 ± 31,4	109,4 ± 28,0
		2	119,4 ± 40,9*	92,6 ± 36,1	124,9 ± 44,8	105,25 ± 4,03
Trf (89 kD)	499,7 ± 168,8	1	637,2 ± 174,3	568,5 ± 211,1	311,8 ± 97,2	602,8 ± 73,6
		2	632,1 ± 87,5	511,0 ± 140,9	525,0 ± 375,0	573,0 ± 15,9
Alb (66 kD)	2174 ± 806	1	2607,0 ± 583,0	2616 ± 365	2577 ± 316,0	2613 ± 204
		2	2722,0 ± 398,0	2588 ± 271,0	2417,0 ± 327,0	2010,0 ± 283,0
$\alpha 1$ – antitrip (60 kD)	493,1 ± 115,5	1	279,0 ± 140,5*	314,1 ± 131,7	356,0 ± 209,0	336,0 ± 222,0
		2	326,4 ± 174,7	287,0 ± 128,5	352,0 ± 274,0	221,35 ± 9,55
IgGcp (54 kD)	764 ± 404	1	750,0 ± 477,0	759,0 ± 317,0	701,2 ± 47,0	637,0 ± 286,0
		2	748,0 ± 293,0	855,0 ± 348,0	835,0 ± 267,0	741,2 ± 107,2
Hp (45 kD)	170,9 ± 67,7	1	153,9 ± 100,9	184,2 ± 97,5	191,6 ± 127,7	201,9 ± 81,8
		2	161,3 ± 69,3	158,8 ± 43,8	187,4 ± 123,5	141,8 ± 37,7
GPA (42 kD)	57,1 ± 11,34	1	75,8 ± 75,0	65,70 ± 18,16	100,5 ± 45,3	81,4 ± 45,5
		2	77,0 ± 29,8	66,45 ± 23,13	99,6 ± 34,0	79,4 ± 10,75
IgG cl (30 kD)	2789 ± 378	1	1424 ± 629,0*	1408,0 ± 432,0	1004,0 ± 251,0	1252,8 ± 95,8*
		2	1252,0 ± 539,0*	1211,0 ± 334,0	1202,0 ± 317,0	1061,0 ± 112,9*
Apo A1 (27 kD)	417,7 ± 98	1	322,8 ± 156,9	303,6 ± 97,7	235,4 ± 112,9	254,6 ± 94,8
		2	311,7 ± 105,0	307,4 ± 157,6	258,2 ± 131,2	177,2 ± 3,11
ASA (14 kD) (μ g/ml)	1,32 ± 0,31	1	2,2 ± 0,9	2,0 ± 0,7 ^a	2,6 ± 0,3 ^a	1,8 ± 0,2 ^{a*}
		2	2,6 ± 1,5	2,8 ± 1,3 ^b	3,4 ± 1,5 ^b	3,8 ± 0,1 ^{b*}

Proteína total (PT); $\alpha 2$ – macroglobulina ($\alpha 2$ – macro); ceruloplasmina (Cp); Trf (transferrina); albumina (alb); $\alpha 1$ – antitripsina ($\alpha 1$ – antitrip); IgG de cadeia pesada (cp); haptoglobina (Hp); glicoproteína ácida (GPA); IgG de cadeia leve; apolipoproteína A1 (Apo A1); amilóise sérica A (ASA). * M0 ou M3 difere significativamente do grupo controle e letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey com $p < 0,05$.

Os valores de PT encontrados nos animais com indicação ao tratamento clínico (G1) e cirúrgico (G2) além de diferir estatisticamente no M0, também diferiram no último momento da coleta (M3) quando comparado ao GC, apesar disso, encontram-se dentro dos valores de referência para a espécie, conforme descrito na literatura (WEISS e WARDROP, 2010), exceto no M3 do G2, onde esse valor encontra-se abaixo dos valores de referência. O período do jejum pós-operatório, com introdução alimentar de forma gradual e a própria lesão entérica causada pelo processo inflamatório da cólica e/ou trauma cirúrgico, levando a perda das proteínas para a cavidade abdominal, podem justificar esse achado. Resultados semelhantes foram descritos por Di Filippo et al. (2010) e Nogueira et al. (2013) em cavalos com cólica submetidos à obstrução experimental. Os autores relatam alteração das proteínas totais apenas no líquido peritoneal desses animais, atribuindo essa alteração a lesão entérica ou mesmo ao trauma cirúrgico, levando ao extravasamento dos elementos plasmático para o peritônio.

Quando comparado o momento da chegada ao HOVET (M0) dos animais acometidos pela cólica com indicação de tratamento clínico (G1) e os animais com indicação de tratamento cirúrgico (G2) com o GC, a PT e a IgG de cadeia leve mantiveram o comportamento nos G1 e G2, a Cp apresentou elevação da concentração com diferença significativa no G2 e a $\alpha 1$ -antitripsina apresentou diferença estatística com concentração reduzida apenas no G1. A $\alpha 1$ -antitripsina, assim como a $\alpha 2$ -macroglobulina, também é uma protease, apesar disso, apresentou um comportamento diferente da mesma. Diferindo desse estudo onde os grupos doentes (G1 e G2) não apresentaram elevação dessa proteína, em um ensaio realizado Di Filippo et al. (2011) para determinar as concentrações das PFAs em equinos hípidos e com lesões de intestino grosso e delgado submetidos à laparotomia, a $\alpha 1$ -antitripsina elevou sua concentração nos animais doentes e de forma mais precoce nos casos mais graves. Achados semelhantes foram observados por Fagliari e Silva (2002) em equinos naturalmente acometidos por cólica. No entanto, os ensaios citados referem-se a casos com torção de cólon maior, encarceramento nefro-esplênico, compactação de íleo, hérnia inguino-escrotal, encarceramento de jejuno e volvo do intestino delgado, ou seja, acarretando uma lesão tecidual mais grave e conseqüentemente uma resposta inflamatória mais intensa.

Em relação à Cp, os achados desse estudo diferem dos achados descritos por Di Filippo et al. (2011) onde não foi observada elevação da Cp em animais com cólica submetidos à laparotomia. Os autores acreditam que a ausência de alterações verificadas no ensaio ocorreu devido à imprecisão na determinação do tempo de evolução do distúrbio gastrointestinal, fato comum em ensaios naturais. No entanto, nossos resultados corroboram os achados descritos por Saquetti et al. (2008) e Nogueira et al. (2013) no que se refere à elevação da Cp em animais com cólica (induzidos experimentalmente à obstrução intestinal). Porém, no presente estudo a elevação da Cp se deu no M0 dos animais com indicação de tratamento cirúrgico, ou seja, antes da realização do procedimento. Os referidos autores atribuem o comportamento da Cp ao procedimento cirúrgico, o que vai contra aos achados neste estudo onde a concentração da Cp aumentou de acordo com a gravidade da lesão, mesmo antes da intervenção cirúrgica. Como já mencionado, a imprecisão no tempo de evolução da cólica pode justificar nossos achados, o processo inflamatório observado em nossos animais pode ter um período de evolução maior quando comparado aos trabalhos citados. Vale ressaltar que, nos estudos realizados por Saquetti et al. (2008) e Nogueira et al. (2013), houve a indução da cólica, ou seja, o processo inflamatório foi iniciado após o procedimento cirúrgico o que possivelmente levou a elevação da Cp.

Na comparação feita entre M0 dos animais acometidos pela cólica do G1 e G2 com os animais do GC após 72 horas da primeira coleta (M3), a PT e a IgG de cadeia leve mantiveram o comportamento no dois grupos (G1 e G2). Já a α 1-antitripsina apresentou um aumento da sua concentração e a ceruloplasmina se manteve ou diminuiu discretamente, não sendo mais evidenciada diferença estatística. Também não foi observada diferença estatística ao avaliar o comportamento das PFAs dentro de cada tratamento nos grupos (G1 e G2) e seus respectivos momentos (M0 – M3). Nossos achados corroboram os achados descritos por Pihl et al. (2015) que, buscando identificar a influência do processo inflamatório e duração da doença nas PFAs do soro e fluido peritoneal em cavalos com cólica, concluíram que um aspecto importante a ser observado na análise de um biomarcador é a sua cinética, para isso, determinar o momento inicial do processo inflamatório e a partir daí estabelecer os momentos para realizar as coletas seriadas é de suma importância no

auxílio de uma interpretação mais precisa dos resultados obtidos. Por se tratar de um estudo realizado com pacientes acometidos naturalmente por cólica, a obtenção de informações sobre o início da doença foi uma estimativa baseada em informações fornecidas pelos proprietários, não sendo possível estabelecer com precisão a duração da cólica, o que pode ter comprometido a interpretação dos resultados. Pesquisas feitas com indução experimental da doença ao invés de casos com animais naturalmente acometidos trariam informações mais acuradas sobre o ensaio realizado. No entanto, estudos com casuística natural da doença refletem as verdadeiras dificuldades e variações impostas pela rotina clínica e cirúrgica.

A Hp não apresentou diferença estatística nos momentos avaliados. Em equinos, é uma das PFAs frequentemente mensurada, no entanto, apresenta uma resposta moderada podendo aumentar sua concentração, durante a resposta de fase aguda, em uma a dez vezes (CRISMAN et al., 2008). Diferindo dos nossos achados, Fagliari et al. (2008) observaram no traçado eletroforético de animais com cólica submetidos à laparotomia (n=20) e que vieram a óbito (n=10), que a proteína que se elevou mais precocemente foi a haptoglobina, 22,5%, 24h após a laparotomia. Os autores concluíram que a haptoglobina e ceruloplasmina podem ser consideradas indicadores de prognóstico para síndrome cólica em equinos submetidos à laparotomia. Achados semelhantes também foram observados por Fagliari e Silva (2002) associando a elevação da Hp ao trauma cirúrgico. No entanto, no nosso ensaio, o número de animais com indicação cirúrgica que vieram a óbito e o momento do óbito devem ser levados em consideração uma vez que, houve coleta 24 horas após o procedimento em apenas três animais dos seis com indicação cirúrgica, além disso, os ensaios citados são controlados, o momento inicial do processo inflamatório foi estabelecido com maior precisão em relação ao nosso estudo.

Em contrapartida, Pihl et al. (2016) observaram que a Hp não contribuiu no modelo de regressão logística criado para diferenciar cavalos com cólica inflamatória dos animais com indicação cirúrgica, corroborando nossos achados onde não houve diferença nos grupos analisados (clínico e cirúrgico). Di Filippo et al. (2014) relataram o aumento da concentração da Hp sérica em cavalos submetidos a orquiectomia entre 96 e 120 horas após o procedimento cirúrgico, porém, no nosso ensaio foram realizadas coletas até 72 horas. Em outro ensaio, a haptoglobina não foi

útil como diagnóstico ou indicador prognóstico para cavalos com sinais de dor abdominal e o aumento da sua concentração também não foi associada ao desenvolvimento de complicações (WESTERMAN et al., 2016).

Apesar da Hp ser utilizada para monitoramento e diagnóstico de processos inflamatórios em equinos, essa PFA apresenta resposta mais tardia e uma variação relevante em animais hípidos (POLLOCK et al., 2005). O comportamento variado dessa proteína pode justificar os nossos achados, uma vez que, com a imprecisão no tempo de evolução dos casos descritos, pode não ter havido tempo suficiente para que fosse observado um aumento significativo da Hp.

Apesar da GPA também não ter apresentado diferença estatística nos momentos avaliados, sua concentração manteve-se elevada nos G1 e G2 em relação ao GC, demonstrando ser uma PFA interessante a ser analisada. Este resultado difere dos achados de Di Filippo et al. (2011) em que a GPA elevou sua concentração nos animais com cólica submetidos ao procedimento cirúrgico; Di Filippo et al. (2010) e Fagliari et al. (2008), onde estes autores observaram que a concentração da GPA foi mais elevada em equinos com cólica submetidos ao tratamento cirúrgico e nos óbitos, quando comparados aos animais sobreviventes.

A apolipoproteína A1 (Apo A1) também não apresentou diferença significativa nas comparações realizadas, no entanto, essa proteína manteve sua concentração baixa nos grupos doentes (G1 e G2), em comparação ao GC (Figura 7). Trata-se de uma PFA negativa que compõe a camada superficial da lipoproteína plasmática HDL. Nos animais doentes avaliados no nosso estudo, durante o processo inflamatório agudo, a amiloide sérica A (ASA) apresentou aumento da sua concentração, esse achado pode justificar o comportamento da Apo A1. A ASA se liga a HDL para realizar parte da sua função, fazendo com que ocorra o desligamento da apolipoproteína A1, e esta é imediatamente removida da circulação, justificando a diminuição da sua concentração (COETZEE et al., 1986).

Na comparação feita entre os momentos avaliados (M0 - M3) dentro de cada grupo acometido pela cólica (G1 e G2), não foi observada diferença estatística para os valores da ASA. Apesar disso, no G1 a concentração da ASA foi diminuindo gradativamente com o menor valor no último momento da coleta (M3 : 72h) (Figura 8). Já no G2 é possível observar que essa proteína oscila positivamente indicando a

severidade do caso, uma vez que se trata de animais que podem ter vindo a óbito ou realizado procedimento cirúrgico.

Foi observada diferença estatística entre os M3 dos referidos grupos, bem como do GC e M3 do G2, reforçando a assertiva anterior. De acordo com Daniel et al.(2016) a mensuração seriada da ASA (48, 72 e 96 horas) após a cirurgia pode ser útil para determinar o risco de complicações e orientar no cuidado pós-operatório, entretanto, em nosso estudo não foi possível realizar coletas após 72h do procedimento cirúrgico, uma vez que os animais que não vieram a óbito após o procedimento recebem alta hospitalar nesse momento. Também foi observada uma resposta significativa da ASA no M1, M2 e M3, com valores mais elevados nos animais do G2, na comparação feita entre o G1 e G2. Vandenplas et al., (2005) observaram concentrações mais elevadas da ASA em cavalos com cólica e que não sobreviveram quando comparada aos animais sobreviventes, isso vai de acordo com a diferença encontrada em nosso estudo quando comparamos os grupos tratados clinicamente e cirurgicamente, visto que ocorreram óbitos apenas no grupo tratado cirurgicamente.

Por fim, Pihl et al.(2016) demonstraram a capacidade da ASA como marcador diagnóstico em cavalos com cólica, permitindo diferenciar cólicas com resolução clínica das cirúrgicas e sugerindo que a inclusão dessa PFA como marcador diagnóstico pode auxiliar na tomada de decisão quanto ao tratamento a ser instituído, melhorando o prognóstico dos pacientes.

O conhecimento a cerca dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório da síndrome cólica, que leva a alteração na concentração das PFAs, são relevantes e podem auxiliar na conduta do Médico Veterinário na instituição do tratamento e prognóstico dos pacientes.

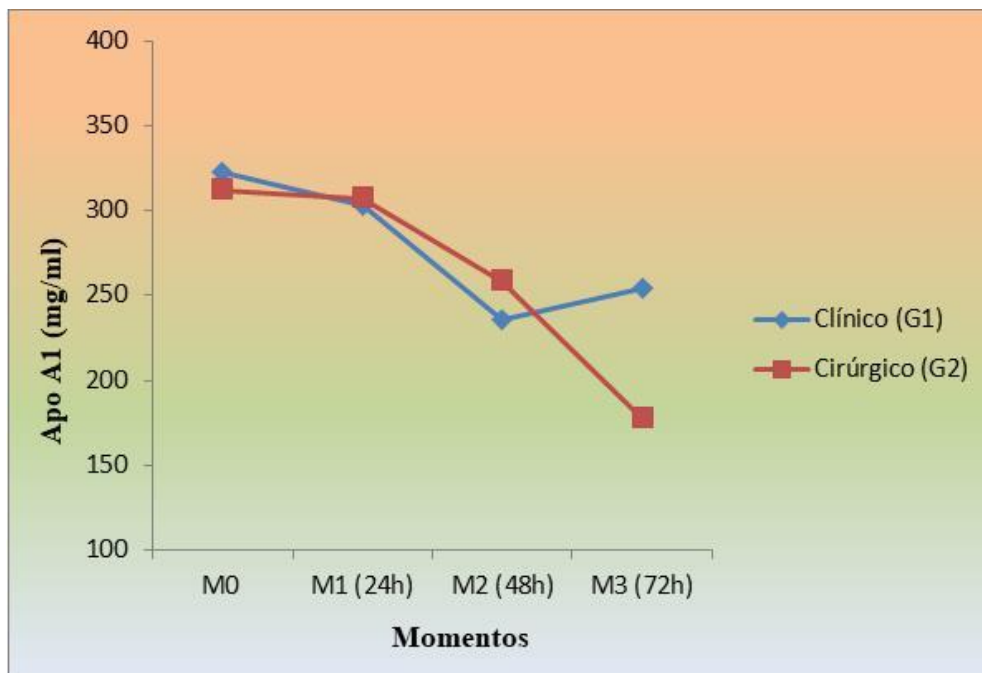


Figura 7. Comportamento da Apolipoproteína A1 nos momentos avaliados.

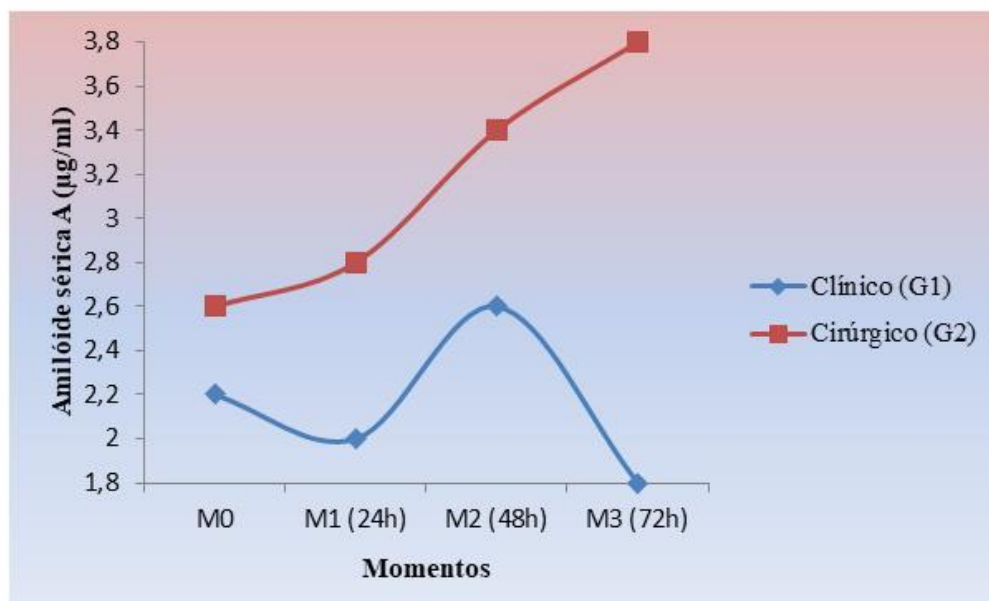


Figura 8. Comportamento da amilóide sérica A nos momentos avaliados.

3. Conclusão

O comportamento das PFAs encontradas nesse estudo foi variável. A elevação da concentração de algumas proteínas (α 2-macroglobulina, ceruloplasmina e ASA) nos animais doentes indica que houve uma resposta das PFAs induzida pelo processo inflamatório agudo, apesar de algumas PFAs de importância para os equinos, como a haptoglobina, não apresentarem o comportamento esperado. No entanto, deve-se considerar o fato de que por se tratar de um ensaio natural não foi possível determinar com precisão o tempo ocorrido entre o início do processo inflamatório e a chegada do animal ao HOVET. Os animais chegaram ao HOVET em diferentes momentos de evolução do quadro de abdômen agudo, desde um processo inicial até um processo de melhora clínica ou mesmo antecedendo o óbito. Essa variação clínica entre os pacientes nos momentos da coleta pode ter refletido no comportamento das PFAs e conseqüentemente na interpretação de alguns achados.

A ASA e a Cp foram favoráveis na avaliação da resposta de fase aguda em cavalos naturalmente acometidos pela síndrome cólica, sendo bons marcadores inflamatórios quando comparados o GC e GD. A mensuração seriada dessas proteínas foi útil na diferenciação do tratamento clínico ou cirúrgico e prognóstico de cavalos com esta enfermidade. É necessário um maior tempo de coleta para melhor avaliar a cinética dessas proteínas.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A síndrome cólica é uma das enfermidades que mais causa óbito na espécie equina. Apesar de ser facilmente diagnosticada, o diagnóstico etiológico e a instituição do tratamento são uns dos maiores entraves para o clínico veterinário. A tomada de decisão precisa e de maneira precoce estão diretamente relacionadas a resposta clínica dos pacientes mediante ao tratamento instituído. Sendo assim, o comportamento das proteínas de fase aguda nesta enfermidade é de grande valia no auxílio diagnóstico e prognóstico destes animais.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a determinação das concentrações da α 2-macroglobulina, ceruloplasmina e ASA são marcadores importantes na síndrome cólica. A Cp demonstrou ser um bom marcador da cólica cirúrgica e a ASA apresentou capacidade de determinar o prognóstico desta enfermidade.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F. . et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215(3), p. 403–410, 1990.

BENTZ, B. **Understanding Equine Colic: your guide to horse health care and management**. 1. ed. Lexington, KY: Blood-Horse Publications, 2004.

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

COETZEE, G. A. et al. Serum amyloid A-containing human high density lipoprotein 3. Density, size, and apolipoprotein composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 21, p. 9644–9651, 1986.

CONTIN, C. M. et al. Proteínas de fase aguda: Revisão de literatura. **Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n. 2, p. 73–76, 2015.

CRAY, C. Acute phase proteins in animals. In: CONN, P. M. (Ed.). **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. Oxford, UK: Elsevier Inc., 2012. v. 105p. 113–150.

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.; KENT, S. W.; ZIMMERMAN, K. L. Blood Proteins and Inflammation in the Horse. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 24, n. 2, p. 285–297, 2008.

CYWIŃSKA, A. et al. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. **Research in Veterinary Science**, v. 93, n. 3, p. 1402–1406, 2012.

DANIEL, A. J. et al. Concentrations of serum amyloid A and plasma fibrinogen in horses undergoing emergency abdominal surgery. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 26, n. 3, p. 344–351, 2016.

DAVIS, J. L. et al. A Retrospective Analysis of Hepatic Injury in Horses with Proximal Enteritis (1984-2002). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 17, n. 6, p. 896–901, 2003.

DI FILIPPO, P. A. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, p. 9–12, 2010.

DI FILIPPO, P. A. et al. Parâmetros bioquímicos de avaliação da função renal e hepática de equinos com cólica submetidos a laparotomia, sobreviventes ou não. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 460–465, 2012.

DI FILIPPO, P. A. et al. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos submetidos à orquiectomia. **Ciência Rural**, v. 44, n. 12, p. 2221–2227, 2014.

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

DI FILIPPO, P. A.; SANTANA, A. E.; COLETA, F. E. D. Avaliação clínica e eritroleucograma de equinos com cólica submetidos à laparotomia, sobreviventes e não sobreviventes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1246–1255, 2009.

DONDI, F. et al. 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.

ECKERSALL, P. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue De Medecine Veterinaire**, v. 151, n. 7, p. 577–584, 2000.

ECKERSALL, P. D. et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine Caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**, v. 3, p. 1–6, 2007.

ECKERSALL, P. D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. San Diego: Academic Press, 2008. p. 117–156.

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

FAGLIARI, J. J. et al. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 322–328, 2008.

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.

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

GAFFNEY, P. M. et al. Protein profiling of isolated uterine AA amyloidosis causing fetal death in goats. **The FASEB Journal**, v. 29, n. 3, p. 911–919, 2015.

GRONDIN, T. M.; DEWITT, S. F. Normal Hematology of the Horse and Donkey. In: WEISS, D. J.; J, W. K. (Eds.). **Schalm's veterinary hematology**. 6. ed. Iowa-USA: Wiley-Blackwell, 2010. p. 821–827.

HEEGAARD, P. M. H. et al. The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1–2, p. 151–159, 2000.

HEEGAARD, P. M. H. et al. Pig α 1-Acid Glycoprotein: Characterization and First Description in Any Species as a Negative Acute Phase Protein. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1–13, 2013.

HILLYER, M. H. et al. Case control study to identify risk factors for simple colonic obstruction and distension colic in horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 5, p. 455–463, 2002.

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

HULTÉN, C. et al. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin , fibrinogen and α 2 -globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine veterinary journal**, v. 34, n. 7, p. 699–704, 2002.

HULTÉN, C.; DEMMERS, S. Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 7, p. 693–698, 2002.

HUSSEIN, H. A. et al. Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. **Veterinary World**, v. 11, n. 1, p. 34–41, 2018.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. **Journal of pharmacy and bioallied sciences**, v. 3, n. 1, p. 118–127, 2011.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. [s.l.] Academic press, 2008.

KELLER A, NESVIZHSKII AI, KOLKER E, A. R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 5383–5392, 2002.

LAURITZEN, B. et al. Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment: An experimental model of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. **Research in Veterinary Science**, v. 74, n. 3, p. 261–270, 2003.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. **Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento**, p. 56, 2016.

MAIR, T. S.; SMITH, L. J.; SHERLOCK, C. E. Evidence-Based Gastrointestinal Surgery in Horses. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice**, v. 23, n. 2, p. 267–292, 2007.

MCDONALD, T. L. et al. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 83, n. 3–4, p. 203–211, 2001.

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 771–776, 2010.

MORIMATSU, M. et al. Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 18, p. 11833–11837, 1991.

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.

NESVIZHSHKII, A. I. et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 4646–4658, 2003.

NOGUEIRA, A. F. S. et al. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos hípidos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2018–2024, 2013.

OLIVEIRA, E. et al. Eletroforese: Conceito e aplicações. **Enciclopédia biosfera**, v. 11, n.22, p. 1129–1149, 2015.

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.

PARRY, B. W.; GAY, C. C.; ANDERSON, G. A. Assessment of the necessity for surgical intervention in cases of equine colic: A retrospective study. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, n. 3, p. 216–221, 1983.

PEDROSA, A. R. P. A. A. **Cólicas em equinos: tratamento médico vs cirúrgico-critérios de decisão**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária, 2008.

PEPYS, M. B. C-Reactive Protein Fifty Years on. **The Lancet**, v. 317, n. 8221, p. 653–657, 1981.

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

PIHL, T. H. et al. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n. 2, p. 177–183, 2013.

PIHL, T. H. et al. Influence of Disease Process and Duration on Acute Phase Proteins in Serum and Peritoneal Fluid of Horses with Colic. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 2, p. 651–658, 2015.

PIHL, T. H. et al. Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 26, n. 5, p. 664–674, 2016.

PIHL, T. H. et al. Acute phase proteins in blood and peritoneal fluid as prognostic markers in horse with colic. **Equine Veterinary Education**, p. 34–35, 2017.

POCACQUA, V. et al. Glycan moiety modifications of feline α 1-acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 107, n. 1–2, p. 17–26, 2005.

POLLOCK, P. J. et al. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. **Veterinary Record**, v. 156, n. 17, p. 538–542, 2005.

RIET-CORREA, F. et al. **Doença de Ruminantes e Equinos**. 2(2) ed. São Paulo - SP: VARELA, 2001.

ROBINSON, C. S. et al. Are serum amyloid A or D-lactate useful to diagnose synovial contamination or sepsis in horses? **Veterinary Record**, v. 181, n. 16, p. 425, 2017.

RUBEL, C. et al. Fibrinogen Promotes Neutrophil Activation and Delays Apoptosis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 3, p. 2002–2010, 2001.

SANTOS, W. B. et al. Proteína-C-reativa e doença cardiovascular: as bases da evidência científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 4, p. 452–456, 2013.

SAQUETTI, C. H. C. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 4, p. 794–799, 2008.

SAVERIO, P. et al. Critical Assessment of the Diagnostic Value of Feline α 1 -Acid Glycoprotein for Feline Infectious Peritonitis Using the Likelihood Ratios Approach. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 3, p. 266–272, 2007.

SELTING, K. A et al. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 14, n. 5, p. 503, 2000.

SHEVCHENKO, A. et al. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, v. 1(6), p. 2856–2860, 2006.

STOCKHAM, S.; SCOTT, M. A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2011.

TAIRA, T. et al. NII-Electronic Library Service. **Journal of veterinary science**, v. 54, n. 3, p. 435–442, 1992.

THOMASSIAN, A. **Enfermidade dos cavalos**. 4. ed. São Paulo - SP: VARELA, 2005.

THRALL, M. A. . et al. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 2. ed. São Paulo - SP: Roca Ltda., 2015.

VANDENPLAS, M. L. et al. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. **American Journal Veterinary Research**, v. 66, n. 9, p. 1509–1516, 2005.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6. ed. Iowa-USA: Wiley-Blackwell, 2010.

WESTERMAN, T. L. et al. Evaluation of serum amyloid a and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. **American Journal of Veterinary Research**, v. 76, n. 10, p. 882–888, 2016.

WHITE, N. A. Equine colic. **52 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners - AAEP**, v. 52, 2006.

WHITE, N. A.; EDWARDS, G. B. **Handbook of Equine Colic**. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1999.

WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; MAIR, T. S. **The Equine Acute Abdomen: Diagnosis and Treatment of Gastrointestinal Disease**. Jackson, WY: Teton Newmedia, 2009.

WILSON, K.; WALKER, J. **Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology**. 7. ed. Cambridge-UK: Cambridge University Press, 2010.

ANEXO I**FICHA PARA COLETA DE DADOS**

Animal: _____ Sexo: _____ Raça: _____ Idade: _____ Ficha: _____ Amostra: _____
Tempo de cólica: _____ Medicação: _____
Alimentação: _____
Dor abdominal: _____
Distensão abdominal: _____
FC: _____ FR: _____ Coloração da mucosa: _____ TPC: _____
Auscultação abdominal: _____
Refluxo: _____
Exame transretal: _____

Diagnóstico: _____
Resolução: Clínica () Cirúrgica () Óbito ()
OBS: _____
Coletas: M0 () M1 () M2 () M3 () M4 () M5 () Coletas concluídas ()

ANEXO II

ANÁLISES REALIZADAS

ID	Mom	Trat	PT g/dl	α -2 macro (182 kD) mg/dL	Cp (157 kD) mg/dL	Trf (89 kD) mg/dL	Alb (66 kD) mg/dL	α -1 antitrip (60 kD) mg/dL	IgG (54 kD) mg/dL	Hp (45 kD) mg/dL	GPA (42 kD) mg/dL	IgG (30 kD) mg/dL	Apoli A1 (27 kD) mg/dL	ASA (11 kD) m μ /ml
P2	M0	Clí	6,8	92,7	80,3	420	2720	153,7	312,9	37,9	24,4	599,8	187,7	1,13
P2	M1	Clí	6	179,9	96,5	502	2480	215,5	648,5	90,7	59,9	848,5	189,2	2,21
P2	M2	Clí	6	211,5	85,7	419	2370	208	748,7	84,7	68,5	717,5	106	2,99
P2	M3	Clí	6,4	179,2	100	660,9	2660	207,9	504,8	126,6	52,5	1353,7	208,2	1,69
P5	M0	Clí	8,4	106,3	90,2	752,2	1310	172,5	358,6	157	32	825,4	252,6	2,92
P7	M0	Clí	6,4	168,3	55,8	486,5	2884	200,8	213,1	75,4	<10	1018,7	184,7	3,24
P7	M1	Clí	6,2	211	87,5	529,4	2930	319,4	394,4	125,3	51,1	1221,9	202,8	1,28
P8	M0	Clí	6,4	200	99,6	658,8	2930	140,9	448,4	88,6	45,5	1046,9	199,6	1,84
P8	M1	Clí	6,2	237,5	109,9	417,4	2760	<10	651,7	128,5	<10	1027,6	360,9	1,66
P8	M2	Clí	6,4	203,3	116,8	229,5	2940	<10	654,8	157,1	<10	1182,3	286,3	2,23
P8	M3	Clí	6,5	144,9	87,3	520	2790	207,6	440,6	190,3	57,8	1163,1	191,9	2,15
P9	M0	Clí	6,4	192,4	72	429,2	1980	460,2	854,9	96,7	29,8	1079,6	273,9	1,43
P9	M1	Clí	6	198,6	90	638,3	2130	196,3	577,5	152,8	58,5	1160,8	181,2	1,6
P11	M0	Clí	6,3	351,6	171,9	636	3000	264,9	1638,3	206,2	78,8	1857,6	-	1,91
P11	M1	Clí	5,1	153,1	49,2	333,7	2140	260,4	519	117,7	63,5	1358,9	316,4	3,02
P12	M0	Clí	5,5	389,4	153,9	609	2660	228,9	1275,8	370,7	253,8	2226,3	621	3,23
P12	M1	Clí	5,2	296,7	89,2	501	2520	586,7	1161,7	385	45,6	1670,4	374,7	2,04
P12	M2	Clí	5,2	296,4	148,4	287	2420	503,1	700,2	333	132,5	1113,5	314	2,61
P12	M3	Clí	5,1	326,5	140,8	627,6	2390	592,8	965,8	288,9	133,8	1241,5	363,6	1,8

P14	M0	Clf	5,7	272	113	818,4	2970	532,1	891	134,3	72,4	2023,2	438	1,32
P14	M1	Clf	5,1	315,5	183,8	590,5	2830	270,2	822,8	238,4	87	2065,8	381,6	1,28
P15	M0	Clf	7,1	350,7	140,2	924,5	3011	357,3	759	218,3	69,8	2139	424,7	3,13
P15	M1	Clf	7,2	446,4	120,3	1035,5	3140	350,5	1299,1	235,4	94,3	1906,9	422	3,11
P3	M0	Cir	7,6	139,1	148,1	646,5	3010	167,3	300,4	171,5	61	1072,2	198,6	5,38
P3	M1	Cir	5	243	113,3	640,5	2130	201,6	490	129,4	73,4	812,2	157	3,68
P3	M2	Cir	5,3	250,5	118,2	198,2	2180	183,3	629,2	138,6	80,8	1084,1	189,1	5,13
P3	M3	Cir	4,5	242,9	108,1	584,2	1810	214,6	665,4	168,5	87	981,5	179,4	3,97
P3	M4	Cir	5	250,9	92,8	586,6	1740	134,9	897	269	95,5	752	173,6	3,79
P6	M0	Cir	6,9	199,8	99	706,9	2870	193,5	475,8	198,7	56,7	413,7	320,7	1,18
P6	M1	Cir	6,1	205,2	72,9	577	2670	223,2	469,2	202,4	83	931,6	288,1	1,46
P10	M0	Cir	5,9	200	89,4	633,2	2450	281,4	752,8	103,5	81,7	1233,6	207,4	1,75
P10	M1	Cir	5,4	152,4	36,7	433,4	2450	174,3	722,3	88,7	40,7	1234,4	97	1,31
P10	M2	Cir	5,3	174,4	83,8	443,6	2280	205,5	740,2	95,7	79,1	960,6	176,1	2,01
P10	M3	Cir	5,8	199,3	102,4	561,7	2210	228,1	817	115,2	71,8	1141,1	175	3,72
P1	M0	Cir	6	122,6	76,2	517,5	2570	<10	523,2	66,4	29,8	936,3	253,7	1,2
P4	M0	Cir	6,2	260,2	104,9	549,3	1965,5	154	888,2	152,9	98,9	949	225,3	-
P13	M0	Cir	6,2	51,4	205,9	742,5	3270	580	843,2	118,4	65,6	1446,3	455,6	3,82
P13	M1	Cir	5,8	259,9	94,7	677,8	2920	234	977,9	165,00	35,2	1084,7	393,4	4,94
P13	M2	Cir	5,9	356,6	172,6	934,5	2790	668,6	1137	327,8	138,9	1561,4	409,5	3,12
P16	M0	Cir	5,6	432,5	118,6	542,2	2730	378,4	1062,6	186,3	97,8	1952,7	418,9	2,94
P16	M1	Cir	5,2	312,7	94,5	325,5	2640	499,6	1199,6	165,8	74,5	1614,3	510,8	3,02
P17	M0	Cir	6,4	268,6	113,2	718,9	2910	529,9	1134	292,7	124,3	2011,7	413,5	2,34
P17	M1	Cir	5,8	344,6	143,4	411,6	2720	389,5	1271	201,3	91,9	1588,3	398	2,96
PC1		GC	7,7	76,8	52	830,2	2370	544,5	749,5	149,8	52,6	2857,9	446,3	1,13
PC2		GC	7,3	134,7	101,7	402,3	2530	337,9	1180,9	233,4	59,6	2744,5	628,2	1,67
PC3		GC	7	190,4	61,6	672,3	2640	561,3	709,8	180,2	72,2	2359	414	1,53

PC4	GC	7,9	162	66,6	412,6	2500	675,8	1148,9	116,8	38,9	3108,5	364	0,87
PC5	GC	8,6	158,9	65,5	349,6	198,1	461,7	461,7	239,6	59,3	3436,5	299,2	1,58
PC6	GC	7	75	102	362	2340	522,3	314	260,2	65	2918,6	353,9	1,18
PC7	GC	7,7	143,2	75,8	457	2510	330,3	1285,6	94,6	44	2573,6	394,9	-
PC8	GC	7,3	42,5	73,3	511,6	2300	510,9	263,5	92,3	65,8	2315,2	440,6	-
PC9	GC	6,6	141,4	95,2	473,3	2850	259	725,3	157,5	76,9	1580,5	372,4	-

ID	Mom	Trat	VG (%)	Leucócitos (/mm³)	Neutrófilos (/mm³)	Linfócitos (/mm³)	Monócitos (/mm³)	Eosinófilos (/mm³)	Bastonete (/mm³)	Basófilo (/mm³)
P2	M0	Clí	37,5	3.300	627	2178	297	0	0	0
P2	M1	Clí	-	4.700	1786	1974	376	0	0	0
P2	M2	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P2	M3	Clí	-	7.500	5100	1950	150	0	0	0
P5	M0	Clí	51,3	10.100	5757	3737	101	101	404	0
P7	M0	Clí	34,8	14.900	11175	2384	1043	447	298	0
P7	M1	Clí	-	12.000	7200	4080	360	360	0	0
P8	M0	Clí	35,5	11.200	7168	3360	560	112	0	0
P8	M1	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P8	M2	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P8	M3	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P9	M0	Clí	29	12.300	6273	5658	246	0	0	123
P9	M1	Clí	-	15.600	8112	6708	0	0	156	624
P11	M0	Clí	35	7.800	4056	3432	312	0	0	0
P11	M1	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	M0	Clí	25	13.000	5980	4030	1300	0	1560	0
P12	M1	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	M2	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P12	M3	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-

P14	M0	Clí	31,1	19.200	8448	8256	1920	0	384	0
P14	M1	Clí	-	-	-	-	-	-	-	-
P15	M0	Clí	29,9	7.800	4368	3042	390	0	0	0
P15	M1	Clí	-	9.200	2944	5428	368	276	92	92
P3	M0	Cir	35	8.100	2592	2835	1620	0	1053	0
P3	M1	Cir	-	5.800	2436	2146	638	0	522	0
P3	M2	Cir	-	6.100	2806	1891	854	0	549	0
P3	M3	Cir	-	8.100	3078	3969	324	162	567	0
P3	M4	Cir	-	19.300	15440	3281	579	0	0	0
P6	M0	Cir	21,4	7.400	2516	4736	148	0	0	0
P6	M1	Cir	-	-	-	-	-	-	-	-
P10	M0	Cir	29	7.800	1404	6240	78	78	0	0
P10	M1	Cir	-	6.700	3216	2278	268	0	938	0
P10	M2	Cir	-	-	-	-	-	-	-	-
P10	M3	Cir	-	-	-	-	-	-	-	-
P1	M0	Cir	46,9	3.700	3034	629	37	0	0	0
P4	M0	Cir	28	4.200	924	1848	252	0	1092	0
P13	M0	Cir	26	12.700	7620	4826	254	0	0	0
P13	M1	Cir	-	6.000	2880	2700	240	0	180	0
P13	M2	Cir	-	5.400	1188	3510	270	162	270	0
P16	M0	Cir	28	7.400	1850	4884	74	592	74	0
P16	M1	Cir	-	8.900	4094	2937	89	0	1780	0
P17	M0	Cir	31	6.300	3150	2142	567	0	378	63
P17	M1	Cir	-	6.300	3465	2583	189	126	0	0
PC1		GC	26,6	7.000	4480	1330	210	980	0	0
PC2		GC	31,1	12.300	5535	4797	1107	369	0	246
PC3		GC	25,5	10.700	4601	9202	107	0	0	0

PC4	GC	34	9.300	4557	3441	279	837	93	93
PC5	GC	34,1	9.400	5076	2538	564	1222	0	0
PC6	GC	23,7	9.700	5238	3104	291	1067	0	0
PC7	GC	26,4	7.400	2294	4292	74	740	0	0
PC8	GC	26,4	10.100	5757	1919	707	1313	0	404
PC9	GC	39	12.100	6292	4840	242	726	0	0

ID	Mom	Trat	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	AST (U/L)	GGT (U/L)	CK (U/L)
P2	M0	Clí	-	-	-	-	-
P2	M1	Clí	-	-	-	-	-
P2	M2	Clí	-	-	-	-	-
P2	M3	Clí	-	-	-	-	-
P5	M0	Clí	34,2	3,1	7,62	33	8136
P7	M0	Clí	30,3	0,83	223	23	443
P7	M1	Clí	19,9	1,05	231	20	226
P8	M0	Clí	39,6	1,2	225	24	228
P8	M1	Clí	-	-	-	-	-
P8	M2	Clí	-	-	-	-	-
P8	M3	Clí	-	-	-	-	-
P9	M0	Clí	39,6	1,2	225	24	228
P9	M1	Clí	-	-	-	-	-
P11	M0	Clí	63,65	1,35	195	27	328
P11	M1	Clí	-	-	-	-	-
P12	M0	Clí	34,7	1,39	170	6	480
P12	M1	Clí	-	-	-	-	-
P12	M2	Clí	-	-	-	-	-

P12	M3	Clí	-	-	-	-	-
P14	M0	Clí	37,4	1,29	8	21	162
P14	M1	Clí					
P15	M0	Clí	35,9	1,56	172	5,1	170
P15	M1	Clí	-	-	-	-	-
P3	M0	Cir	43,6	1,33	13,2	19,08	934
P3	M1	Cir	30,6	0,78	918	52	1487
P3	M2	Cir	13,2	0,76	1212	40	-
P3	M3	Cir	19,08	0,69	1434	49	-
P3	M4	Cir	-	-	-	-	-
P6	M0	Cir	59,1	0,98	228	12	191
P6	M1	Cir					
P10	M0	Cir	18,2	1,48	245	18	299
P10	M1	Cir	-	-	-	-	-
P10	M2	Cir	-	-	-	-	-
P10	M3	Cir	-	-	-	-	-
P1	M0	Cir	40,5	1,33	172	23	259
P4	M0	Cir	25,3	1,36	141	11	241
P13	M0	Cir	31,5	0,96	546	26	885
P13	M1	Cir	-	-	-	-	-
P13	M2	Cir	-	-	-	-	-
P16	M0	Cir	28,8	1,21	169	8	213
P16	M1	Cir	-	-	-	-	-
P17	M0	Cir	113,5	6,38	112	10,8	-
P17	M1	Cir	65,6	2,87	113	12,9	217
PC1		GC	43,2	0,77	175	26	320
PC2		GC	65,6	1,35	213	23	223

PC3	GC	67,4	1,41	218	25	218
PC4	GC	52,1	1,25	175	28	450
PC5	GC	54,1	1,32	211	22	226
PC6	GC	49,4	1,39	198	18	188
PC7	GC	57,1	1,53	217	23	291
PC8	GC	60,3	1,37	218	24	279
PC9	GC	45,6	1,59	212	30	177

ANEXO III

IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

Proteína	Número de acesso	Base de dados	MS/MS Score	Prob. Proteína	Peso molecular (kDa)	Sequência de peptídeos	Prob. Peptídeos
Alfa-2-macroglobulina	F6R942	Equidae / Uniprot	245	100%	163	VDFSSPAQSLPGSPAH	100%
						LR	99%
						ASFSVLGDILGSAMR	95%
Ceruloplasmina	F6PQ46	Equidae / Uniprot	101	100%	122	APVEHFHQPR	98%
						GAHPLSIEPIGVR	94%
Transferrina	P27425	Equidae / Uniprot	211	100%	80	DLYSGLIGPLIVCR	100%
						AVSNFFAGSCVPCADR	99%
Albumina sérica	P02769	Metazoa / Uniprot	589	100%	71	YYGYTGAFR	100%
						RHPYFYAPELLYYANK	100%
						DAFLGSFLYEYSR	99%
Alpha-1-antitripsina	B5BV00	Equidae / Uniprot	119	92%	47	LGEYGFQNALIVR	100%
						IAPNLADFAFSLYR	99%
IgG de cadeia pesada	H9GZT5	Equidae / Uniprot	72	92%	37	EPQVYVLAPHRDELSK	99%
Haptoglobina	F6XWM5	Equidae / Uniprot	213	100%	39	VVFHPDYQEVDIGLIK	100%
						VMPICLPSKDYAQVGR	99%
						VGYVSGWGR	95%
Apolipoproteína A1	F6Z2L5	Equidae / Uniprot	328	100%	30	KWQEEVEVYR	95%
						VNLAPFSEELR	100%
Amilóide sérica A	P19857	Equidae / Uniprot	87	100%	12	LLSFLGEAAR	92%