

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE MULTIVARIADA DO LEUCOGRAMA E DA  
RESPOSTA DE FASE AGUDA EM EQUINOS  
ACOMETIDOS POR SÍNDROME CÓLICA DE ORIGEM  
NATURAL OU EXPERIMENTAL**

**Andressa Francisca Silva Nogueira**

Médica Veterinária

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE MULTIVARIADA DO LEUCOGRAMA E DA  
RESPOSTA DE FASE AGUDA EM EQUINOS  
ACOMETIDOS POR SÍNDROME CÓLICA DE ORIGEM  
NATURAL OU EXPERIMENTAL**

**Andressa Francisca Silva Nogueira**

**Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr. Aureo Evangelista Santana**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Paula Alessandra Di Filippo**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área de Clínica Médica Veterinária.

2014

Nogueira, Andressa Francisca Silva  
N778a Análise multivariada do leucograma e da resposta de fase aguda em equinos acometidos por síndrome cólica de origem natural ou experimental / Andressa Francisca Silva Nogueira. – – Jaboticabal, 2014  
xix, 61 p. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014  
Orientador: Aureo Evangelista Santana  
Coorientadora: Paula Alessandra Di Filippo  
Banca examinadora: André Escobar, Rafael Resende Faleiros, Sérgio Antônio Ferraudó, Raimundo Souza Lopes  
Bibliografia

1. Abdômen agudo. 2. Eletroforese. 3. Cavalos. 4. Proteínas de fase aguda. 5. Leucograma I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616-072:636.1

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** ANÁLISE MULTIVARIADA DO LEUCOGRAMA E DA RESPOSTA DE FASE AGUDA EM EQUINOS ACOMETIDOS POR SÍNDROME CÓLICA DE ORIGEM NATURAL OU EXPERIMENTAL


**AUTORA:** ANDRESSA FRANCISCA SILVA NOGUEIRA  
**ORIENTADOR:** Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA  
**CO-ORIENTADORA:** Profa. Dra. PAULA ALESSANDRA DI FILIPPO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. AUREO EVANGELISTA SANTANA  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. ANTONIO SERGIO FERRAUDO  
Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. ANDRÉ ESCOBAR  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. RAIMUNDO SOUZA LOPES  
Departamento de Clínica Veterinária / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

  
Prof. Dr. RAFAEL RESENDE FALEIROS  
Universidade Federal de Minas Gerais / Belo Horizonte/MG

Data da realização: 17 de fevereiro de 2014.

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ANDRESSA FRANCISCA SILVA NOGUEIRA** – nascida em 27 de dezembro de 1981, em Jaboticabal, SP., Médica Veterinária formada pela Universidade Federal de Lavras UFLA, Lavras, MG, em dezembro de 2006. No ano de 2007, ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária e Saúde Pública (Residência), área de concentração em Patologia Clínica Veterinária, junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - (FCAV/Unesp), Jaboticabal, SP. Em março de 2009, iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp (Área de concentração em Clínica Médica Veterinária), obtendo o Título de Mestre em Medicina Veterinária em fevereiro de 2010. Em março de 2010, ingressou no curso de doutorado, novamente junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária da FCAV/Unesp (Área de concentração em Clínica Médica Veterinária). Em 2012 realizou estágio de doutoramento no exterior, junto à Clinéquine/VetAgro Sup - École Nationale de Lyon, Fr., por seis meses.

*“Daqui a vinte anos a sua maior frustração será com as coisas que você deixou de fazer e não com as que você fez e deu errado. Então solte as amarras e navegue para longe do porto-seguro. Pegue os ventos de mudanças nas suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.”*

*Mark Twain*

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Sidney e Ayres, pelo apoio, incentivo e esforço para realização dos meus sonhos.

Às minhas irmãs, Adna e Adriana, pelo carinho e dedicação.

À minha avó Joana, pelas orações.

Às amigas Letícia, Luísa, Camila e Kalina pela amizade, apoio, dedicação, paciência e carinho sempre.

Ao Aureo Evangelista Santana Junior, pelo companheirismo, paciência e carinho.

Aos animais, por me darem a oportunidade de conhecê-los melhor e buscar conhecimentos para tratá-los com competência e seriedade.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. Áureo Evangelista Santana agradeço sua orientação, dedicação, ensino, paciência, confiança, apoio, carinho e amizade. Homem de grande sabedoria e humildade, que com responsabilidade e integridade comanda uma vida de dedicação e amor ao ensino, pesquisa e extensão no exercício pleno da Medicina Veterinária.

À co-orientadora Paula A. Di Filippo não apenas pela orientação, mas também pela oportunidade, confiança e amizade sem os quais não seria possível a consecução deste trabalho.

Ao funcionário Paulo César da Silva pela disponibilidade, ensino e amizade imprecindíveis.

Ao amigo Eugênio de Campos Filho que sempre soube ensinar e fazer tudo parecer mais fácil e possível; e ao Auxiliar de Laboratório, Matheus Yamazaki Andrade pela ajuda, companhia, carinho e amizade. Sem sua presença os dias se tornariam menos alegres.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr. José Jurandir Fagliari, responsável pelo Laboratório de Pesquisa do DCCV/FCAV/Unesp, pela contribuição científica.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade e apoio na realização deste ensaio.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio e apoio à realização desta pesquisa.



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	1
3. OBJETIVOS .....	5
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	6
4.1 Aspectos infraestruturais .....	6
4.2 Animais .....	6
4.3 Delineamento experimental .....	7
4.4 Coleta dos dados .....	9
4.4.1 Avaliações laboratoriais .....	9
4.5 Procedimentos analítico-laboratoriais .....	10
4.5.1 Obtenção das proteínas totais .....	10
4.5.2 Eletroforetograma das proteínas .....	10
4.5.3 Leucograma.....	11
4.6 Análise estatística .....	12
5. RESULTADOS .....	13
5.1 Animais acometidos por cólica natural (CN) x Animais acometidos por cólica experimental (CE).....	13
5.2 Fase Inicial (FI) x Fase Final (FF).....	16
5.3 Animais acometidos por cólica natural em Fase Inicial (CNFI) x Animais acometidos por cólica natural em Fase Final (CNFF).....	18
5.4 Animais acometidos por cólica experimental em Fase Inicial (CEFI) x Animais acometidos por cólica experimental em Fase Final (CEFF).....	20
5.5 Alfa-1 Antitripsina e P10.....	22

6. DISCUSSÃO.....	24
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS .....	32
APÊNDICE .....	39
A – Soluções empregadas na eletroforese (SDS-PAGE).....	40



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 027728/09 do trabalho de pesquisa intitulado "**Estudo comparativo do proteinograma sérico de eqüinos acometidos por cólica natural e experimental**", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aureo Evangelista Santana, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 10 de dezembro de 2009.

Jaboticabal, 10 de dezembro de 2009.

**Prof. Dr. Jeffrey Frederico Lui**  
Presidente - CEBEA

**Med. Vet. Maria Alice de Campos**  
Secretária - CEBEA

## **“ANÁLISE MULTIVARIADA DO LEUCOGRAMA E DA RESPOSTA DE FASE AGUDA EM EQUINOS ACOMETIDOS POR SÍNDROME CÓLICA NATURAL OU EXPERIMENTAL”**

**RESUMO** – As proteínas de fase aguda são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos e surgem precocemente na circulação sanguínea durante processos inflamatórios. Assim, o estudo objetivou identificar, diferenciar, quantificar, avaliar e comparar as proteínas séricas de fase aguda em equinos com cólica de ocorrência natural e naqueles submetidos à obstrução intestinal experimental e correlacioná-las com o leucograma destes animais. Utilizaram-se 27 equinos adultos, 12 animais atendidos junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (FCAV/Unesp) no período de julho de 2010 à julho de 2013 para tratamento de abdômen agudo, sobreviventes ou não, e 15 animais submetidos a obstrução intestinal experimental de intestino delgado ou grosso. Foram colhidas amostras de sangue total com anticoagulante, para realização do leucograma, e sem anticoagulante para realização do eletroforetograma em SDS-PAGE imediatamente antes da laparotomia (M0), após o procedimento cirúrgico (M1) e, diariamente, até o sétimo dia pós-operatório, com exceção do sexto dia (M2, M3, M4, M5, M6 e M7). Para análise dos dados utilizou-se o método estatístico multivariado com análise de fatores. Os equinos com cólica natural apresentaram padrão de resposta inflamatória mais intensa que os equinos submetidos à obstrução experimental. Os equinos submetidos à obstrução experimental apresentaram, ainda, resposta inflamatória ao modelo de obstrução instituído. As proteínas de fase aguda tiveram maior participação na variabilidade da resposta inflamatória que o leucograma e, somente quando avaliou-se a influência do tempo em cada grupo, observou-se correlação entre as proteínas de fase aguda e o leucograma. As proteínas de fase aguda alfa-1 glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina mostraram-se eficientes marcadores da resposta inflamatória e suas alterações podem ser utilizadas como indicadores prognósticos e do tempo de evolução de abdômen agudo em equinos.

**Palavras-chave:** abdômen agudo, eletroforese, cavalos, proteínas de fase aguda, leucograma

**“MULTIVARIATE STATISTICAL ANALYSIS OF LEUKON COUNT AND ACUTE  
PHASE RESPONSE IN HORSES SUFFERING FROM NATURAL OR  
EXPERIMENTAL COLICS”**

**SUMMARY** – The acute phase proteins are glycoproteins synthesized by hepatocytes and appear early in the bloodstream during inflammatory processes. The study aimed to identify, differentiate, measure, evaluate and compare the acute phase serum proteins in horses with naturally occurring colics and those undergoing experimental intestinal obstruction and correlate them with the leukon count in these animals. From the 27 adult horses studied 12 were treated in the Veterinary Hospital "Governor Laudo Natel" (FCAV / UNESP) from July 2010 to July 2013 for acute abdomen, survivors or not, and 15 animals were subjected to experimental small or large intestinal obstruction. Samples were obtained from whole blood with anticoagulant, to perform the WBC, and without anticoagulant to perform the SDS-PAGE electrophoretogram immediately before laparotomy (M0), after surgery (M1), and daily until the seventh day after surgery, except the sixth day (M2, M3, M4, M5, M6 and M7). For data analysis the multivariate statistical method with exploratory factor analysis was used. The horses with naturally occurring colic showed intense inflammatory patterns that horses undergoing experimental intestinal obstruction. The horses undergoing experimental intestinal obstruction had also inflammatory obstruction established the model. The acute phase proteins had greater participation in the variability of the inflammatory response than the WBC and only when the influence of time in each group was evaluated there was a correlation between acute phase proteins and WBC. The acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin and ceruloplasmin were effective markers of the inflammatory response and its changes can be used as prognostic and time course indicators of acute abdomen in horses.

**Keywords:** acute abdomen, electrophoresis, horses, acute phase proteins, leukon count

## LISTA DE ABREVIATURAS

AGP: alfa-1-glicoproteína ácida

Bas: basófilos

bpm: batimentos por minuto

CAP37: azoridina

cm: centímetros

Cp: Ceruloplasmina

°C: graus Celsius

Eos: eosinófilos

FC: frequência cardíaca

fr: frequência respiratória

g/dL: gramas por decilitro

g/dL / 100 ou  $10^{-2}$  g/dL: gramas por decilitro dividido por cem

Hp: haptoglobina

IgA: imunoglobulina A

IgE: imunoglobulina E

IgG: imunoglobulina G

IgM: imunoglobulina M

IL-1: interleucina 1

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IM: intramuscular

IV: intravenoso

K<sub>2</sub>-EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético dipotássico

kDa: quilo Dalton

kg: quilograma

Le: leucócitos totais

Linf: linfócitos

mA: miliamper

MGG: May-Grunwald, Giemsa e Metanol

mg/kg: miligramas por quilo

mm: milímetros

Mon: monócitos

mov/min: movimentos por minuto

NE: elastase

NS: neutrófilos segmentados

NB: neutrófilos bastonetes

PBS: salina tamponada com fosfato

PFA: proteínas de fase aguda

PT: proteínas totais

SAA: amilóide A sérica

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio

Tf: Transferrina

TR: temperatura retal

µL: microlitros

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões dos grupos de animais acometidos por cólica natural e cólica experimental.....	14
Tabela 2. Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias nas Fases Inicial (FI: M0, M1 e M2) e Final (FF: M3, M4, M5, M6 e M7) experimental.....	18
Tabela 3. Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias de animais acometidos por cólica natural nas Fases Inicial (M0, M1 e M2) e Final (M3, M4, M5, M6 e M7) do experimento.....	22
Tabela 4. Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias de animais acometidos por cólica experimental nas Fases Inicial (M0, M1 e M2) e Final (M3, M4, M5, M6 e M7) do experimento.....	27



**LISTA DE FIGURAS**

Página

- Figura 2. Representação gráfica das concentrações séricas médias de Alfa-1 Antitripsina e P 10, em g/dL, de equinos com cólica natural durante as Fases Inicial e Final do experimento..... xx

## 1. INTRODUÇÃO

O paciente equino responde aos distúrbios gastrintestinais e aos traumas cirúrgicos associados à laparotomia através de modificações celulares, teciduais e sistêmicas. Estas modificações incluem alteração no número, estrutura e função das células sanguíneas, desenvolvimento de processos inflamatórios peritoneais e aumento na concentração das proteínas de fase aguda (EURELL et al, 1993).

A resposta de fase aguda é considerada um processo dinâmico envolvendo mudanças metabólicas e sistêmicas, como febre e leucocitose (TAKIGUCHI et al, 1990; GODSON et al, 1996), que constituem mecanismos de defesa não específicos e precoces contra insultos, até que a imunidade específica seja deflagrada (CERÓN et al, 2005; CARAPETO et al, 2006; JACOBSEN, 2007). Trata-se de uma fase da defesa orgânica que inclui mudanças na concentração das proteínas de fase aguda (PFA).

Na clínica, os métodos de detecção de PFA têm auxiliado o diagnóstico de processos inflamatórios. Alguns trabalhos comparativos sugerem que as PFA são mais sensíveis para detecção de processos inflamatórios e infecciosos do que a análise hematológica (JAIN, 1993).

O eletroforetograma representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas aportando informações sobre elevações e decréscimos nas concentrações séricas das diferentes frações protéicas. Embora as alterações nos padrões das frações protéicas não sejam características de uma doença, em particular, podem trazer importantes informações diagnósticas, quando usadas em conjunto com outros achados clínico-patológicos (THOMAS, 2000).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Como decorrência de uma injúria, trauma ou infecção de um tecido desenvolve-se no hospedeiro uma série complexa de reações metabólicas e sistêmicas, denominada resposta de fase aguda. A resposta de fase aguda é considerada um processo dinâmico envolvendo mudanças metabólicas e sistêmicas que constituem

mecanismos de defesa não específicos e precoces contra insultos até que a imunidade específica seja deflagrada (CERÓN et al., 2005; CARAPETO et al., 2006; JACOBSEN, 2007). Trata-se de uma fase da defesa orgânica que inclui liberação de um amplo espectro de mediadores por parte dos macrófagos teciduais, monócitos e linfócitos sanguíneos, dentre os quais o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas IL-1 e IL-6, principais mediadores da síntese das proteínas de fase aguda (PFA), mudanças na concentração das PFA, e, não menos importante, variação na contagem de leucócitos, como uma das respostas mais comuns à inflamação (FAZIO et al, 2010).

As PFA são glicoproteínas sintetizadas pelos hepatócitos (JACOBSEN, 2007) e podem ser classificadas em negativas, como a albumina e a transferrina, cujos níveis séricos tendem a decrescer em condições inflamatórias, e em positivas, como alfa 1-glicoproteína ácida, amilóide A sérica, haptoglobina e ceruloplasmina. Também é importante considerar que as PFA se subfracionam, de acordo com seu peso molecular e densidade de cargas, em cadeias alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama ( $\gamma$ ) (MURATA et al, 2004; PETERSEN et al, 2004; CERÓN et al. 2005). O interesse por tais proteínas se fundamenta no seu potencial uso como indicadores precoces e confiáveis da presença, grau e tempo de evolução de alguma forma de doença inflamatória ou inflamação, incluindo doenças malignas (MURATA et al, 2004; VANDENPLAS et al, 2005; JACOBSEN et al, 2006).

Na espécie equina, a Amiloide A sérica (SAA) é considerada a PFA mais sensível, mudando suas concentrações séricas rapidamente perante um dano tecidual ou inflamação aguda (CYWINSKA et al, 2010). A Haptoglobina (Hp), por sua vez, está relacionada à modulação da função dos linfócitos e macrófagos, e, sua concentração se eleva em processos inflamatórios agudos, estresse e, às vezes, durante processos neoplásicos recentes. Em equinos, o aumento sérico desta proteína foi observado após procedimentos cirúrgicos, processos inflamatórios experimentais, bem como durante doenças naturais (MURATA et al, 2004).

A Ceruloplasmina (Cp) aumenta significativamente após processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários, enquanto que sua diminuição é observada ao nascimento, desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias

hepáticas associadas à intoxicação de cobre. A  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AGP) é uma proteína que participa fundamentalmente, ligando-se à maioria das drogas básicas, tais como agentes bloqueadores e antiarrítmicos (JAIN, 1993).

A síndrome cólica é uma das principais causas de urgência cirúrgica em equinos. Apesar dos avanços nos métodos de diagnóstico, nas técnicas anestésicas e cirúrgicas, e na terapia pós-operatória, a taxa de morbimortalidade permanece elevada. Considera-se que as alterações intestinais favoreçam a passagem de bactérias e toxinas do lúmen intestinal para a corrente sanguínea, contribuindo para a manifestação de sinais sistêmicos, tais como o choque séptico em equinos (WEISS et al, 1997). Nos casos de cólica natural, devido à grande variabilidade no tempo de evolução e na forma de tratamento, é frequente o desenvolvimento de processos inflamatórios e infecciosos (EURELL et al, 1993; VANDENPLAS et al, 2005).

DI FILIPPO et al (2009), avaliando alterações hemogasométricas em equinos com cólica, observaram que as alterações metabólicas verificadas não são capazes de predizer o diagnóstico de obstruções intestinais específicas em equinos com cólica, entretanto, auxiliam no prognóstico, visto que se relacionam diretamente com a precocidade do distúrbio gastrointestinal. De outra parte, nas situações de cólica experimentalmente induzida, o tempo de evolução e o número de intervenções são pré-estabelecidos e, os processos inflamatórios e infecciosos são desencadeados, na maioria das vezes, apenas pelo trauma cirúrgico. Tal assertiva encontra ressonância nos resultados relatados por FALEIROS (2003), cujos aumentos nas atividades do TNF- $\alpha$  no soro sanguíneo e líquido peritoneal de equinos, submetidos à obstrução intestinal experimental, foram atribuídos ao reflexo da resposta inflamatória decorrente dos procedimentos cirúrgicos obstrutivos e da manipulação visceral, instituídos na consecução do modelo experimental.

O desencadeamento do quadro de cólica, não depende, na maioria das vezes, de um único fator de risco. Os resultados de muitos ensaios têm mostrado que um conjunto de fatores atua sobre o organismo do paciente para que a cólica se desenvolva (LARANJEIRA & ALMEIDA, 2008). Esses fatores isolados ou combinados, que podem ser internos ou externos, podem interagir de várias formas dando início a

mudanças fisiológicas as quais podem levar ao desenvolvimento da afecção (TRAUB-DARGATZ et al, 2001). Segundo DI FILIPPO et al (2008), em estudos realizados com equinos acometidos por cólica natural, a magnitude e a persistência das alterações relacionam-se negativamente com a recuperação dos animais com cólica. Além do mais, cada anormalidade é um importante complicador à sobrevivência do paciente com cólica, associando-se a um prognóstico reservado. Essa interação de fatores predisponentes e promotores de episódios de cólica em equinos, em condições naturais, não é observada nos ensaios de cólica experimentalmente induzida cuja aclimação e adaptação dietética, dentre outras, restringem o ato da indução experimental da cólica como o único fator desencadeador da referida síndrome. Assim, mesmo que nas condições experimentais sejam reproduzidos fenômenos semelhantes àqueles verificados em cólicas de ocorrência natural, e seus resultados possam ser utilizados em apoio ao diagnóstico e prognóstico, a fenomenologia da síndrome, sua intensidade e repercussões, bem o comportamento dos seus marcadores clínico-patológicos, poderão apresentar importantes variações.

JACOBSEN et al (2005) observaram aumento sérico e peritoneal de Hp em equinos após a castração. Segundo estes últimos autores, os níveis séricos das PFA refletiram o curso e a severidade da inflamação, entretanto, mudanças no número de leucócitos, usualmente considerados marcadores inflamatórios e infecciosos, não foram observadas durante o período pós-operatório. SAQUETTI et al (2008) verificaram aumento na concentração de PFA em equinos submetidos à obstrução experimental do cólon menor. Segundo BUSK et al (2010) e JACOBSEN et al (2009) o tipo de técnica cirúrgica instituído promove traumas bastante severos que culminam em aumento das concentrações das PFA no pós-operatório cirúrgico. Em suas conclusões, asseveraram os referidos autores que o aumento nas concentrações de PFA facilita o reconhecimento e tratamento precoce dos processos inflamatórios e infecciosos.

Mais recentemente, avanços nas técnicas de monitoração da resposta de fase aguda, em ensaios clínicos ou experimentais, têm sido amplamente alcançados. Entretanto, a fenomenologia da fase aguda, e inicial da defesa orgânica, não está completamente entendida, evidenciando a importância e necessidade de estudos

constantes e verticalizados sobre o tema (ECKERSALL, 2000).

O eletroforetograma representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas e vem se tornando valioso para o entendimento dos processos fisiopatológicos à medida que aporta informações sobre elevações e decréscimos nas concentrações séricas das diferentes frações protéicas. Embora as alterações nos padrões das frações protéicas não sejam características de uma doença, em particular, podem trazer importantes informações diagnósticas, quando usadas em conjunto com outros achados clínico-patológicos (THOMAS, 2000).

As técnicas de eletroforese utilizadas na rotina laboratorial têm como matrizes fitas de acetato de celulose (RODRIGUES et al, 2007), filmes de agarose (GAMA et al, 2007) ou gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio SDS-PAGE (NAOUM et al, 1999). São relativamente simples, e de baixo custo, possibilitando a visibilização de concentrações séricas extremamente baixas e a identificação variável de proteínas, necessitando tão somente de quantidade muito pequena de amostra (GORDON, 1975). De modo geral, no caso do fracionamento de proteínas, os géis de poliacrilamida têm sido preferidos, graças ao seu maior poder de resolução, podendo discriminar e identificar de 20 a 30 proteínas (SAQUETTI et al, 2008). Além disso, géis de poliacrilamida são muito translúcidos, característica esta que possibilita, se for o caso, a quantificação da atividade enzimática por densitometria (ALFENAS & BRUNE, 1998).

### **3. OBJETIVOS**

Objetivou-se identificar, diferenciar, quantificar, avaliar e comparar as proteínas séricas de fase aguda em equinos com cólica de ocorrência natural e naqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. Adicionalmente, correlacionar as concentrações séricas das proteínas de fase aguda com o tempo de evolução do processo e leucograma.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos infraestruturais

O ensaio foi conduzido nas dependências da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista (Unesp), Câmpus de Jaboticabal-SP. Os leucogramas e as dosagens das proteínas totais foram conduzidos junto ao Laboratório de Patologia Clínica Veterinária “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” e o fracionamento eletroforético das referidas proteínas junto ao Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, da instituição em epígrafe.

### 4.2 Animais

Utilizaram-se 27 equinos adultos, de diferentes raças, idades e sexos. Deste total, 12 animais constituíram o grupo de equinos acometidos por cólica natural, atendidos junto ao Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel" (FCAV/Unesp), no período de julho de 2010 à julho de 2013 para tratamento de abdômen agudo. Os outros 15 animais constituíram o grupo de equinos submetidos à obstrução intestinal experimental, composto por equinos sem raça definida, com média de idade de  $6,2 \pm 3,0$  anos, escore corporal de três a quatro (SPEIRS, 1997) e peso corporal médio de  $295,9 \pm 32,7$ kg. Para os animais pertencentes ao grupo experimental, uma semana antes do início do ensaio, após avaliação clínica que incluiu frequência cardíaca (FC, em bpm), por meio de auscultação durante um minuto; frequência respiratória (FR, em mov/min), por meio da contagem do movimento respiratório do gradil costal durante um minuto e temperatura retal (TR, em  $^{\circ}\text{C}$ ), termometria clínica convencional, durante dois minutos; realizou-se o controle de endoparasitas (mebendazol<sup>1</sup>, 50mg kg<sup>-1</sup>) e de ectoparasitas (deltametrina<sup>2</sup> a 0,025%). Os animais foram mantidos em piquetes coletivos com dieta a base de feno de Coast cross (*Cynodon dactylon*) e água à vontade. A ração concentrada comercial<sup>3</sup> foi fornecida duas vezes ao dia, em

---

<sup>1</sup> Platelmin Eqüino – UCB S.A.

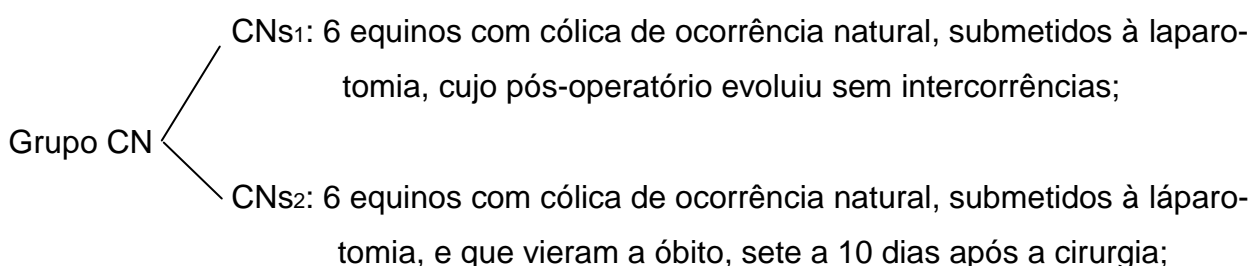
<sup>2</sup> Butox P – Intervet S.A.

<sup>3</sup> Tec Horse – Purina.

quantidade equivalente a 1% do peso corpóreo (2,5 a 3,4kg), adicionada de 50g/dia de suplemento mineral<sup>4</sup>. Após essa adaptação, os animais foram identificados e a distribuição entre os subgrupos ocorreu aleatoriamente, utilizando-se de sorteio dos animais.

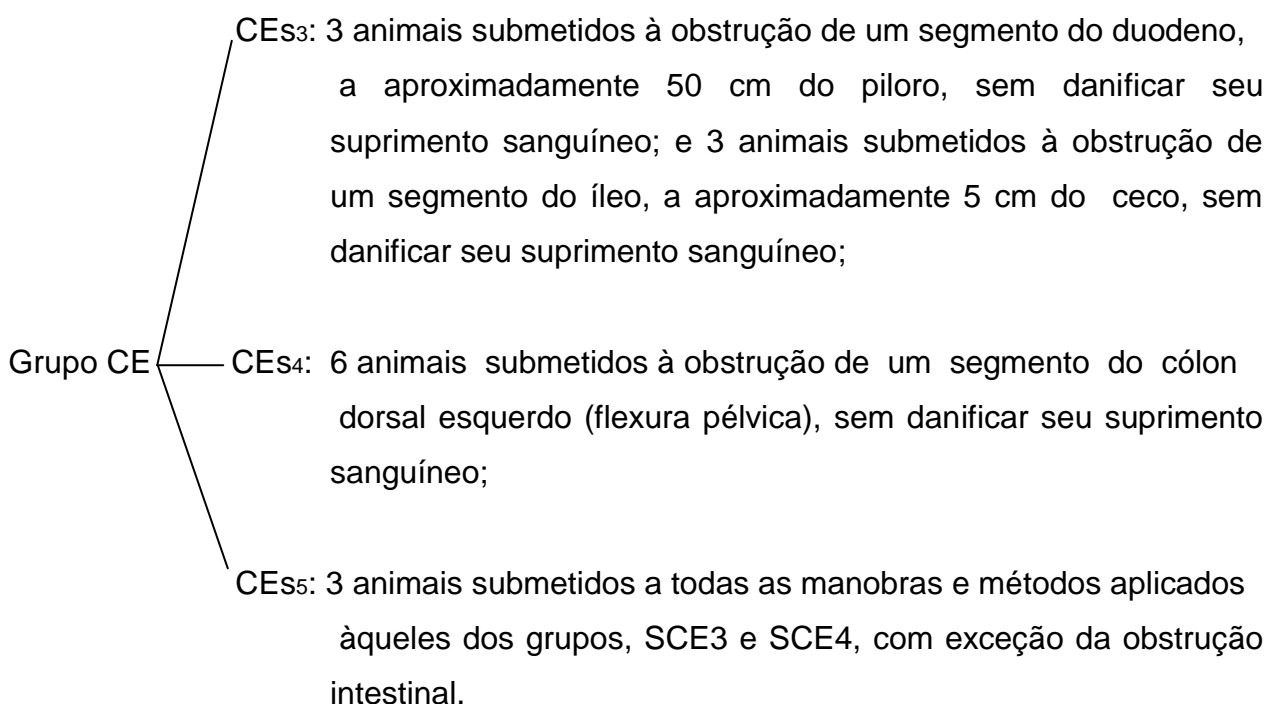
### 4.3 Delineamento experimental

Para realização do ensaio foram estabelecidos, portanto, dois grupos: grupo de equinos acometidos por cólica natural (CN) e grupo de equinos submetidos à obstrução intestinal experimental (CE). Ambos os grupos foram, ainda, divididos em subgrupos: CN em: CNs<sub>1</sub>, constituído por 6 equinos com cólica de ocorrência natural, submetidos à laparotomia para correção de transtornos gastrintestinais causadores de cólica e que cujo pós-operatório evoluiu sem intercorrências e CNs<sub>2</sub>, constituído por 6 equinos com cólica de ocorrência natural, submetidos à laparotomia para correção de transtornos gastrintestinais causadores de cólica e que vieram a óbito, sete a 10 dias após a cirurgia; e CE em: CEs<sub>3</sub>, constituído por 6 equinos submetidos à obstrução intestinal experimental de intestino delgado, regiões de duodeno (três animais) e íleo (três animais), CEs<sub>4</sub>, composto por 6 equinos submetidos à obstrução intestinal experimental de intestino grosso, região de cólon maior e CEs<sub>5</sub>, grupo controle, composto por três animais submetidos somente a laparotomia e, subsequentemente, cada animal teve uma alça intestinal manipulada, mas não obstruída, correspondendo a cada porção obstruída em cada grupo experimental. Resumidamente, ficaram assim constituídos os grupos experimentais:



<sup>4</sup> Omolen Ephos – Purina.





Os animais foram contidos em brete, e após tricotomia e antissepsia da fossa paralombar, sedados com acepromazina 1%<sup>5</sup> (0,025mg kg<sup>-1</sup>, IV), cloridrato de xilazina 2%<sup>6</sup> (0,5mg kg<sup>-1</sup>, IV) e meperidina<sup>7</sup> (4mg kg<sup>-1</sup>, IM). Ato contínuo procedeu-se anestesia local infiltrativa, utilizando-se da associação (1:1) de lidocaína 2%<sup>8</sup> e de bupivacaína 0,75%<sup>9</sup>, ambas sem vasoconstritor. Com os animais em estação foi conduzida a laparotomia, com abordagem pelo flanco direito para duodeno e íleo, e esquerdo para cólon maior, e os segmentos intestinais foram identificados e, em seguida, um dreno de Penrose nº3 posicionado ao redor da alça intestinal, e após o seu fechamento iniciou-se a obstrução intestinal, segundo modelo descrito por DATT & USENIK (1975). Neste exato momento os animais receberam 1,5mg kg<sup>-1</sup>, IV, de cloridrato de tramadol<sup>10</sup>. Na sequência procedeu-se a sutura simples contínua dos músculos transversos do abdômen e da pele, utilizando-se de vicryl nº2-0 e náilon nº4, respectivamente. As obstruções foram mantidas por três horas e, após este período, foi promovida a

<sup>5</sup> Acepran 1% - Univet S.A.

<sup>6</sup> Virbaxil 2% – Virbac.

<sup>7</sup> Dolosal – Cristália.

<sup>8</sup> Lidovet – Bravet.

<sup>9</sup> Neocaína 0,75% - Cristália.

reversão das obstruções, tendo como acesso e manobras cirúrgicos os mesmos utilizados na sua instituição. Os drenos foram então removidos e as cavidades abdominais fechadas de acordo com a técnica descrita por TURNER & McILWRAITH (2002).

No pós-operatório foi instituída terapia antimicrobiana à base de penicilina benzatina<sup>11</sup>, na dose de 30.000UI kg<sup>-1</sup>, IM, a cada 48 horas, perfazendo três aplicações. Como analgésico e antiinflamatório, foi administrado flunixin meglumine<sup>12</sup>, na dose de 0,5mg kg<sup>-1</sup>, IV, a cada 24 horas, durante dois dias. As feridas cirúrgicas foram tratadas com polivinilpirrolidona-iodo tópica a 1%, duas vezes ao dia até a retirada dos pontos no 10º dia pós-operatório.

O modelo de obstrução intestinal experimental foi o utilizado por DI FILIPPO, 2009. O protocolo experimental foi devidamente apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal, conforme protocolo nº 89374-6.

#### **4.4 Coleta dos dados**

##### **4.4.1 Avaliações laboratoriais**

As amostras de soro sanguíneo e de sangue total com anticoagulante foram obtidas em oito diferentes momentos, sejam eles, imediatamente antes da laparotomia (M0), após o procedimento cirúrgico (M1) e, diariamente, a cada 24 horas, até o sétimo dia pós-operatório, com exceção do sexto dia (M2, M3, M4, M5, M6 e M7). Por conseguinte, para efeito do estudo da dinâmica das proteínas séricas, foram considerados os referidos momentos (M0 a M7), de evolução do quadro seroprotéico na síndrome cólica natural e experimentalmente induzida. As colheitas de sangue foram obtidas por venipunção jugular mediante utilização de um catéter. Foram colhidos 5 mL de sangue, de cada equino, sem anticoagulante para sinérese e obtenção do soro sanguíneo, para posterior estudo eletroforético das proteínas séricas.

---

<sup>10</sup> Tramal - Cristália.

<sup>11</sup> Pentabiótico Veterinário Reforçado – Fort Dodge.

<sup>12</sup> Flunixin Injetável – UCB S.A.

Concomitantemente à colheita de amostras de sangue destinadas à eletroforese, alíquotas de 2 mL de sangue contendo Etilenodiaminotetracetato Dipotássico (K<sub>2</sub>-EDTA) foram colhidas e processadas para obtenção do leucograma.

As amostras de soro sanguíneo, de todos os animais, nos diferentes momentos de colheitas, foram devidamente envasadas e estocadas à temperatura de congelação, para posterior determinação das concentrações de proteínas totais (PT) e fracionamento eletroforético das mesmas.

## **4.5 Procedimentos analítico-laboratoriais**

### **4.5.1 Obtenção das proteínas totais**

As amostras de soro sanguíneo foram estocadas em frascos estéreis e congeladas à -10°C e, posteriormente, descongeladas em temperatura ambiente e, em seguida, submetidas às dosagens de proteínas totais e análise eletroforética. As concentrações de proteínas totais do soro foram obtidas pelo método do Biureto, com o auxílio de um conjunto de reagentes<sup>13</sup> e leituras espectrofotométricas<sup>14</sup>.

### **4.5.2 Eletroforetograma das proteínas**

Para o fracionamento eletroforético dos diferentes constituintes seroproteicos procedeu-se corrida eletroforética das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI – VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD).

A placa, contendo o gel foi acoplada ao suporte de sustentação apropriado<sup>15</sup> em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,9 (Apêndice A). As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e, após polimerização, com o gel de empilhamento a 4% (Apêndice A). Então, aguardaram-se algumas horas para polimerização do material. O próximo passo consistiu no preparo das amostras para o fracionamento das proteínas adicionando-se 10 µL de soro sanguíneo, diluídos em 30

<sup>13</sup> Labtest - Sistema de Diagnósticos Ltda. - Lagoa Santa, Brazil.

<sup>14</sup> Labquest - CELM, modelo E-225-D.

<sup>15</sup> BRL – Bethesda Labs, Gaithersburg, MN, USA.

$\mu\text{L}$  de tampão-fosfato (PBS) (Apêndice A), e 20  $\mu\text{L}$  de gel mix (Apêndice A) e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra de soro sanguíneo foi depositada em uma determinada cavidade do gel, tendo a primeira e a última amostra de cada gel em duplicata, além da amostra padrão<sup>16</sup> como referência, que sempre foi colocada em uma cavidade pré-estabelecida.

O conjunto foi, então, submetido à corrente elétrica inicial de 20 mA por gel, fornecido por uma fonte de energia apropriada<sup>17</sup>. Após a passagem das amostras do gel de empilhamento para o gel de separação, a corrente elétrica foi aumentada em 25% do valor inicial, perfazendo um total de 40 mA. Terminada a separação, a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel, retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% (Apêndice A) sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Em seguida o gel foi submerso em solução decolorante a base de metanol (Apêndice A) para retirar o excesso de corante, até que todo o gel se apresentasse nítido.

Os pesos moleculares e as concentrações das frações protéicas foram determinados por densitometria computadorizada<sup>18</sup>, através do escaneamento das amostras. Para o cálculo do peso molecular foram utilizados marcadores<sup>16</sup> de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20 kDa, além das proteínas purificadas<sup>16</sup> albumina,  $\alpha_1$ -antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina (Tf) e imunoglobulina G (IgG). Para a avaliação densitométrica das bandas protéicas confeccionaram-se curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

#### 4.5.3 Leucograma

As contagens globais de leucócitos foram obtidas com o auxílio de um contador automático de células<sup>18</sup> e a contagem diferencial dos leucócitos obtida a partir do exame microscópico de esfregaços sanguíneos corados com uma mistura de May-Grunwald, Giemsa e Metanol – MGG. Os leucogramas dos equinos foram obtidos

---

<sup>16</sup> Marcador Sigma Marker 6.500 – 200.000.

<sup>17</sup> Fotodyne, Fotodyne Inc, Houston, TX, USA.

<sup>18</sup> ABC-VET, ABX, França.

através das médias das contagens globais e absoluta das variedades leucocitárias, incluindo leucócitos totais (Le), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), linfócitos (Linf), monócitos (Mon), eosinófilos (Eos) e basófilos (Bas).

#### **4.6 Análise estatística**

Foi calculada a média estatística e os processos inflamatórios, que foram responsáveis pela variabilidade principal das variáveis avaliadas, foram identificados através de análise de fatores (KIM; MUELLER, 1978; MILSTEIN, 1993). A análise de fatores é uma técnica exploratória multivariada que permite relações entre um conjunto de variáveis a serem explicadas em termos de um número limitado de novas variáveis, sendo este último adotado como responsável pela covariação entre as variáveis observadas. Dentre as diversas técnicas disponíveis para a extração de fatores, utilizou-se a extração por componentes principais (SELO, 1964; JEFFERS, 1978) calculado a partir da matriz de correlação entre variáveis. O primeiro fator (F1) extraído dessa matriz é a combinação linear das variáveis originais, que representa o máximo de variabilidade possível contida nas amostras. O segundo fator (F2) é a segunda combinação linear das variáveis originais, que responde pela maior parte da variabilidade restante, e assim por diante. Os fatores são independentes entre si, não têm unidades e são variáveis padronizadas (Distribuição normal, média = 0 variância = 1). Os coeficientes das funções lineares que definem os fatores são usados para interpretar o seu significado, utilizando o sinal e o valor relativo dos coeficientes como uma indicação do peso a ser atribuído a cada variável (MILSTEIN et al, 2005). Para melhor interpretação, os fatores foram rotacionados pelo método varimax (KAISER, 1958). As cargas dos fatores são as correlações entre cada variável e o respectivo fator. O poder discriminatório das variáveis nos fatores foi medido considerando-se cargas com valor absoluto acima de 0,6.

Como já se sabe, as PFA apresentam picos de suas concentrações na circulação sanguínea, que podem variar entre horas ou até dias, dependendo da sua classificação. Assim, o estudo foi dividido em duas fases: Fase Inicial, que correspondeu as primeiras 24 horas experimentais (M0, M1 e M2), e Fase Final, que correspondeu aos dias de

pós-operatório (M3, M4, M5, M6 e M7). Foram caracterizados os padrões das respostas inflamatórias (leucograma e proteínas de fase aguda) entre CN e CE; Fase Inicial de CN e CE e Fase Final de CN e CE; CN em Fase Inicial e Fase Final; e CE em Fase Inicial e Fase final.

## 5. RESULTADOS

Após o fracionamento das proteínas do soro sanguíneo, verificou-se, por meio dos traçados eletroforéticos, a presença de 22 a 63 frações protéicas, cujos pesos moleculares variaram de 17 a 285 kDa. Dentre as proteínas encontradas 10 foram consideradas como proteínas de fase aguda e de importância para o estudo em questão, sendo oito delas identificadas nominalmente: imunoglobulina A (IgA) com peso molecular igual a 175 kDa, ceruloplasmina 110 kDa, transferrina 80 kDa, albumina (Alb) 65 kDa, imunoglobulina G com 85 kDa,  $\alpha_1$ -antitripsina (Antitrip) 61 kDa, haptoglobina 42 kDa e  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AGP) 39 kDa. Duas, dentre as proteínas consideradas como de fase aguda, com peso molecular correspondente a 24 kDa (P24) e 10 kDa (P10) respectivamente, e não identificadas nominalmente na literatura, foram observadas no traçado eletroforético. As proteínas  $\alpha_1$ -antitripsina e P10 foram encontradas apenas nos eletroforetogramas dos equinos acometidos por cólica natural, por este motivo não entraram na avaliação estatística, sendo consideradas separadamente.

### 5.1 Animais acometidos por cólica natural (CN) x Animais acometidos por cólica experimental (CE)

A Tabela 1 apresenta os resultados da análise de fatores que caracterizaram os padrões em CN e CE, respectivamente. Para CN, cinco fatores foram responsáveis por 75,78% da variabilidade contida nas variáveis originais. Já para CE, sete fatores foram responsáveis por 76,19% da variabilidade contida nas variáveis originais.

**Tabela 1.** Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões dos grupos de animais acometidos por cólica natural e cólica experimental.

Fatores	CN	CE	CN	CE	CN	CE	CN	CE	CN	CE	CE	CE
	F1	F1	F2	F2	F3	F3	F4	F4	F5	F5	F6	F7
Le	-0,08	-0,04	<b>0,95</b>	<b>0,94</b>	0,13	0,00	0,00	-0,01	0,09	0,20	-0,06	-0,02
NS	-0,04	-0,06	<b>0,92</b>	<b>0,94</b>	0,03	-0,03	-0,01	-0,12	-0,10	-0,17	-0,03	-0,05
NB	0,05	-0,16	0,07	0,48	<b>0,88</b>	0,12	-0,06	0,14	0,01	-0,00	0,12	0,23
Mon	0,12	-0,06	0,12	0,28	<b>0,73</b>	-0,06	0,32	-0,23	-0,14	0,51	0,26	0,11
Bas	-0,03	0,02	0,04	-0,07	<b>0,76</b>	0,04	-0,20	<b>0,80</b>	0,28	-0,18	-0,07	-0,09
Eos	-0,03	0,18	-0,17	-0,12	0,32	-0,13	0,05	<b>0,74</b>	<b>0,72</b>	0,32	0,02	0,07
Linf	-0,18	0,05	0,51	-0,02	-0,16	0,11	-0,02	0,06	<b>0,61</b>	<b>0,86</b>	-0,12	0,00
PT	<b>0,95</b>	<b>0,93</b>	-0,08	0,01	0,03	0,16	0,16	0,09	-0,04	0,14	0,07	0,14
Tf	<b>0,77</b>	<b>0,71</b>	0,07	-0,20	0,03	-0,12	0,23	-0,02	-0,23	-0,27	-0,06	0,27
Alb	<b>0,91</b>	<b>0,93</b>	-0,04	-0,07	0,04	0,13	0,07	0,04	-0,09	0,00	0,04	-0,03
Cp	<b>0,75</b>	0,14	-0,09	0,03	0,07	-0,06	0,34	0,09	0,10	0,00	0,25	<b>0,73</b>
IgG	<b>0,74</b>	0,02	-0,26	0,07	0,00	<b>-0,94</b>	-0,12	0,07	0,12	0,03	-0,01	0,04
IgA	0,53	0,31	0,15	0,06	-0,03	<b>0,87</b>	0,38	0,04	0,26	0,15	0,07	0,07
AGP	0,16	0,10	-0,19	-0,13	0,00	0,21	<b>0,86</b>	-0,16	-0,12	0,05	-0,17	<b>0,74</b>
Hp	0,23	0,08	0,18	-0,08	-0,04	0,06	<b>0,83</b>	-0,03	0,15	-0,06	<b>0,92</b>	0,01
P24	0,57	0,43	0,42	-0,04	-0,07	-0,32	0,09	0,02	0,37	0,00	-0,02	0,56
<b>Var. Expl</b>	<b>4,24</b>	<b>2,67</b>	<b>2,44</b>	<b>2,19</b>	<b>2,08</b>	<b>1,93</b>	<b>1,97</b>	<b>1,35</b>	<b>1,37</b>	<b>1,34</b>	<b>1,09</b>	<b>1,60</b>
<b>%</b>	<b>26,56</b>	<b>16,70</b>	<b>15,29</b>	<b>13,71</b>	<b>13,02</b>	<b>12,09</b>	<b>12,35</b>	<b>8,45</b>	<b>8,56</b>	<b>8,38</b>	<b>6,81</b>	<b>10,05</b>

Leucócitos (Le), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), monócitos (Mon), basófilos (Bas), linfócitos (Linf) e eosinófilos (Eos). Proteínas Totais (PT), Transferrina (Tf), albumina (Alb), ceruloplasmina (Cp), imunoglobulina G (IgG), haptoglobina (Hp), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), P24 e imunoglobulina A (IgA).

Tanto para o grupo CN como para CE, três fatores foram suficientes para discriminar as variáveis leucométricas (Le, NS, NB, Mon, Bas, Linf e Eos), que, por sua vez representaram a fase celular efetora da resposta de fase aguda. No grupo CN, todas as variáveis ficaram discriminadas nos fatores CNF2, CNF3 e CNF5, que, juntos foram responsáveis por 36,87% da variabilidade original. No grupo CE, ficaram discriminadas as variáveis leucocitárias Le, NS, Bas, Linf e Eos nos fatores CEF2, CEF4 e CEF5, que, juntos responderam por 30,54% da variabilidade contida nas variáveis originais. Já as variáveis NB e Mon, do grupo CE, não influenciaram na variabilidade dos dados. Todas as variáveis leucométricas discriminadas nos fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, em cada um deles, indicando associação direta entre elas, ou seja, quando o valor de uma aumenta os valores das demais também aumentam (ou vice-versa).

A fase celular da resposta de fase aguda teve participação secundária nas variações ocorridas nos grupos CN e CE, estando, sua atuação, discriminada somente a partir de F2, que responde pela maior parte da variabilidade restante, depois de F1. Em CN, esta resposta celular indicou uma resposta inflamatória tóxica ao discriminar a variável NB em F3.

Para os grupos CN e CE, a discriminação das proteínas de fase aguda, em dois fatores para CN e quatro para CE, determinaram a fase proteica como fase efetora da resposta de fase aguda. No grupo CN, as Proteínas Totais e as proteínas de fase aguda Tf, Alb, Cp, IgG, Hp e AGP ficaram discriminadas nos fatores CNF1 e CNF4, que, juntos somaram 38,91% da variabilidade original. Já as PFA P24 e IgA não apresentaram efeito algum sobre a variabilidade do grupo CN. No grupo CE, as Proteínas Totais e as proteínas de fase aguda Tf, Alb, Cp, Hp, AGP, IgA e IgG foram discriminadas nos fatores CEF1, CEF3, CEF6 e CEF7, que, juntos foram responsáveis por 45,65% da variabilidade original. As variáveis discriminadas que ficaram com cargas com mesmo sinal, em cada fator, indicaram uma associação direta entre elas; porém, as variáveis discriminadas que ficaram com cargas com sinal diferentes, em cada fator, indicaram uma associação indireta entre elas, ou seja, quando o valor de uma aumentou os valores das demais diminuíram (ou vice-versa).

As alterações proteicas da resposta de fase aguda foram as principais responsáveis pelas variações contidas nas variáveis originais, visto que, estas variáveis ficaram discriminadas no F1, responsável pela maior variabilidade contida nos dados originais. Em CN, esse processo proteico da resposta de fase aguda indicou um processo tardio devido à presença da proteína ceruloplasmina. Já em CE essas variáveis indicaram um processo proteico de resposta de fase aguda inicial observando-se a correlação positiva entre PT e Alb e a correlação negativa entre IgG e IgA em F2.



## 5.2 Fase Inicial (FI) x Fase Final (FF)

A caracterização dos padrões da resposta inflamatória em FI e FF, por análise de fatores, são apresentados na Tabela 2. Para FI, cinco fatores foram responsáveis por 70,71% da variabilidade contida nas variáveis originais. Já para FF, seis fatores foram responsáveis por 76,87% da variabilidade contida nas variáveis originais.

Em FI, dois fatores foram suficientes para discriminar as variáveis leucométricas Le, NS, Mon, Bas e Linf. Estes fatores, FIF3 e FIF5, juntos foram responsáveis por 24,81% da variabilidade original. As variáveis NB e Eos não apresentaram poder discriminatório em FI. Em FF, ficaram discriminadas as variáveis leucocitárias Le, NS, NB, Mon, Bas e Linf nos fatores FFF3, FFF4 e FFF5, que, juntos responderam por 35,36% da variabilidade contida nas variáveis originais. Já a variável Eos, em FF, não influenciou na variabilidade dos dados. Com exceção do FIF5, as demais variáveis leucométricas discriminadas nos fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, em cada um deles, indicando associação direta entre elas. Em FIF5, Mon e Bas apresentaram cargas com sinais contrários indicando uma associação indireta entre as variáveis.

As variáveis leucocitárias que indicaram o processo celular da resposta de fase aguda tiveram menor participação nas variações ocorridas em todas as fases experimentais, tendo, sua atuação, discriminada somente a partir de F3, que responde à variabilidade restante, depois de F1 e F2.

FI e FF apresentaram três fatores discriminatórios para as proteínas de fase aguda, sendo que, em FI, PT, Tf, Alb, Cp, Hp, AGP, IgA e IgG ficaram discriminadas nos fatores FIF1, FIF2 e FIF4, que, juntos somaram 45,9% da variabilidade original. P24 não apresentou efeito algum sobre a variabilidade de FI. Na Fase Final, PT, Tf, Alb, Cp, Hp, IgA e P24 foram discriminadas nos fatores FFF1, FFF2 e FFF6, que, juntos foram responsáveis por 41,51% da variabilidade original. As variáveis AGP e IgG não tiveram poder discriminatório para FF. As proteínas discriminadas que ficaram com cargas com mesmo sinal, em cada fator, indicaram uma associação direta; porém, as proteínas

discriminadas que ficaram com cargas com sinal diferentes, em cada fator, indicaram uma associação indireta entre elas.

**Tabela 2.** Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias nas Fases Inicial (FI: M0, M1 e M2) e Final (FF: M3, M4, M5, M6 e M7).

Fatores	FI	FF	FI	FF	FI	FF	FI	FF	FI	FF	FF
	F1	F1	F2	F2	F3	F3	F4	F4	F5	F5	F6
Le	-0,14	0,12	-0,01	-0,03	<b>0,95</b>	0,12	-0,01	<b>0,95</b>	0,03	0,15	-0,02
NS	-0,25	0,16	0,00	-0,03	<b>0,86</b>	-0,07	0,02	<b>0,93</b>	0,09	-0,14	-0,05
Linf	0,22	-0,13	-0,10	0,03	<b>0,61</b>	-0,17	-0,16	0,07	-0,12	<b>0,88</b>	0,02
NB	-0,41	-0,02	0,25	0,11	0,50	<b>0,87</b>	-0,08	-0,02	-0,03	-0,14	0,03
Mon	0,21	-0,05	0,14	0,03	0,19	<b>0,75</b>	0,06	0,36	<b>0,71</b>	-0,02	0,30
Bas	0,31	0,05	-0,08	-0,11	0,04	<b>0,76</b>	-0,14	-0,09	<b>-0,64</b>	0,08	-0,29
Eos	0,47	0,16	-0,14	-0,21	0,03	0,41	0,29	-0,17	-0,49	0,59	-0,15
PT	<b>0,94</b>	<b>0,96</b>	0,09	0,04	-0,15	-0,00	-0,01	0,14	-0,02	-0,02	0,05
Alb	<b>0,89</b>	<b>0,93</b>	0,13	0,11	-0,18	-0,00	-0,06	0,10	-0,05	-0,10	-0,02
Cp	<b>0,67</b>	<b>0,62</b>	-0,05	0,04	-0,03	0,09	0,06	0,05	0,11	0,18	0,34
IgA	<b>0,72</b>	0,57	-0,21	<b>-0,66</b>	-0,03	-0,08	-0,57	0,20	-0,06	0,06	0,20
P24	0,08	0,18	0,52	<b>0,82</b>	0,38	-0,03	0,33	0,05	-0,23	0,08	0,12
Tf	0,33	0,44	<b>0,71</b>	<b>0,68</b>	-0,17	-0,03	0,13	0,07	0,08	-0,17	-0,08
Hp	0,04	0,18	<b>0,82</b>	-0,08	0,17	0,02	0,02	-0,13	0,00	-0,03	<b>0,78</b>
AGP	-0,15	-0,16	<b>0,80</b>	0,59	-0,15	-0,12	-0,06	-0,23	0,21	-0,08	0,31
IgG	-0,06	0,07	0,00	<b>0,71</b>	-0,05	0,16	<b>0,95</b>	-0,07	0,03	0,00	-0,23
<b>Var. Expl.</b>	<b>3,49</b>	<b>2,92</b>	<b>2,32</b>	<b>2,54</b>	<b>2,63</b>	<b>2,21</b>	<b>1,53</b>	<b>2,14</b>	<b>1,33</b>	<b>1,30</b>	<b>1,17</b>
<b>%</b>	<b>21,83</b>	<b>18,25</b>	<b>14,50</b>	<b>15,92</b>	<b>16,49</b>	<b>13,85</b>	<b>9,57</b>	<b>13,38</b>	<b>8,32</b>	<b>8,13</b>	<b>7,34</b>

Leucócitos (Le), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), monócitos (Mon), basófilos (Bas), linfócitos (Linf) e eosinófilos (Eos). Proteínas Totais (PT), Transferrina (Tf), albumina (Alb), ceruloplasmina (Cp), imunoglobulina G (IgG), haptoglobina (Hp), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), P24 e imunoglobulina A (IgA). M0: pré-operatório; M1: pós-cirúrgico (6h); M2: 24h pós-operatório; M3: 2º dia pós-operatório; M4: 3º dia pós-operatório; M5: 4º dia pós-operatório; M6: 5º dia pós-operatório; M7: 7º dia pós-operatório.

As PFA que indicaram o processo proteico da resposta de fase aguda tiveram participação importante nas variações ocorridas em todas as fases experimentais, tendo, sua atuação, discriminada primeiramente em F1, fator que contém a maior variabilidade presente nos dados.

### 5.3 Animais acometidos por cólica natural em Fase Inicial (CNFI) x Animais acometidos por cólica natural em Fase Final (CNFF)

Os resultados da análise de fatores que caracterizaram os padrões da resposta inflamatória em CNFI e CNFF estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias de animais acometidos por cólica natural nas Fases Inicial (M0, M1 e M2) e Final (M3, M4, M5, M6 e M7) do experimento.

Fatores	CNFI F1	CNFF F1	CNFI F2	CNFF F2	CNFI F3	CNFF F3	CNFI F4	CNFF F4	CNFF F5
Le	-0,02	-0,08	0,20	<b>-0,91</b>	<b>0,94</b>	-0,13	0,04	0,26	0,02
NS	-0,16	-0,10	-0,15	<b>-0,91</b>	<b>0,84</b>	-0,11	0,29	0,11	-0,06
NB	-0,07	-0,02	<b>0,92</b>	<b>-0,72</b>	-0,06	-0,09	0,15	-0,33	-0,04
Eos	0,13	-0,12	<b>0,80</b>	0,10	0,09	0,09	-0,15	0,04	<b>0,87</b>
Bas	-0,05	-0,11	<b>0,93</b>	0,07	-0,04	-0,23	0,01	<b>0,75</b>	-0,03
Mon	-0,03	<b>0,60</b>	<b>0,88</b>	-0,09	0,17	-0,13	0,11	-0,02	-0,01
Linf	0,28	-0,04	-0,09	-0,41	0,39	-0,12	<b>-0,62</b>	<b>0,72</b>	0,26
Cp	0,55	0,41	0,15	0,05	0,02	<b>0,81</b>	<b>0,74</b>	-0,06	0,03
PT	0,28	<b>0,73</b>	0,03	0,18	0,17	<b>0,60</b>	<b>0,90</b>	0,05	0,06
Tf	0,19	<b>0,79</b>	-0,04	0,09	0,48	0,28	<b>0,72</b>	0,03	-0,12
Alb	0,15	<b>0,74</b>	0,02	0,18	0,21	0,50	<b>0,87</b>	0,11	0,03
AGP	<b>0,79</b>	<b>0,79</b>	-0,07	0,17	-0,23	-0,08	0,08	-0,26	-0,02
Hp	<b>0,89</b>	<b>0,69</b>	-0,06	-0,24	-0,00	0,11	0,18	0,01	-0,08
IgA	<b>0,79</b>	0,46	0,00	-0,23	-0,00	0,18	0,46	0,09	0,53
IgG	0,16	0,00	0,09	0,22	-0,04	<b>0,88</b>	<b>0,79</b>	-0,10	0,12
P24	0,55	0,20	0,00	-0,33	0,40	0,44	0,45	<b>0,62</b>	-0,07
<b>Var. Expl.</b>	<b>2,97</b>	<b>3,67</b>	<b>3,28</b>	<b>2,77</b>	<b>2,33</b>	<b>2,52</b>	<b>4,32</b>	<b>1,80</b>	<b>1,19</b>
<b>%</b>	<b>18,59</b>	<b>22,97</b>	<b>20,52</b>	<b>17,35</b>	<b>14,59</b>	<b>15,78</b>	<b>27,00</b>	<b>11,27</b>	<b>7,47</b>

Leucócitos (Le), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), monócitos (Mon), basófilos (Bas), linfócitos (Linf) e eosinófilos (Eos). Proteínas Totais (PT), Transferrina (Tf), albumina (Alb), ceruloplasmina (Cp), imunoglobulina G (IgG), haptoglobina (Hp), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), P24 e imunoglobulina A (IgA). M0: pré-operatório; M1: pós-cirúrgico (6h); M2: 24h pós-operatório; M3: 2º dia pós-operatório; M4: 3º dia pós-operatório; M5: 4º dia pós-operatório; M6: 5º dia pós-operatório; M7: 7º dia pós-operatório.

Para CNFI, quatro fatores foram responsáveis por 80,7% da variabilidade contida nas variáveis originais, sendo dois destes discriminantes somente para as variáveis leucométricas Le, NS, NB, Mon, Bas e Eos. Estes fatores, CNFIF2 e CNFIF3, juntos, foram responsáveis por 35,11% da variabilidade original e as variáveis contida nestes fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta entre elas. A

variável Linf foi discriminada pelo fator CNFIF4 juntamente com as proteínas PT, Tf, Alb, Cp e IgG. Este fator contribuiu com 27% da variabilidade original. Linf apresentou carga com sinal diferente das demais variáveis, indicando uma associação indireta.

Para CNFF, cinco fatores foram responsáveis por 76,87% da variabilidade contida nas variáveis originais, sendo três destes discriminantes somente para as variáveis leucométricas Le, NS, NB, Bas, Linf e Eos. Estes fatores, CNFFF2, CNFF4 e CNFFF5, juntos, foram responsáveis por 36,09% da variabilidade original e as variáveis contida nestes fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta entre elas. A variável Mon foi discriminada pelo fator CNFFF1 juntamente com as proteínas PT, Tf, Alb, Hp e AGP, enquanto que Linf e Bas foram discriminada no fator CNFF4 juntamente com a proteína P24. Estes fatores contribuíram com 22,97% e 11,27% da variabilidade original, respectivamente, e, as variáveis contidas nestes fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta.

CNFI e CNFF apresentaram dois fatores discriminantes para as proteínas de fase aguda, sendo um fator exclusivo para proteínas e o outro em associação com variáveis leucocitárias. Em CNFI, o fator discriminatório somente para proteínas (Hp, AGP e IgA) foi CNFIF1, responsável por 18,59% da variabilidade original. As variáveis presentes neste fator ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta entre elas. A variável P24 não apresentou poder discriminatório para CNFI. As proteínas PT, Tf, Alb, Cp e IgG ficaram discriminadas no fator CNFIF4 juntamente com a variável leucocitária Linf. Este fator contribuiu com 27% da variabilidade original, onde a variável Linf apresentou carga com sinal diferente do sinal das proteínas, indicando uma associação indireta entre elas.

Em CNFF, o fator discriminatório somente para proteínas (PT, Cp e IgG) foi CNFFF3, responsável por 15,78% da variabilidade original. As variáveis presentes neste fator ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta. A variável IgA não apresentou poder discriminatório para CNFF. As proteínas PT, Tf, Alb, Hp e AGP ficaram discriminadas no fator CNFFF1 juntamente com a variável

leucocitária Mon e a proteína P24 foi discriminada em CNFFF4 juntamente com as variáveis Linf e Bas. Estes fatores contribuíram com 27% e 11,27%, respectivamente, da variabilidade original e todas as variáveis apresentaram cargas com mesmo sinal, indicando uma associação direta entre elas.

As principais alterações responsáveis pelas variações contidas nas variáveis originais e discriminadas em CNFIF1 e CNFIF2 indicaram uma resposta de fase aguda iniciada por PFA seguida da participação celular na manutenção deste processo. Para CNFF, as variáveis discriminadas em F1 e F2 indicaram uma resposta de fase aguda tardia devido à correlação entre células (Mon) e as PFA, seguida pelo estabelecimento de um processo inflamatório tóxico devido à correlação positiva entre Le, NS e NB.

#### **5.4 Animais acometidos por cólica experimental em Fase Inicial (CEFI) x Animais acometidos por cólica experimental em Fase Final (CEFF)**

Os resultados da análise de fatores que caracterizaram os padrões da resposta inflamatória em CEFI e CEFF são apresentados na Tabela 4.

Para CEFI, seis fatores foram responsáveis por 75,48% da variabilidade contida nas variáveis originais, sendo dois destes discriminantes somente para as variáveis leucométricas Le, NS, NB, Linf e Eos. Estes fatores, CEFIF2 e CEFIF4, juntos, foram responsáveis por 25,11% da variabilidade original e as variáveis contidas nestes fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta entre elas. A variável Bas foi discriminada pelo fator CEFIF6 (9,05%) juntamente com a proteína AGP e apresentou carga com sinal diferente da proteína, indicando uma associação indireta. A variável Mon não apresentou poder discriminatório para CEFI.

Para CEFF, seis fatores foram responsáveis por 74,26% da variabilidade contida nas variáveis originais, sendo três fatores discriminantes somente para as variáveis leucométricas Le, NS, NB e Mon. Estes fatores, CEFFF2, CEFFF5 e CEFFF6, juntos foram responsáveis por 29,77% da variabilidade original e as variáveis contidas nestes

fatores ficaram com cargas com mesmo sinal, indicando associação direta entre elas. A variável Eos foi discriminada pelo fator CEFFF1 juntamente com as proteínas PT, Alb e Hp. Este fator contribuiu com 19,95% da variabilidade original e todas as variáveis apresentaram cargas com mesmo sinal, indicando uma associação direta. As variáveis leucométrica Linf e Bas não tiveram poder discriminatório sobre CEFF.

**Tabela 4.** Caracterização por análise de fatores com influência exploratória dos padrões das respostas inflamatórias de animais acometidos por cólica experimental nas Fases Inicial (M0, M1 e M2) e Final (M3, M4, M5, M6 e M7) do experimento.

Fatores	CEFI F1	CEFF F1	CEFI F2	CEFF F2	CEFI F3	CEFF F3	CEFI F4	CEFF F4	CEFI F5	CEFF F5	CEFI F6	CEFF F6
Le	-0,02	0,01	<b>0,95</b>	<b>0,94</b>	0,00	0,02	0,11	-0,04	0,06	0,16	0,00	0,16
NS	-0,01	-0,18	<b>0,92</b>	<b>0,89</b>	-0,02	-0,12	-0,21	0,10	0,07	-0,04	0,00	-0,08
NB	0,08	-0,13	<b>0,62</b>	0,07	-0,05	0,02	-0,28	0,04	-0,13	0,01	0,05	<b>0,84</b>
Linf	0,02	0,26	-0,04	0,20	0,08	0,31	<b>0,87</b>	-0,25	0,05	0,51	0,09	0,39
Eos	-0,05	<b>0,62</b>	-0,20	0,12	-0,08	-0,22	<b>0,64</b>	-0,12	0,01	-0,33	-0,33	0,31
Mon	-0,21	0,06	0,50	0,25	-0,04	-0,05	0,26	-0,05	-0,51	<b>0,72</b>	0,14	-0,10
Bas	-0,11	0,43	-0,07	0,07	0,27	0,14	-0,03	-0,29	0,08	-0,57	<b>-0,81</b>	-0,15
AGP	0,18	0,09	-0,07	0,01	0,20	0,31	-0,08	<b>0,69</b>	0,08	0,21	<b>0,68</b>	-0,11
Cp	0,37	0,08	-0,02	0,26	0,39	0,08	0,12	<b>0,62</b>	-0,57	-0,13	0,17	-0,03
P24	0,42	0,43	0,01	-0,05	0,52	-0,25	0,08	<b>0,64</b>	-0,20	-0,13	0,32	0,21
Tf	<b>0,85</b>	0,49	-0,03	-0,38	0,19	-0,12	-0,17	0,38	0,03	-0,01	0,00	-0,35
Alb	<b>0,91</b>	<b>0,85</b>	-0,03	-0,21	-0,12	0,16	-0,00	0,02	-0,01	0,01	0,08	-0,15
PT	<b>0,94</b>	<b>0,90</b>	0,01	-0,00	-0,16	0,17	0,10	0,18	-0,10	0,06	0,11	-0,05
Hp	0,07	<b>0,60</b>	-0,18	-0,14	-0,16	0,12	-0,18	0,41	<b>-0,80</b>	-0,01	-0,04	0,05
IgA	0,34	0,33	0,06	0,08	<b>-0,85</b>	<b>0,87</b>	0,07	0,08	-0,10	0,01	0,08	0,06
IgG	0,05	0,05	0,01	0,14	<b>0,91</b>	<b>-0,93</b>	0,08	0,01	0,01	0,03	-0,07	0,01
<b>Var Expl.</b>	<b>3,01</b>	<b>3,19</b>	<b>2,51</b>	<b>2,14</b>	<b>2,24</b>	<b>2,08</b>	<b>1,50</b>	<b>1,83</b>	<b>1,35</b>	<b>1,35</b>	<b>1,44</b>	<b>1,26</b>
<b>%</b>	<b>18,83</b>	<b>19,95</b>	<b>15,71</b>	<b>13,40</b>	<b>14,03</b>	<b>13,05</b>	<b>9,40</b>	<b>11,49</b>	<b>8,46</b>	<b>8,44</b>	<b>9,05</b>	<b>7,93</b>

Leucócitos (Le), neutrófilos segmentados (NS), neutrófilos bastonetes (NB), monócitos (Mon), basófilos (Bas), linfócitos (Linf) e eosinófilos (Eos). Proteínas Totais (PT), Transferrina (Tf), albumina (Alb), ceruloplasmina (Cp), imunoglobulina G (IgG), haptoglobina (Hp), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), P24 e imunoglobulina A (IgA). M0: pré-operatório; M1: pós-cirúrgico (6h); M2: 24h pós-operatório; M3: 2º dia pós-operatório; M4: 3º dia pós-operatório; M5: 4º dia pós-operatório; M6: 5º dia pós-operatório; M7: 7º dia pós-operatório.

Para discriminar somente as proteínas totais (PT) e as proteínas de fase aguda (Tf, Alb, Hp, IgA e IgG), em CEFI, foram necessários três fatores: CEFIF1, CEFIF3 e CEFIF5. Juntos, estes fatores foram responsáveis por 41,32% da variabilidade original

e as variáveis que ficaram com cargas com mesmo sinal indicaram uma associação direta; inversamente, as variáveis que ficaram com cargas com sinal diferente indicaram uma associação indireta entre elas. A variável AGP foi discriminada pelo fator CEFIF6 juntamente com a variável leucocitária Bas. Este fator contribuiu com 9,05% da variabilidade original e as variáveis discriminadas apresentaram cargas com sinal diferente, indicando uma associação indireta. As proteínas Cp e P24 não tiveram poder discriminatório sobre CEFI.

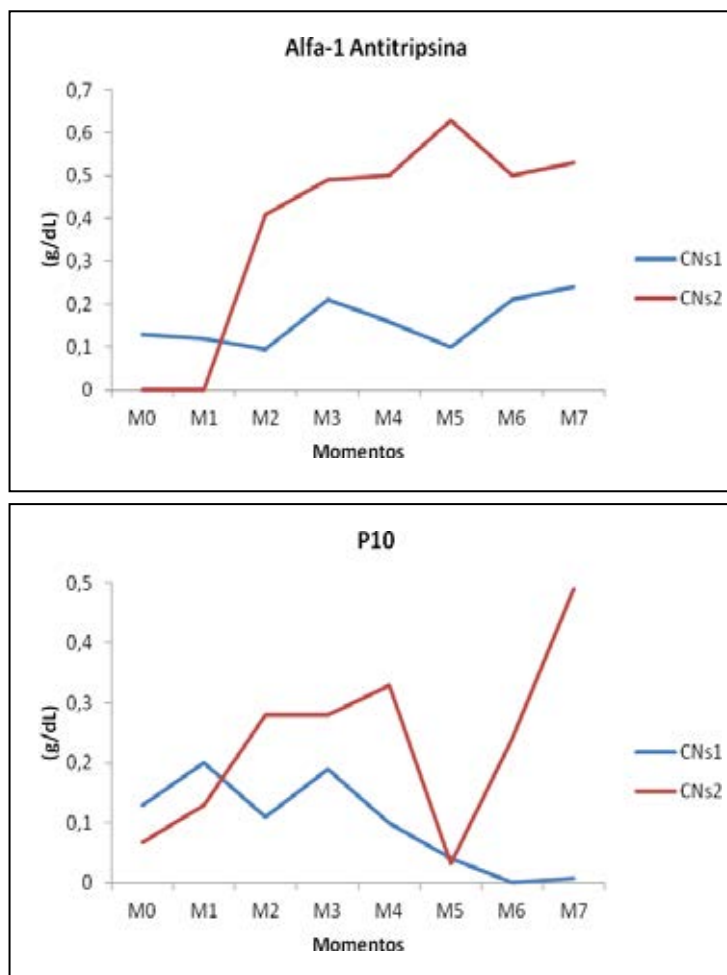
Para CEFF, dois fatores foram discriminantes somente para as variáveis proteínas de fase aguda Cp, AGP, P24, IgA e IgG. Estes fatores, CEFFF3 e CEFFF4, juntos foram responsáveis por 24,54% da variabilidade original e as variáveis que ficaram com cargas com mesmo sinal indicaram uma associação direta entre elas; inversamente, as variáveis que ficaram com cargas com sinal diferente indicaram uma associação indireta. As variáveis PT, Alb e Hp foram discriminadas pelo fator CEFFF1 juntamente com a variável leucocitária Eos. Este fator contribuiu com 19,95% da variabilidade original e todas as variáveis apresentaram cargas com mesmo sinal, indicando uma associação direta. A variável Tf não obteve poder discriminatório sobre CEFF.

As principais alterações responsáveis pelas variações contidas nas variáveis originais e discriminadas em CEFIF1 e CEFIF2 indicaram uma resposta de fase aguda iniciada por PFA seguida da participação celular na manutenção deste processo. Para CNFF, as variáveis discriminadas em F1 e F2 indicaram uma resposta de fase aguda tardia devido à correlação entre células (Mon) e as PFA, seguida pelo estabelecimento de um processo inflamatório devido à correlação positiva entre Le e NS.

### **5.5 Alfa-1 Antitripsina e P10**

As médias das concentrações séricas das proteínas Alfa-1 Antitripsina e P10, dos grupos de animais acometidos por cólica natural, em todos os momentos experimentais, estão representadas graficamente pela Figura 1.

**Figura 1.** Representação gráfica das concentrações séricas médias de Alfa-1 Antitripsina e P10, em g/dL, de equinos com cólica natural durante as Fases Inicial e Final do experimento.



CNs<sub>1</sub>: equinos com cólica de ocorrência natural, submetidos à laparotomia, cujo pós-operatório evoluiu sem intercorrências; CNs<sub>2</sub>: equinos com cólica de ocorrência natural, submetidos à laparotomia, e que vieram a óbito, sete a 10 dias após a cirurgia. Fase Inicial (FI): M0: pré-operatório; M1: pós-cirúrgico (6h); M2: 24 horas pós-operatório; Fase Final (FF): M3: 2º dia pós-operatório; M4: 3º dia pós-operatório; M5: 4º dia pós-operatório; M6: 5º dia pós-operatório; M7: 7º dia pós-operatório. FCAV/Unesp – Jaboticabal, 2010 – 2013.

Os animais do grupo de equinos acometidos por cólica natural e sobreviventes apresentaram uma oscilação na concentração sérica de Alfa-1 Antitripsina, alcançando o maior valor no período pós-operatório (Fase Final), em M7. Já os animais do grupo de equinos acometidos por cólica natural e não-sobreviventes apresentaram aumento



gradativo das concentrações séricas médias de Alfa-1 Antitripsina, observando-se a concentração máxima, também no período pós-operatório (Fase Final), porém em M5.

Para os equinos acometidos por cólica natural e sobreviventes as concentrações séricas de P10 diminuíram ao longo do tempo até não serem detectadas na circulação sanguínea (M6). Após isto a proteína foi detectada ainda em concentrações bem menores que as iniciais. Inversamente, os equinos acometidos por cólica natural e não-sobreviventes apresentaram um aumento da concentração de P10 até M4, e então, uma brusca diminuição (M5), que voltou a aumentar no final período pós-operatório (M6 e M7).

## **6. DISCUSSÃO**

O padrão da resposta inflamatória produzida pelo grupo de animais acometidos por cólica natural (CN) caracterizou-se por uma resposta de fase aguda em evolução, iniciada pelas PFA e acompanhado posteriormente pela participação das células leucocitárias, indicando um processo inflamatório tóxico (Tab. 3).

A resposta inflamatória mediada pelos leucócitos iniciou-se com diminuição na média da contagem de leucócitos nos períodos pré-operatório (M0) e pós-obstrução (M1 e M2), seguido por um aumento da contagem leucocitária na fase pós-operatória, de M3 à M7. Em contrapartida, os animais do grupo experimentalmente acometido por cólica (CE) apresentaram um quadro de resposta de fase aguda inicial onde a atuação das PFA foi a responsável pela resposta primária e acompanhada posteriormente por uma resposta inflamatória. Esta resposta inflamatória iniciou-se com aumento na média da contagem de leucócitos, de M0 à M2, seguido por uma diminuição da contagem leucocitária. Essas diferenças residem, segundo LASSEN & SWARDSON (1995), no tempo de evolução do processo, difícil de ser mensurado em estudos casuísticos, como o grupo CN, integrante do projeto em tela. Ademais, na fase inicial dos transtornos abdominais, os valores do leucograma podem estar próximos dos normais ou ligeiramente alterados.

A fase efetora da resposta imune consiste no recrutamento e ativação dos leucócitos. Através de estímulos ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com consequente liberação de corticosteróides pelo córtex da adrenal, aumentando a concentração de corticosteroides endógenos circulantes, em resposta ao estresse fisiológico ou doenças, observam-se alterações nas contagens global e diferencial de leucócitos (BREIDER, 1993).

A redução inicial no número de leucócitos observada no grupo CN (M2), mais expressivamente em CN<sub>s2</sub>, provavelmente, foi ocasionada pela marginação e migração de neutrófilos para o foco inflamatório em resposta a lesão entérica, como explicaram SVENDSEN et al. (1979), JAIN (1993) e LASSEN & SWARDSON (1995). Segundo BENJAMIN (1999), a leucopenia é um achado normal durante a evolução da síndrome cólica visto que os neutrófilos são os efetores fundamentais na defesa do organismo contra as infecções bacterianas com o intuito de fagocitar microrganismos, células mortas e debris celulares. Confirmando os resultados encontrados, estudos realizados por DI FILIPPO et al (2011) com equinos submetidos à obstrução intestinal, estes autores observaram que os grupos de animais submetidos à obstrução de íleo ou duodeno apresentaram leucopenia durante a fase de obstrução. Entretanto, FAGLIARI & SILVA (2002), estudando equinos acometidos por cólica natural, observaram leucocitose desde a fase pré-cirúrgica.

Neste estudo, a leucocitose foi observada, no grupo CN, apenas na Fase Final (M6 e M7), acompanhada de neutrofilia e desvio à esquerda em CN<sub>s2</sub>, de M4 à M7. Esse achado sinalizou para a presença de um processo inflamatório, resultante da obstrução, que por reter a digesta no lume intestinal predispõe à absorção de toxinas, o que foi confirmado pela presença de bastonetes. SVENDSEN et al (1979) e DI FILIPPO et al (2011) também encontraram leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda no pós-operatório de equinos com cólica. Segundo LASSEN & SWARDSON (1995), o desvio a esquerda é o indicador mais específico e sensível da presença de um processo inflamatório e, a magnitude do desvio indica o grau de demanda tecidual por neutrófilos.

O grupo CN não apresentou alterações na contagem de linfócitos; porém, no grupo CE constatou-se linfopenia em M1, para CE<sub>s3</sub> e CE<sub>s4</sub>, e em M4 para CE<sub>s5</sub>. Segundo JAIN (1993), não é rara a ocorrência de linfopenia, decorrente de infecção bacteriana ou toxemia, como acontece comumente em casos de abdômen agudo.

Durante a Fase Final do experimento, tanto em CN como em CE, o padrão da resposta inflamatória foi caracterizado pela atuação dos leucócitos e das PFA conjuntamente (Tabelas 3 e 4). De acordo com FAZIO et al (2010), o organismo responde à inflamação promovendo variação na contagem de leucócitos e estimulando estas células a liberarem mediadores (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) da síntese de PFA. A indução das PFA por IL-6 ocorre através da fosforilação do fator de transcrição NF-IL-6 que depois é translocado para o núcleo, onde medeia a transcrição dos genes de fase aguda. IL-1 e TNF- $\alpha$ , depois de se ligarem ao seu respectivo receptores, causam fosforilação e degradação de I $\kappa$ B, o inibidor do fator de transcrição NF $\kappa$ B, levando à liberação de NF $\kappa$ B e subsequente ativação dos genes de fase aguda no núcleo (JENSEN & WHITEHEAD, 1998).

A correlação positiva observada entre os monócitos e as PFA indicou a presença de uma resposta de fase aguda instalada, na qual a atuação dos componentes celulares estimula a produção de PFA. Sustentando esses achados, segundo UEHARA et al (2003), os neutrófilos possuem proteínas catiônicas, como a elastase (NE), capazes de clivar receptores presentes nos fibroblastos e assim induzir à produção de citocinas tais como a interleucina-8 (IL-8) e a proteína quimiotática-1 de monócitos. Além disso, a NE realiza sua regulação por feedback negativo da granulopoiese, por meio da clivagem do fator estimulador de colônia de granulócitos. A proteína azurocidina (CAP37) presente nos neutrófilos, de acordo com LEE et al (2003), também possui atividade quimiotática para monócitos e, no endotélio, expressa moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1 e E-adesina), o que resulta na fixação de monócitos e neutrófilos no endotélio. A proteína calreticulina, presente na superfície dos monócitos, por sua vez reage com a CAP37 resultando assim na ativação dos monócitos e consequente produção de IL-6. A IL-6, por sua vez, estimula a produção de proteínas de fase aguda.

Confirmando os resultados observados neste estudo, onde a ativação dos leucócitos estimula a produção de fatores indutores de PFA, JACOBSEN et al (2009), avaliando a resposta de fase aguda em diferentes cirurgias em cavalos, constatou que cavalos, no pré-operatório, com leucograma e/ou concentrações de fibrinogênio no limite superior do intervalo de referência tinham níveis mais elevados de IL-6 no pós-operatório do que cavalos, no pré-operatório, com leucograma e/ou níveis de fibrinogênio no limite inferior do intervalo de referência.

De acordo com CRUICKSHANK et al (1990), cirurgias abdominal e torácica, de maior extensão, causam maior liberação de IL-6 e PFA do que cirurgia músculo-esquelética. Ainda, segundo esses autores, as células peritoneais produzem vários tipos de citocinas, incluindo IL-6, e a laparotomia mostrou provocar grandes aumentos no concentrações de citocinas no líquido peritoneal e, assim, possivelmente afetar a magnitude da resposta de fase aguda no pós-operatório. GRANDE et al (2002), também avaliando a resposta de fase aguda em diferentes cirurgias, observou que as concentrações de IL-6 são mais elevadas no pós-operatório de cirurgias abertas convencionais do que em procedimentos minimamente invasivos.

As PFA tiveram participação importante na resposta inflamatória, em ambos os grupos, sendo a primeira resposta efetora ao injúrio estabelecido. O grupo CN apresentou um padrão comportamental bem distinto do apresentado pelo grupo CE, indicando a presença de um processo em evolução. As médias das concentrações séricas de PT em CN foram menores que as observadas em CE, havendo hipoproteinemia em CN, durante a Fase Inicial, e hiperproteinemia em CE, durante a Fase Final. VALADÃO et al (1996) explicaram que a hipoproteinemia ocorre por comprometimento da integridade da parede intestinal, o que acarreta alteração vascular e conseqüente extravasamento de fluidos e de elementos plasmáticos para o interior da alça intestinal e/ou cavidade peritoneal. A hiperproteinemia encontrada em CE sugere que ocorreu resposta inflamatória estimulada pelo ato cirúrgico e pela própria lesão entérica.

De acordo com JACOBSEN, 2007 e DI FILIPPO et al, 2010, na cólica é frequente o desenvolvimento de processos inflamatórios e infecciosos, não só em

decorrência direta da síndrome, mas também secundariamente ao trauma cirúrgico. Ademais, procedimentos cirúrgicos e processos inflamatórios induzem à resposta inicial do organismo, desencadeando alterações fisiológicas, denominadas resposta de fase aguda da inflamação, que culminam em modificação do metabolismo hepático, com aumento da produção de PFA (TAKIGUCHI et al., 1990).

De modo geral, o estímulo à síntese de PFA ocorre no período de seis a oito horas após a injúria, sendo que a concentração máxima é alcançada em dois a cinco dias. Porém, o pico e a persistência das concentrações plasmáticas destas proteínas dependem do metabolismo, extravasamento vascular e deposição tecidual (JAIN, 1993), o que justifica a participação destas proteínas na resposta inflamatória durante toda a fase experimental.

As concentrações de AGP, em CE, elevaram-se em 23% (CE<sub>s5</sub>), 30% (CE<sub>s3</sub>) e 116% (CE<sub>s4</sub>) enquanto que em CN este aumento foi de 131% (CN<sub>s1</sub>) e 208% (CN<sub>s2</sub>), entre M2 e M4, quando comparadas aos valores de referência 0,08 – 0,013 mg/mL, segundo ALBANI et al, (1984). Ainda, segundo estes autores, as concentrações de AGP podem aumentar 2 – 5 vezes durante doenças inflamatórias, como o observado no ensaio em questão. A IL-8, IL-1, IL-6 e os glicocorticóides são os maiores moduladores da produção AGP pelos hepatócitos (FOURNIER et al, 2000). AGP é considerada um agente anti-inflamatório e imunomodulador devido à sua atividade anti-neutrófila e anti-complemento *in vitro* e *in vivo* (WILLIAMS et al, 1997). Segundo SHIAN et al (1996), os monócitos e leucócitos polimorfonucleares (PMN) são as células alvo principais para AGP. Esta afirmação explica a interação observada em CN entre a AGP e os monócitos durante a Fase Final (Tabela 3) e a interação observada em CE entre a AGP e os basófilos durante a Fase Inicial (Tabela 4). AGP pode ainda estar relacionada com a gravidade do processo inflamatório/ infeccioso, visto que FAGLIARI et al (2008) e DI FILIPPO et al (2010) observaram que equinos com cólica que não sobreviveram após tratamento cirúrgico apresentavam níveis superiores de AGP, quando comparados a animais sobreviventes.

Para a espécie equina, as proteínas SAA, AGP, Hp e Cp são consideradas as PFA mais importantes. Destas, a SAA é uma proteína de fase aguda maior, enquanto

AGP, Hp e Cp são proteínas de fase aguda moderada. As proteínas de fase aguda moderadas, como a Hp e Cp, respondem a um estímulo com um aumento de sua concentração de 5 – 10 vezes durante a ativação, alcançando pico após 2 – 3 dias e diminuem sua resposta mais lentamente que as proteínas de fase aguda maiores (ECKERSALL, 2010). Confirmando essas afirmações, observou-se que as concentrações de Hp, em CN e CE, elevaram-se ao longo do período experimental, alcançando pico durante a Fase Final. Porém, as concentrações de Hp do grupo CE permaneceu dentro dos valores de normalidade de 2 – 10 g/L (CRISMAN et al, 2008); já no grupo CN, as concentrações de Hp aumentaram acima dos valores referenciados.

Corroborando os achados deste ensaio, estudo realizado por FAGLIARI et al. (2008) revelou aumento nos níveis de haptoglobina em equinos com cólica, mesmo antes do procedimento cirúrgico. Ademais, demonstrou que equinos com cólica que não sobreviveram apresentavam valores de haptoglobina superiores aos sobreviventes.

O padrão de resposta inflamatória do grupo CN, durante a Fase Final do experimento, apresentou interação entre Hp e os monócitos. Essa interação se deve às características da Hp e dos monócitos. A haptoglobina é uma  $\alpha_2$ -globulina responsável pelo transporte de hemoglobina nas células do sistema mononuclear fagocitário, para que haja a recuperação do íon ferro durante o processo de hemocaterese e na defesa contra microorganismos (MURATA et al, 2004). O ferro, por sua vez, é denominado um reagente de fase aguda negativo em cavalos e outras espécies, e recentemente mostrou-se um indicador muito sensível na inflamação sistêmica em cavalos (JACOBSEN et al, 2009).

O grupo CE também apresentou um padrão de resposta inflamatória distinto durante a Fase Final, havendo interação entre Hp e os eosinófilos. Uma possível explicação para esta interação é que durante a cirurgia de cólica a manipulação do intestino é inevitável. Em cavalos, as reações inflamatórias intestinais têm sido descritas após isquemia-reperfusão, infecção parasitária e colite experimentalmente induzida. As células inflamatórias envolvidas na inflamação incluem eosinófilos e neutrófilos, que são parte da população de células residente na submucosa e mucosa do intestino. Dentro da mucosa intestinal de cavalos saudáveis, um maior número de eosinófilos está

presente no ceco, cólons ascendente e transverso, do que no estômago, duodeno, jejuno e cólons descendentes. As funções dos eosinófilos no intestino não são completamente compreendidas, embora sab-se que eles desempenham um papel importante na doença inflamatória do intestino em várias espécies, incluindo cavalos, e estão bem equipados para iniciar e manter uma reação inflamatória local (HOPSTER-IVERSEN et al, 2011).

A Ceruloplasmina, como uma enzima, que é um eliminador universal de radicais livres, possui atividades de ferroxidase, cuproxidase, superóxido-desmutase, peroxidase glutaciona dependente e NO-oxidase. A Cp equina é considerada uma PFA positiva, moderada, e classifica-se como uma  $\alpha_2$ -globulina. Segundo MURATA et al. (2004) e CERÓN et al. (2005), as  $\alpha_2$ -globulinas são induzidas pela IL-6, elevam-se mais tardiamente e, assim permanecem por várias semanas. Corroborando a afirmação, os resultados apresentados mostram que os grupos CN e CE apresentaram maiores concentrações de Cp na Fase Final do experimento.

FAGLIARI & SILVA (2002), SAQUETTI et al (2008) e DI FILIPPO et al (2010), também observaram aumento das frações ceruloplasmina, haptoglobina e  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida em equinos com cólica submetidos à laparotomia para correção de torção de cólon maior, compactação de cólon maior e encarceramento nefroesplênico de cólon maior, em animais submetidos à obstrução experimental do cólon menor, e animais submetidos à obstrução de duodeno, íleo e cólon maior, respectivamente. Durante a Fase Inicial observou-se no grupo CN uma interação negativa entre Cp e os linfócitos. Esta interação negativa possivelmente ocorreu devido à capacidade de Cp inibir a atividade pró-oxidante das enzimas leucocíticas, quando se liga à mieloperoxidase (MPO) (SEGELMARK et al, 1997).

## **7. CONCLUSÃO**

A resposta inflamatória em equinos acometidos por cólica natural mostrou-se mais intensa, apresentando maiores concentrações de proteínas de fase aguda e

resposta inflamatória tóxica, demonstrada pela leucocitose por neutrofilia e desvio à esquerda.

Os equinos submetidos à obstrução experimental apresentaram resposta inflamatória ao modelo de obstrução instituído, apresentando elevação nos valores das PFA e leucócitos, mesmo para o grupo controle.

As proteínas de fase aguda alfa-1 glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina mostraram-se eficientes marcadores da resposta inflamatória, alterando suas concentrações de acordo com a evolução do processo e suas concentrações séricas podem ser utilizadas como indicadores prognósticos e de evolução do abdômen agudo em equinos.



## 8. REFERÊNCIAS

ALBANI, F. et al. Stereoselective binding of propranolol enantiomers to human alpha 1-acid glycoprotein and human plasma. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Chichester, v. 18, p. 244-246, 1984.

ALFENAS, A. C.; BRUNE, W. Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: ALFENAS, A.C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins – fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora UFV, p. 151-182, 1998.

BENJAMIN, C. F. **Importância da redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal na evolução da sepse: papel do óxido nítrico**. 1999. 106f. Tese (Doutorado em farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

BREIDER, M. A. Endothelium and inflammation. **Journal American Veterinary Medical Association**, Washington, v. 203, n. 2, p. 300-306, 1993.

BUSK, P., JACOBSEN, S., MARTINUSSEN, T. Administration of perioperative penicillin reduces postoperative serum amyloid A response in horses being castrated standing. **Veterinary Surgery**, v. 39, p. 638-643, 2010.

CARAPETO, M.V. et al. Serum  $\alpha$ -globulin fraction in horses is related to changes in the acute phase proteins. **Journal of Equine Veterinary Science**, Philadelphia, v. 26, n. 3, p. 120-127, 2006.

CERÓN, J.J. et al. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

CRISMAN, M. V.; SCARRATT, W. K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Maryland Heights, v. 24, p. 285-297, 2008.

CRUICKSHANK, A. M. et al. Response of serum interleukin-6 in patients undergoing elective surgery of varying severity. **Clinical Science**, v. 79, p. 161-165, 1990.

CYWINSKA, A. et al. Serum amyloid A level as a potential indicator of the status of endurance horses. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v.42, Suppl.38, p.23-27, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-3306.2010.00280.x/pdf>

DATT, S. C.; USENIK, E. A. Intestinal obstruction in the horse. Physical signs and blood chemistry. **The Cornell Veterinarian**, Ithaca, v. 65, n. 2, p. 152-172, 1975.

DI FILIPPO, P. A. et al. Equilíbrio ácido-base e hidroeletrólítico em equinos com cólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 4, p. 1003-1009, 2008.

DI FILIPPO, P. A. et al. Hemogasometria de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 156-162, 2009.

DI FILIPPO, P. A. et al. Avaliação clínica e eritroleucograma de equinos com cólica submetidos à laparotomia, sobreviventes ou não sobreviventes. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 4, p. 1246-1255, 2009.

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, n. 4, p. 938-946, 2010.

DI FILIPPO, P. A. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida, transferrina e  $\alpha_1$ -antitripsina, em equinos com cólica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2108-2113, 2011.

ECKERSALL, D. P. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 151, p. 577-584, 2000.

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

EURELL, T.E. et al. The effect of exploratory laparotomy on the serum and peritoneal haptoglobin concentrations of the pony. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 57, n. 1, p. 42-44, 1993.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hípidos e de eqüinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, G. T. 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**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 322-328, 2008.

FALEIROS, R. R. Obstrução experimental do cólon menor eqüino: aspectos clínicos, patológicos e terapêuticos. **Jaboticabal, 168p. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, 2003.**

FAZIO, F.; ASSENZA, A.; TOSTO, F.; CASELLA, S.; PICCIONE, G.; CAOLLA, G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds during training. **Veterinary Record**, London, v. 167, n. 10, p. 370-373, 2010.

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

GAMA, F.G.V.; SANTANA, A.E.; FILHO, E.C.; NOGUEIRA, C.A. Agarose gel electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins of dogs after sample concentration using a membrane microconcentrator technique. **Veterinary Clinical Pathology**, Santa Barbara, v. 36, n. 1, p. 85-88, 2007.

GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAHPOKU, S.K. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology**, v. 51, p. 277-292, 1996.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels**. New York: Elsevier Science Publishers, 1975. 213p.

GRANDE, M. et al. Systemic acute phase response after laparoscopic and open cholecystectomy. **Surgery Endoscopy**, Nova York, v. 16, p. 313-316, 2002.

HOPSTER-IVERSEN, C. et al. Influence of mechanical manipulations on the local inflammatory reaction in the equine colon. **Equine Veterinary Journal**, Malden, v. 43 (suppl. 39), p. 1-7, 2011.

JACOBSEN, S. et al. Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 6, p. 552-556, 2005.

JACOBSEN, S.; NIEWOLD, T.A.; HALLING-THOMSEN, M.; NANNI, S.; OLSEN, E.; LINDEGAARD, C.; ANDERSEN, P. H. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 110, n. 3-4, p. 325–330, 2006.

JACOBSEN, S. Review of Equine Acute-Phase Proteins. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 53., 2007, Orlando, Flórida. **Proceedings...** Orlando: University of Florida, 2007. v. 53, p. 230-235.

JACOBSEN S., NIELSEN J. V., KJELGAARD-HANSEN M..... Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. **Veterinary Surgery**, v. 38, p. 762-769, 2009.

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

JEFFERS J. N. R. **An Introduction to System Analysis: with Ecological Applications**. London, E. Arnold Publ., 1978. 198p.

JENSEN, L. E.; WHITEHEAD, A. S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response. **Biochemical Journal**, Londres, v. 334, p. 489-503, 1998.

KAISER, H. F. The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. **Psychometrika**, v. 23, p. 187-200, 1958.

KIM J. O.; MUELLER C. W. Factor Analysis. Statistical Methods and Practical Issues. **Quantitative Applications in the Social Sciences 14**. Sage University, 1978. 8 pp.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LARANJEIRA, P. V. E. H.; ALMEIDA, F. Q. Síndrome cólica em equinos: ocorrência e fatores de risco. **Revista de Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 1, p. 64-78, 2008.

LASSEN, E. D.; SWARDSON, C. J. Hematology and hemostasis in the horse: normal functions and common abnormalities. **Veterinary Clinics of North America. Equine practice**, Philadelphia, v. 11, n. 3, p. 351-389, 1995.

LEE, T. D. et al. CAP37, a neutrophil-derived inflammatory mediator, augments leukocyte adhesion to endothelial monolayers. **Microvasc Research**, Philadelphia, v. 66, p. 38-48, 2003.

MILSTEIN A. Factor and canonical correlation analyses: basic concepts, data requirements and recommended procedures. In: Prein M., Hulata G. and Pauly D. (eds), **Multivariate Methods in Aquaculture Research: Case Studies of Tilapias in Experimental and Commercial Systems. ICLARM Studies and Reviews**, v. 20, p. 24-31, 1993.

MILSTEIN A. et al. Characterization of water quality in shrimp ponds of different sizes and with different management regimes using multivariate statistical analysis. **Aquaculture International**, v. 13, p. 501-518, 2005.

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

NAOUM, P. C. et al. Conhecimentos básicos de eletroforese. In: NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2ed. São Paulo: Santos Livraria e Editora, p. 1-38, 1999.

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

RODRIGUES, A.M.A.; ZANUTTO, M.S.; HAGIWARA, M.K.; Concentrações séricas de proteína total, albumina e gamaglobulinas em gatos infectados pelo vírus da imunodeficiência felina. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 1, p. 153-158, 2007.

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**. Belo Horizonte v. 60, n. 4, p. 794-799, 2008.

SEGELMARK, M. et al. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? **Clinical & Experimental Immunology**, Chichester, v. 108, n. 1, p. 167-174, 1997.

SHIAN, S. D. et al. The interaction of peripheral blood leukocytes with alpha1-acid glycoprotein, its carbohydrate chains and neoglycoconjugates. **Gematologiya i Transfuziologiya**, v. 41, p. 24-29, 1996.

SPEIRS, C. V. **Clinical examination of horses**. Pennsylvania: Saunders Company, 1997, 358p.

SVENDSEN, C. K.; HJORTKJAER, R. K.; HESSELHOLT, M. Colic in the horse: a clinical and clinical chemical study of 42 cases. **Nordisk Veterinaermedicin**, Kobenhavn, v. 31, n. 10, p. 1-32, 1979.

TAKIGUCHI, M; FUJINAGA, T.; NAIKI, M. et al. Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, p. 1215-1220, 1990.

THOMAS, J. S. Overview of Plasma Proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5 ed. Canada: Lippincott Williams e Wilkins, p. 891-898, 2000.

TRAUB-DARGATZ, J. L. et al. A estimate of the national incidence of and operation level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, n. 1, p. 67-71, 2001.

TURNER, A. S.; McILWRAITH, C. W. Laparotomia do flanco e exploração abdominal. In:\_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo: Roca, 2002. p. 237-242.

UEHARA, A. et al. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. **The Journal of Immunology**, Bethesda, v. 170, p. 5690-5696, 2003.

VALADÃO, C.A.A. et al. Aspectos bioquímicos do plasma e fluido peritoneal de equinos com cólica. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 32-35, 1996. Disponível em: [http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&n\\_extAction=lnk&exprSearch=257066&indexSearch=ID](http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&n_extAction=lnk&exprSearch=257066&indexSearch=ID)

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

WEISS, D. J.; EVANSON, O. A.; FAGLIARI, J. J. A preliminary study of mucosal barrier function in experimental equine laminitis. **Veterinary Pathology**, Baltimore, v. 34, p. 480, 1997.

WILLIAMS, J. P. et al.  $\alpha_1$ -acid glycoprotein reduces local and remote injuries after intestinal ischemia in the rat. **American Journal of Physiology**, v. 273, p. 1031-1035, 1997.

## **APÊNDICE**



## A- SOLUÇÕES EMPREGADAS NA ELETROFORESE (SDS-PAGE)

### GEL DE SEPARAÇÃO A 10%

- ✓ 11,9 mL de água deionizada
- ✓ 5,9 mL de Tris HCl 2 M, pH 8,8 ± 0,1
- ✓ 10,5 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87 C)
- ✓ 1,7 mL de glicerol
- ✓ 0,63 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- ✓ 0,63 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- ✓ 242 µL de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- ✓ 27 µL de TEMED

### GEL DE EMPILHAMENTO A 4%

- ✓ 3,95 mL de água deionizada
- ✓ 0,6 mL de Tris HCl 0,617 M, pH 6,8 ± 0,1
- ✓ 1 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87% C)
- ✓ 300 µL de glicerol
- ✓ 123 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- ✓ 123 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- ✓ 60 µL de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- ✓ 13 µL de TEMED

### TRIS HCl – 2 M – pH 8,9 (GEL DE CORRIDA)

Tris Base (PM: 121,1) ..... 121,1g

Completar para 500 mL com água deionizada.

Acertar para pH 8,9;

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

**TRIS HCl 0,617 M (GEL EMPILHADOR)**

Tris Base (PM: 121,1) ..... 7,475g

Completar para 100 mL com água deionizada.

Acertar para pH 6,8;

Filtrar a solução e guardar em geladeira.

**ACRILAMIDA/BIS (30% T / 1,87% C)**

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08) ..... 73,6g

N,N metileno bisacrilamida para eletroforese Sigma ..... 1,4g

Completar para 250 mL com água deionizada;

Aquecer se necessário.

**EDTA 0,5 M**

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico (PM: 380,2) ..... 19,01g

Completar para 100 mL com água deionizada.

Acertar para pH 8,3.

**LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%**

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4) ..... 10,0g

Completar para 100 mL com água deionizada.

**COOMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R – 250)**

Metanol ..... 500 mL

Ácido acético ..... 100 mL

Águabi destilada ..... 400 mL

Coomassie blue (Brilliant blue R) ..... 2,0g

Deixar em repouso durante duas horas e filtrar.

**GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)**

Lauril sulfato de sódio 10% .....	10,0 mL
EDTA 0,5 M .....	4,0 mL
Tris fosfato 0,617 M, pH 6,8 .....	5,0mL
Mercaptoetanol .....	3,0 mL
Glicerol .....	10,0 mL
Água deionizada .....	18,0 mL
Azul de bromofenol (Bromphenol Blue) .....	5,0 mg
Separar em frações de uso (450 ou 900 µL) – manter no freezer até o momento do uso.	

**PERSULFATO DE AMÔNIA 10%**

Persulfato de amônia .....	0,1g
Água deionizada .....	1,0 mL
(Preparar no momento da confecção do gel).	

**DESCORANTE**

Metanol .....	250,0 mL
Ácido acético .....	100,0 mL

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40°C.

**TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10X)**

TrizmaBase .....	63,2g
Glicina .....	39,9g
SDS .....	10,0g

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Obs: para o uso na corrida usar o tampão de corrida diluído.

**TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)**

Medir 100 mL do **tampão de corrida concentrado (10X)** e completar o volume para 1.000 mL.

**PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEÍNAS PURIFICADAS**

8  $\mu$ L de marker

2  $\mu$ L de gel mix

Congelar até o momento do fracionamento ou preparar na hora do uso.

**PBS – CÁLCIO FREE (TAMPÃO FOSFATO SALINA)**

NaCl .....	2,0g
KCl .....	0,0625g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	12g
H <sub>2</sub> O .....	0,2875g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,05

