

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

**NÍVEIS DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS
EXPOSTOS À SOBRECARGA DE CARBOIDRATOS
ASSOCIADA À ALCALINIZAÇÃO CECAL**

**Isabela Peixoto Rabelo
Médica Veterinária**

2019

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

**NÍVEIS DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS
EXPOSTOS À SOBRECARGA DE CARBOIDRATOS
ASSOCIADA À ALCALINIZAÇÃO CECAL**

Discente: Isabela Peixoto Rabelo

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Cirurgia Veterinária**

2019

R114n Rabelo, Isabela Peixoto
 Níveis de proteínas de fase aguda em equinos expostos
 à sobrecarga de carboidratos associada à alcalinização
 cecal / Isabela Peixoto Rabelo. -- Jaboticabal, 2019
 43 p. : il., tabs. + 1 CD-ROM

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
 (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
 Jaboticabal

 Orientador: Carlos Augusto Araújo Valadão

 1. Cavalo. 2. Proteínas séricas. 3. Inflamação. 4. Trato
 gastrointestinal. 5. Claudicação em equinos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

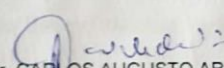
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

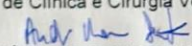
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: NÍVEIS DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS EXPOSTOS À SOBRECARGA DE CARBOIDRATOS ASSOCIADA À ALCALINIZAÇÃO CECAL


AUTORA: ISABELA PEIXOTO RABELO

ORIENTADOR: CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ANDRÉ MARCOS SANTANA
Departamento de Medicina Veterinária-UEM / Umuarama/PR


Pós-Doutoranda DANIELA GOMES DA SILVA
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 11 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ISABELA PEIXOTO RABELO – Nascida na cidade de São João del Rei, Minas Gerais, no dia 01 de junho de 1992. Médica Veterinária graduada pela Universidade Federal de Lavras (UFLA) em Lavras, Minas Gerais, com início em março de 2010 e término em julho de 2015. Realizou estágio curricular no ano de 2015, sob orientação do Prof. Dr. Rodrigo Norberto Pereira, na área de Cirurgia Veterinária de Grandes Animais no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP em São Paulo, SP, e na Seção Veterinária do 1º Regimento da Cavalaria de Guardas do Exército Brasileiro em Brasília, DF. Realizou residência pelo Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária e Saúde, na subárea de Clínica Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais no Hospital Veterinário de Grandes Animais da UFLA, com início em março de 2016 e término em fevereiro de 2018, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Rosa Maria Cabral. Atualmente é mestranda pelo programa de pós-graduação em Cirurgia Veterinária, contemplada pela bolsa CAPES, com início em março de 2018, sob orientação do Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço:

Aos meus pais, Giovanna Cherfên Peixoto e José Maria Rabelo, pelo amor e apoio incondicional, em todos os momentos da minha vida. À minha irmã e melhor amiga, Sara Peixoto Rabelo. Amo muito vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão. Pelo voto de confiança em me aceitar como aluna, por toda orientação profissional e carinho ao longo desses dois anos.

Aos colegas Dani, Moreno, Caio, Vanessa e Paulo. Obrigada por toda paciência e ajuda. Sem vocês esse trabalho seria impossível.

Aos professores, técnicos e colegas da UNESP Jaboticabal, pela parceria direta e indireta neste experimento.

À FAPESP (2018/14720-9) e CAPES, pelo auxílio e pela bolsa de estudo, respectivamente, para que esse projeto fosse realizado com sucesso.

Às minhas amigas Amandinha, Ariane e Vivi, que mesmo longe conseguem me trazer alegria e paz, e provar que a distância é só um mero detalhe.

À minha família número dois da Residência, Dabinha, Debinha, Sarinha Furação, Pat, Djow, Dougão, Álvaro e Druno, Prof. Rosa e Prof. Norberto. Não conseguiria imaginar esses dois anos da minha vida sem vocês e morro de saudade dos plantões e cafés.

Às novas amizades construídas nessa nova fase, Roberto, Liliam, Flavinha, meus amados do teatro, Vanessa, Pão e Mari. Obrigada por toda companhia e por conseguirem transformar São Paulo, Ribeirão Preto e Jaboticabal em três novas casas.

Aos meus pequeninos, Abadá e Caracu, pela dose canina “cavalar” de serotonina diária, que enche de cor os meus dias, e aos cavalos que participaram do meu projeto de pesquisa.

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

SUMÁRIO**Página**

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. REVISÃO DE LITERATURA	2
3.1 Modelo experimental.....	2
3.2 Proteínas de fase aguda.....	3
3.2.1 Amiloide A sérica.....	4
3.2.2 Proteína C reativa	4
3.2.3 Haptoglobina	5
3.2.4. Fibrinogênio	5
3.2.5 α -1-antitripsina	6
3.2.6 α -1-glicoproteína ácida.....	6
3.2.7 Ceruloplasmina	7
3.2.8 Albumina	7
3.2.9 Transferrina.....	8
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 Animais e delineamento experimental	9
4.2 Proteínas	11
4.3 Análise estatística.....	11
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
6. CONCLUSÕES	22
7. REFERÊNCIAS.....	23

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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



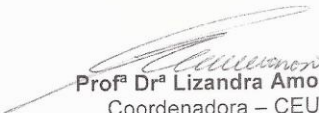
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Identificação genômica do microbioma cecal de cavalos com laminite induzida por oligofrutose. Efeitos do tamponamento cecal”, protocolo nº 23.391/15, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL -SP, em reunião ordinária de 07 de abril de 2016.

Vigência do Projeto	01/03/2016 a 30/02/2018
Espécie / Linhagem	Equina
Nº de animais	15
Peso / Idade	350 Kg
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Fazendas de criação

Jaboticabal, 07 de abril de 2016.


Prof.ª Dr.ª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA



Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n - 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil
tel 16 3209 2600 fax 3202 4275 www.fcav.unesp.br

NÍVEIS DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS EXPOSTOS À SOBRECARGA DE CARBOIDRATOS ASSOCIADA À ALCALINIZAÇÃO CECAL

RESUMO – Avanços acerca da fisiopatologia da laminite equina permitiram imputar como fator primário e deflagrador dos estágios iniciais dessa doença, a ativação da cascata inflamatória. Sabe-se que equinos submetidos à sobrecarga de carboidratos, podem desenvolver laminite e que essa afecção se dá por mudanças na microbiota do trato gastrintestinal. A laminite induz alterações sistêmicas que repercutem nos valores de proteínas de fase aguda (PFA). Com este estudo, buscou-se encontrar uma associação entre os valores dessas proteínas com a evolução dos sinais clínicos de equinos expostos à sobrecarga de carboidrato (amido de milho na dose de 17,6 g/kg de peso vivo, diluído em água na proporção de um quilo/litro, fornecido via sondagem nasogástrica) e tratados com solução tampão intracecal (composto contendo 3,5 g de hidróxido de alumínio, 65,6 g de hidróxido de magnésio e 1,2 g de simeticona, diluído em água destilada em volume equivalente à metade do volume administrado via sondagem nasogástrica). Dez equinos hípidos foram divididos de maneira aleatória e fatorial (2x2), em quatro grupos (n=5): controle (GCC), controle + tratamento (GCT), laminite (GAC), laminite + tratamento (GAT). Os animais do GCC e GAC integraram, respectivamente, GAT e GCT, respeitando um intervalo de 15 dias entre o procedimento experimental. Eles foram avaliados durante sete momentos (T0h, T4h, T8h, T12h, T24h, T48h, T72h), nos quais também foram coletadas amostras de sangue venoso para obtenção do soro e realização do proteinograma. As concentrações séricas de proteínas totais e albumina foram determinadas por colorimetria e as demais PFA através de eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e kits comerciais de ELISA. Os valores referentes às concentrações séricas das proteínas foram submetidos à análise de variância (ANOVA de duas vias) e, quando $p < 0,05$, ao teste de Tukey. Para avaliar o grau de relação entre valores de proteínas e parâmetros clínicos, utilizou-se do coeficiente de Pearson. 40% dos animais desenvolveram laminite clínica (10% do GAC e 30% do GAT). Não houve diferença entre os grupos para os valores de proteínas totais, albumina, amiloide A sérica e proteína C reativa ($p > 0,05$). A transferrina, considerada uma PFA negativa, apresentou padrão de resposta positiva em GAC e GAT. Os valores de ceruloplasmina e α -1-glicoproteína ácida apresentaram correlação com a maioria dos parâmetros fisiológicos avaliados. Essas duas proteínas, juntamente com a haptoglobina e α -1-antitripsina se elevaram consideravelmente no GAT, sugerindo maior ativação da resposta inflamatória nos animais desse grupo, quando comparado aos demais. As alterações dos parâmetros clínicos também foram mais evidentes no GAT, corroborando os achados do proteinograma.

Palavras-chave: Eletroforese, proteinograma, SIRS, tamponamento gastrintestinal

ACUTE PHASE PROTEINS LEVELS IN HORSES EXPOSED TO CARBOHYDRATE OVERLOAD ASSOCIATED WITH CECAL ALKALINIZATION

ABSTRACT – It's is known that the inflammatory response plays an important role in the development of the equine laminitis, mostly in its early stages. Among several risk factors, horses submitted to carbohydrate overload can develop this syndrome, due to changes in the cecal pH and microbiota, followed by an increase in the transmural absorption of several luminal contents, such as bacterial endotoxins. The acute phase response that occurs after injury elicits the overproduction of several proteins by the liver, called acute phase proteins (APP). However, there are few studies using proteinogram to characterize the inflammatory response during the development of this syndrome. The aim of this study was to correlate APP values with clinical signs of horses submitted to carbohydrate overload (17.6 g.kg^{-1} BW of corn starch solution, administered via nasogastric tube) and treated with a buffer solution (3.5 g of aluminum hydroxide, 65.6 g of magnesium hydroxide and 1.2 g of simethicone, administered into the cecum through catheterization). Ten healthy horses were divided in a factorial and randomized way into four groups ($n = 5$): control (GCC), control + treatment (GCT), laminitis (GAC), laminitis + treatment (GAT). The animals from GCC and GAC integrated GAT and GCT, respectively, respecting an interval of 15 days between the experimental procedure. They were evaluated during seven moments (T0h, T4h, T8h, T12h, T24h, T48h, T72h), in which blood were also collected to obtain serum to perform the proteinogram. Total protein and albumin concentrations were determined by colorimetry and the other APP by polyacrylamide gel electrophoresis containing sodium dodecyl sulphate (SDS – PAGE) and commercial ELISA kits. Values of the serum concentration of those proteins were submitted to a two-way ANOVA, when significant ($p < 0.05$) to the Tukey test. The correlation between clinical signs and APP were verified using the Pearson's correlation coefficient. 40% of the animals developed clinical laminitis (10% of GAC and 30% of GAT). There was no difference between groups in the values of total protein, albumin, serum amyloid A and C reactive protein ($p > 0.05$). Transferrin, considered a negative APP, showed a positive response pattern in GAC and GAT. Ceruloplasmin and α -1-acid glycoprotein serum concentrations had a positive correlation with most physiological parameters. These two proteins, together with α -1-antitrypsin and haptoglobin had its values increased considerably in GAT, suggesting greater activation of inflammatory response in animals of this group, comparing to the ones from GAC. Changes in clinical parameters were also more evident in the GAT group, corroborating the proteinogram findings.

Keywords: Electrophoresis, gastrointestinal buffering, proteinogram, SIRS

LISTA DE ABREVIATURAS

AAS – Amiloide A sérica

AAS3 – Amiloide A sérica (isoforma 3)

bpm – batimentos por minuto

CHO – Carboidratos

Cp – Ceruloplasmina

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

Fb – Fibrinogênio

FC – Frequência cardíaca

GAC – Grupo Amido/Controle

GAT – Grupo Amido/Tampão

GCC – Grupo Controle/Controle

GCT – Grupo Controle/Tampão

Hb – Hemoglobina

Hp – Haptoglobina

IC – Intra cecal

PCR – Proteína C reativa

PFA – Proteína de fase aguda

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNG – Sondagem nasogástrica

T°C – Temperatura

α -1-AT – α -1-antitripsina

α -1-GA – α -1-glicoproteína ácida

1. INTRODUÇÃO

Poucas doenças causam mais prejuízos à equideocultura do que a laminite. A natureza devastadora dessa síndrome caracterizada, na maioria das vezes, por uma dor excruciante e mudanças irreversíveis no dígito, leva à perda de animais de alto valor econômico ou afetivo. Apesar de muitas medidas terapêuticas adotadas, muitos cavalos que conseguem se recuperar dessa enfermidade não regressam à vida atlética sem sequelas (Belknap, 2016). Por essas razões, torna-se imperiosa a redução de risco da laminite, seja pelo estabelecimento de medidas terapêuticas precoces ou preventivas (Belknap e Durham, 2016).

O desenvolvimento dessa enfermidade decorrente de causas alimentares já foi muito bem documentado (Pollitt e Visser, 2010). Sabe-se que a ingestão excessiva de carboidratos (CHO) leva a um aumento do processo fermentativo no ceco, que ultrapassa a capacidade tamponante desse órgão, resultando em acidificação do pH cecal, mudanças na microbiota e liberação de endotoxinas na corrente sanguínea e ativação da resposta inflamatória sistêmica (Eades, 2016). Logo, acredita-se que a administração de uma sobrecarga única de CHO seja capaz de induzir, em equinos saudáveis, o desenvolvimento de laminite clínica. Ademais, acredita-se que a solução tampão no ambiente intracecal seja capaz de minimizar as alterações na microbiota, evitar o surgimento da endotoxemia e, por conseguinte, o desenvolvimento da laminite (Souza, 2007).

A identificação da inflamação antes do aparecimento dos sinais iniciais tem sido fundamental, uma vez que o aparecimento desses sinais geralmente repercute o comprometimento drástico do tecido lamelar imediato na laminite relacionada à síndrome da resposta inflamatória sistêmica (Belknap e Durham, 2016; van Eps, 2016). Acredita-se que por meio do proteinograma se possa detectar o início da resposta inflamatória, antecipadamente ao aparecimento dos sinais clínicos.

Existem evidências de alterações nas taxas de proteínas de fase aguda (PFA) em cavalos com quadro de laminite clínica (Fagliari et al., 1998). Considerando as descobertas recentes sobre o papel das PFA na inflamação e laminite (Leise, 2018), aponta-se para a condução de estudos complementares sobre a instalação desta síndrome, que venham a validar esta hipótese do envolvimento precoce das PFA.

2. OBJETIVOS

- Verificar a eficácia da sobrecarga enteral única de CHO sobre o desenvolvimento de laminite clínica em equinos saudáveis.
- Avaliar o impacto da solução tampão nas fases iniciais da laminite; nos parâmetros fisiológicos; e na resposta inflamatória, pela concentração sérica das PFA.
- Verificar se houve aumento nos níveis séricos das PFA nos animais que desenvolveram laminite, e se essa elevação precedeu o aparecimento dos sinais clínicos.
- Correlacionar os sinais clínicos apresentados pelos animais que desenvolveram laminite aguda com os valores séricos de cada proteína identificada.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Modelo experimental

Nas últimas duas décadas os mecanismos sistêmicos e locais envolvidos na deflagração da laminite têm sido estudados, o que permitiu classificar a fisiopatogenia dessa doença multifatorial em três grandes categorias: endocrinopática, sobrecarga de peso e relacionada a sepse (Belknap, 2016; Leise, 2018). Existem dois modelos experimentais utilizados para indução da laminite em equinos que se assemelham com a laminite clínica: intoxicação por extrato de noqueira negra (*Juglans nigra*) (Thomsen et al., 2000) e sobrecarga de carboidratos (CHO) (Pollitt e Visser, 2010). A modificação na população bacteriana presente no ceco durante a fermentação excessiva de CHO resulta em acidificação do pH cecal. A redução do pH restringe o crescimento de bactérias Gram-negativas e favorece o das bactérias Gram-positivas, sobretudo de *Streptococcus bovis* (Milinovich et al., 2010).

A inflamação tem um papel fundamental em promover danos à estrutura lamelar do casco nas fases iniciais da laminite, sobretudo quando sua ocorrência está

relacionada com síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou à sepse (Leise, 2018). Essa resposta inflamatória pode envolver a participação de vários órgãos na produção de citocinas, incluindo fígado, pulmões e rins (Stewart et al., 2009; Leise et al., 2011).

3.2 Proteínas de fase aguda

A resposta de fase aguda consiste em um conjunto complexo de reações inflamatórias, mediante infecção ou lesão tecidual deflagrada pela produção de mediadores inflamatórios pelas células ou tecidos lesados (Jacobsen, 2007). Dentre as diversas modificações orgânicas, o fígado tem sido responsabilizado pela produção exacerbada de algumas proteínas, denominadas proteínas de fase aguda (Koj, 1996).

O padrão de resposta das PFA é espécie-específico. Em equinos, elas podem ser classificadas como negativas, quando se encontram abaixo do intervalo padrão diante de um quadro inflamatório – este é o caso da albumina e da transferrina – ou positivas, quando seus valores se encontram acima daqueles considerados normais para espécie (Murata et al., 2004; Saquetti et al., 2008). As PFA positivas podem ainda ser subdivididas, na espécie equina, em: aquela cuja concentração aumenta de dez a mil vezes em relação aos valores basais, representada pela amiloide A sérica, e outras cujas concentrações se elevam entre cinco e dez vezes em relação aos valores basais, representadas pela haptoglobina, α -1-glicoproteína ácida, α -1-antitripsina, proteína C reativa, fibrinogênio e ceruloplasmina (Miller et al., 2004; Jacobsen, 2007).

Em humanos, as mensurações de PFA são mundialmente realizadas para avaliação à beira leito do estado inflamatório de pacientes internados (Kargaltseva et al., 2019). Existem diversos relatos na literatura sobre a utilização das PFA como ferramenta diagnóstica na clínica veterinária (Murata et al., 2004). Em equinos, com exceção do fibrinogênio, essas mensurações se restringem à pesquisa e de forma bem limitada (Jacobsen, 2007). Para esta espécie, já foram relatados aumento nos valores de PFA durante infecções bacterianas e virais (artrite infecciosa, pneumonia, sepse, enterite, herpes e infecção pelo vírus da influenza), pós-parto, pós-cirúrgico, e em animais com síndrome cólica e laminite (Hultén et al., 1999; Hultén e Demmers,

2002; Duggan et al., 2008; Kyaw-Tanner et al., 2008; Saquetti et al., 2008; Eades 2016; Witkowska-Piłaszewicz et al., 2019a, b).

3.2.1 Amiloide A sérica

A amiloide A sérica (AAS) é uma apolipoproteína hepática produzida durante a resposta de fase aguda. Algumas de suas isoformas extra-hepáticas, como a AAS3, já foram identificadas na espécie equina, na glândula mamária, durante a formação do colostro e em articulações de animais acometidos por artrite (Jacobsen et al., 2006a, b; Duggan et al., 2008). Embora não bem elucidado, essa proteína parece exercer papel fisiológico na: função leucocitária; inibição da proliferação linfocitária, de células endoteliais e agregação plaquetária; recrutamento quimiotáxico de células inflamatórias e controle da expressão de metaloproteinases (Xu et al., 1995; Vallon et al., 2001). Os valores de referência da concentração de AAS variam de indetectáveis a 20 mg/L (Witkowska-Piłaszewicz et al., 2019a). A baixa expressão da AAS nos cavalos hígidos, associado ao tempo de meia vida curto, permite inferências diretas e precisas frente a pequenas variações na concentração dessa proteína durante um estímulo inflamatório (Jacobsen, 2007).

3.2.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é considerada um excelente parâmetro para identificação e monitoramento de processos inflamatórios na espécie humana (Crisman et al., 2008). Dentre suas funções biológicas, podem-se destacar efeitos pró-inflamatórios, como ativação da cascata de coagulação, opsonização, estímulo para produção de citocinas inflamatórias e fagocitose (Petersen et al., 2004). A PCR também possui propriedades anti-inflamatórias relacionadas à atividade de neutrófilos, atuando como inibidora dos processos de quimiotaxia, adesão e produção de espécies reativas de oxigênio (El Kebir et al., 2011; Ostrowski et al., 2012).

Em equinos saudáveis, os valores séricos de PCR variam entre 7 a 8 µg/mL. (Yamashita et al., 1991). Essa proteína se mostrou aumentada em casos de laminite, pneumonia, enterite, artrite e após orquiectomia (Takiguchi et al., 1990). Outros autores, no entanto, relataram que as concentrações séricas de PCR não são

afetadas pela doença inflamatória (Pollock et al., 2005; Lavoie-Lamoureux et al., 2012). Nos potros, a PCR, embora apontada como bom bioindicador inflamatório, apresentou pouco valor prognóstico na sepse, pois seus valores não variaram de maneira significativa entre potros doentes e saudáveis (Zabrecky et al., 2015).

3.2.3 Haptoglobina

A haptoglobina (Hp) é uma α -2-globulina hepática, que se liga irreversivelmente à hemoglobina livre (Hb), formando um complexo Hp-Hb, que posteriormente é degradado pelas células de Kupffer. Esse complexo permite o reaproveitamento do ferro presente na Hb tornando-o, adicionalmente, indisponível para crescimento bacteriano. Acredita-se que a Hp possua propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e cicatrizantes (Murata et al., 2004).

Os valores de referência da concentração de haptoglobina variam entre 2 a 10 g/L (Crisman et al., 2008). Os níveis séricos de Hp aumentaram de maneira considerável em cavalos frente à indução de artrite por administração intra-articular de lipopolissacarídeos (Andreassen et al., 2017) e anfotericina B (Barrachina et al., 2016) se elevando de forma discreta após o parto em éguas (Krakowski et al., 2017). Essa proteína não foi considerada como bioindicador no diagnóstico e classificação de enfermidades gastrintestinais (Pihl et al., 2016; Westerman et al., 2016), tampouco como ferramenta prognóstica de mortalidade na sepse de potros, uma vez que a concentração de Hp foi menor se comparada à de potros saudáveis (Zabrecky et al., 2015).

3.2.4. Fibrinogênio

O fibrinogênio (Fb) é uma glicoproteína plasmática solúvel, sintetizado pelo fígado, relacionado ao processo de coagulação, como precursor da fibrina, na formação do coágulo. Ele também participa no processo inflamatório, ligando-se a integrinas de membrana celular (CD11 e CD18) de granulócitos e, conseqüentemente, estimulando a degranulação, fagocitose e citotoxicidade dependente de anticorpos (Crisman et al., 2008).

Os níveis de fibrinogênio têm sido usados no monitoramento de diversos processos inflamatórios da espécie equina (Giguère et al., 2003; Borges et al., 2007; Hobo et al., 2007). Trata-se de uma PFA de expressão moderada aumentando de uma a 10 vezes ao longo de 24 a 72 horas após insulto. Em cavalos hígidos, os valores de Fb variam entre 200 a 400 mg/dL (Crisman et al., 2008). O aumento da concentração plasmática possui correlação direta com a instalação do processo inflamatório. Porém, a variação na taxa do Fb ocorre de forma lenta, sendo pouco sensível para detectar fases pontuais da inflamação e estabelecer prognóstico (McGovern, 2018).

3.2.5 α -1-antitripsina

A α -1-antitripsina (α -1-AT) é uma PFA positiva sintetizada no fígado com atividade inibidora de proteases como tripsina, elastase e quimotripsina (Pollitt e Bell, 1983). A α -1-AT é responsável por aproximadamente 90% da capacidade inibitória de proteases no plasma e está envolvida na regulação da inflamação (Patterson, 1991). A elevação da concentração sérica da α -1-AT foi observada em humanos expostos a processos infecciosos e inflamatórios (McCarthy et al., 2014, 2018). Sabe-se que essa proteína exerce atividade anti-inflamatória nas células leucocitárias, como neutrófilos (O'Dwyer et al., 2015), linfócitos B (Grimstein et al., 2011) e macrófagos (Churg et al., 2007) e é apontada como moduladora de processos apoptóticos de células endoteliais (Petrache et al., 2006) e da expressão de citocinas mediadas por fibroblastos (Grimstein et al., 2010).

Potros com úlcera gástrica apresentaram níveis séricos elevados da α -1-AT (Taharaguchi et al., 2007). Cavalos também apresentaram elevação desses níveis após exercício físico intenso (Scoppetta et al., 2012) e em casos de laminite induzida por sobrecarga de carboidratos (Fagliari et al., 1998).

3.2.6 α -1-glicoproteína ácida

A α -1-glicoproteína ácida (α -1-GA) é uma proteína glicosilada sintetizada e secretada principalmente por hepatócitos, importante no metabolismo e na imunomodulação. Possui afinidade de ligação às substâncias endógenas e exógenas,

como serotonina, esteroides, heparina e a alguns fármacos (Fournier et al., 2000). A α -1-GA tecidual, contribui com a manutenção da homeostase, pois protege as células epiteliais e endoteliais durante processos inflamatórios. Ela também inibe a ativação de neutrófilos, aumenta a secreção do antagonista do receptor de IL-1 por macrófagos e atua na neutralização de lipopolissacarídeos provenientes de bactérias Gram-negativas (Moore et al., 1997).

Na espécie equina, os níveis basais da α -1-GA se encontram entre 70 e 90 mg/L (Jacobsen, 2007) ocorrendo aumento nas concentrações séricas de α -1-GA após orquiectomia, jejunojejunostomia e na laminite por sobrecarga de CHO (Taira et al., 1992; Fagliari et al., 1998). Acredita-se que essa proteína esteja mais associada a processos inflamatórios crônicos do que agudos (Crisman et al., 2008).

3.2.7 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina (Cp) é uma α -2-globulina sintetizada principalmente por hepatócitos, responsável pelo transporte de 95% do cobre plasmático, sendo essencial para formação do colágeno e reparação tecidual. Ela participa da oxidação e incorporação do ferro à apotransferrina, para o transporte desse mineral isento de toxicidade. Além disso, atua contra substâncias oxidantes produzidas por fagócitos (Cerón et al., 2005; Smith, 2014).

Em equinos, os níveis de Cp variam de 300 a 400 mg/L (Jacobsen, 2007). Existem relatos de aumento desses níveis basais nos períodos peri- e pós-parto em éguas (Okumura et al., 1991); em pôneis submetidos à laminite por sobrecarga de CHO (Fagliari et al., 1998); durante a síndrome cólica (Souto et al., 2019); após exercício físico de alta intensidade (Scoppetta et al., 2012) e em potros acometidos por *Rhodococcus equi* (Barton e Embury, 1987).

3.2.8 Albumina

A albumina (Alb) é a globulina mais abundante no plasma de mamíferos. Seu papel está relacionado com o transporte de diversas substâncias no plasma, como esteroides, ácidos graxos, hormônios e fármacos. Ela também contribui com 75% na manutenção da pressão oncótica no espaço intravascular (Bhat et al., 2018).

Em equinos, as concentrações séricas de Alb variam entre 3,2 a 3,8 g/dL (McGovern, 2018). Essa proteína é uma PFA negativa, pois seus níveis séricos geralmente reduzem durante a resposta de fase aguda (Bhat et al., 2018). Essa diminuição ocorre nas fases mais tardias do processo inflamatório, devido à alta demanda por aminoácidos para síntese de PFA positivas e demais mediadores do processo inflamatório (Cray, 2009; McGovern, 2018). A hipoalbuminemia também pode ser secundária a alterações da pressão oncótica, e em casos de enteropatias, onde há extravasamento de proteínas para compartimentos extravasculares (McGovern, 2018).

3.2.9 Transferrina

A transferrina (Trf) é uma β -globulina carreadora, capaz de se ligar de maneira reversiva ao ferro (Fe^{3+}), tornando-o solúvel em condições fisiológicas. Ela permite que esse mineral circule com segurança pelo organismo e seja fornecido às células em crescimento, prevenindo a toxicidade mediada pelo Fe (via produção de radicais livres), e tornando-o indisponível para microorganismos dependentes de Fe (fungos, vírus e bactérias) (Huebers e Finch, 1987; Kaplan et al., 1991). Na maioria das espécies, a Trf é considerada uma PFA negativa (Murata et al., 2004; Saquetti et al., 2008). Seus níveis séricos reduzem, pois durante a resposta de fase aguda, e sobretudo quando esta está relacionada a um processo infeccioso, o organismo reduz a absorção de nutrientes como o Fe^{3+} para limitar o crescimento bacteriano, em um processo denominado imunidade nutricional (Skaar et al., 2010).

Na espécie equina, o padrão de expressão de Trf ainda não está muito bem elucidado. Existem relatos que demonstram sua redução no lavado broncoalveolar de animais com doença respiratória crônica (Miskovic et al., 2015) e no soro de cavalos com obstrução experimental de cólon menor (Saquetti et al., 2008). Entretanto, a Trf se mostrou aumentada no líquido amniótico de éguas com placentite (Loux e Ball, 2018), no soro de cavalos de salto submetidos a treinamento de alta intensidade (Assenza et al., 2016), líquido peritoneal de asininos submetidos a ovariectomia (Barros et al., 2018) e em equinos com obstrução intestinal (Nogueira et al., 2014).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e delineamento experimental

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP/Jaboticabal (protocolo nº 23.391/15). Foram utilizados 10 equinos hípidos, incluindo fêmeas e machos castrados, com idade entre três e dez anos, pesando entre 300 e 400 kg. Esses animais receberam vermífugo (Equalan®), vacina contra raiva (Rabmune®), e passaram por um período de adaptação de 15 dias em baias individuais com acesso à piquete com pastagem (3 h/dia), no setor de Equinocultura da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP, câmpus Jaboticabal. Ademais, receberam diariamente dois quilos de ração comercial (Selvagem® – Agromix), quatro quilos de feno *Coast-cross* (*Cynodon dactylon*) e água *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em baias individuais durante o período experimental, sem acesso aos piquetes, recebendo a mesma dieta da fase de adaptação, sendo distribuídos em quatro grupos (n=5), segundo um delineamento aleatório e fatorial 2x2:

- **Grupo Controle/Controle (GCC)**: administração de água por sonda nasogástrica (SNG) e, decorridas oito horas, solução salina por via intracecal (IC).
- **Grupo Amido/Controle (GAC)**: administração de sobrecarga de amido via SNG e, decorridas oito horas, solução salina por via IC.
- **Grupo Controle/Tampão (GCT)** - administração de água por SNG e, decorridas oito horas, solução tampão via IC.
- **Grupo Amido/Tampão (GAT)** – administração de sobrecarga de amido por SNG e, decorridas oito horas, solução tampão via IC

Os cavalos que fizeram parte do GCC e GCT integraram, respectivamente, GAT e GAC, respeitando um intervalo de quinze dias entre a realização do protocolo experimental. Para administração da sobrecarga de amido por SNG no GAC e GAT, utilizou-se o amido de milho na dose de 17,6 g/kg de peso vivo diluído em água na proporção de um quilo/litro, conforme descrito por Garner et al. (1975). No GCC e GCT foi administrado água sem amido, mas seguindo a mesma regra de volume descrita para sobrecarga de CHO do GAC e GAT.

Todos os equinos passaram por procedimento de tifloplexia, conforme descrito por Diaz et al. (2010), 30 dias antes do procedimento experimental. A solução tampão contendo 3,5 g de hidróxido de alumínio, 65,6 g de hidróxido de magnésio e 1,2 g de simeticona (Souza, 2007) foi administrada no GCT e GAT, via IC. Esta solução foi diluída em água destilada em volume equivalente à metade do volume administrado via SNG. No GCC e GAC, foi administrado solução salina no lugar da solução tampão, respeitando a mesma regra de volume para os grupos Controle/Tampão e Amido/Tampão.

As coletas de sangue venoso, mediante punção da veia jugular, foram realizadas em sete intervalos de tempo. O T0h correspondeu a coleta realizada momentos antes da administração de amido (GAC e GAT) ou solução salina (GCC e GCT) via SNG. As demais coletas foram realizadas em intervalos de quatro horas, até completar 12h da administração do conteúdo via sonda (T4h, T8h, T12h). Depois disso, aumentou-se o intervalo inicialmente para 12h (T24h) e posteriormente para 24h, até completar as 72h após a administração do conteúdo via sonda (T48h e T72h). As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos, a uma velocidade de 3000 rotações por minuto, em uma sala com temperatura controlada (21°C), para obtenção das amostras de soro, que foram posteriormente armazenadas em freezer - 24°C.

A avaliação clínica desses animais foi realizada nos intervalos de tempo anteriormente descritos, consistindo em: aferição da frequência cardíaca (mediante ausculta por estetoscópio), temperatura retal (por termômetro digital), porcentagem de desidratação (por sinal da prega cutânea), pulso digital (por palpação das artérias digitais), temperatura dos cascos (avaliação tátil) e coloração de mucosas (inspeção visual). O padrão comportamental foi avaliado por meio de sinais de desconforto, movimentação dentro da baia, ingestão de água e feno, produção de fezes. Avaliou-se a qualidade da marcha e número de passos em piso de cimento plano em um espaço de seis metros. Concomitantemente, os sinais de dificuldade locomotora e aumento de sensibilidade foram classificados segundo a escala proposta por Obel (1948):

- **Grau I:** Equino realiza transferência de peso ou levantamento intermitente do membro afetado. Ausência de claudicação ao passo e redução da passada ao trote.

- **Grau II:** Equino apresenta movimentos voluntários ao passo, com encurtamento da fase de apoio. Não há relutância na retirada de um membro do solo.
- **Grau III:** Equino se movimenta com relutância e resiste em tentar levantar o membro afetado ou contralateral do solo.
- **Grau IV:** Equino apresenta relutância acentuada ou recusa-se a mover-se.

4.2 Proteínas

A concentração sérica de proteínas totais e albumina foi determinada por espectrofotometria em um analisador bioquímico semi-automático (LabQuest - Labtest) pelo método colorimétrico do biureto e verde de bromocresol, respectivamente, e leitura por absorvância. Para a identificação e quantificação das PFA empregou-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE), conforme descrito por Laemmli (1970). A análise quantitativa foi realizada através de densitômetro computadorizado (modelo CS-9301PC – Shimadzu Corp).

As concentrações séricas de proteína C reativa e amiloide A sérica foram determinadas por kit's comerciais de ELISA, da marca MyBioSource - ELISA Horse C-reactive protein (cód.: MBS020917) e ELISA Horse Serum Amyloid A (cód.: MBS281865). A leitura foi realizada por absorvância em uma leitora automática de microplaca (iMark™ Microplate Absorbance Reader – Bio-Rad), de acordo com as recomendações do fabricante dos kit's

4.3 Análise estatística

Com o auxílio do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System), os valores das concentrações séricas das proteínas mensuradas foram submetidos à análise de variância (ANOVA de duas vias) e, em casos de significância entre os grupos, utilizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias (Cohen, 1988).

Com intuito de verificar uma possível correlação entre os valores séricos de proteínas e os parâmetros fisiológicos, utilizou-se da correlação de Pearson ($p < 0,05$) que foi classificada, mediante o valor de "r", em negativa ($r < -1$), fraca ($-0,1 < r < -0,3$),

moderada ($0,4 < r < 0,6$) e forte ($0,7 < r < 1,0$), como proposto por Cohen (1988). Para esta análise, utilizou-se o programa Prisma (GraphPad Prism 7.00).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do GCC e GCT mantiveram, ao longo de todo período experimental, frequência cardíaca (FC) e temperatura retal ($T^{\circ}\text{C}$) consideradas normais para espécie equina (Feitosa, 2008), com deambulação e temperatura dos cascos sem alterações. Todos os animais do GAC e GAT apresentaram taquicardia a partir de T4h. A incidência de desidratação e diarreia em GAC foi mais evidente em T24h, acometendo, respectivamente, 40% e 60% dos equinos. As alterações dos parâmetros clínicos aconteceram de maneira mais intensa nos cavalos de GAT, principalmente entre T24h e T48h (Tabela 1).

A fase de desenvolvimento da laminite é definida como o período entre a agressão inicial (neste caso, a sobrecarga de CHO) e a instalação da claudicação aguda de duração variável; e termina após 72h, ou quando há evidência radiográfica ou física de deslocamento da falange distal (Hood, 1999). A fase aguda é caracterizada por claudicação em um ou mais membros; aumento da temperatura do casco e amplitude do pulso digital; e alteração postural (van Eps, 2016). O desenvolvimento dessa síndrome ocorreu em um cavalo do GAC, e em três do GAT. De fato, ao se observar a Tabela 1, nota-se que o aumento da temperatura dos cascos, do pulso digital e ocorrência de claudicação foram mais evidentes em GAT, entre T24h e T48h.

Contudo, não se pode afirmar que a solução tampão teve alguma influência no desenvolvimento da síndrome. O modelo de indução utilizado foi proposto por Garner (1975). Em seu estudo, apenas 70% dos animais submetidos à sobrecarga de amido desenvolveram laminite e grau Obel III entre 32 e 48 horas após indução. No presente estudo, 40% dos animais que receberam a sobrecarga desenvolveram a síndrome, com grau Obel \geq III em T72h. Logo, seria prudente dizer que a ausência de homogeneidade entre o GAT e GAC, estaria mais relacionada com o modelo de indução utilizado e diferenças individuais entre os animais dos dois grupos.

Tabela 1. Parâmetros fisiológicos de equinos submetidos à sobrecarga de carboidratos, não tratados e tratados com solução tampão intracecal (Grupo Amido/Controle – GAC e Grupo Amido/Tampão – GAT, respectivamente), nos sete momentos avaliados (T0h, T4h, T8h, T12h, T24h, T48h, T72h).

GAC (n=5)								
Parâmetro	Unidade	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
FC média	bpm	39	54	58	54	50	49	59
T° retal média	°C	37,2	37,6	37,7	37,7	37,4	37,7	37,5
Desidratação	% de animais	0	0	0	20	40	0	0
Hiporexia	% de animais	0	0	0	0	0	20	0
Diarreia	% de animais	0	0	0	0	60	40	0
Pulso digital	% de animais	0	20	20	20	40	20	0
↑ T° Casco	% de animais	0	20	20	0	20	40	20
Claudicação	% de animais	0	0	0	0	0	40	20
GAT (n=5)								
Parâmetro	Unidade	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
FC média	bpm	40	49	44	58	54	70	59
T° retal média	°C	37,3	37,4	38,2	39,3	38,4	38,1	37,7
Desidratação	% de animais	0	0	20	60	100	60	40
Hiporexia	% de animais	0	0	40	40	80	100	40
Diarreia	% de animais	0	0	0	60	80	60	0
Pulso digital	% de animais	0	0	0	0	80	20	80
↑ T° Casco	% de animais	0	0	0	0	60	80	60
Claudicação	% de animais	0	0	0	0	20	60	60

- Parâmetros não se enquadram dentro dos valores de referência considerados normais para espécie equina (Feitosa, 2008): Frequência cardíaca (FC) – 28 a 40 bpm; Temperatura retal (T°) – 37,5 a 38,5 °C.
- Parâmetros alterados que apontam para desenvolvimento de laminite clínica
- T0h: administração da sobrecarga de amido, via sondagem nasogástrica
- T8h: administração da solução tampão, via intracecal

Os valores da concentração sérica de proteínas totais (Tabela 2) flutuaram na faixa de normalidade para espécie equina nos quatro grupos ($p>0,05$), corroborando os valores de um estudo clínico e laboratorial de equinos submetidos a laminite por sobrecarga de CHO (Martins Filho et al., 2007). Os valores de albumina, obtidos por meio da espectrofotometria, também não apresentaram variações ao longo dos tempos experimentais, tampouco entre os grupos ($p>0,05$). Por se tratar de uma PFA negativa, sua concentração sérica tende a reduzir em animais acometidos por doença inflamatória sistêmica (Saquetti et al., 2008). Entretanto, segundo Jacobsen (2007), essa queda acontece no sexto dia de doença, e atinge concentrações mínimas entre o oitavo e décimo dias. Isso acontece, pois a albumina é utilizada pelo fígado como

precursora de aminoácidos para manter a produção de PFA positivas e mediadores inflamatórios, (Cray, 2009; McGovern, 2018). Assim, os valores dessa proteína se encontram dentro do esperado, levando em consideração que o último horário de coleta se deu 72h horas após a administração da sobrecarga de amido. Ademais, apenas 40% dos equinos desenvolveram condição inflamatória sistêmica severa, o que justifica a manutenção da síntese de albumina em níveis normais.

Foram encontradas aproximadamente 18 proteínas pela técnica de SDS-PAGE (Figura 1), e dez foram identificadas com base no peso molecular em kDa: IgA (175 kDa), ceruloplasmina (130 kDa), transferrina (85 kDa), albumina (65 kDa), α -1-antitripsina (60 kDa), IgG de cadeia pesada (55 kDa), haptoglobina (45 kDa) e α -1-glicoproteína ácida (40 kDa), IgG de cadeia leve (29 kDa) e P23 (23 kDa). Dentre elas, podem-se destacar quatro PFA positivas (Tabela 2): Cp, α -1-AT, Hp e α -1-GA.

As únicas PFA que variaram em função dos tempos experimentais, ao avaliar cada grupo separadamente, foram a Hp e α -1-GA ($p < 0,05$), sobretudo em T48h e T72h nos animais do GAC e GAT ($p < 0,05$). Entre os equinos do GAC e GCC, não houve diferença ($p > 0,05$) nos níveis de ceruloplasmina, α -1-antitripsina, e α -1-glicoproteína ácida. Em contrapartida, os animais submetidos sobrecarga de CHO e tratados com solução tampão intracecal (GAT), tiveram um aumento dos níveis séricos dessas quatro PFA, quando comparados com os do GCC (Tabela 2), em pelo menos um dos três últimos momentos avaliados ($p < 0,05$), reforçando os achados do exame clínico. Apenas a Hp variou entre os animais de GCT e GAT nos períodos T24h, T48h e T72h ($p < 0,05$). Essa PFA também diferiu entre os equinos de GCT e GAC, em T72h ($p < 0,05$).

A α -1-antitripsina é considerada o principal inibidor endógeno de proteases, possuindo propriedades anti-inflamatórias na injúria aguda (Reeves et al., 2019). A elevação de 15% em T24h nos níveis de α -1-AT no GAT poderia ter contribuído na modulação positiva da resposta inflamatória, fato este não observado no GAC (Figura 2). Entretanto, como demonstrado na Tabela 3, houve uma correlação negativa do aumento do número de passos com os níveis séricos dessa proteína no GAC. Tendo em mente que os equinos que desenvolveram laminite clínica tiveram aumento do número de passos, pode-se conjecturar que a α -1-AT tenha atuado, nos equinos deste grupo, como agente anti-inflamatório.

Tabela 2. Média \pm desvio padrão das concentrações séricas de proteína total, albumina, α -1-antitripsina, proteína C reativa, transferrina, ceruloplasmina, α -1-glicoproteína ácida, haptoglobina e amiloide A sérica dos equinos de cada grupo experimental (grupo Controle/Controle – GCC; grupo Controle/Tampão – GCT; grupo Amido/Controle – GAC; grupo Amido/Tampão – GAT), nos sete momentos avaliados (T0h, T4h, T8h, T12h, T24h, T48h e T72h).

Proteína total (g/dL) ¹							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	7,89 \pm 0,40	7,59 \pm 0,40	7,64 \pm 0,36	7,57 \pm 0,32	7,94 \pm 0,38	7,98 \pm 0,31	7,91 \pm 0,43
GCT	8,51 \pm 0,15	8,21 \pm 0,57	7,86 \pm 0,84	8,59 \pm 0,63	8,26 \pm 0,26	8,05 \pm 0,40	7,87 \pm 1,24
GAC	8,38 \pm 0,57	8,00 \pm 0,40	8,16 \pm 1,08	7,73 \pm 0,67	8,65 \pm 0,35	8,50 \pm 0,78	8,50 \pm 0,61
GAT	8,30 \pm 0,63	NA	NA	NA	8,89 \pm 0,80	9,04 \pm 0,66	8,61 \pm 0,81
Albumina (g/dL) ¹							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	2,27 \pm 0,26	2,29 \pm 0,26	2,23 \pm 0,24	2,20 \pm 0,25	2,35 \pm 0,32	2,30 \pm 0,30	2,33 \pm 0,33
GCT	2,16 \pm 0,15	2,09 \pm 0,13	2,13 \pm 0,15	2,00 \pm 0,18	2,09 \pm 0,35	2,10 \pm 0,21	2,06 \pm 0,19
GAC	2,29 \pm 0,07	2,23 \pm 0,21	2,35 \pm 0,26	2,22 \pm 0,20	2,40 \pm 0,24	2,27 \pm 0,30	2,21 \pm 0,14
GAT	2,12 \pm 0,16	NA	NA	NA	2,16 \pm 0,19	2,22 \pm 0,24	2,04 \pm 0,36
Transferrina (mg/dL) ² - PM: 85 kDa							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	436 \pm 125	420 \pm 114	426 \pm 111 ^A	430 \pm 105 ^A	426 \pm 86,8 ^A	424 \pm 68,6 ^A	397 \pm 87,5
GCT	544 \pm 81,6	523 \pm 63,4	512 \pm 66,3 ^{AB}	580 \pm 83,0 ^B	587 \pm 146 ^B	502 \pm 114 ^{AB}	499 \pm 104
GAC	523 \pm 65,0	504 \pm 54,0	571 \pm 154 ^B	526 \pm 117 ^{AB}	585 \pm 163 ^B	595 \pm 145 ^B	505 \pm 74,5
GAT	413 \pm 79,9	NA	NA	NA	435 \pm 104 ^A	445 \pm 51,8 ^A	430 \pm 49,8
Ceruloplasmina (mg/dL) ² - PM: 130 kDa							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	17,8 \pm 10,0 ^A	22,6 \pm 2,42 ^A	23,5 \pm 4,56	22,8 \pm 1,62 ^A	24,8 \pm 3,65 ^A	23,6 \pm 2,24 ^A	22,2 \pm 6,34 ^A
GCT	32,8 \pm 4,42 ^B	38,5 \pm 3,66 ^B	34,6 \pm 7,70	36,6 \pm 4,83 ^B	36,8 \pm 4,58 ^{AB}	33,0 \pm 8,67 ^{AB}	33,1 \pm 6,55 ^A
GAC	25,4 \pm 5,78 ^{AB}	27,0 \pm 3,49 ^{AB}	24,5 \pm 7,10	24,7 \pm 6,44 ^{AB}	25,4 \pm 7,44 ^A	32,6 \pm 10,1 ^{AB}	34,7 \pm 6,86 ^A
GAT	37,9 \pm 5,63 ^B	NA	NA	NA	38,9 \pm 5,98 ^B	44,7 \pm 10,0 ^B	48,2 \pm 15,1 ^B
α -1-antitripsina (mg/dL) ² - PM: 60 kDa							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	685 \pm 139	725 \pm 88,5	736 \pm 90,8	749 \pm 111	718 \pm 164 ^A	697 \pm 120 ^A	707 \pm 162
GCT	814 \pm 94,1	856 \pm 15,8	671 \pm 135	783 \pm 21,7	804 \pm 21,3 ^{AB}	777 \pm 18,5 ^{AB}	757 \pm 3,75
GAC	798 \pm 190	681 \pm 278	761 \pm 285	700 \pm 95,1	795 \pm 172 ^{AB}	783 \pm 270 ^{AB}	871 \pm 341
GAT	904 \pm 301	NA	NA	NA	1044 \pm 419 ^B	1009 \pm 451 ^B	881 \pm 421

Continua...

Continuação da Tabela 2

Haptoglobina (mg/dL) ² - PM: 45 kDa							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	31,2 ± 17,4	34,6 ± 19,7 ^A	34,8 ± 20,9 ^A	33,3 ± 18,7 ^A	39,5 ± 23,2 ^A	46,8 ± 21,4 ^A	47,4 ± 19,9 ^A
GCT	64,8 ± 30,0	57,2 ± 21,9 ^{AB}	55,8 ± 20,5 ^{AB}	57,8 ± 15,4 ^{AB}	57,5 ± 21,4 ^{AB}	74,2 ± 31,0 ^B	55,3 ± 21,7 ^A
GAC	71,8 ± 33,7 ^a	68,8 ± 20,7 ^{Ba}	71,3 ± 30,9 ^{Ba}	65,1 ± 12,4 ^{Ba}	73,2 ± 19,2 ^{BCa}	83,1 ± 17,9 ^{Bab}	103 ± 16,7 ^{Bb}
GAT	66,4 ± 13,6 ^a	NA	NA	NA	92,7 ± 30,0 ^{Cab}	121 ± 29,4 ^{Cc}	118 ± 13,2 ^{Bbc}
α-1-glicoproteína ácida (mg/dL) ² - PM: 40 kDa							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	12,2 ± 2,72	10,9 ± 2,48	11,1 ± 2,03	11,6 ± 1,63	13,2 ± 3,05	12,1 ± 2,07	13,5 ± 2,79 ^A
GCT	10,7 ± 8,03 ^a	9,94 ± 5,17 ^{ab}	10,1 ± 7,00 ^a	10,3 ± 6,04 ^{ab}	13,1 ± 7,28 ^{ab}	16,7 ± 7,32 ^b	12,8 ± 6,69 ^{ABa}
GAC	10,8 ± 7,54 ^a	12,4 ± 5,59 ^{ab}	13,0 ± 8,15 ^{ab}	11,7 ± 3,80 ^{ab}	12,2 ± 4,56 ^{ab}	14,5 ± 4,97 ^{ab}	19,8 ± 6,22 ^{ABb}
GAT	10,0 ± 5,10 ^a	NA	NA	NA	13,4 ± 6,35 ^{ab}	24,3 ± 12,6 ^{bc}	27,8 ± 14,3 ^{Bc}
Amiloide A sérica (ng/mL) ³							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	332 ± 13,0	294 ± 71,0	328 ± 101	200 ± 73,6	248 ± 86,9	251 ± 146	229 ± 63,3
GCT	219 ± 152	316 ± 175	316 ± 100	357 ± 387	336 ± 253	280 ± 246	354 ± 175
GAC	267 ± 414	199 ± 239	301 ± 343	733 ± 793	450 ± 572	308 ± 417	304 ± 459
GAT	44,0 ± 31,7	NA	NA	NA	41,2 ± 13,6	85,0 ± 80,3	90,8 ± 51,7
Proteína C reativa (µg/mL) ³							
	T0h	T4h	T8h	T12h	T24h	T48h	T72h
GCC	1,88 ± 0,23	1,95 ± 0,46	1,60 ± 0,24	1,65 ± 0,23	1,64 ± 0,30	1,62 ± 0,49	1,56 ± 0,12
GCT	1,80 ± 0,53	1,62 ± 0,13	1,60 ± 0,31	1,75 ± 0,31	1,79 ± 0,26	1,75 ± 0,42	1,68 ± 0,42
GAC	1,91 ± 0,70	1,78 ± 0,97	3,08 ± 3,18	1,53 ± 0,63	1,53 ± 0,54	1,53 ± 0,56	1,57 ± 0,63
GAT	2,23 ± 1,85	NA	NA	NA	1,94 ± 1,11	2,25 ± 1,46	2,17 ± 1,48

NA – Não avaliado; PM – Peso molecular.

Letras minúsculas apontam diferenças dentro de um mesmo grupo e letras maiúsculas apontam diferenças entre os grupos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Valores obtidos pelo método de espectrofotometria e leitura por absorbância (1); SDS-PAGE, leitura por densitômetro e identificação por PM (2); ELISA e leitura por absorbância (3).

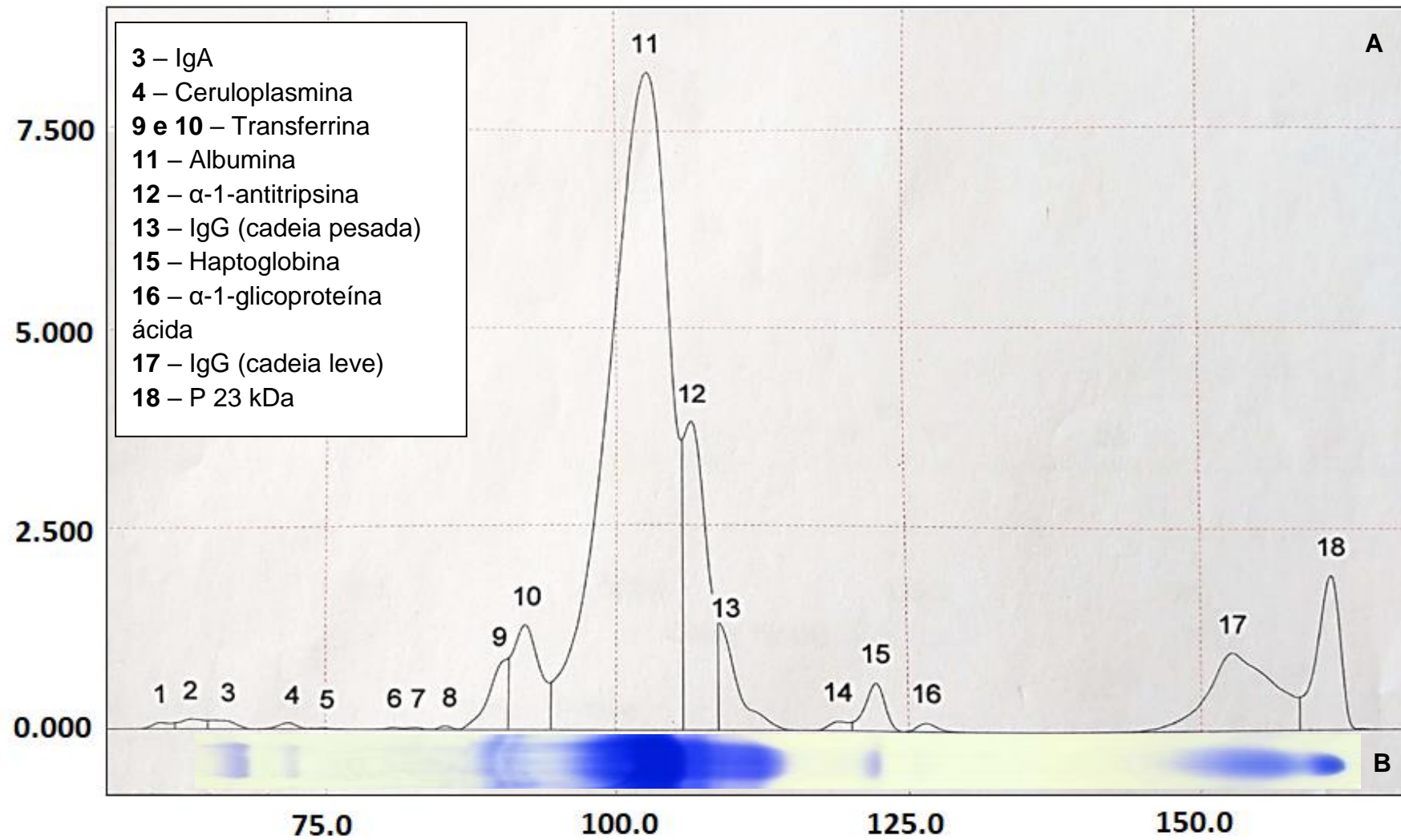


Figura 1. Representação gráfica do traçado eletroforético obtido por meio de densitometria (A), a partir do escaneamento do SDS-PAGE (B), de amostra de soro de um equino do grupo Amido/Tampão (GAT), coletada no T48h.

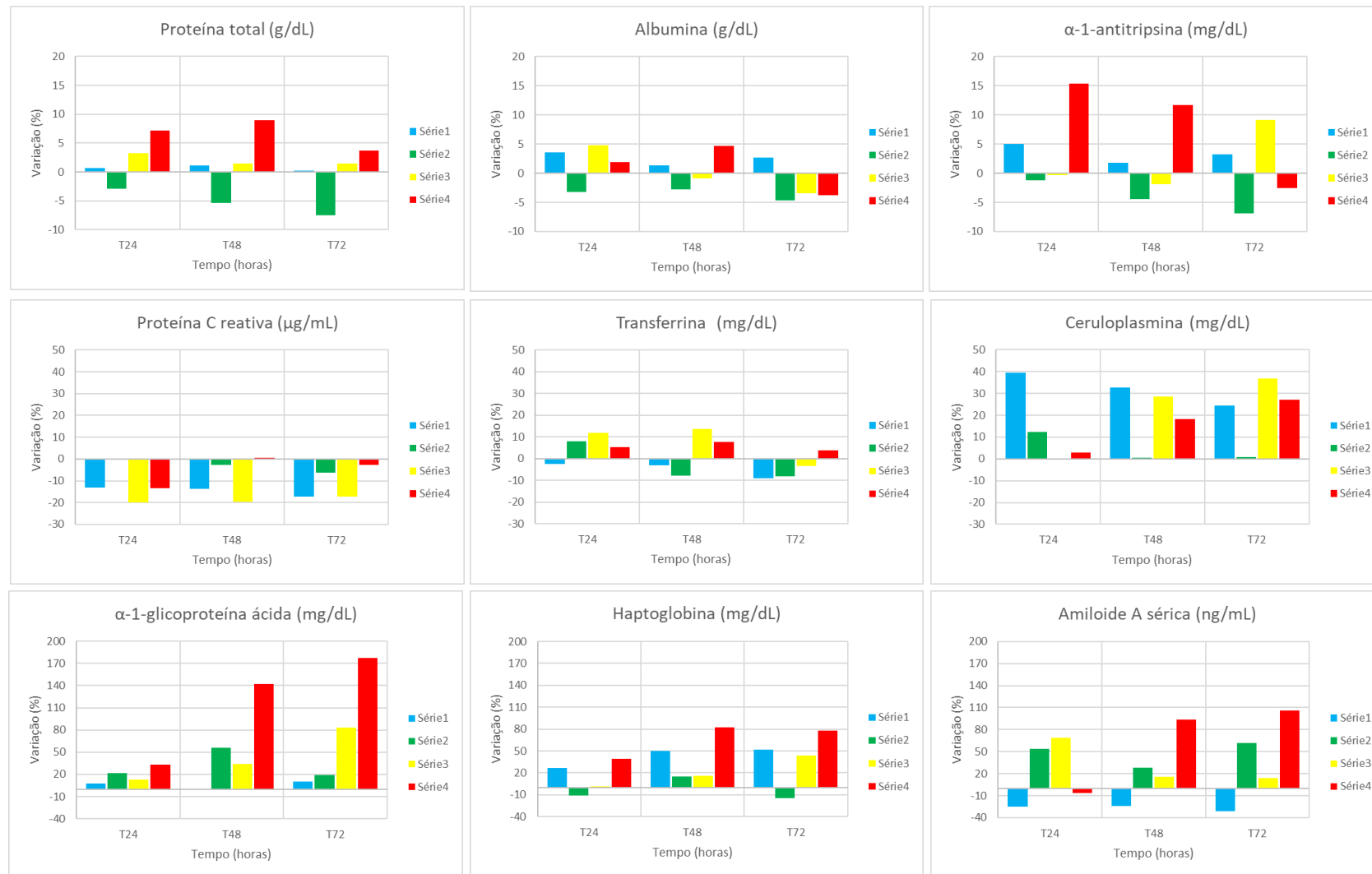


Figura 2. Variação percentual, em relação ao T0h, das concentrações séricas de proteína total, albumina, α -1-antitripsina, proteína C reativa, transferrina, ceruloplasmina, α -1-glicoproteína ácida, haptoglobina e amiloide A sérica dos equinos de cada grupo experimental (grupo Controle/Controle – GCC; grupo Controle/Tampão – GCT; grupo Amido/Controle – GAC; grupo Amido/Tampão – GAT), em quatro momentos avaliados (T24h, T48h e T72h).

Tabela 3. Valores obtidos do coeficiente da correlação de Pearson (r) e significância (p), das concentrações séricas de proteína total e proteínas de fase aguda, com os parâmetros fisiológicos avaliados em equinos submetidos à sobrecarga de carboidratos, não tratados e tratados com solução tampão intracecal (Grupo Amido/Controle – GAC e Grupo Amido/Tampão – GAT, respectivamente).

GAC (n=5)																		
Parâmetros fisiológicos	Proteínas																	
	PT		Alb		Cp		Trf		α-1-AT		Hp		α-1-GA		AAS		PCR	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
n° passos	0,1	0,527	0,4	0,014	0,5	0,005	0,1	0,453	-0,5	0,005	-0,1	0,668	0,0	0,986	-0,2	0,330	-0,2	0,174
↑ Pulso digital	-0,1	0,577	0,5	0,002	0,0	0,880	-0,2	0,235	-0,1	0,494	-0,3	0,094	-0,3	0,090	0,0	0,951	-0,3	0,050
↑ Temperatura dos cascos	0,2	0,273	0,3	0,049	0,4	0,031	-0,2	0,267	-0,1	0,455	-0,1	0,621	-0,1	0,558	-0,2	0,314	0,0	0,895
FC	0,0	0,890	-0,2	0,212	0,0	0,798	0,1	0,422	0,3	0,085	0,3	0,065	0,5	0,004	0,2	0,355	0,0	0,815
T°C	0,1	0,454	0,0	0,929	0,1	0,608	-0,1	0,419	0,2	0,364	-0,1	0,632	0,0	0,905	0,1	0,503	0,1	0,675
Diarreia	0,3	0,095	0,2	0,172	0,0	0,839	0,3	0,096	0,0	0,949	0,0	0,958	0,0	0,906	0,0	0,970	-0,1	0,772
Hiporexia	0,1	0,647	0,3	0,129	0,2	0,325	0,2	0,321	-0,2	0,276	0,0	0,873	0,1	0,622	-0,2	0,459	-0,2	0,315
Decúbito	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
Desidratação	0,0	0,973	0,0	0,913	-0,2	0,365	0,0	0,818	0,1	0,480	-0,1	0,643	-0,1	0,459	-0,2	0,354	-0,1	0,516
Grau Obel	0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0		0,0	
GAT (n=5)																		
Parâmetros fisiológicos	Proteínas																	
	PT		Alb		Cp		Trf		α-1-AT		Hp		α-1-GA		AAS		PCR	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Decúbito	-0,3	0,268	0,0	0,979	0,2	0,336	0,2	0,382	-0,6	0,089	0,2	0,349	0,8	<,001	-0,3	0,278	0,5	0,038
Grau Obel	-0,2	0,327	0,1	0,622	0,5	0,033	0,1	0,642	-0,6	0,096	0,2	0,461	0,6	0,007	0,1	0,747	0,3	0,219
FC	0,0	0,968	0,2	0,439	0,6	0,009	0,2	0,305	-0,4	0,283	0,2	0,316	0,4	0,121	0,2	0,379	0,0	0,967
n° passos	0,1	0,657	0,0	0,934	0,6	0,012	0,1	0,680	-0,3	0,403	0,4	0,104	0,3	0,190	0,3	0,156	0,2	0,446
↑ Temperatura dos cascos	0,2	0,408	0,5	0,026	0,2	0,512	0,1	0,593	0,1	0,830	0,3	0,257	0,3	0,186	0,3	0,158	0,0	0,967
T°C	0,4	0,058	0,1	0,543	0,1	0,629	0,2	0,510	0,2	0,659	0,3	0,269	0,0	0,912	0,1	0,803	0,0	0,868
Diarreia	0,0	0,888	0,4	0,090	0,0	0,907	0,1	0,703	-0,1	0,833	-0,1	0,645	-0,1	0,795	0,1	0,801	0,1	0,543
Hiporexia	0,1	0,773	0,1	0,679	0,2	0,513	0,3	0,250	-0,4	0,303	0,3	0,232	0,4	0,067	-0,1	0,770	0,1	0,639
Desidratação	0,1	0,830	0,4	0,080	0,3	0,278	0,4	0,127	-0,5	0,213	0,0	0,985	0,3	0,203	0,0	0,939	0,2	0,406
↑ Pulso digital	0,2	0,313	0,1	0,570	0,1	0,529	0,2	0,318	-0,2	0,587	0,3	0,154	0,4	0,085	0,1	0,556	0,4	0,125

FC – Frequência cardíaca; T°C – temperatura retal; PT – proteína total; Alb – albumina; Cp – ceruloplasmina; Trf – transferrina; α-1-antitripsina; Hp – haptoglobina; α-1-GA – α-1-glicoproteína ácida; AAS – amiloide A sérica; PCR – proteína C reativa. Classificação da correlação (Cohen, 1988): ● Negativa ($r < 1$); ● Fraca ($0,1 < r < 0,3$); ● Moderada ($0,4 < r < 0,6$); ● Forte ($0,7 < r < 1$). Obel (1948).

A elevação da α -1-glicoproteína ácida em GAT foi de 180%, ao se comparar os momentos T0h e T72h. Embora a função exata dessa proteína não seja bem estabelecida, a α -1-GA pode ser considerada um agente anti-inflamatório e imunomodulador endógeno (Fournier et al., 2000). Conseqüentemente, é possível levantar a hipótese de que a produção dessa PFA pudesse contribuir para a manutenção da homeostase, ao reduzir o dano tecidual deflagrado pelo processo inflamatório.

A concentração sérica de transferrina foi maior nos animais não tratados, submetidos a sobrecarga de CHO (GAC), quando comparada com a concentração dos animais do GCC, nos tempos T8h, T24h e T48h ($p < 0,05$). Entre os equinos do GAC e GAT, nota-se que a elevação da transferrina foi superior em T48h no grupo que não recebeu solução tampão intracecal (Figura 2). Padrões de elevação similares foram encontrados por Barros et al. (2018) em asininos submetidos a ovariectomia por laparoscopia e por Nogueira et al. (2014) no líquido peritoneal de equinos com obstrução intestinal. Ao se avaliar o efeito do tratamento não associado ao quadro inflamatório (GCT x GCC), nota-se que houve um aumento da concentração sérica de transferrina nos animais tratados com a solução tampão, até 16 horas após sua administração (T12h e T24h). Por se tratar de uma PFA negativa na maioria das espécies de mamíferos, esperava-se que ela diminuísse ao longo do tempo nos grupos submetidos a condição inflamatória sistêmica (GAC e GAT). Entretanto, essa diminuição geralmente ocorre frente a processos infecciosos, devido à redução na absorção de Fe^{2+} , com o objetivo de reduzir o crescimento bacteriano (Skaar et al., 2010). Apenas um animal do GAT apresentou quadro clínico sugestivo de sepse, 48h após a administração da sobrecarga de CHO, o que reforça a ausência de redução nos valores séricos de Trf em GAT e GAC.

Até o momento, o padrão de resposta do amiloide A sérica em equinos foi descrito detalhadamente em um número restrito de enfermidades (Hultén e Demmers, 2002; Hobo et al., 2007; Duggan et al., 2008; Jacobsen et al., 2009; Andersen et al., 2012; Casella et al., 2012; Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019a, b). As concentrações séricas dessa proteína variam consideravelmente conforme estudos, o que pode sugerir diferenças individuais na resposta imune e nos métodos utilizados para sua quantificação. Portanto, recomenda-se que a interpretação seja feita de maneira

individual, comparando-se os valores basais – de amostras do animal hígido – com àqueles obtidos após estímulo inflamatório, injúria e/ou tratamento (Witkowska-Pilaszewicz et al., 2019a).

Os valores representados na Tabela 3 demonstram que de fato houve muita variabilidade (coeficiente de variação alto) nas concentrações de amiloide A sérica, o que talvez justifique, ausência de diferença significativa ao longo do tempo e entre grupos enfermos (tratados e não tratados). Ao se avaliar a variação percentual (Figura 2), tomando-se como basal as amostras coletadas em T0h, nota-se que houve aumento expressivo da concentração dessa proteína até o momento T72h nos grupos tratados com solução tampão (106% no GAT e 62% no GCT). Já o GAC, apresentou um aumento de apenas 14%, demonstrando que a solução tampão teve maior impacto que a sobrecarga de CHO na expressão dessa PFA.

Alguns estudos têm demonstrado elevação das concentrações da isoforma 3 de amiloide A no líquido sinovial de equinos submetidos a artrite séptica (Jacobsen et al., 2006a, b; Ludwig et al., 2016). Sabe-se que essas proteinases estão envolvidas no mecanismo de degradação fisiológica e mórbida da matriz extracelular, sendo essa última relacionada com o desenvolvimento de lesões lamelares em cavalos com laminite (Kyaw-Tanner e Pollitt, 2004; Kyaw-Tanner et al., 2008). Logo, a detecção e tipificação da AAS no foco de inflamação podem, futuramente, aumentar o potencial diagnóstico dessa proteína, permitindo a distinção entre condições locais e sistêmicas.

A ausência de diferença ($p < 0,05$) níveis séricos de Proteína C reativa, corroboram resultados de Pollock et al. (2005) e Lavoie-Lamoureux et al. (2012), nos quais as concentrações séricas dessa proteína não foram afetadas pela doença inflamatória. Em humanos, níveis elevados de PCR já foram relatados em casos de síndrome metabólica (Ryu et al., 2008; Maleki et al., 2014) e resistência à insulina (Ingelsson et al., 2008). Embora a ingestão frequente de grandes quantidades de CHO possa contribuir com o desenvolvimento de síndrome metabólica e resistência à insulina (Burns e Toribio, 2016) em equinos, o modelo para indução da laminite clínica consistiu na administração única de uma sobrecarga de amido. Este fato talvez justifique a ausência de resposta uniforme perante o desenvolvimento da síndrome, com pouca repercussão nos níveis de PCR.

Como pode ser observado na Tabela 3, houve correlação negativa no GAC entre os valores de α 1AT e PCR com o número de passos e aumento do pulso digital, respectivamente. Neste grupo, ocorreu uma correlação positiva fraca entre os níveis de Alb e aumento da temperatura dos cascos; e moderada entre o número de passos e valores de Alb e Cp. Essas duas proteínas também apresentaram correlação de mesma intensidade com elevação do pulso digital e aumento da temperatura dos cascos, respectivamente. Ademais, os níveis de α 1GA tiveram correlação positiva moderada com a FC.

Em GAT, foi possível observar que os valores de α 1GA tiveram uma correlação positiva forte com a ocorrência de decúbito, e moderada com o grau Obel. A Cp apresentou correlação positiva moderada com a FC, número de passos e grau Obel. A Alb e PCR se correlacionaram na mesma intensidade com o aumento da temperatura dos cascos e ocorrência de decúbito, respectivamente.

A correlação entre proteínas de fase aguda e demais parâmetros hematológicos, inflamatórios e sistêmicos, foi estabelecida para algumas enfermidades na espécie equina (Jacobsen et al., 2010; Kim e Leopold, 2012; Leclere et al., 2015). A correlação positiva entre α -1-globulinas e o grau Obel em equinos com laminite clínica, foi descrito por Edinger et al. (1992). Embora não se tenha encontrado mais dados na literatura consultada, evidenciou-se correlação dos níveis de PFA com as variáveis clínicas anotadas dos animais submetidos à sobrecarga de amido, neste modelo de indução da laminite.

6. CONCLUSÕES

O modelo de sobrecarga enteral única de carboidratos foi capaz de induzir a laminite em 10% dos animais de GAC e em 30% de GAT. Os animais submetidos a sobrecarga e tratados com solução tampão tiveram maior alteração dos parâmetros clínicos e, de maneira simultânea, dos valores séricos de proteínas, principalmente de α -1-antitripsina, haptoglobina e α -1-glicoproteína ácida. Foi possível evidenciar correlação entre diversas PFA com os parâmetros clínicos avaliados, sobretudo da ceruloplasmina e α -1-glicoproteína ácida.

7. REFERÊNCIAS

Andersen SA, Petersen HH, Ersbøll AK, Falk-Rønne J, Jacobsen S (2012) Vaccination elicits a prominent acute phase response in horses. **Veterinary Journal** 191:199-202.

Andreassen SM, Vinther AML, Nielsen SS, Andersen PH, Tnibar A, Kristensen AT, Jacobsen S (2017) Changes in concentrations of haemostatic and inflammatory biomarkers in synovial fluid after intra-articular injection of lipopolysaccharide in horses. **BMC Veterinary Research** 13:182.

Assenza A, Congiu F, Giannetto C, Fazio F (2016) Serum iron, ferritin, transferrin and haptoglobin concentration variations during repeated show jumping competition in horse. **Acta Veterinaria Brno** 85:343-347.

Barrachina L, Remacha AR, Soler L, García N, Romero A, Vázquez FJ, Vitoria A, Álava MA, Lamprave F, Rodellar C (2016) Acute phase protein haptoglobin as inflammatory marker in serum and synovial fluid in an equine model of arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 182:74-78.

Barros IO, Fonseca NBS et al. (2018) Resposta inflamatória peritoneal de asininos (*Equus asinus*) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec** 70:1468–1476.

Barton MD, Embury DH (1987) Studies of the pathogenesis of *rhodococcus equi* infection in foals. **Australian Veterinary Journal** 64: 332–39.

Belknap JK (2016) Laminitis: an overview. In.: Belknap JK, Geor R **Equine Laminitis**. p. 11–12.

Belknap, JK., Durham AE (2016) Overview of laminitis prevention. In.: Belknap JK, Geor R **Equine Laminitis**. p. 423–426.

Bhat

Borges AS, Divers TJ, Stokol T, Mohammed OH (2007) Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 3:489-394.

Burns TA, Toribio RE (2016) Metabolic syndrome in humans and horses: the relationship between obesity and insulin resistance. In.: Belknap JK, Geor R **Equine Laminitis**. p. 49-166.

Casella S, Fazio F, Giannetto C, Giudice E, Piccione G (2012) Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse. **Research in Veterinary Science** 93:914–17.

Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S (2005) Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology** 34:85–99.

Churg A, Wang X, Wang RD, Meixner SC, Pryzdial ELG, Wright JL (2007) α 1-antitrypsin suppresses $\text{tnf-}\alpha$ and mmp-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 2:144-151

Cohen J (1988) **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2^a ed. Lawrence Earlbaum Associates. p. 109-139.

Cray C, Zaias J, Altman NH (2009) Acute Phase Response in Animals: A Review. **Comparative Medicine** 58:517-526.

Crisman MV, Scarratt WK, Zimmerman KL (2008) Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice** 2:285-297.

Diaz ADPU, Santana AE, Valadão CAA, de Souza AH (2010) Canulação cecal em equinos. **Ciência Animal Brasileira** 11:357–362.

Duggan VE, Holyoak GR, MacAllister CG, Cooper SR, Confer AW (2008) Amyloid A in equine colostrum and early milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 1-2:150-155.

Eades SC. (2016) Sepsis-related laminitis. In.: Belknap JK, Geor R **Equine Laminitis**. p. 191–95.

El Kebir D, Zhang Y, Potempa LA, Wu Y, Fournier A, Filep JG (2011) C-Reactive Protein-Derived Peptide 201-206 Inhibits Neutrophil Adhesion to Endothelial Cells and Platelets through CD32. **Journal of Leukocyte Biology** 6:1167-1175.

Edinger H, Miller I, Stanek C, Gemeiner M (1992) [Electrophoretic studies of serum protein fractions in horses with laminitis]. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** 99:426–30.

van Eps AW (2016) General clinical aspects of the laminitis case. In.: Belknap JK, Geor R **Equine Laminitis**. p. 183–190.

Fagliari JJ, McClenahan D, Evanson OA, Weiss DJ (1998) Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research** 10:1234–37.

Fagliari JJ, Silva SL, Silva PC, Pereira GT (2008) 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** 60:322–28.

Feitosa FL (2008) **Semiologia veterinária – a arte do diagnóstico**. 2ªed. Editora Rocca. p. 77-102.

Fournier T, Medjoubi-N N, Porquet D (2000) Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology** 1482:157–171.

Garner HE, Coffman JR, Hahn AW, Hutcheson DP, Tumbleson ME (1975) Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. **American Journal of Veterinary Research** 36:441-444.

Giguère S, Hernandez J, Gaskin J, Miller C, Bowman JL (2003) Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 6:775-781.

Grimstein C, Choi YK, Satoh M, Lu Y, Wang X, Campbell-Thompson M, Song S (2010) Combination of alpha-1 antitrypsin and doxycycline suppresses collagen-induced arthritis. **Journal of Gene Medicine** 1:35-44.

Grimstein C, Choi YK, Wasserfall CH, Satoh M, Atkinson MA, Brantly ML, Campbell-Thompson M, Song S (2011) Alpha-1 antitrypsin protein and gene therapies decrease autoimmunity and delay arthritis development in mouse model. **Journal of Translational Medicine** 9:21.

Hobo S, Niwa H, Anzai T (2007) Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein d in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. **Journal of Veterinary Medical Science** 8:827-830.

Hood DM (1999) Laminitis in the horse. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice** 15:287–294.

Huebers HA, Finch CA (1987) The physiology of transferrin and transferring receptors. **Physiological Reviews** 67:520-582.

Hultén C, Demmers S (2002) Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. **Equine Veterinary Journal** 7:693-698.

Hultén C, Sandgren B, Skiöldebrand E, Klingeborn B, Marhaug G, Forsberg M (1999) The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. **Acta Veterinaria Scandinavica** 4:323–33.

Ingelsson E, Hulthe J, Lind L (2008) Inflammatory markers in relation to insulin resistance and the metabolic syndrome. **European Journal of Clinical Investigation** 38:502-509.

Jacobsen S, Niewold TA, Halling-Thomsen M, Nanni S, Olsen E, Lindegaard C, Andersen PH (2006a) Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses

with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 3-4:325-330.

Jacobsen S, Halling-Thomsen M, Nanni S (2006b) Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. **American Journal of Veterinary Research** 10:1738-1742.

Jacobsen S (2007) Review of equine acute-phase proteins. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners** 53:230-235.

Jacobsen S, Nielsen JV, Kjølgaard-Hansen M, Toelboell T, Fjeldborg J, Halling-Thomsen M, Martinussen T, Thoefner MB (2009) Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. **Veterinary Surgery** 38:762–769.

Jacobsen S, Jensen JC, Frei S, Jensen AL, Thoefner MB (2010) 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** 37:552–56.

Kaplan J, Jordan I, Sturrock A (1991) Regulation of the transferrin – independent iron transport system in cultured cells. **Journal of Biological Chemistry** 266:2997-3004.

Kargaltseva NM, Kotcherovets VI, Mironov AY, Borisova OY, Burbello AT (2019) Inflammation markers and bloodstream infection (review of literature). **Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika** 7:435–42.

Kim PH, Leopold S (2012) Gustilo-Anderson classification. **Clinical Orthopaedics and Related Research** 470:3270-3274.

Koj A (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease** 2:84–94.

Krakowski L, Bartoszek P, Krakowska I, Olcha P, Piech T, Stachurska A, Brodzki P (2017) Serum amyloid A protein (SAA), haptoglobin (Hp) and selected hematological and biochemical parameters in wild mares before and after parturition. **Polish Journal of Veterinary Sciences** 2:299-305.

Kyaw-Tanner M, Pollitt CC (2004) Equine laminitis: increased transcription of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) occurs during the developmental phase. **Equine Veterinary Journal** 36:221-225.

Kyaw-Tanner MT, Wattle O, van Eps AW, Pollitt CC (2008) Equine laminitis: membrane type matrix metalloproteinase-1 (MMP-14) is involved in acute phase onset. **Equine Veterinary Journal** 5:482-487.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680–85.

Lavoie-Lamoureux A, Leclere M, Lemos K, Wagner B, Lavoie JP (2012) Markers of systemic inflammation in horses with heaves. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 6:1419-1426.

Leclere M, Lavoie-Lamoureux A, Lavoie JP (2015) Acute phase proteins in racehorses with inflammatory airway disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:940-945.

Leise B, Watts M, Johnson PJ, Black SJ, Belknap JK (2011) Inflammatory gene expression in the liver, lung, and kidney in the carbohydrate overload model of equine laminitis. **Journal of Equine Veterinary Science** 10:566–67.

Leise B (2018) The role of neutrophils in equine laminitis. **Cell and Tissue Research** 3:541–50.

Loux SC, Ball BA (2018) The proteome of fetal fluids in mares with experimentally-induced. **Placenta** 64:71-78.

Ludwig EK, Wiese RB, Graham MR, Tyler AJ, Settlege JM, Were SR, Petersson-Wolfe CS, Kanevsky-Mullarky I, Dahlgren LA (2016) Serum and synovial fluid serum amyloid A response in equine models of synovitis and septic arthritis. **Veterinary Surgery** 45:859-867.

Maleki A, Rashidi N, Meybodi HA, Montazeri M, Montazeri M, Falsafi F, Ghanavati R, Foroughi S, Alyari F (2014) Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers in adults: a population-based survey in western region of Iran. **International Cardiovascular Research Journal** 8:156-160.

Martins Filho LP, Fagliari JJ, Moraes JRE, Sampaio RC, Oliveira JA, Lacerda Neto JC (2007) Estudo clínico e laboratorial da fase prodrômica da laminite eqüina induzida por sobrecarga de carboidrato. **Ars Veterinaria** 23:32–39.

McCarthy C, Saldova R, Wormald MR, Rudd PM, McElvaney NG, Reeves EP (2014) The role and importance of glycosylation of acute phase proteins with focus on alpha-1 antitrypsin in acute and chronic inflammatory conditions. **Journal of Proteome Research** 7:313-3143.

McCarthy C, Dunlea DM, Saldova R, Henry M, Meleady P, McElvaney OJ, Marsh B, Rudd PM, Reeves EP, McElvaney NG (2018) Glycosylation repurposes alpha-1 antitrypsin for resolution of community-acquired pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 10:1346-1349.

McGovern K (2018) Acute phase proteins and their clinical use in the adult horse. **UK-Vet Equine** 2:42–48.

Milinovich GJ, Klieve AV, Pollitt CC, Trott DJ (2010) Microbial events in the hindgut during carbohydrate-induced equine laminitis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice** 1:79–94.

Miller I, Friedlein A, Tsangaris G, Maris A, Fountoulakis M, Gemeiner M (2004) The serum proteome of *Equus caballus*. **Proteomics** 10:3227-3234.

Miskovic FM, Couetil LL, Riley CP, Zhang X, Adamec J, Raskin RE (2015) Secretoglobulin and Transferrin Expression in Bronchoalveolar Lavage Fluid of Horses with Chronic Respiratory Disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 29:1692-1699.

Moore DF, Rosenfeld MR, Gribbon PM, Winlove CP, Tsai CM (1997) Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. **Inflammation** 21:69-82.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal** 1:28-40.

Nogueira AFS, Di Filippo PA et al. (2014) Establishment of peritoneal liquid electrophoretogram from healthy horses and horses submitted to experimentally induced intestinal obstruction. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 66:665–71.

Obel N (1948) Studies on the histopathology of acute laminitis. **Almqvist & Wiksells Boktrycker Ab**, Uppsala Sweden. Thesis.

O'Dwyer CA, O'Brien ME, Wormald MR, White MM, Banville N, Hurley K, McCarthy C, McElvaney NG, Reeves EP (2015) The BLT1 Inhibitory function of α -1 antitrypsin augmentation therapy disrupts leukotriene B₄ neutrophil signaling. **The Journal of Immunology** 8:3628-3641.

Okumura M, Fujinaga T, Yamashita K, Tsunoda N, Mizuno S (1991) Isolation, characterization, and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses. **American Journal of Veterinary Research** 52:1979-1985.

Ostrowski S, Marcinkiewicz A, Nowak D, Zwoliński R, Jaszewski R (2012) Comparison of the clinical application of reactive oxygen species and inflammatory markers in patients with endocarditis. **Archives of Medical Science** 2:244-249.

Patterson SD (1991) Mammalian α 1-antitrypsins: comparative biochemistry and genetics of the major plasma serpin. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry** 100:439-454.

Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research** 2:163-187.

Petrache I, Fijalkowska I, Medler TR, Skirball J, Cruz P, Zhen L, Petrache HI, Flotte TR, Tudor RM (2006) α -1 antitrypsin inhibits caspase-3 activity, preventing lung endothelial cell apoptosis. **American Journal of Pathology** 4:1155-1166.

Pihl TH, Scheepers E, Sanz M, Goddard A, Page P, Toft N, Kjelgaard-Hansen M, Andersen PH, Jacobsen S (2016) Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care** 5:664-674.

Pollitt CC, Bell K. (1983) Characterisation of the α 1-protease inhibitor system in thoroughbred horse plasma by horizontal two-dimensional (ISO-DALT) electrophoresis. 1. protein staining. **Animal Blood Groups and Biochemical Genetics** 2:83-105.

Pollitt CC, Visser MB (2010) Carbohydrate alimentary overload laminitis. **Veterinary Clinics of North America - Equine Practice** 1:65–78.

Pollock PJ, Prendergast M, Schumacher J, Bellenger CR (2005) Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. **Veterinary Record** 17:538-542.

Reeves EP, Dunlea DM et al. (2019) Circulating truncated alpha-1 antitrypsin glycoprotein in patient plasma retains anti-inflammatory capacity. **Journal of Immunology** 202:2240-2253.

Ryu SY, Kim KS, Park J, Kang MG, Han MA (2008) The association between circulating inflammatory markers and metabolic syndrome in Korean rural adults. **Journal of Preventive Medicine and Public Health** 41:413-418.

Saqueti CHC, Faleiros RR, Macoris DG, Fagliari JJ, Silva SL (2008) Perfil eletroforético do proteinograma sérico de eqüinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 4:794–99.

Scoppetta F, Tartaglia M, Renzone G, Avellini L, Gaiti A, Scaloni A, Chiaradia A (2012) Plasma protein changes in horse after prolonged physical exercise: a proteomic study. **Journal of Proteomics** 75:4494-4504.

Skaar EP (2010) The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. **PLOS Pathogens** 6:e1000949.

Smith BP (2014) **Large Animal Internal Medicine**. 6^a ed. Elsevier Health Sciences. P. 486-504.

Souto PC, da Fonseca LA, Orozco AMO, Lopez CJR, Ermita PAN, de Carvalho Filho WP, Girardi FM (2019) Acute-phase proteins of healthy horses and horses naturally affected by colic syndrome. **Journal of Equine Veterinary Science** 80:1-4.

Souza A (2007) **Tamponamento cecal: aspectos clínico, fisiopatológico e terapêutico na laminite experimental em eqüinos**. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Stewart AJ, Pettigrew A, Cochran AM, Belknap JK (2009) Indices of inflammation in the lung and liver in the early stages of the black walnut extract model of equine laminitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 3–4: 254–60.

Taharaguchi S, Nagano A, Okai K, Miyasho T, Kuwano M, Taniyama H, Yokota H (2007) Detection of an isoform of α 1-antitrypsin in serum samples from foals with gastric ulcers. **Veterinary Record** 161:338-342.

Taira T, Fujinaga T, Tamura K, Izumi M, Itoh H, Tsunoda N, Yamashita K, Okumura M, Mizuno S (1992) Isolation and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reactive protein in horses. **American Journal of Veterinary Research** 53:961-965.

Takiguchi M, Fujinaga T, Naiki M, Mizuno S, Otomo K (1990) Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. **American Journal of Veterinary Research** 8:1215-1220.

Thomsen ME, Davis EG, Rush BR (2000) Black walnut induced laminitis. **Veterinary and Human Toxicology** 1: 8–11.

Vallon R, Freuler F et al. (2001) Serum amyloid A (ApoSAA) expression is up-regulated in rheumatoid arthritis and induces transcription of matrix metalloproteinases. **The Journal of Immunology** 4:2801-2807.

Westerman TL, Foster CM, Tornquist SJ, Poulsen KP (2016) Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with colic. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 5:664-674.

Witkowska-Piłaszewicz OD, Żmigrodzka M, Winnicka A, Miśkiewicz A, Strzelec K, Cywińska A (2019a) Serum amyloid A in equine health and disease. **Equine Veterinary Journal** 3:293-298.

Witkowska-Piłaszewicz OD, Bąska P, Czopowicz M, Żmigrodzka M, Szczepaniak J, Szarska E, Winnicka A, Cywińska A (2019b) Changes in serum amyloid A (SAA) concentration in arabian endurance horses during first training season. **Animals** 6:1-9.

Xu L, Badolato R, Murphy WJ, Longo DL, Anver M, Hale S, Oppenheim JJ, Wang JM (1995) A novel biologic function of serum amyloid A induction of t lymphocyte migration and adhesion. **Journal of Immunology** 3:1184-1190.

Yamashita K, Fujinaga T, Okumura M, Takiguchi M, Tsunoda N, Mizuno S (1991) Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. **Journal of Veterinary Medical Science** 6:1019-1024.

Zabrecky KA, Slovis NM, Constable PD, Taylor SD (2015) Plasma C-reactive protein and haptoglobin concentrations in critically ill neonatal foals. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 2:673-677.