

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DE
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BEZERROS
PORTADORES DE HÉRNIA UMBILICAIS

Gisele Tobias Soares
Médica Veterinária

ARAÇATUBA – SP
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA e CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CÂMPUS DE ARAÇATUBA

CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DE
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BEZERROS
PORTADORES DE HÉRNIA UMBILICAIS

Gisele Tobias Soares

Orientador: Prof.^a Ass. Dr.^a Juliana Regina Peiró

Co-orientador: Prof. Ass. Dr. Paulo César Ciarlini

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP

2008

Catalogação-na-Publicação (CIP)

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S676c Soares, Gisele Tobias
Concentrações plasmática e peritoneal de proteínas de fase aguda em bezerros portadores de hérnias umbilicais / Gisele Tobias Soares. - Araçatuba: [s.n.], 2008
50 f. ; tab.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária, 2008
Orientador: Profa. Dra. Juliana Regina Peiró
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

1. Bovino 2. Hérnia umbilical 3. Proteínas da fase aguda
4. Líquido ascítico 5. Eletroforese das proteínas sangüíneas

CDD 636.0896

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GISELE TOBIAS SOARES - nascida em 22 de dezembro de 1979, na cidade de São Paulo, formada em Medicina Veterinária pela Universidade Metodista de São Paulo – SP, residência na área de Clínica Médica, Cirúrgica e Anestesiologia de Grandes Animais pela Universidade Estadual Paulista UNESP – Araçatuba.

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha mãe, Eunice, por estar sempre ao meu lado e ao meu pai, Nelson (in memoriam) que mesmo não estando presente, tenho certeza que olhou por mim em todos os momentos.

Dedico também a todos os animais que já tive na vida: Taca, Preto, Rambo, Domenique, Pingo, Palhacinha, Bolinha, Doty, Pretinha, Mitsy, Samanta, Pantera, Lilica, Winnie, Johnnie, Picanha e Love.

AGRADECIMENTOS

À Deus, em primeiro lugar, por permitir que tudo fosse possível.

À minha mãe, Eunice, cujos esforços nunca foram medidos para que eu pudesse realizar este grande sonho. Muito obrigada. Não tenho palavras para dizer o que sinto agora. Te amo muito.

Ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho (processo 07/51389-4).

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Juliana Regina Peiró, pela confiança, amizade, dedicação e paciência com minhas dúvidas freqüentes e minhas limitações em relação à pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, pela atenção, pelas dicas, orientações, e total amparo quando minha orientadora não pôde estar presente.

À Prof.^a Dr.^a Sílvia Helena Venturolli Perri, pela paciência e dedicação na realização da análise estatística.

À Prof.^a Dr.^a Cárís Maroni Nunes, pela colaboração no projeto, atenção e disponibilidade total do laboratório de bioquímica e biologia molecular animal para realização das eletroforeses.

Ao Prof. Dr. José Jurandir Fagliari, por sua atenção, dedicação e paciência em me ensinar muito sobre as proteínas, e também por ter cedido seu laboratório para execução de parte de meu experimento e leitura dos géis.

Aos funcionários do Laboratório de eletroforese do Departamento de Cirurgia Veterinária da UNESP – Campus de Jaboticabal, pela ajuda em todos os momentos em que foi necessário, e pela paciência.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal da Unesp – Campus de Araçatuba, pela atenção e simpatia, sempre.

Aos funcionários da biblioteca do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP – Araçatuba), em especial à Isabel Pereira Matos, pelas correções e paciência com as minhas dúvidas freqüentes.

À aluna da graduação e bolsista de iniciação científica Tatiane S. Pólo, pela ajuda indispensável na organização dos dados e tabelas, pela uma memória perfeita e dedicação, que muito me ajudaram nos momentos mais importantes da realização deste trabalho.

Às minha amigas Flávia e Adriana, com quem morei por 2 anos, que me mostraram o que era ter irmãs. Pelas brigas, discussões, broncas e amor acima de tudo.

Às minhas grandes amigas Capivaras, Tatinha, Larissa, Luciana, Bia que tornaram a minha vida muito melhor sempre amo todas vocês.

Às minhas amigas Carol e Nádia que me mostraram durante os anos em que estive em Araçatuba, que São Paulo não era tão longe assim.

À minha mais nova amiga e Prof.^a Dr.^a Daniela Rozza, que eu conheci há tão pouco, mas que já amo de todo coração, pelas conversas, conselhos, e por ter me ajudado no momento mais difícil da minha vida até agora. Muito obrigada.

Aos meus cães Johnnie e Picanha, que apesar de tudo, cada vez que eu chegava à minha casa estavam sempre ali, sorrindo para mim.

RESUMO - Os objetivos deste estudo foram determinar intervalos de referência para as proteínas de fase aguda no plasma e no líquido peritoneal em bezerros portadores de hérnia umbilical congênita, antes e após a cirurgia; determinar se a presença da hérnia umbilical poderia desencadear a produção destas proteínas em relação aos bezerros normais; tentar avaliar se estas alterações ocorrem mais precocemente no plasma ou no líquido peritoneal; bem como um possível efeito das paracenteses seriadas no líquido peritoneal dos animais do grupo controle. Foram utilizados 20 bezerros da raça Holandesa, entre 3 e 7 meses de idade, com e sem hérnia umbilical congênita. Os animais do grupo experimental foram submetidos à herniorrafia e amostras de plasma e líquido peritoneal foram colhidas imediatamente antes da cirurgia (momento 0) e aos 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. Nos mesmos momentos foram colhidas amostras nos animais do grupo controle. Cinco proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados indicaram que estas proteínas aumentaram mais rapidamente no líquido peritoneal do que no plasma, exceto a haptoglobina e a transferrina, que aumentaram nos mesmos momentos no plasma e no líquido peritoneal. Concluiu-se que a utilização dessas proteínas ajuda a monitorar a resposta inflamatória na cavidade abdominal estabelecida após a cirurgia e que a paracentese seriada não resultou em alterações significantes nas concentrações destas proteínas de fase aguda.

Palavras-Chave: bovino, hérnia umbilical, líquido peritoneal, proteínas da fase aguda

SUMMARY - The aims of this study were to determine reference intervals for the different acute phase proteins in plasma and peritoneal fluid samples of calves with congenital umbilical hernia before and after herniorrhaphy; to determine if the presence of an umbilical hernia would trigger the production of these proteins in comparison with normal calves; to identify if these alterations occur earlier in plasma or in peritoneal fluid and to evaluate a possible effect of serial paracentesis in peritoneal fluid in control group. Twenty Holstein calves, 3 to 7 month-aged, were divided in 2 groups: calves without umbilical hernia (control group) and calves with congenital umbilical hernia (experimental group). Calves from the experimental group underwent herniorrhaphy. Plasma and peritoneal fluid samples were collected in experimental group immediately before surgery (time 0), 1, 3, 5, 7 and 15 days after surgery and at the same moments in the control group. Five acute phase proteins were evaluated (ceruloplasmin, transferrin, albumin, haptoglobin and acid-glycoprotein) in all samples using the SDS-PAGE method. The results showed that these acute phase proteins rapidly increased in peritoneal fluid than in plasma, but haptoglobin and transferrin increased at the same moments in both plasma and peritoneal fluid. It was concluded that the use of these proteins helps to monitor the ongoing inflammatory response in the abdominal cavity established after the surgery and serial paracentesis did not result in changes in concentrations of these acute phase proteins.

Keywords: umbilical hernia, acute-phase protein, peritoneal fluid

SUMÁRIO	Página
1.0 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1 Referências.....	17
2.0 CAPÍTULO 2 – CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BEZERROS PORTADORES DE HÉRNIA UMBILICAIS.....	24
Resumo.....	24
Summary.....	25
2.1 Introdução.....	26
2.2 Material e método.....	27
2.2.1 Animais.....	27
2.2.2 Colheita das amostras.....	28
2.2.3 Eletroforese.....	28
2.2.3.1 Gel de separação.....	29
2.2.3.2 Gel de empilhamento.....	29
2.2.3.3 Solução tampão.....	29
2.2.3.4 Amostras.....	29
2.2.3.4.1 Plasma.....	29
2.2.3.4.2 Líquido Peritoneal	30
2.2.3.5 Coloração dos géis	30
2.2.3.6 Descoloração dos géis	30
2.2.3.7 Avaliação das proteínas	30
2.2.4 Análise estatística	31
2.3 Resultado.....	31

2.4 Discussão	38
2.5 Conclusão	45
2.6 Referências	46

Lista de tabelas	Página
Tabela 1 – Valores (mediana, valor mínimo e máximo) das concentrações de ceruloplasmina no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)	34
Tabela 2 - Valores (mediana, valor mínimo e máximo) das concentrações de transferrina no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E).	35
Tabela 3 - Valores (mediana, valor mínimo e máximo) das concentrações de albumina no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)	36
Tabela 4 - Valores (mediana, valor mínimo e máximo) das concentrações de haptoglobina no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle =C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)	37
Tabela 5 - Valores (mediana, valor mínimo e máximo) das concentrações de glicoproteína ácida no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)	38

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A hérnia umbilical é uma enfermidade observada em todas as raças e acredita-se que esteja relacionada a fatores hereditários (MÜLLER et al., 1988; REBHUN et al., 1995) ou que estejam associadas com inflamação do umbigo (AL-BADRANY, 2001; CHUANG et al., 2000; REBHUN et al., 1995; TRENT, 1987). Representa de 8 a 30% dos defeitos congênitos encontrados em bovinos (BAHR; DISTL, 2005), podendo em alguns animais desaparecer em até quatro dias. Somente as hérnias que persistem após este período são consideradas hérnias umbilicais verdadeiras (ENZERINK et al., 2000). A onfaloflebite em bovinos aumenta o risco de aparecimento de hérnia umbilical durante os dois primeiros meses de vida (STEENHOLDT; HERNANDES, 2004).

Dependendo do tamanho do anel herniário, o rúmen (KUMAR, 2001), o omento, o abomaso, o intestino delgado (STEINMAN et al., 2000), ou uma combinação destes pode se alojar no saco herniário.

As hérnias de longa duração são mais prováveis de desenvolver aderências entre estas estruturas e o peritônio evertido. Encarceramento (FIELD, 1988; VOERMANS et al., 2004), estrangulamentos de alças (HYLTON; ROUSSEAUX, 1985; RIJKENHUIZEN; SICKMANN, 1995), evisceração do conteúdo (WEIK; MOORES, 2005) ou fístulas enterocutâneas podem ocorrer (FREEMAN et al., 1988; MARKEL et al., 1987). Podem aparecer outras enfermidades congênitas associadas à hérnia umbilical (MARKEL et al., 1987), como, por exemplo, o úraco dilatado (PARRAH; BUCHOO, 2004).

As condições citadas anteriormente podem levar aos processos inflamatórios locais, e podem provocar alterações das concentrações de proteínas de fase aguda no plasma e líquido peritoneal que podem ser identificadas pelo método de eletroforese (FAGLIARI et al., 1998). Sendo assim, a avaliação destas proteínas pode ser útil em detectar e monitorar a progressão e a gravidade de processos inflamatórios.

Caso alterações ou complicações se desenvolvam durante o período pós-operatório (ANDERSON et al., 1993), a determinação dos parâmetros normais do líquido peritoneal neste período seria extremamente importante para a subsequente interpretação destes dados (ANDERSON et al., 1994). Contudo, dados referentes a proteínas de fase aguda no líquido peritoneal de bezerros jovens sob estas condições não estão disponíveis na literatura (BURTON et al., 1997).

Anderson et al. (1995) e Mendes et al. (2005) concluíram que os valores de referência para os parâmetros de proteínas totais do líquido peritoneal de bovinos adultos clinicamente normais não seriam apropriados para interpretar os resultados obtidos na análise do líquido peritoneal de bezerros.

A utilização de dados de bovinos adultos ou mesmo bezerros mais velhos pode resultar em interpretações errôneas quando se avalia o líquido peritoneal de bezerros mais jovens. Animais muito jovens podem apresentar várias condições que afetam a cavidade abdominal como obstruções intestinais estrangulantes e não-estrangulantes, septicemia, úlceras de abomaso, onfalite (BURTON et al., 1997; RINGS, 1995), hérnias umbilicais, abscessos umbilicais e persistência de úraco (RINGS, 1995; VIRTALA et al., 1996).

A colheita do líquido peritoneal é um procedimento que possibilita repetição e fornece informações que permitem avaliar a gravidade das lesões abdominais, ajudando a decidir se a cirurgia deve ou não ser realizada (DUCHARME; LOWE, 1988). A avaliação seriada do líquido peritoneal é um indicador útil na avaliação da resposta da peritonite e do trauma abdominal ao tratamento clínico (DYSON, 1983; NAZIFI et al., 2000), e tem sido utilizada com sucesso em muitas espécies animais para auxiliar no diagnóstico de doença abdominal (ARDEN; STICK, 1988; HIRSCH; TOWNSEND, 1982; HOUSE et al., 1992; ORSINI et al., 1991; SANTSCHI et al., 1988; WILSON et al., 1985).

A análise do líquido peritoneal em eqüinos ajuda a determinar o prognóstico para animais com sinais de dor abdominal (ALLEN JUNIOR et al., 1986; ORSINI et al., 1991), a diferenciar enfermidades clínicas das cirúrgicas

no trato gastrintestinal (ARDEN; STICK, 1988; JOHNSTON; MORRIS, 1987), e a diferenciar abscessos intra-abdominais de neoplasia (ZICKER et al., 1990).

A resposta de fase aguda é uma reação sistêmica aos distúrbios locais ou sistêmicos na homeostase, causados por infecção, injúria tecidual, trauma, cirurgia, crescimento neoplásico ou desordens imunológicas (GRUYS et al., 1999). É uma condição fisiológica que ocorre bem no início do processo inflamatório independente do tipo de inflamação estabelecida (HIRVONEN, 2000) e tem o propósito de prevenir a injúria de um órgão, isolar e destruir um organismo infeccioso, remover moléculas indesejáveis e debris, e ativar os processos de reparação que são necessários para que o organismo restabeleça sua função normal (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

No local da injúria tecidual, são iniciadas respostas teciduais quando citocinas pró-inflamatórias são liberadas e o sistema vascular e células inflamatórias são ativadas. Essas respostas em série estão associadas com a produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para o líquido extracelular e também para a circulação sanguínea (GRUYS et al., 2005).

As mudanças nas composições das proteínas séricas que ocorrem após o dano tecidual representam uma parte da resposta sistêmica do animal acometido por processo inflamatório agudo mediada por citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral- α , Interleucina-1 e Interleucina-6) (OPPENHEIN; SHEVACH, 1990). A síntese e liberação das proteínas de fase aguda (PFAs) do fígado para o plasma são reguladas por mediadores inflamatórios de quatro categorias: citocinas do grupo da interleucina-6, citocinas da família da interleucina-1, glucocorticóides e fatores de crescimento (HIRVONEN, 2000). As citocinas estimulam principalmente a expressão do gene da produção de PFAs, enquanto os glicocorticóides e fatores de crescimento funcionam como moduladores da ação das citocinas (BAUMANN; GAULDIE, 1994).

As PFAs ditas negativas são aquelas que têm sua concentração plasmática diminuída durante a fase aguda. Em alguns distúrbios inflamatórios, algumas PFAs podem ser mais ativamente consumidas, resultando em níveis baixos em relação ao estado inflamatório (HIRVONEN, 2000; THOMPSON et al., 1992).

A esse grupo pertencem a albumina, a transferrina, e outras proteínas transportadoras (GRUYS et al., 1994; HIRVONEN, 2000). As proteínas que apresentam sua concentração aumentada em mais de 25% são chamadas de proteínas de fase aguda positivas, como a ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida, amilóide sérica A e proteína C reativa (KUSHNER, 1982).

As proteínas de fase aguda têm sido consideradas como potencial indicador da presença de enfermidades, e também como indicador da saúde do rebanho (GÄNHEIM et al., 2007), podendo os perfis apresentados variarem entre as espécies e dentro delas também (HAYES, 1994)

As principais proteínas de fase aguda em bovinos já avaliadas são a haptoglobina, a ceruloplasmina, o fibrinogênio, a alfa-1 anti-tripsina, a amilóide sérica A e a fetuína (BOOSMAN et al., 1989; BROWN et al., 1992; ECKERSALL; CONNER, 1988). A proteína amilóide sérica A, a haptoglobina, a proteína C-reativa, o fibrinogênio, dentre outras, são produzidas pelo fígado durante a fase de resposta aguda à inflamação, em resposta às citocinas liberadas no local da injúria, na tentativa de defender o organismo ou combater algum patógeno. A amilóide sérica A e a haptoglobina são usadas em bovinos como indicadores primários de inflamação e infecção, tendo alta sensibilidade (HORADAGODA et al., 1999).

A ceruloplasmina é uma PFA transportadora, com importante papel no metabolismo e transporte do cobre, essencial à eritropoese, e tem funções imunológicas e removedora de radicais livres do oxigênio produzidos na inflamação (GRUYS et al., 1994; HIRVONEN, 2000).

A transferrina está relacionada ao transporte de ferro no sangue para a medula óssea, sistema retículo-endotelial, baço, fígado, intestino delgado e musculatura (WEINBERG, 1978). Além disso, contribui para o controle de ferro plasmático no combate à infecção e problemas nessa ligação podem contribuir para o aumento da susceptibilidade à infecção (KEENE; JANDL, 1965; STAHL, 1987). Sua concentração também pode ser um requisito à proliferação de linfócitos T em humanos (HUNTER et al., 1984).

A albumina, por ser uma proteína de fase aguda negativa (GRUYS et al., 1994), não deve aumentar em resposta a estímulo inflamatório agudo. Bovinos com histórico de reticulopericardite traumática geralmente têm valores aumentados de albumina plasmática e animais submetidos a procedimentos cirúrgicos apresentam diminuição da concentração de albumina (HIRVONEN; PYORALA, 1998).

A haptoglobina, uma proteína ligadora da hemoglobina, é considerada a principal proteína de fase aguda em bovinos sendo utilizada como um importante indicador da presença de infecção bacteriana nesta espécie (CONNER et al., 1988; ECKERSALL; CONNER, 1988; HIRVONEN et al., 1996; SALONEN et al., 1996), podendo ter sua concentração aumentada em até 10 vezes (SKINNER et al., 1991; SALONEN et al., 1996).

A glicoproteína ácida é uma proteína que tem ação na parede dos microvasos durante a fase aguda, propriedades imunomoduladoras (SATO et al., 1995), de reparo e de cicatrização (THOMPSON et al., 1992). Possui resposta moderada à relativamente baixa em resposta à injúria tecidual em bovinos (CONNER et al., 1988, HIRVONEN, 2000) e tem também a capacidade de se ligar a medicamentos como trimetoprim e eritromicina (HIRVONEN, 2000), por exemplo.

As funções das proteínas de fase aguda relacionadas à defesa do hospedeiro durante a inflamação não estão totalmente estabelecidas (GRUYS et al., 1994). As eletroforeses em acetato de celulose e em gel de agarose têm sido utilizadas para analisar as concentrações de proteínas plasmáticas, mas

essas técnicas são limitadas, porque podem identificar de 5 a 7 grupos de proteínas apenas (EDINGER et al., 1992; KIRK et al., 1975; MATTHEWS, 1982).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), por outro lado, permite identificar mais de 20 frações protéicas, podendo separá-las claramente mesmo quando em quantidades extremamente pequenas, e ser realizada com quantidades muito pequenas de plasma (GORDON, 1975). Esta técnica tem sido utilizada para analisar concentrações de proteínas plasmáticas (COYNE et al., 1990; WEBER; OSBORN, 1969), mas até o presente momento não foi empregada para determinar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda de bezerros portadores de hérnia umbilical.

Assim a quantificação destas proteínas pode resultar em informações importantes sobre a resposta de fase aguda bem como a evolução de uma determinada doença e devem ser utilizadas para explorar o impacto dos diferentes agentes etiológicos e de outros fatores em enfermidades de bezerros criados a campo (NIKUNEN et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- AL-BADRANY, M.S. Clinical and surgical assessment of umbilical masses in calves. *Iraqi J. Vet. Sci.*, v.14, n.1, p.119-24, 2001.
- ALLEN JUNIOR, D.; WHITE, N.A.; TYLER, D.E. Factors for prognostic use in equine obstructive small intestinal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.189, n. 7 p.777-780, 1986.
- ANDERSON, D.E. et al. Comparative analyses of peritoneal fluid from calves and adult cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.56, n.8, p.973-976, 1995.
- ANDERSON, D.E. et al. Comparison of peritoneal fluid analysis before and after exploratory celiotomy and omentopexy in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v.55, n. 12 p.1633-1637, 1994.

- ANDERSON, D.E. et al. Small-intestinal volvulus in cattle: 35 cases (1967-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.203, n. 8, p.1178-1183, 1993.
- ARDEN, W.A.; STICK, J.A. Serum and peritoneal fluid phosphate concentrations as predictors of major intestinal injury associated with equine colic. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.193, n. 8, p.927-931, 1988.
- BAHR, C.; DISTL, O. Frequency of congenital anomalies in cattle: results from the practice in comparison with literature. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.112, n.4, p.149-154, 2005.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.
- BOOSMAN, R. et al. Serum amyloid A concentrations in cows given endotoxin as an acute phase stimulant. *Am. J. of Vet. Res.*, v.50, n. 10, p.1690-1694, 1989.
- BROWN, W.M. et al. Fetuin – an old friend revisited. *Bio Essays*, v.14, p.749-755, 1992.
- BURTON, S. et al. Peritoneal fluid values and collection technique in young, normal calves. *Vet. Clin. Pathol.*, v.26, n.1, p.38-44, 1997.
- CHUANG, S.T. et al. Umbilical hernia and infection in calves. *Taiwan J. Vet. Med. Anim. Husbandry*, v.70, n.34, p.85-92, 2000.
- CONNER, J.G. et al. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.*, v.44, n. 1, p.82-88, 1988.
- COYNE, C.P. et al. Preliminary investigation of alterations in blood viscosity, cellular composition, and electrophoresis plasma protein fraction profile after competitive racing activity in Thoroughbred horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, n. 12 p. 1956-1963, 1990.
- DUCHARME, N.G.; LOWE, J.E. Decision for surgery. *Vet. Clin. North Am. Equine Pract.*, v.4, n. 1, p.51-61, 1988.
- DYSON, S. Review of 30 cases of peritonitis in the horse. *Equine Vet. J.*, v.15, n. 1, p.25-30, 1983.
- ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.*, v.12, n. 2/3, p.169-178, 1988.

- EDINGER, V.H. et al. Electrophoretic studies of serum protein fractions in horses with laminitis. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.99, n. 10, p.426-430, 1992.
- ENZERINK, E. et. al. Closure of the abdominal wall at the umbilicus and the development of umbilical hernias in a group of foals from birth to 11 months of age. *Vet. rec.*, v.147, n.2, p.37-39, 2000.
- FAGLIARI, J. J. et al. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res*, v.59, n.10, p. 1234-1237, 1998.
- FIELD, J.R. Umbilical hernia with abomasal incarceration in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n.5, p.665-666, 1988.
- FREEMAN, D.E. et al. Complications of umbilical hernias in horses: 13 cases (1972-1986). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n.6, p.804-807, 1988.
- GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; PERSSON WALLER, K. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *Vet. J*, v.173, n. 3, p. 645-651, 2007.
- GORDON, A.H. *Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels*. New York: *Elsevier Science Publishers*, 1975, 213p.
- GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M.J. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in the veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, v.64, p.1009-1018, 1994.
- GRUYS, E. et al. Acute phase reactions and acute phase proteins. *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, v. 6, n.11, p. 1045-1056, 2005.
- GRUYS, E. et al. Infection, inflammation and stress inhibit growth. Mechanisms and non-specific assessment of the process by acute phase proteins. In: WENSING, T. (Ed.) *Production diseases in farm animals: Tenth international conference*, 1998. Wageningen: *Wageningen press*, p. 72-87, 1999.
- HAYES, M.A. Functions of cytokines and acute phase proteins in inflammation. In: LUMSDEN, J. H. (Ed) *International Society for Animal Clinical Biochemistry*, 10., 1994, Guelph (Canadá). *Proceedings*, Guelph. Canada, 1994, p.1-7.

- HIRSCH, V.M.; TOWNSEND, H.G.G. Peritoneal fluid analysis in the diagnosis of abdominal disorders in cattle: a retrospective study. *Can. Vet. J.*, v.23, n. 12 p.348-354, 1982.
- HIRVONEN, J. et al. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *Dairy Res.*, v.63, n. 3, p.351-360, 1996.
- HIRVONEN, J. Acute phase response in dairy cattle. 2000. 79 f. Thesis-Faculty of Medicine Veterinary University of Helsinki, Helsinki, 2000.
- HIRVONEN, J.; PYORALA, S. Acute phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders. *Vet. J.*, v. 155, n. 1, p. 53-61, 1998.
- HORADAGODA, N.U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.*, v.144, n.16, p.437-441, 1999.
- HOUSE, J.K. et al. Ancillary tests or assessment of the ruminant digestive system. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.8, n.2, p.203-232, 1992.
- HUNTER, R.L. et al. Transferrin in disease. I: A potential prognostic indicator in patients undergoing bone marrow transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.* v. 81, n. 5, p.581-585, 1984.
- HYLTON, W.E.; ROUSSEAU, C.G. Intestinal strangulation associated with omphaloarteritis in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.186, n.10, p.1099, 1985.
- JOHNSTON, J.K.; MORRIS, D.D. Comparison of duodenitis/proximal jejunitis and small intestinal obstruction in horses: 68 cases (1977-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.191, n. 7, p.849-854, 1987.
- KEENE, W.R.; JANDL, J.H. The sites of hemoglobin catabolism. *Blood*, v. 26, n. 6, p. 703-719, 1965.
- KIRK, G.R.; HUTCHESON, D.P.; NEATE, S. Electrophoretic pattern of serum protein in clinically normal horses and ponies with laminitis. *Vet. Med. Small Anim. Clin.*, v.70, n.3, p.337-339, 1975.
- KUMAR, R.V.S. Repair of umbilical hernia involving rumen in a cross-bred calf. *Indian J. Vet. Surg.*, v.22, n.2, p.134, 2001.
- KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 389, p.39-48, 1982.

- MARKEL, M.D.; PASCOE, J.R.; SAMS, A.R. Strangulated umbilical hernias in horses: 13 cases (1974-1985). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.190, n.6, p.692-694, 1987.
- MATTHEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. *Equine Vet. J.*, v. 14, n. 4, p.322-324, 1982.
- MENDES, L.C.N. et al. Effect of age and abomasal puncture on peritoneal fluid, hematology, and serum biochemical analyses in young calves. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, n.6, p.899-904, 2005.
- MULLER, W. et al. Congenital umbilical hernia in the calf (Zum angeborenen Nabelbruch beim Kalb). *Monats. Veterinarmed.*, v.43, n.5, p.161-163, 1988.
- NAZIFI, S.; DEGHANI, S.; BARZEGAR, M.R. Evaluation of cellular and biochemical parameters of blood and peritoneal fluid following enterectomy in the goat. *Small Rumin. Res.*, v.37, n. ½, p.65-71, 2000.
- NIKUNEN, S. et al. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v.30, n. 3, p. 143-151, 2007.
- OPPENHEIN, J. J.; SHEVACH, E. M. Immunophysiology: The role of cells and cytokines in immunity and inflammation. Oxford University Press, 1990 p. 259-273.
- ORSINI, J.A.; GALLIGAN, D.T.; REEVES, M. Determining a prognosis for equine abdominal crisis (colic). *Equine Pract.*, v.13, n. 9, p. 9-14, 1991.
- PARRAH, J.D.; BUCHOO, B.A. Congenital hypoplastic urinary bladder and umbilical hernia with dilated urachus in a male calf: A case report. *Indian Vet. J.*, v.81, n.9, p.1040-1041, 2004.
- REBHUN, W.C.; GUARD, C.; RICHARDS, C.M. Diseases of dairy cattle. Baltimore: *Williams & Wilkins*, 1995. 530p.
- RIJKENHUIZEN, A.B.; SICKMANN, H.G. Incarcerated umbilical hernia with enterocutaneous fistula in a calf. *Tijdschr. Diergeneesk.*, v.120, n.1, p.8-10, 1995.

- RINGS, D.M. Umbilical hernias, umbilical abscesses, and urachal fistulas. surgical considerations. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.11, n.1, p. 137-148, 1995.
- SALONEN, M. et al. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Res. Vet. Sci.*, v.60, n. 1, p. 88-91, 1996.
- SANTSCHI, E.M. et al. Peritoneal fluid analysis in ponies after abdominal surgery. *Vet. Surg.*, v.17, n. 1, p. 6-9, 1988.
- SATO, S.; SUZUKI, T.; OKADA, K. Supression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, v.57, n. 2, p. 373-375, 1995.
- SKINNER, J.G.; BROWN, R. A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet. Rec.*, v.128, n. 7, p.147-149, 1991.
- STAHL, W.M. Acute phase protein response to tissue injury. *Crit. Care Med.*, v. 15, n. 6, p. 545-550, 1987.
- STEENHOLDT, C.; HERNANDES, J. Risk factors for umbilical hernia in Holstein heifers during the first two months after birth. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.224, n.9, p.1487-1490, 2004.
- STEINMAN, A. et al. Omphalocele in a foal. *Vet. Rec.*, v.146, n.12, p.341-343, 2000.
- THOMPSON, D.; MILFORD-WARD, A.; WHICHER, J. T. The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Ann. Clin. Biochem*, v. 29, pt.2, p.123-131, 1992.
- TRENT, A.M. Surgical management in umbilical masses in calves. *Bovine Pract.*, v.22, p.170-173, 1987.
- VIRTALA, A.M. et al. Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.208, n.12, p.2043-2046, 1996.
- VOERMANS, M. et al. Inarcerated umbilical hernia in the horse: a case with a review of the literature. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, v. 129, n. 5, p. 142-149, 2004.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, v. 244, n. 16 p. 4406-4412, 1969.

WEINBERG, E.D. Iron and *infection*. *Microbiol. Rev.* v.42, n. 1, p. 45-66, 1978.

WEIK, J.; MOORES, D. An unusual case of umbilical hernia rupture with evisceration. *J. Pediatr. Surg.*, v. 40, n. 4, p. E33 - E35, 2005.

WILSON, A.D.; HIRSCH, V.M.; OSBORNE, A.D. Abdominocentesis in cattle: technique and criteria for diagnosis of peritonitis. *Can. Vet. J.*, v. 26, n. 2, p. 74-80, 1985.

ZICKER, S.C.; WILSON, W.D.; MEDEARIS, I. Differentiation between intra-abdominal neoplasms and abscesses in horses, using clinical and laboratory data: 40 cases (1973-1988). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 196, n. 7, p. 1130-34, 1990.

CAPÍTULO 2 - CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICA E PERITONEAL DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM BEZERROS PORTADORES DE HÉRNIA UMBILICAIS

RESUMO - Os objetivos deste estudo foram determinar intervalos de referência para as proteínas de fase aguda no plasma e no líquido peritoneal em bezerros portadores de hérnia umbilical congênita, antes e após a cirurgia; determinar se a presença da hérnia umbilical poderia desencadear a produção destas proteínas em relação aos bezerros normais; tentar avaliar se estas alterações ocorrem mais precocemente no plasma ou no líquido peritoneal; bem como um possível efeito das paracenteses seriadas no líquido peritoneal dos animais do grupo controle. Foram utilizados 20 bezerros da raça Holandesa, entre 3 e 7 meses de idade, com e sem hérnia umbilical congênita. Os animais do grupo experimental foram submetidos à herniorrafia e amostras de plasma e líquido peritoneal foram colhidas imediatamente antes da cirurgia (momento 0) e aos 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. Nos mesmos momentos foram colhidas amostras nos animais do grupo controle. Cinco proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados indicaram que estas proteínas aumentaram mais rapidamente no líquido peritoneal do que no plasma, exceto a haptoglobina e a transferrina, que aumentaram nos mesmos momentos no plasma e no líquido peritoneal. Concluiu-se que a utilização dessas proteínas ajuda a monitorar a resposta inflamatória na cavidade abdominal estabelecida após a cirurgia e que a paracentese seriada não resultou em alterações significantes nas concentrações destas proteínas de fase aguda.

Palavras-Chave: hérnia umbilical, herniorrafia, líquido peritoneal, proteínas da fase aguda

CHAPTER 2- PLASMATIC AND PERITONEAL CONCENTRATION OF ACUTE PHASE PROTEINS IN CALVES WITH CONGENITAL UMBILICAL HERNIAS

SUMMARY - The aims of this study were to determine reference intervals for the different acute phase proteins in plasma and peritoneal fluid samples of calves with congenital umbilical hernia before and after herniorrhaphy; to determine if the presence of an umbilical hernia would trigger the production of these proteins in comparison with normal calves; to identify if these alterations occur earlier in plasma or in peritoneal fluid and to evaluate a possible effect of serial paracentesis in peritoneal fluid in control group. Twenty Holstein calves, 3 to 7 month-aged, were divided in 2 groups: calves without umbilical hernia (control group) and calves with congenital umbilical hernia (experimental group). Calves from the experimental group underwent herniorrhaphy. Plasma and peritoneal fluid samples were collected in experimental group immediately before surgery (time 0), 1, 3, 5, 7 and 15 days after surgery and at the same moments in the control group. Five acute phase proteins were evaluated (ceruloplasmin, transferrin, albumin, haptoglobin and acid-glycoprotein) in all samples using the SDS-PAGE method. The results showed that these acute phase proteins rapidly increased in peritoneal fluid than in plasma, but haptoglobin and transferrin increased at the same moments in both plasma and peritoneal fluid. It was concluded that the use of these proteins helps to monitor the ongoing inflammatory response in the abdominal cavity established after the surgery and serial paracentesis did not result in changes in concentrations of these acute phase proteins.

Keywords: umbilical hernia, acute phase protein, peritoneal fluid

2.1 Introdução

A hérnia umbilical bovina é uma enfermidade observada em todas as raças, representa de 8 a 30% dos defeitos congênitos encontrados em bovinos (BAHR; DISTL, 2005) e acredita-se que esteja relacionada a fatores hereditários (MÜLLER et al., 1988; REBHUN et al., 1995) ou que esteja associada à inflamação do umbigo (AL-BADRANY, 2001; REBHUN et al., 1995; TRENT, 1987). Processos inflamatórios locais podem provocar alterações das concentrações de proteínas de fase aguda tanto no plasma como no líquido peritoneal (FAGLIARI et al., 1998).

Caso alterações ou complicações se desenvolvam durante o período pós-operatório a determinação dos parâmetros de proteínas de fase aguda do líquido peritoneal neste período seriam extremamente importantes para a subsequente interpretação destes dados (ANDERSON et al., 1993, 1994).

As proteínas de fase aguda têm sido consideradas como potenciais indicadoras da presença de doenças e bem-estar em animais e também estão relacionadas à sanidade do rebanho (MURATA et al., 2004) e sua quantificação pode nos fornecer informações importantes sobre a resposta inflamatória de fase aguda e sua evolução, podendo ser utilizada para estabelecer parâmetros e explorar o impacto dos diferentes agentes etiológicos e outros fatores envolvidos nas enfermidades de bezerros criados a campo (NIKUNEN et al., 2007).

Contudo, dados do líquido peritoneal de bezerros jovens com estas condições não estão disponíveis na literatura (BURTON et al., 1997) e os valores de referência para os parâmetros do líquido peritoneal de bovinos adultos clinicamente normais não são apropriados para interpretar os resultados obtidos na análise do líquido peritoneal de bezerros (ANDERSON et al., 1995; MENDES et al., 2005).

A eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), permite identificar mais de 20 frações de proteínas, é

relativamente simples de ser realizada a baixo custo, possibilitando a avaliação de concentrações séricas de proteínas, mesmo quando estas se encontram em quantidades extremamente baixas (COYNE et al., 1990; FAGLIARI et al., 1998; GORDON, 1975; WEBER; OSBORN, 1969). Esta técnica representa um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas plasmáticas (FAGLIARI et al., 2006), mas até o presente momento, não foi empregada para determinar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda de bezerros portadores de hérnia umbilical antes e após a herniorrafia.

Assim, a finalidade deste estudo foi estabelecer, por meio da aplicação da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), intervalos de referência para as diferentes proteínas de fase aguda no plasma e no líquido peritoneal de bezerros portadores de hérnia umbilical congênita antes e após a correção cirúrgica; determinar se a presença de uma hérnia umbilical poderia desencadear a produção destas proteínas da fase aguda em relação aos bezerros normais, e tentar identificar se estas alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda ocorrem mais precocemente no plasma ou no líquido peritoneal. Foi avaliado também um possível efeito das paracenteses seriadas nos dados obtidos para os elementos do líquido peritoneal nos animais não portadores de hérnias umbilicais.

2.2 Materiais e Método

2.2.1 Animais

Vinte bezerros, da raça Holandesa, entre 3 e 7 meses de idade, de ambos os sexos, foram divididos em 2 grupos: controle composto por 10 animais sadios e experimental composto por 10 animais com hérnias umbilicais não complicadas. Todos os animais foram vermifugados com abamectina¹ aplicada por via subcutânea, mantidos em pasto de capim tifton, receberam água *ad libitum* e ração comercial no cocho. Os animais lactentes receberam 2 litros de leite duas vezes ao dia em mamadeiras, pela manhã e no final da

¹ Agabendazol 15%, Agener União, São Paulo, SP, Brasil

tarde. Todos os animais foram avaliados clinicamente a cada colheita e somente bezerros com valores normais de hemogramas foram incluídos neste estudo.

Os animais foram submetidos à herniorrafia a céu aberto de acordo com a técnica descrita por Rings (1995), e após a cirurgia receberam antibiótico-terapia com oxitetraciclina² de longa ação (20mg/kg de peso vivo, a cada 48 horas, IM), durante 10 dias.

2.2.2 Colheita das amostras

Cada animal foi sedado com diazepam³ (0,05 mg/kg de peso vivo, IV) e xilazina⁴ (0,05 mg/kg de peso vivo, IM) antes da paracentese (MENDES et al., 2005). Todos os bezerros foram submetidos à colheita de líquido peritoneal de acordo com a técnica previamente estabelecida por BURTON et al. (1997). As amostras em duplicata de líquido peritoneal e sangue da veia jugular foram colhidas em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) nos momentos 0 (imediatamente antes da cirurgia), 1, 3, 5, 7 e 15 dias após a cirurgia. As amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos a 10.000 giros por minuto sendo o plasma obtido, congelado.

A avaliação das proteínas de fase aguda encontradas no plasma e no líquido peritoneal dos animais foi feita pelo método de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e identificadas por seus respectivos pesos moleculares com marcador de referência de 6.500 a 200.000 Da⁵ após coloração com azul de Comassie.

2.2.3 Eletroforese

Para a confecção dos diferentes géis foram utilizados produtos Sigma⁵.

² Oxitetraciclina LA, Bayer, Sp, Brasil

³ Compaz, Pharmacon, Itapira, SP, Brasil

⁴ Sedazine, Fort Dodge, SP, Brasil

⁵ Sigma Chemical Co, St Louis, Mo

2.2.3.1 Gel de separação

O gel de separação a 10% consistiu de 11,3 mL de água deionizada, de 5,6 mL de solução de Tris-HCL 2M, com o pH ajustado para 8,8, acrescido de 10 mL de solução de Acrilamida/Bis (30%/2,6%), de 1,6 mL de Glicerol, de 0,6 mL de solução de EDTA 0,5M pH 8,3, e 0,6mL de solução de SDS 10%. Foi polimerizado pela adição de 230 uL de persulfato de amônio a 10% e 25 uL de tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

2.2.3.2 Gel de empilhamento

O gel de empilhamento a 4% consistiu de 3,95 mL de água deionizada, de 0,6 mL de solução Tris-HCl 0,617M, com pH ajustado para 6,8, acrescido de 0,85 mL de solução de Acrilamida/Bis (30%/2,67%), de 300 uL de glicerol, de 123 ul de EDTA 0,5M pH 8,3, e 123 ul de SDS 10%, e foi polimerizado pela adição de 60 uL de persulfato de amônio 10% e 13 uL de TEMED.

2.2.3.3 Solução tampão

A solução de tampão concentrada 10 vezes consistiu de 63,2g de trizma-base, 39,9g de glicina, e 10g de SDS e completado o volume com 1000 mL de água destilada.

2.2.3.4 Amostras

2.2.3.4.1 Plasma

Foram utilizados 10 ul de amostra em um tubo de polipropileno⁴ de 0,5 mL, adicionando-se 20 uL de tampão de amostra (10 mL de lauril sulfato de sódio a 10%, 4 mL de EDTA 0,5M , 5 mL de triz-fosfato 0,617M (pH 6,8), 3 mL de 2-mercaptoetanol, 10 mL de glicerol, 18 mL de água deionizada e 5 mg de azul de bromofenol) e 30 uL de solução tampão de fosfato salina (PBS).

2.2.3.4.2 Líquido peritoneal

Foram utilizados 15uL de amostra em tubos de polipropileno⁴ aos quais adicionou-se 20 uL de tampão de amostra e 30 uL de PBS.

As amostras foram fervidas por 10 minutos para desnaturação das proteínas e em seguida foram aplicadas ao gel. Foi utilizada uma cuba de eletroforese⁶ e 2 sistemas verticais de gel medindo 20cm x 15cm ligados à fonte de energia⁷ programada a 20 mA enquanto as amostras estavam no gel de empilhamento e aumentada para 30 mA quando as amostras chegavam ao gel de separação.

2.2.3.5 Coloração dos géis

Os géis foram corados durante 15 minutos em 200 mL de solução de azul de Comassie 0,2% (Brilliant Blue R 250) à base de metanol (50%), ácido acético glacial (10%), água (40%) e azul de Comassie (0,25%).

2.2.3.6 Descoloração dos géis

Os géis foram descorados em uma solução contendo 25% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 65% de água destilada, até que o fundo do gel ficasse completamente transparente.

2.2.3.7 Avaliação das proteínas

As frações de proteínas de fase aguda foram identificadas utilizando-se como referência um marcador de peso molecular⁵ de 6.500 a 200.000 Daltons e pela comparação com a mobilidade eletroforética da ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida purificadas de referência⁵. As proteínas amilóide sérica A e proteína C reativa não foram encontradas nas amostras deste estudo. As concentrações das frações protéicas foram determinadas por um videodensitômetro⁸ computadorizado.

2.2.4 Análise estatística

A análise de variância dos dados foi realizada para se determinar a existência de diferenças significativas; dados não paramétricos foram

⁶ Cuba para eletroforese

⁷ Power Pac 1000, Bio-Rad, UK

⁸ Shimadzu CS-900, Shimadzu Corp. Kyoto, Japan

analisados utilizando-se o teste de Friedman; diferenças entre medianas para comparações múltiplas entre os dias dentro de cada grupo foram comparadas pelo teste de Dunn; o teste de Mann-Whitney foi realizado para se comparar grupos no mesmo momento e o teste de Wilcoxon foi utilizado para avaliar se houve diferença entre as variáveis no plasma e no líquido peritoneal nos dois grupos. O valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo para todos os testes e utilizou-se o programa GraphPad InStat V.3 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) para tais análises.

2.3 Resultados

A concentração de ceruloplasmina no líquido peritoneal do grupo operado no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia) já se encontrava aumentada em relação ao grupo controle e também no 1º e 5º dias após a cirurgia (Tabela 1). Porém, não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de ceruloplasmina no líquido peritoneal para os grupos controle ou operado ao longo do tempo (Tabela 1). No plasma, não houve diferença estatisticamente significativa da concentração de ceruloplasmina entre os dois grupos de animais, nem dentro de cada grupo em nenhum dos momentos avaliados (Tabela 1).

Não houve diferença estatisticamente significativa nos valores de transferrina no líquido peritoneal entre os grupos controle e experimental, nem dentro do grupo controle ao longo do tempo (Tabela 2). No entanto, os animais do grupo experimental apresentaram um aumento estatisticamente significativo da concentração de transferrina no líquido peritoneal 15 dias após a cirurgia, em relação ao seu valor basal (Tabela 2). A transferrina no plasma do grupo experimental apresentou uma diminuição estatisticamente significativa, 1 e 3 dias após a cirurgia, em relação ao seu valor basal (Tabela 2). Não houve diferença estatisticamente significativa nos momentos avaliados no plasma do grupo controle, enquanto os animais do grupo experimental apresentaram aumento estatisticamente significativo da concentração de transferrina plasmática 15 dias após a cirurgia em relação ao seu valor basal (Tabela 2).

A concentração de albumina no líquido peritoneal do grupo experimental também já se encontrava significativamente aumentada ($P < 0,05$) no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia) e de 1 a 7 dias após a cirurgia em relação ao grupo controle (Tabela 3). Porém, dentro de cada grupo não houve diferença significativa entre os valores de albumina ao longo do tempo (Tabela 3). Houve aumento estatisticamente significativo da concentração de albumina 5 dias após a cirurgia em relação ao momento 15 dias após a cirurgia (Tabela 3).

No plasma, a concentração de albumina do grupo experimental já se apresentou significativamente aumentada no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia) e do terceiro ao 15º dia após a cirurgia em relação aos animais do grupo controle (Tabela 3). No grupo controle não houve diferença significativa entre os valores de albumina ao longo do tempo (Tabela 3). Houve diminuição significativa entre os valores de albumina plasmática 5 dias após a cirurgia em relação ao 15º dia do pós-operatório (Tabela 3).

No líquido peritoneal, não houve diferença estatisticamente significativa dos valores de haptoglobina do grupo experimental em relação ao grupo controle, nem dentro de cada grupo em nenhum dos momentos avaliados (Tabela 4). Entretanto, a haptoglobina plasmática nos animais do grupo experimental já se apresentava com valor significativamente mais baixo no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia) e no 1º, 5º e 7º dias após a cirurgia, em relação ao grupo controle (Tabela 4). No entanto, dentro de cada grupo não houve diferença significativa da concentração de haptoglobina plasmática ao longo do tempo (Tabela 4).

As concentrações de glicoproteína ácida no líquido peritoneal do grupo experimental apresentaram aumento significativo 3 dias após a cirurgia em relação ao grupo controle. Porém, dentro de cada grupo não houve diferença significativa entre os valores de glicoproteína ácida ao longo do tempo (Tabela 5). No plasma dos animais do grupo experimental, a glicoproteína ácida apresentou diminuição significativa 7 e 15 dias após a cirurgia em relação ao grupo controle (Tabela 5). No entanto, dentro de cada grupo, não houve

diferença significativa entre os valores plasmáticos de glicoproteína ácida ao longo do tempo (Tabela 5).

Quando foi realizada a comparação dos valores de proteínas de fase aguda entre o líquido peritoneal e o plasma, constatou-se que nos animais do grupo controle os valores de ceruloplasmina, transferrina, albumina e haptoglobina no líquido peritoneal (Tabelas 1, 2, 3 e 4) foram significativamente menores que os valores plasmáticos em todos os momentos analisados. O mesmo foi observado para as concentrações de glicoproteína ácida no líquido peritoneal, exceto no último momento de avaliação (Tabelas 5).

No grupo experimental, as concentrações de ceruloplasmina, transferrina e albumina no líquido peritoneal foram significativamente menores que no plasma em todos os momentos avaliados (Tabelas 1, 2 e 3). Entretanto a concentração de haptoglobina peritoneal nos animais do grupo experimental foi significativamente menor que a concentração plasmática no terceiro e no 15º dia após a cirurgia (Tabelas 4), e a concentração de glicoproteína ácida no líquido peritoneal foi significativamente menor que a plasmática no momento 0 (imediatamente anterior à cirurgia) e no 15º dia após a cirurgia (Tabelas 5).

Não se observou alteração estatisticamente significativa nas concentrações de ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida nos animais do grupo controle, submetidos à paracenteses seriadas.

Tabela 1 – Valores (medianas, valor mínimo e máximo) das concentrações de ceruloplasmina (mg/dL) no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle =C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)

Ceruloplasmina no líquido peritoneal (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupo	0	1	3	5	7	15
C	0,95 ^B (0,17 – 8,40)	1,20 ^B (0,50 -3,00)	1,20 (0,30 -3,70)	1,60 ^B (0,50 -5,10)	1,79 (0,40 -4,00)	1,80 (0,50 -4,40)
E	2,52 ^A (0,20 -4,00)	3,15 ^A (1,28 -8,60)	3,00 (0,32 -6,50)	3,867 ^A (0,90 -6,00)	3,75 (0,50 -6,60)	2,46 (1,10 -3,80)

Ceruloplasmina plasmática (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupo	0	1	3	5	7	15
C	6,52* (1,20 -13,70)	6,01* (2,10 -13,87)	6,51* (0,40 -10,64)	7,57* (2,10 -12,00)	8,25* (0,70 -17,00)	7,89* (5,96 -10,65)
E	5,75# (1,90 -23,10)	5,85# (2,30 -14,20)	5,20# (2,00 -12,4)	7,00# (2,00 -17,00)	10,75# (3,40 -23,00)	10,41# (5,30 -17,40)

Letras minúsculas na linha diferem entre si (teste de Dunn, $P < 0,05$).

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

* Diferente do Líquido peritoneal no grupo controle (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Diferente do Líquido peritoneal no grupo experimental (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Tabela 2 – Valores (medianas, valor mínimo e máximo) das concentrações de transferrina (mg/dL) no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)

Transferrina no líquido peritoneal (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupo	0	1	3	5	7	15
C	7,25 (3,00 -14,50)	8,25 (2,60 -17,9)	6,10 (1,90 -19,00)	7,20 (1,75 -35,00)	7,30 (2,20 -21,30)	11,00 (5,00 -24,00)
E	6,50 ^b (2,60 -28,00)	12,52 (4,80 -27,40)	11,75 (4,70 -26,30)	10,65 (4,80 -25,00)	8,05 (1,50 -31,00)	15,36 ^a (4,30 -30,80)

Transferrina plasmática (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupos	0	1	3	5	7	15
C	36,35* (1,43 -52,50)	37,58 ^A * (30,41-53,00)	39,07 ^{A*} (24,51-73,00)	41,78* (17,50 -64,00)	40,89* (21,82 -91,00)	37,88 ^{B*} (28,91 -58,12)
E	21,60 ^{b#} (8,80 -59,00)	25,95 ^{bB#} (10,70, 53,30)	23,9 ^{bB#} (9,10, 60,20)	20,3 ^{b#} (8,60, 49,90)	25,35 [#] (9,51, 55,00)	48,23 ^{aA#} (31,70 -76,3)

Letras minúsculas na linha diferem entre si (teste de Dunn, $P < 0,05$).

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

* Diferente do Líquido peritoneal no grupo controle (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Diferente do Líquido peritoneal no grupo experimental (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Tabela 3 – Valores (medianas, valor mínimo e máximo) das concentrações de albumina (g/dL) no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)

Albumina no líquido peritoneal (g/dL)						
Momentos (dias)						
Grupos	0	1	3	5	7	15
C	0,70 ^B (0,36 -1,27)	1,02 ^B (0,29 -1,88)	0,99 ^B (0,20 -1,43)	0,98 ^B (0,53 -2,28)	0,65 ^B (0,48 -1,35)	1,03 (0,62 -1,96)
E	1,99 ^A (0,73 -4,75)	1,82 ^A (1,31 -3,24)	1,95 ^A (0,87 -2,81)	2,12 ^{aA} (0,57 -2,94)	1,30 ^A (0,56 -2,33)	1,31 ^b (0,74 -2,12)

Albumina plasmática (g/dL)						
Momentos (dias)						
Grupos	0	1	3	5	7	15
C	3,51 ^{B*} (1,77 -4,87)	3,78 [*] (2,56 -4,71)	3,52 ^{B*} (2,16 -4,89)	3,42 ^{B*} (2,36 -4, 51)	3,09 ^{B*} (2,66 -6,14)	3,54 ^{B*} (3,01 -3,95)
E	4,44 ^{A#} (3,89 -4,79)	4,32 [#] (3,24 -5,43)	4,59 ^{A#} (3,36 -5,63)	4,09 ^{bA#} (3,28 -5,37)	4,77 ^{A#} (3,54 -6,80)	4,92 ^{Aa#} (3,89 -7,33)

Letras minúsculas na linha diferem entre si (teste de Dunn, $P < 0,05$).

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

* Diferente do Líquido peritoneal no grupo controle (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Diferente do Líquido peritoneal no grupo experimental (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Tabela 4 – Valores (medianas, valor mínimo e máximo) da haptoglobina (mg/dL) no líquido peritoneal e plasma de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)

Haptoglobina no líquido peritoneal (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupos	0	1	3	5	7	15
C	0,45 (0,20 -1,90)	0,50 (0,10 -2,40)	0,60 (9,10 -1,80)	0,70 (0,40 -1,60)	0,50 (0,10 -0,70)	0,60 (0,30 -0,80)
E	0,67 (0,09 -16,00)	0,65 (0,10 -2,90)	0,45 (0,10 -2,70)	0,90 (0,10 -21,0)	0,45 (0,20 -1,80)	0,54 (0,20 -1,20)

Haptoglobina plasmática (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupos	0	1	3	5	7	15
C	2,35 ^{A*} (0,19 -5,60)	2,30 ^{A*} (1,20 -10,70)	2,79* (0,90 -9,30)	2,71 ^{A*} (1,00 -9,00)	2,89 ^{A*} (1,89 -7,00)	2,06* (1,63 -2,56)
E	0,96 ^B (0,40 -2,50)	1,35 ^B (0,44 -2,40)	1,35 [#] (0,44 -3,90)	1,37 ^B (0,55 -2,30)	1,04 ^B (0,60 -2,00)	1,70 [#] (1,00 -2,80)

Letras minúsculas na linha diferem entre si (teste de Dunn, $P < 0,05$).

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

* Diferente do Líquido peritoneal no grupo controle (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Diferente do Líquido peritoneal no grupo experimental (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Tabela 5 – Valores das medianas, valor mínimo e máximo, da glicoproteína ácida (mg/dL) no líquido peritoneal de bezerros normais (grupo controle = C) e bezerros submetidos à herniorrafia (grupo experimental = E)

Glicoproteína ácida no líquido peritoneal (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupo	0	1	3	5	7	15
C	0,30 (0,03 -0,90)	0,40 (0,05 -3,90)	0,20 ^B (0,08 -0,50)	0,60 (0,10 -1,80)	0,35 (0,10 -1,60)	1,75 (0,10 -2,40)
E	0,55 (0,10 -0,90)	0,81 (0,20 -1,90)	0,75 ^A (0,16 -3,40)	0,80 (0,10 -8,10)	1,00 (0,10 -7,00)	0,54 (0,20 -0,80)

Glicoproteína ácida plasmática (mg/dL)						
Momentos (dias)						
Grupo	0	1	3	5	7	15
C	1,60* (0,73 -9,90)	1,83* (0,88 -4,40)	1,53* (0,82 -3,40)	1,45* (0,50 -6,70)	2,93 ^{A*} (0,60 -11,10)	1,99 ^A (0,89 -3,83)
E	1,20 [#] (0,20 -4,50)	0,81 (0,30 -3,40)	0,55 (0,17 -2,97)	0,67 (0,20 -2,40)	0,80 ^B (0,30 -2,29)	1,16 ^{B#} (0,24 -2,39)

Letras minúsculas na linha diferem entre si (teste de Dunn, $P < 0,05$).

Letras maiúsculas na coluna diferem entre si (teste de Mann-Whitney, $P < 0,05$).

* Diferente do Líquido peritoneal no grupo controle (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

Diferente do Líquido peritoneal no grupo experimental (teste de Wilcoxon, $P < 0,05$).

2.4 Discussão

Os animais com hérnias umbilicais apresentaram alterações nas concentrações da produção de proteínas de fase aguda tanto no plasma (transferrina e albumina) como no líquido peritoneal (ceruloplasmina, transferrina, albumina e glicoproteína ácida), que caracterizam a fase inicial da inflamação aguda (COLLINS, 2000).

A análise do líquido peritoneal traz informações importantes sobre as condições inflamatórias da cavidade abdominal (ANDERSON et al., 1995). Estudos prévios mostram que valores de proteínas totais no líquido peritoneal de bezerros podem ser mais baixos que os valores apresentados por animais adultos, o que também foi observado neste estudo tanto nos animais sadios quanto nos com hérnias umbilicais e reforça a proposição de que os valores de referência estabelecidos para os animais adultos não seriam apropriados para analisar-se comparativamente em animais jovens (ANDERSON et al., 1995; BURTON et al., 1997; MENDES et al., 2005).

Os valores de proteínas de fase aguda encontrados no grupo controle mantiveram-se dentro da faixa de normalidade, o que era esperado, já que os animais deste grupo estavam sadios e tiveram um estímulo inflamatório mínimo desencadeado pelas paracenteses seriadas.

As concentrações aumentadas de ceruloplasmina no líquido peritoneal nos animais do grupo experimental antes da cirurgia mostram que a presença da hérnia umbilical por si só poderia desenvolver um processo inflamatório local, pelas alterações anatômicas, circulatórias e de permeabilidade vascular que podem ocorrer no saco herniário e nas estruturas envolvidas, que poderiam ainda se apresentar de forma encarcerada ou não (FIELD, 1988; VOERMANS et al., 2004).

A produção desta proteína pode ter sido estimulada pela produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam células inflamatórias a produzirem outras citocinas (BAUMANN; GAULDIE, 1994) no local da hérnia. Já os aumentos estatisticamente significantes no 1º e 5º dias após a cirurgia, no líquido peritoneal, mostram que o processo inflamatório estabelecido pela

cirurgia pode fazer com que essa proteína de fase aguda aumente rapidamente nesse compartimento devido ao estímulo cirúrgico e às alterações de permeabilidade vascular determinadas pelo processo inflamatório na cavidade abdominal, estimulando a produção e atraindo as PFAs para este compartimento (BAUMANN; GAULDIE, 1994; GRUYS et al., 1994). Mudanças importantes nas concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda desencadeadas por processos inflamatórios no período pós-cirúrgico em bovinos adultos já foram relatadas (GÄNHEIM et al., 2007, HORADAGODA et al., 1999).

Os resultados também estão de acordo com aqueles encontrados em cães, após procedimento cirúrgico de enxerto de aorta, em que os animais apresentaram níveis plasmáticos de ceruloplasmina aumentados em 24 horas (CONNER et al., 1988), em decorrência do estímulo cirúrgico. Porém, em nosso estudo, o líquido peritoneal mostrou mais precocemente o aumento desta proteína, pelo foco inflamatório estar presente na cavidade abdominal. Foi também observado que os valores da ceruloplasmina plasmática estão proporcionalmente relacionados ao volume e tamanho da lesão tecidual em humanos, mas as razões para tal ainda não estão completamente esclarecidas (STAHL, 1987). A incisão cirúrgica a que os animais deste estudo foram submetidos foi pequena, porém responsável por um processo inflamatório local, que estimulou a produção da ceruloplasmina na cavidade abdominal.

Em eqüinos acometidos por abdômen agudo, a ceruloplasmina apresentou aumento estatisticamente significativo no plasma em relação ao grupo controle (FAGLIARI; SILVA, 2002), à semelhança dos nossos resultados entre os grupos controle e experimental no líquido peritoneal, devido às alterações inflamatórias responsivas ao estímulo cirúrgico, já que o aumento da permeabilidade vascular e quimiotaxia devem ter estimulado a atração dessa proteína para a cavidade abdominal para restabelecimento da homeostase (COLLINS, 2000). Isso também justifica o fato da alteração da concentração desta proteína ter se apresentado mais precocemente no líquido peritoneal.

A transferrina é reconhecidamente uma proteína de fase aguda negativa (GRUYS et al., 1994), e não deve aumentar nas fases agudas da inflamação, resultado apresentado no presente estudo em que o aumento significativo da concentração desta proteína ocorreu no 15º dia após a cirurgia, tanto no líquido peritoneal quanto no plasma, quando o processo inflamatório agudo já estava resolvido e a incisão cirúrgica cicatrizada.

Por ser uma proteína relacionada ao transporte de ferro no sangue, quando não está ligada ao ferro, a presença de ferro livre pode predispor o animal à multiplicação bacteriana (RATLEDGE; DOVER, 2000), podendo ser um indicador de complicações pós-cirúrgicas. O fato dos animais deste estudo não apresentarem alterações significantes das concentrações de transferrina durante os primeiros 7 dias da inflamação no líquido peritoneal e ainda terem apresentado diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, pode estar relacionado à ausência de infecção local ou sistêmica antes ou após o procedimento cirúrgico devido à instituição de antibiótico-terapia preventiva. Os animais deste estudo também não apresentaram hemorragia durante o procedimento cirúrgico, o que também poderia disponibilizar o ferro, favorecendo possíveis infecções bacterianas secundárias.

Os resultados observados por Gruys et al. (1994) mostraram que a transferrina não deveria aumentar em processos inflamatórios sem infecção, porém discordam do presente estudo em que foi observado um aumento da concentração de transferrina no 15º dia após a cirurgia tanto no líquido peritoneal quanto no plasma, em relação ao grupo controle, mesmo na ausência de infecção.

A albumina também é considerada uma proteína de fase aguda negativa (GRUYS et al., 1994), e não deveria aumentar na inflamação aguda. Porém, sua concentração já aumentada antes da cirurgia nos animais portadores de hérnia umbilical tanto no líquido peritoneal quanto no plasma, sugere que as alterações locais de permeabilidade vascular e estímulos quimiotáteis do processo inflamatório local (COLLINS, 2000) estabelecido pela presença da hérnia, podem ter estimulado a produção desta proteína nos animais neste

estudo. Por outro lado, o processo inflamatório mínimo que poderia ser desencadeado pelas paracenteses seriadas não foi suficiente para aumentar a concentração desta proteína no líquido peritoneal e no plasma dos animais saudáveis, mostrando que sua produção foi elevada pelo estímulo inflamatório desencadeado pela cirurgia.

O fato da albumina no líquido peritoneal estar aumentada no 5º dia e no plasma no 15º dia, mostrou que o estímulo inflamatório cirúrgico elevou a concentração de albumina de maneira significativa dentro do grupo experimental. O aumento da albumina no líquido peritoneal coincidindo com a sua diminuição no plasma, no mesmo momento (5º dia), sugere que esta proteína extravasou do leito vascular para a cavidade abdominal durante a fase aguda do processo inflamatório pós-cirúrgico e o inverso, observado no 15º dia, indica a resolução deste processo inflamatório local.

Em um recente estudo, vacas com problemas obstétricos apresentaram valores de albumina plasmáticos muito maiores do que vacas com problemas abdominais, e estas tiveram diminuição significativa nos níveis de albumina plasmática após intervenções cirúrgicas (HIRVONEN; PYORALA, 1998), sugerindo que intervenções abdominais podem não ser um estímulo importante para o aumento da concentração de albumina nos animais adultos.

A haptoglobina, embora seja a principal proteína de fase aguda em bovinos (ECKERSALL; CONNER, 1988), não apresentou alterações estatisticamente significativas neste estudo no plasma ou no líquido peritoneal no grupo experimental, o que poderia ser uma característica da faixa etária, associada ao tipo de inflamação. Um estudo mostrou que vacas submetidas à cirurgia cesareana não apresentaram aumentos significativos das concentrações de haptoglobina plasmática e aumentos significativos, observados em animais com distocia, não foram observados antes do 5º dia pós-cirúrgico (SCHONFELDER et al., 2005).

Em um estudo com eqüinos acometidos por abdômen agudo foi demonstrado que a haptoglobina foi a proteína com menor percentual de aumento no grupo controle, e nos animais acometidos por abdômen agudo

houve aumento significativo relacionado aos transtornos metabólicos e não ao procedimento cirúrgico (FAGLIARI; SILVA, 2002). Os resultados aqui apresentados foram semelhantes ao referido estudo uma vez que alterações estatisticamente significantes não foram observadas dentro dos grupos e os animais não apresentavam alterações metabólicas importantes previamente à cirurgia que pudessem estimular a produção de haptoglobina, senão pelo processo inflamatório.

Em um estudo com vacas apresentando problemas abdominais tratados cirurgicamente, notou-se que os valores pré-operatórios de haptoglobina no plasma de animais com reticuloperitonite traumática foram significativamente altos e tiveram um pequeno aumento em seus valores após a cirurgia, mostrando que um processo infeccioso pode estimular mais intensamente a resposta de fase aguda do que um estímulo cirúrgico (HIRVONEN; PYORALA, 1998), o que poderia explicar os resultados aqui observados em relação à haptoglobina, que não apresentou valores significativamente aumentados após o estímulo cirúrgico.

Foi demonstrado também que a haptoglobina pode ser utilizada para monitorar complicações em bovinos após a cirurgia, mas é aconselhável comparar os valores pré-operatórios e pós-operatórios, porque muitos animais com outros problemas abdominais demonstraram valores de haptoglobina aumentados (HIRVONEN; PYORALA, 1998). No presente estudo, os valores plasmáticos de haptoglobina no grupo experimental foram mais baixos que nos animais do grupo controle. A alteração das concentrações plasmáticas de haptoglobina em relação ao líquido peritoneal indica que foi detectada no plasma a mudança na concentração desta proteína de fase aguda. Porém não foi detectada no líquido peritoneal, mostrando que não houve extravasamento desta proteína para este compartimento.

Em bovinos submetidos à infecção experimental, a produção máxima de haptoglobina no plasma foi observada no 6º e 7º dias após a inoculação do vírus respiratório sincicial (HEEGARD et al., 2000). No presente estudo, os animais do grupo experimental não apresentaram nenhum tipo de processo

infeccioso e esperava-se que houvesse aumentos significativos das concentrações de haptoglobina que fosse devido à inflamação decorrente do ato cirúrgico, o que não ocorreu, havendo ainda diminuição significativa dessa proteína no grupo experimental, sugerindo que a haptoglobina pode ter um comportamento diferente no plasma e líquido peritoneal em bezerros em relação aos bovinos adultos. Isso mostra que o estímulo desencadeado pela incisão cirúrgica não estimulou a produção desta proteína neste estudo, o que pode estar relacionado à idade dos animais (BURTON et al., 1997) e ao estímulo cirúrgico e também, por não haver infecção no local da incisão.

Apesar da haptoglobina ser considerada um indicador útil de prognóstico no restabelecimento da homeostase em bovinos e caninos (ECKERSALL; CONNER, 1988) e por estar relacionada também à atividade imunossupressora (MURATA; MIYAMOTO, 1993), Skinner et al. (1991) não observaram nenhuma correlação entre as concentrações de haptoglobina e prognóstico, porém tem sido, relacionada à severidade da infecção.

A concentração de haptoglobina observada nos bezerros com hérnia foi diferente das já relatadas, já que na inflamação aguda esperava-se que houvesse aumento significativo, concordando com estudos que mostram que a mensuração de haptoglobina fornece informações mais importante referentes à condições infecciosas e inflamatórias crônicas do que às inflamatórias agudas em ruminantes (CONNER et al., 1989; KENT, 1992).

A função exata fisiológica da glicoproteína ácida ainda não está totalmente estabelecida (HIRVONEN, 2000), porém sabe-se que ela suprime a blastogênese de linfócitos, possui propriedades imunossupressoras em bovinos (MOTOI et al., 1992; SATO et al., 1995) e também está envolvida no reparo, cicatrização e agregação plaquetária (THOMPSON et al., 1992).

O aumento significativo observado no líquido peritoneal do grupo experimental pode estar relacionado ao processo de cicatrização da incisão cirúrgica, já que não houve processo infeccioso associado. Foi observado também, em estudo com humanos e camundongos, que a glicoproteína ácida inibe o rolamento, marginação e adesão leucocitária ao endotélio da

microvascularização mesentérica (MESTRINER et al., 2007), e apresentou-se aumentada no soro de pacientes humanos com sepse (BRINKMAN et al., 1996). No presente estudo, o aumento significativo da glicoproteína ácida ocorreu no 3º dia após a cirurgia, sem aumentos significativos posteriores. Como os animais não apresentaram infecção, não houve estímulo à produção posterior desta proteína.

O perfil de aumento da concentração da glicoproteína ácida foi substancialmente diferente das outras proteínas de fase aguda com um aumento mais gradual, seguido de um lento declínio nas concentrações plasmáticas, dando suporte ao conceito de que o aumento de glicoproteína ácida pode ser um biomarcador de processos infecciosos crônicos em ovinos (ECKERSALL et al., 2007). No presente estudo, o processo inflamatório agudo presente durante a cirurgia ou também a pouca idade dos animais, pode ter desencadeado uma resposta inflamatória diferente de animais adultos e relação às proteínas de fase aguda.

Em humanos submetidos à cirurgia de vértebras lombares, as concentrações séricas de glicoproteína ácida apresentaram aumento contínuo do 1º ao 7º dia pós-cirúrgico mesmo na presença de agentes anti inflamatórios (MUNÓZ et al., 2004). Foi observado que a glicoproteína ácida teve uma resposta moderada à relativamente pequena à injúria tecidual em bovinos (CONNER et al., 1988) e que traumas musculares induzem fortemente a produção desta proteína no soro (HIRVONEN, 2000), o que mostra que este estudo pode sugerir que o estímulo à produção desta proteína pode ser devido à incisão da linha alba durante a cirurgia e posterior processo cicatricial instalado.

2.5 Conclusão

2.5.1 Foram determinados intervalos de referência para a ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida no plasma e no líquido peritoneal de bezerros portadores de hérnias umbilicais congênitas antes e após a herniorrafia.

2.5.2 Os aumentos da ceruloplasmina e da albumina no plasma e no líquido peritoneal antes da cirurgia mostraram que a produção dessas proteínas foi estimulada pela presença da hérnia.

2.5.3 O aumento das concentrações de ceruloplasmina, albumina e glicoproteína ácida ocorreram primeiro no líquido peritoneal do que no plasma, mostrando que a alteração ocorreu mais precocemente neste compartimento.

2.5.4 A haptoglobina não parece ser um bom marcador de resposta aguda após a cirurgia em bezerros jovens.

2.5.5 As paracenteses seriadas não causaram estímulo inflamatório significativo para alterar a concentração das proteínas de fase aguda na cavidade abdominal de bezerros normais.

2.6 Referências

AL-BADRANY, M.S. Clinical and surgical assessment of umbilical masses in calves. *Iraqi J Vet Sci.* v.14, n.1, p.119-24, 2001.

ANDERSON, D.E. et al. Small-intestinal volvulus in cattle: 35 cases (1967-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.203, n. 8, p.1178-1183, 1993.

ANDERSON, D.E. et al. Comparison of peritoneal fluid analysis before and after exploratory celiotomy and omentopexy in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 55, n. 12, p. 1633-1637, 1994.

ANDERSON, D.E. et al. Comparative analyses of peritoneal fluid from calves and adult cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 56, n.8, p. 973-976, 1995.

ARTHINGTON, J.D. et al. Effect of transportation and commingling on the acute-phase response, growth and feed intake of newly weaned beef calves. *J. Anim. Sci.*, v. 81, n. 5, p. 1120-1125, 2003.

- BAHR, C.; DISTL, O. Frequency of congenital anomalies in cattle: results from the practice in comparison with literature. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, v. 112, n. 4, p. 149-154, 2005.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunol. Today*, v.15, n. 2, p.74-80, 1994.
- BRINKMAN-VAN der LIDEN E.C. et al. *Glycoconj. J.* v.13, p. 27-31.
- BURTON, S, et al. Peritoneal fluid values and collection technique in young, normal calves. *Vet. Clin. Pathol.*, v. 26, n. 1, p. 38-44, 1997.
- COLLINS, T. Inflamação aguda e crônica. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 44-78.
- CONNER, J.G. et al. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.*, v. 44, n. 1, p. 82-88, 1988.
- CONNER, J.G. et al. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Res. Vet. Sci.*, v. 47, n. 2, p. 203-207, 1989.
- COYNE, C.P. et al. Preliminary investigation of alterations in boold viscosity, cellular composition, and electrophoresis plasma protein fraction profile after competitive racing activity in Thoroughbred horses. *Am. J. Vet. Res.*, v.51, v. 12, p.1956-1963, 1990.
- ECKERSALL,, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. *Vet. Res. Commun.*, v.12, n. 213, p. 169-178, 1988.

ECKERSALL, P.D. et al. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Vet. Res.*, v. 3, p. 35, 2007.

FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos e de eqüinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq. Bras. de Med. Vet. e Zootec.* v. 54, n. 6, 2002. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352002000600001&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

FAGLIARI, J.J. et al. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *Am. J. Vet. Res.*, v. 59, n.10, p. 1234-1237, 1998.

FAGLIARI, J.J. et al. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v. 58, n. 3, p. 450-453, 2006.

FIELD, J.R. Umbilical hernia with abomasal incarceration in a calf. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.192, n. 5, p. 665-666, 1988.

GÄNHEIM, C. et al. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. *Vet. J.*, v.173, n.3, p. 645-651, 2007.

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

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in the veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, v. 64, p. 1009-1018, 1994.

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

HIRVONEN, J. et al. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. *J. Dairy Res.*, v.63, n. 3, p. 351-360, 1996.

HIRVONEN, J.; PYORALA, S. Acute phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders. *Vet. J.*, v.155, n.1, p. 53-61, 1998.

HIRVONEN, J. Acute phase response in dairy cattle. 2000. 79 f. Thesis – Faculty of Medicine Veterinary, University of Helsinki, Helsinki, 2000.

HORADAGODA, N.U. et al. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet. Rec.*, v. 144, n.16, p. 437-441, 1999.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br. Vet. J.*, v.148, n. 4, p. 279-282, 1992.

KUSHNER, I.; GEWURZ, H.; BENSON, M. D. C-reactive protein and the acute phase response. *J. Lab. Clin. Med.*, 1981; v.97, n. 6, p. 739-749, 1981.

MENDES, L.C.N. et al. Effect of age and abomasal puncture on peritoneal fluid, hematology, and serum biochemical analyses in young calves. *J. Vet. Intern. Med.*, v.19, n. 6, p. 899-904, 2005.

MESTRINER, F.L.A.C et al. Acute phase protein α -1- acid glycoprotein mediates neutrophil migration failure in sepsis by a nitric oxid-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 104, n. 49, p. 19595-19600, 2007.

MOTOI, Y. et al. Correlation of serum concentration of α 1 glycoprotein with lymphocyte blastogenesis and development of experimentally induced or naturally acquired hepatic abscesses in cattle. *Am. J. Vet. Res.*, v. 53, n. 4, p. 574-579, 1992.

MÜLLER, W. et al. Congenital umbilical hernia in the calf (Zum angeborenen Nabelbruch beim Kalb). *Monatshefte für Veterinärmedizin*, v.43, p. 161-163, 1988.

MUNÓZ, M. et al. Acute phase response in patients undergoing lumbar spinal surgery: modulation by perioperative treatment with naproxen and famotidine. *Eur. Spine J.*, v.13, n. 4, p. 367-373, 2004.

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

MURATA, H.; MIYAMOTO, T. Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *Br. Vet. J.*, v.149, n. 3, p. 277-283, 1993.

NIKUNEN, S. et al. Association of bovine respiratory disease with clinical status and acute phase proteins in calves. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 30, n. 3, p. 143-151, 2007.

RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 54, p. 881-941, 2000.

RINGS, D.M. Umbilical hernias, umbilical abscesses, and urachal fistulas: surgical considerations. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, v.11, n. 1, p. 137-148, 1995.

ROMERO, A. et al. Effect of transferrin concentration on bacterial growth in human ascitic fluid from cirrhotic and neoplastic patients. *Eur. J. Clin. Invest*, v. 23, n.11, p. 699-705, 1993.

REBHUN, W.C; GUARD C.; RICHARS, C.M. Diseases of dairy cattle. Baltimore: *Williams & Wilkins*, 1995. 530p.

SALONEN, M. et al. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Res. Vet. Sci.*, v.60, n. 1, p. 88- 91, 1996.

SATO, S.; SUZUKI, T.; OKADA, KI. Supression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 57, n. 2, p. 373-375, 1995.

SCHÖNFELDER, A. et al. The changes of acute phase protein haptoglobin in cattle during spontaneous labor and cesarean section with or without torsio uteri intrapartum. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.*, v.118, n. 5/6, p. 240-246, 2005.

SKINNER, J.G.; BROWN, R.A.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet. Rec.*, v.128, n. 7, p.147-149, 1991.

STAHL, W.M. Acute Phase protein response to tissue injury. *Crit. care med.*, v. 56, n. 6, p. 545-550, 1987.

THOMPSON, D.; MILFORD-WARD, A.; WHICHER, J. T. , The value of acute phase protein measurements in clinical practice. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 29, pt. 2, p.123-131, 1992.

TRENT, A.M. Surgical management in umbilical masses in calves. *Bovine Pract.*, v.22, p.170-173, 1987.

VOERMANS, M. et al. Incarcerated umbilical hernia in the horse: a case with a review of the literature. *Tijdschr Diergeneeskd.*, v.129, n.5, p.142-149, 2004.

WEBER, K. e OSBORN, M. The rebiability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-poliacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, v. 244, p. 4406-4412, 1969.

YOSHIGA, T. et al. Mosquito transferrin, an acute-phase protein that is up-regulated upon infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 94, n.23, p. 12337–12342, 1997.