

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS
NA AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE
DE LEITÕES NA FASE DE MATERNIDADE**

PAULA TUSSINI ONIDA

Botucatu – SP
Abril 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS
NA AVALIAÇÃO DA IMUNIDADE
DE LEITÕES NA FASE DE MATERNIDADE

PAULA TUSSINI ONIDA

Dissertação apresentada junto ao
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária, área de Clínica
Veterinária.

Orientadora: Profa. Ass. Dra. Elizabeth
Moreira dos Santos Schmidt

Nome: Paula Tussini Onida

Título: **Eletroforetograma de proteínas séricas na avaliação da imunidade de leitões na fase de maternidade**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth M. dos Santos Schmidt

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof.Dr. Ivan Roque de Barros Filho

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Setor de Ciências Agrárias – UFPR – Curitiba

Profa. Dra. Regina Kiomi Takahira

Membro

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da Defesa: 30 de abril de 2013.

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos e amados pais, Jucyara e Paulo, que me ensinaram a perseverar e a confiar em Deus. Sem vocês jamais teria alcançado tão longe meus objetivos. São os responsáveis pelo ser humano que sou. Amo vocês e só tenho a agradecer por todo o empenho, carinho e dedicação à minha excelente criação e educação. **Obrigada por serem a minha referência de tantas maneiras e estarem sempre presentes na minha vida de uma forma indispensável.**

Ao meu amado marido, Onadil, por ser **um grande companheiro, sempre atencioso e compreensivo** neste período tão importante da minha vida profissional. Obrigada por cuidar de mim e me acolher quando mais precisei.

Ao meu amado irmão, Daniel, **companheiro de toda a minha jornada.**

E à minha queridíssima avó, Altair, que junto aos meus pais, **dispensou carinho, empenho e dedicação em minha formação.**

Pai, Mãe, Vó, Dani e Ná

obrigada pela confiança, motivação,

compreensão, dedicação e amor

que sempre depositaram em mim,

e que sem vocês eu jamais

conseguiria.

AGRADECIMENTOS

Ao Curso de **Pós Graduação em Medicina Veterinária da FMVZ - câmpus de Botucatu**, em especial ao **José Roberto de Lalla Júnior** que sempre se demonstrou disposto a ajudar e por ter dispensado tanta compreensão e apoio nos momentos mais difíceis. Obrigada pela oportunidade de estudar nesta instituição tão renomada possibilitando que eu tenha um futuro ainda melhor.

A **minha orientadora Prof. Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt**, pela dedicação, paciência e compreensão com as diversas fases desta empreitada. Obrigada pela força nos momentos mais difíceis. Mas acima de tudo, obrigada por possibilitar a realização deste sonho.

Ao **Prof. Titular José Jurandir Fagliari do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV - UNESP/câmpus de Jaboticabal** pelo auxílio na elucidação dos gráficos deste experimento.

Ao **Paulo César da Silva do Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, câmpus de Jaboticabal**. Obrigada pela paciência e disponibilidade em ensinar a técnica de eletroforese.

Ao **Professor Cabral da PUC-Poços de Caldas** que tornou possível a realização deste projeto, sem sua ajuda e disponibilidade jamais teríamos realizado este estudo. Muito obrigada pela indicação da granja e pela confiança em permitir que eu pudesse em seu nome realizar minhas coletas.

Aos **Professores Dra. Regina K. Takahira e João Carlos Pinheiro Ferreira da FMVZ, câmpus da Unesp – Botucatu**, pela inestimável contribuição no momento da minha qualificação.

Ao **colega de pós-graduação Flávio Elston**. Muito obrigada pela enorme presteza em me ajudar, foi inestimável.

Aos **colegas Saulo Martins de Oliveira e Sérgio Prudente Pires Junior da PUC Poços de Caldas**, alunos do Prof. Cabral e que se disponibilizaram a me auxiliar em todas as coletas. MUITÍSSIMO obrigada sem vocês não teria conseguido dar prosseguimento.

Ao **Márcio José Figueira - Auxiliar Agropecuário do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, câmpus de Botucatu** pelo auxílio neste estudo.

A **Deus**, com certeza sem **Ele** nada disso teria sido possível, pois todas as vezes em que pensei que não teria mais chance uma porta se abriu. **Vem dEle tudo o que sou, o que tenho e o que espero.**

Ao **meu querido marido, Onadil Vieira Junior**, que mesmo nestes últimos tempos tendo enfrentado tantas adversidades foi, e sempre será **meu companheiro fiel de todas as horas, é quem cuida de mim, torce por mim e batalha junto comigo** por uma vida melhor, para nós e nossos pais. **Vida**, obrigada por tudo.

A **querida amiga Prof. Dra. Márcia Valéria Rizzo Scognamillo**, minha referência em dedicação ao estudo e à pesquisa, em sabedoria e gentileza, grande mestre e guia naquilo que me proponho. Tudo começou com você e nosso estudo com o ganho de peso em leitões usando a acupuntura. A partir daí tudo fluiu. MUITÍSSIMO obrigada por ter feito parte da minha vida, por criar oportunidades e por estar sempre pronta a me ajudar, porque sempre que eu preciso você está presente.

A **querida amiga Livia Fagundes**, que sempre me estendeu a mão desde a faculdade de medicina veterinária na UFF até a minha chegada à Botucatu.

A **Equipe da Clínica VetLife – Carla Rejane Rocha e Desirée Schiffer Mariotti**. Obrigada por me ampararem nos momentos em que eu mais precisei.

A **Granja Santa Elisa em Águas da Prata/SP** que permitiu que este estudo pudesse se concretizar. Obrigada pela oportunidade e confiança.

Aos **leitões**, que participaram deste projeto, por terem colaborado e serem os grandes responsáveis pelo desenvolvimento e motivação, e que se tornaram seres essenciais para o meu aprimoramento pessoal e profissional.

Aos **meus cães, Thor, Lucky, Rayla, Snoopy e Igo** que me acompanham em tudo, amigos fiéis e companheiros de estudo madrugadas a fio. Vocês são a razão do meu viver.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Proteinograma sérico dos leitões antes e 48 horas após o nascimento ----- 25

Tabela 2 – Atividades séricas de Gama glutamiltransferase em leitões, antes e 48 horas após o nascimento ----- 26

ABREVIATÖES

SAA - Amiloide A sérico

AGP - Alfa-1 Glicoproteína Ácida

°C – graus Celsius

Cp - ceruloplasmina

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GGT – gama glutamiltransferase

g – gramas

g/dL – grama por decilitro

Hp - haptoglobina

IgG – imunoglobulina G

IL-1 – interleucina - 1

IL-6 – interleucina – 6

kDa - kilodáltons

kD – kilodáltons

mA – miliamperes

mg/dL – miligrama por decilitro

µL – microlitros

mL – mililitros

PBS – tampão-fosfato salino

PCR – proteína C reativa

PFA – proteína de fase aguda

pH – potencial hidrogeniônico

PigMAP - *Pig major acute phase protein*

SDS - dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio

TEMED – tetrametiletenodiamina

Tf – transferrina

U/L – unidade por litro

Unesp – Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. PROTEÍNAS	15
2.2. GAMA GLUTAMILTRANSFERASE	19
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. ANIMAIS	21
3.2. AMOSTRAS	21
3.3. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA	21
3.4. GAMA GLUTAMILTRANSFERASE	22
3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	23
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	31
7 REFERÊNCIAS.....	32
8 ARTIGO CIENTÍFICO	40
Anexo	55

ONIDA, P.T. **Eletroforetograma de proteínas séricas na avaliação da imunidade de leitões na fase de maternidade.** Botucatu, 2013. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Neste estudo foi avaliado o proteinograma sérico de leitões neonatos pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em amostras de soro obtidas ao nascimento, antes da ingestão do colostro, e 48 horas após o nascimento. Foi também avaliada a eficácia da imunização passiva, após a ingestão do colostro, pela determinação da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (GGT) no soro desses animais. Amostras de 1,0mL de sangue foram coletadas por venopunção da jugular de 40 leitões, nestes dois momentos. Houve aumento significativo ($p<0,05$) para as concentrações das proteínas séricas totais após a ingestão do colostro devido o aumento significativo ($p<0,05$) das concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve nos leitões após a ingestão do colostro. As concentrações séricas da enzima GGT apresentaram diminuição significativa ($p<0,05$) após a ingestão do colostro. Foi observada a presença da fração ceruloplasmina no traçado eletroforético, antes e após a ingestão do colostro. Além disso, uma proteína de 23kDa, não-identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético dos leitões e apresentou aumento significativo ($p<0,05$) após a ingestão do colostro.

Palavras-chave: Eletroforese; Suínos; Proteínas séricas; Imunidade

ONIDA, P.T. **Electrophoretogram of serum proteins in the evaluation of the immunity of piglets**. Botucatu, 2013. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

This study evaluated the serum protein concentrations of newborn piglets by means of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in serum samples obtained at birth before colostrum intake, and 48 hours after ingestion of colostrum. The efficacy of passive immunization after ingestion of colostrum was also evaluated by the determination of gamma glutamyltransferase serum activities (GGT) of these animals. Samples of 1.0 mL of blood were collected by jugular venipuncture of 40 piglets in these two different moments. A significant increase ($p<0.05$) of total serum protein concentrations after ingestion of colostrum was found. There was also a significant increase ($p<0.05$) in serum concentrations of IgG (heavy and light chains) after ingestion of colostrum. Serum activities of GGT were significantly decreased ($p<0.05$) after ingestion of colostrum. The presence of ceruloplasmin was observed in all animals before and after colostrum intake. A 23kDa protein, was observed in all piglets and increased significantly ($p<0.05$) after colostrum intake.

Key words: Electrophoresis; Piglets; Serum proteins; Immunity.

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira vem apresentando um grande crescimento em sua produção e exportação. A partir da abertura comercial no início dos anos 90 e com a desvalorização cambial em 1999, o Brasil conseguiu aumentar sua produção e ampliar suas exportações no mercado internacional, passando a configurar a partir de 2006, como quarto maior produtor e exportador de carne suína mundial (FIALHO, 2006). Considerando a importância da produção de carne suína inspecionada para atender aos padrões internacionais de segurança alimentar e o desejo dos consumidores em adquirir um alimento mais saudável, torna-se relevante estudar o crescimento da produção, e também indicadores de evolução da técnica da atividade, como os efeitos da dimensão do rebanho, do peso médio da carcaça e da taxa de desfrute (CUNHA et al., 2009).

A partir da constatação de que os neonatos apresentam deficiências na imunidade passiva e, conseqüentemente, maiores índices de mortalidade e um menor desempenho produtivo, houve um grande estímulo no desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao tema (FEITOSA, 2001).

O metabolismo e a quantidade de proteínas presentes no soro de animais neonatos podem sofrer influência de diversos fatores, entre os quais se devem destacar a ingestão do colostro e a idade. Ao nascimento, principalmente potros, bezerros e leitões, exibem baixas concentrações de proteínas e após receberem o colostro, apresentam um aumento no total das proteínas devido à absorção intestinal de macromoléculas, incluídas as imunoglobulinas (FELDMAN et al., 2000; BUTLER, 1969). Os anticorpos de origem materna transferidos ao neonato pelo colostro são essenciais à sua sobrevivência (EDWARDS et al., 1982).

Atualmente, em termos de pesquisa, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) vem sendo utilizada apesar de não estar ainda totalmente validada para as diferentes espécies de animais domésticos. Com esta técnica, as proteínas não são mais agrupadas em regiões globulares familiares, mas numa série de bandas definidas pela sua massa molecular relativa (ECKERSALL, 2008).

Dentre os testes utilizados para verificar a transferência de imunidade passiva, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) apresenta vantagens por permitir a identificação e a quantificação de imunoglobulinas do tipo G (IgG), considerada a mais importante na imunização passiva, o que permite orientar o manejo de animais hipogamaglobulinêmicos (FAGLIARI et al., 2006). E, se não houver assistência imunológica materna adequada provida pelas imunoglobulinas e outros fatores presentes no colostro, os neonatos têm grande chance de sucumbir a infecções que seriam inócuas a animais adultos (REECE, 2007). Assim, a compreensão da dinâmica da imunidade passiva em leitões é de extrema importância para a prevenção de doenças.

Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar o proteinograma sérico de leitões neonatos, antes de ingerir o colostro em até seis horas após o nascimento e 48 horas após seu nascimento, a fim de avaliar a utilidade da eletroforese como ferramenta para detecção da eficácia da transferência da imunidade passiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O tipo de placenta em fêmeas suínas não permite a transferência de anticorpos para os fetos durante a gestação (DALLANORA e MACHADO, 2010). Além de diferirem na quantidade de superfície uterina à qual estão aderidas, as placentas também diferem no número de camadas de células que separam o sangue materno do fetal. Em éguas, porcas, ovelhas e vacas, o córion fetal superpõe-se ao epitélio uterino materno (placentação epiteliocorial), ao passo que, em gatas e cadelas, o córion se superpõe ao endotélio dos vasos maternos (placentação endoteliocorial). Em roedores e na maioria dos primatas, o córion invade a mucosa uterina e rompe os capilares maternos, de maneira a ficar embebido no sangue materno (placentação hemocorial) (EDWARD, 2008).

As imunoglobulinas são produzidas pelo baço, nódulos linfáticos e medula óssea a partir do estímulo desencadeado pelo antígeno presente na corrente sanguínea ou no tecido (ECKERSALL, 2008). No entanto, as imunoglobulinas estão em altas concentrações no colostro, e pelo seu consumo, o neonato recebe imunidade passiva contra patógenos adquiridos pela mãe. Porém, os neonatos geralmente apresentam um período limitado (em até 36 horas) no qual as imunoglobulinas podem ser absorvidas pelo intestino. Portanto, a ingestão do colostro durante este período é importante para assegurar a presença de imunoglobulinas no recém-nascido (DAVIDSON e STABENFELDT, 2008).

Nas granjas de alta prolificidade, torna-se necessária a intervenção para garantir a ingestão adequada de colostro por todos os leitões até as primeiras seis horas após o parto, pois as concentrações de imunoglobulinas, especialmente as do tipo IgG diminuem drasticamente após este período e a capacidade de absorção pelo intestino do animal também vai sendo reduzida, em função da diminuição gradativa da permeabilidade da mucosa intestinal às imunoglobulinas que têm peso molecular relativamente alto (DALLANORA e MACHADO, 2010).

O metabolismo e a quantidade de proteínas no soro de animais neonatos pode sofrer influência de diversos fatores, entre os quais se devem

destacar a ingestão do colostro e a idade. Ao nascimento, principalmente potros e bezerros, apresentam pequenas concentrações de proteínas e após receberem o colostro, ocorre um aumento nestas concentrações devido à absorção intestinal de macromoléculas, incluídas as imunoglobulinas (FELDMAN et al., 2000).

2.1. Proteínas

As proteínas são compostos indispensáveis à vida e compõem a base de estruturas de células, órgãos e tecidos. Agem como catalisadores em reações bioquímicas, tampão ácido-base, como nutrientes, manutenção da pressão osmótica e até como hormônios na regulação endócrina. Devido ao seu significado biológico e múltiplas funções exercidas no organismo, a avaliação dos níveis séricos de proteínas totais e sua frações obtidas por eletroforese, representa um importante auxílio ao diagnóstico clínico. No plasma, as principais funções estão relacionadas com a participação na coagulação sanguínea, na defesa do organismo contra patógenos (imunoglobulinas), no transporte de metabólitos (albumina, transferrina), regulação do metabolismo, entre outras (ECKERSALL, 2008).

As imunoglobulinas agem como anticorpos e são produzidas em resposta a antígenos. Os patógenos invasores, um trauma ou um fator estressor ativam a imunidade inata representada por cílios, mucosa e pele, que juntos formam a primeira linha de defesa do organismo. Esta resposta inata se inicia com as ações de macrófagos promovendo a liberação das citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa, que agem como mediadores no sangue e, no fígado induzem a produção de proteínas de fase aguda (PFAs) que serão liberadas na corrente sanguínea (HEEGARD et al., 2011; ECKERSALL, 2008).

Reações inflamatórias, infecciosas ou qualquer outro tipo de dano tecidual podem desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias (van MIERT, 1995). Essas citocinas, juntamente com óxido nítrico e glicocorticoides podem desencadear e modular a resposta de fase aguda sistêmica proveniente da produção, pelo fígado, de PFAs (GRUYS et al., 1994). As concentrações das PFAs na circulação estão relacionadas à severidade do distúrbio e a

extensão do dano tecidual nos animais afetados. A quantificação de suas concentrações séricas pode fornecer informações diagnósticas e prognósticas se as amostras forem colhidas nos momentos adequados (MURATA et al., 2004).

As PFAs são classificadas como sendo positivas ou negativas. As PFAs positivas são proteínas que apresentam aumento em sua concentração sérica após algum evento infeccioso, inflamatório ou traumático. As principais PFAs positivas são: proteína-C reativa (CRP), haptoglobina (Hp), ceruloplasmina (Cp), amilóide A sérico (SAA), alfa-1 glicoproteína ácida (AGP) e a PigMAP. As PFAs negativas são proteínas que apresentam diminuição em sua concentração sérica mediante eventos infecciosos, inflamatórios ou traumáticos, como a albumina e a transferrina (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008).

A classificação da resposta das PFAs é dividida em maior, moderada e menor. A CRP e SAA são classificadas como resposta principal. A AGP, Cp e Hp são classificadas como resposta moderada (CERÓN e MARTINEZ-SUBIELA., 2004; ECKERSALL, 2008).

As inflamações e as respostas das PFAs são comuns em todas as espécies, mas apresentam sensibilidade variável de acordo com as diferentes enfermidades nas diferentes espécies animais (ECKERSALL, 2008; CRAY, 2012). Em suínos, as PFAs foram utilizadas para avaliar alterações causadas pelo circovírus, doença de Aujeszkey, micoplasma e nos vírus responsáveis por síndromes respiratórias (CRAY, 2012).

As principais frações proteicas do soro em suínos são:

Albumina: é sintetizada no citoplasma de hepatócitos, é uma proteína que auxilia o transporte de substâncias que são moderadamente solúveis em meio aquoso e também evita a perda pelo rim de importantes moléculas pequenas. É uma proteína de fase aguda negativa e sua concentração diminui gradualmente durante doenças infecciosas e inflamatórias (ECKERSALL, 2008)

Transferrina (Tf): considerada uma PFA negativa, sua concentração diminui em resposta a inflamação (TOHJO et al., 1995). Está relacionada a

imunidade inata por se ligar aos íons ferro (LAW, 2002). Em suínos pode apresentar alteração em sua concentração, como observado na salmonelose aguda experimental (KRAMER et al., 1985).

Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP): é uma sialoglicoproteína sintetizada e secretada principalmente pelo hepatócitos, mas também há relatos de produção extra-hepática. A AGP contribui na manutenção da homeostasia por reduzir os danos teciduais associados com processos inflamatórios. Suas principais funções são: agir como proteínas de ligação e imunomodulação. Assim como a albumina, é uma importante proteína de ligação e transporte de substâncias endógenas e exógenas (FOURNIER et al., 2000). Em leitões neonatos sadios, a AGP apresenta altas concentrações (mais que 40 vezes os valores de referência para adultos). No entanto, tais concentrações declinam rapidamente após o nascimento (ITOH et al., 1993). Esta proteína é importante em bovinos e tem sido utilizada para monitorar processos inflamatórios (ECKERSALL et al., 2001). Em suínos esta proteína tem sua concentração aumentada em animais com doenças infecciosas tais como, meningite e pneumonia (ITOH et al., 1993).

Ceruloplasmina (Cp): é uma glicoproteína do soro (ENDO et al., 1982; MACKIEWICZ et al., 1987). É sintetizada primariamente no fígado, mas também pode ser produzida em locais extra-hepáticos (PAN et al., 1996). Hellman e Gitlin (2002) demonstraram que a Cp é uma ferroxidase, e esta observação, em conjunto com estudos realizados por Cartwright et al. (1968) que comprovou a deficiência de cobre em suínos, possibilitou sugerir um papel para a Cp na homeostase de ferro. A Cp é um reagente de fase aguda, e aumenta a sua concentração no soro durante a inflamação, infecção, trauma e em grande parte como resultado do aumento da transcrição de genes em hepatócitos mediadas pelas citocinas inflamatórias (GITLIN, 1988).

Embora o fígado seja a fonte predominante de Cp sérica, Cp extra-hepática também é sintetizada em muitos tecidos, incluindo pulmão, baço, testículos e cérebro (ALDRED et al., 1987; FLEMING e GITLIN, 1990; KLOMP et al., 1996; YANG et al., 1996). O epitélio das vias respiratórias é a principal fonte de Cp no pulmão (YANG et al., 1996). A concentração desta proteína aumenta ao longo da gestação, e estudos indicam que este aumento ocorre

devido à síntese endógena, sem qualquer transferência significativa de Cp materna pela placenta (GITLIN e BIASUCCI, 1969).

Proteína C reativa (CRP): tem um papel importante na proteção contra infecção, na resolução de dano tecidual, prevenção e regulação da resposta inflamatória (MOLD et al., 2002). Estruturalmente, é um pentâmero cíclico que se liga com uma variedade de bactérias patogênicas ou antígenos intracelulares de células danificadas (Du CLOS e MOLD, 2001). A CRP tem um peso molecular de aproximadamente 115 kDa (PEPYS e BALTZ, 1983). Em suínos, CRP tem sido considerada um bom marcador para identificação de lesões inflamatórias (ECKERSALL et al., 1996). Pode ser também utilizada como parâmetro no monitoramento do estado geral de saúde em suínos, inclusive para avaliação de estresse do rebanho e como biomarcadores de bem-estar animal (BURGER et al., 1998).

Haptoglobina (Hp): é uma alfa-globulina que se liga a hemoglobina livre (WAGENER et al., 2001). A Hp tem diversos efeitos imunomoduladores (EL-GHMATI et al., 1996), pois apresenta efeito inibitório sobre a quimiotaxia, fagocitose e possui atividade antibacteriana (ROSSBACHER et al., 1999). Em suínos, a Hp tem sido utilizada para monitorar a ocorrência e desenvolvimento de condições inflamatórias natural ou experimental por tratamento com injeção de terebintina (PETERSEN et al., 2001). O peso molecular da Hp suína é de aproximadamente 120.000 daltons (HEEGARD et al., 1998). A sua função primária é evitar a perda de ferro por meio da formação de complexos muito estáveis com a hemoglobina livre no sangue. É considerada uma PFA diagnosticamente útil na maioria das espécies de mamíferos domésticos. Em leitões recém-nascidos, a sua concentração sanguínea é baixa (PETERSEN et al., 2004).

Amilóide A sérico (SAA): é uma apolipoproteína de fase aguda. Esta proteína está envolvida no recrutamento quimiotático de células inflamatórias para o local da infecção (XU et al., 1995). Um aumento da concentração sérica de SAA foi observado em porcos após procedimentos cirúrgicos (JACOBSON

et al., 2001) e em infecção experimental com *Actinobacillus pleuropneumoniae* (HEEGARD et al., 1998).

Pig major acute phase protein (PigMap): tem se mostrado como uma importante proteína de fase aguda positiva em suínos e tem sido determinada em uma variedade de modelos experimentais e em diferentes situações fisiológicas e patológicas. A concentração de pig-MAP foi estudada na inflamação aguda induzida por terebintina e no trauma cirúrgico (ALAVA et al., 1997).

2.2. Gama Glutamiltransferase

A gama glutamiltransferase (GGT) é uma enzima utilizada para o auxílio no diagnóstico de doenças do fígado dos animais é encontrada principalmente nas células com altas taxas de secreção ou absorção, e está presente no fígado, rim, pâncreas e intestino. A GGT é considerada um marcador sérico principalmente para doenças do sistema hepatobiliar associado com colestase (BRAUN et al., 1983). Animais recém-nascidos de algumas espécies apresentam concentrações elevadas de GGT sérica após a ingestão do colostro. Em bezerros, a relação direta entre GGT sérica e as concentrações de imunoglobulina, permite afirmar que esta enzima está diretamente relacionada ao sucesso da transferência de imunidade passiva (PARISH et al., 1997; PERINO et al., 1993). Fagliari et al. (1996) verificaram a existência de correlação positiva entre os valores de gamaglobulina e a atividade de GGT, com variações acentuadas entre as concentrações séricas no momento do nascimento e aqueles verificados 24 a 30 horas após o nascimento em bezerros.

As avaliações dos teores de proteínas totais e suas frações propiciam subsídios para a adequada interpretação do estado de hidratação, bem como de inflamação, infecção, doença imunomediada e alteração da síntese protéica. O estudo da cinética das proteínas de fase aguda e das imunoglobulinas pode ser útil para a compreensão da fisiopatogenia dos mais variados processos inflamatórios/infecciosos, contribuindo para o diagnóstico precoce e controle das enfermidades, avaliação da resposta vacinal, bem como para definição do prognóstico (CRAY e TATUM, 1998).

A eletroforese é uma técnica na qual os diferentes tipos de proteínas são separados, possibilitando a determinação de suas frações relativas em uma amostra de material biológico. A separação das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) se baseia na polimerização de acrilamida, para formar o gel que age como uma “peneira molecular” que retarda a migração de proteínas dependendo do seu tamanho. As proteínas irão se concentrar numa nítida banda antes de entrar no gel, e uma vez neste gel, serão separadas por meio de um equilíbrio de massa e carga de cada proteína (GORDON, 1995).

A literatura consultada apresenta alguns estudos de determinação das concentrações das PFAs em espécies como bovinos, caninos, felinos e suínos, após agressão tecidual, seja infecciosa, traumática, neoplásica. No entanto, são escassas as publicações correlacionando o fracionamento eletroforético, imunidade passiva e determinação das PFAs em leitões recém-nascidos.

O objetivo deste estudo é avaliar o proteinograma sérico com o emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em amostras de soro de leitões na fase de maternidade, ou seja, ao nascimento, antes da ingestão do colostro, e 48 horas após o nascimento e determinação da atividade da GGT no soro destes mesmos leitões, como ferramenta para monitorar a transferência passiva de imunidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Os leitões foram originados de porcas que tiveram seu parto induzido 24 horas antes do previsto mediante aplicação de Veteglan Luteolítico (D (+) cloprostenol) (Laboratório Hertape Calier®) de acordo com o manejo da granja, na dosagem de 0,5mL via subcutânea na mucosa vaginal. Assim que as matrizes iniciavam o parto, aplicava-se Decomoton® (carbetocina) na dosagem de 0,5mL via subcutânea na mucosa vaginal.

3.2. AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 1,0mL de sangue em tubos de plástico siliconizados (Vacutainer, Becton Dickinson®, Franklin Lakes, USA), sem anticoagulante pela venopunção da jugular de 40 leitões, provenientes de cinco porcas, em dois momentos distintos: até seis horas após o nascimento, ou seja, antes da ingestão do colostro, e 48 horas após o nascimento. Estes animais eram da linhagem Penarlan, de origem francesa, oriundos de uma granja no município de Águas da Prata/SP.

As amostras foram centrifugadas por 15 minutos após a coleta do sangue para a obtenção do soro que foi fracionado em duas alíquotas, armazenados em frascos do tipo *ependorf* e mantidos a -20°C .

3.3. ELETROFORETOGRAMA DE PROTEÍNAS SÉRICAS

Para a determinação das concentrações das proteínas pelo método do SDS-PAGE, dosou-se primeiramente as concentrações das proteínas totais pelo método do biureto (GORNALL et al., 1949) utilizando-se kit bioquímico comercial (Labtest Diagnóstica®) e leitura em espectrofotômetro automático (Cobas Mira - Roche®). Essas análises foram realizadas no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, campus de Jaboticabal.

Os eletroforetogramas das proteínas foram obtidos em matrizes de geis de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado segundo técnica descrita por LAEMMLI (1970) modificada e por WEBER e OSBORN (1969). A polimerização do gel ocorreu pela adição de 15µL de tetrametiletenodiamina (TEMED) e 0,3µL de persulfato de amônia (10%). A placa contendo o gel foi colocada em suporte apropriado em contato com uma cuba superior contendo solução tampão (pH 8,5), composta de 36,3g de tris-base, 112,5g de glicina, 10g de SDS e água destilada estéril suficiente para completar um litro de solução. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e gel de empilhamento a 4%. Para o fracionamento das proteínas, as amostras foram preparadas utilizando-se 10µL de soro sanguíneo diluídos em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5µL das amostras foi depositada no fosso do gel.

A placa foi colocada em suporte apropriado, e submetida à corrente elétrica a 20 mA, em fonte adequada. Terminada a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de Azul de Comassie 0,2%, no agitador horizontal, para uma coloração uniforme e, em seguida, foi retirado o excesso de corante com solução descorante, até que as frações se apresentassem nítidas. Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (SHIMADZU CS-9301, Kyoto - Japão) por intermédio do escaneamento das amostras. Para a identificação das proteínas foram utilizados marcadores (SIGMA MARKER TM, wide range, 6,5 a 200 KD) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29 e 20 KD. Para a avaliação densitométrica das bandas proteicas foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, campus de Jaboticabal.

3.4. DETERMINAÇÃO DA GAMA GLUTAMILTRANSFERASE

A atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase foi determinada por método cinético colorimétrico com auxílio de kit bioquímico comercial

(Katal®) e leitura em espectrofotômetro automatizado (Cobas Mira-Roche®). Essas análises foram realizadas no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, câmpus de Botucatu.

3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os dados dos eletroforetogramas de proteínas em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e das atividades de gama glutamiltransferase, antes da ingestão do colostro e 48 horas após o nascimento, foram analisados pelo ANOVA e aqueles com diferença significativa foram submetidos ao Teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$) (Statview® 5.0).

4 RESULTADOS

Os resultados dos proteinogramas séricos de leitões da linhagem Penarlan, obtidos pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), avaliados até seis horas após o nascimento, ou seja, antes da ingestão do colostro, e quarenta e oito horas após o nascimento estão apresentados na Tabela 1. Os traçados eletroforéticos apresentaram quatro frações proteicas nos leitões antes da ingestão do colostro e seis frações proteicas após a ingestão do colostro.

Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os momentos avaliados para as concentrações séricas de proteína total, IgG cadeia leve e pesada e de uma proteína não identificada nominalmente, de peso molecular 23kDa. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as concentrações de ceruloplasmina, transferrina e albumina entre os momentos avaliados.

A Tabela 2 apresenta os resultados da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (GGT) antes e após a ingestão do colostro pelos leitões. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois momentos avaliados.

Tabela 1 – Proteinograma sérico em leitões antes da ingestão do colostro e 48 horas após o nascimento

Proteínas		Peso Molecular (kD)	Média ± desvio padrão	Valores mínimos	Valores Máximos
Proteína sérica total (g/dL)	M1		2,7 ± 0,6*	1,8	4,9
	M2		6,0 ± 1,1*	3,7	9,6
Ceruloplasmina (mg/dL)	M1	93	46,0 ± 19,3	26,7	130,8
	M2		42,8 ± 21,8	18,3	116,4
Transferrina (mg/dL)	M1	76	512,7 ± 248,8	79,5	1.319,3
	M2		467,8 ± 172,2	266,5	1.084,1
Albumina (g/dL)	M1	60	1,8 ± 0,3	1,1	2,9
	M2		2,0 ± 0,4	1,3	3,0
IgG cadeia pesada (mg/dL)	M1	55	0 ± 0*	0	0
	M2		2.253,4 ± 613,0*	1.293,5	3.748,5
IgG cadeia leve (mg/dL)	M1	22	0 ± 0*	0	0
	M2		607,7 ± 288,3*	39,4	1.117,5
23 kD**	M1	23	95,7 ± 27,7*	45,7	160,0
	M2		178,0 ± 48,9*	118,2	358,6

*diferença significativa ($p < 0,0001$); **proteína não identificada nominalmente. M1 – antes ingestão do colostro; M2 – 48h após o nascimento.

Tabela 2 – Atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT) em leitões, antes da ingestão do colostro e 48 horas após o nascimento

GGT	Média $\pm$ dp (U/L)	Valores mínimos	Valores máximos
M1	44,4 $\pm$ 21,6 *	8,2	89,7
M2	31,0 $\pm$ 14,5 *	12,3	70,0

M1 – antes ingestão do colostro; M2 – após o nascimento. * Diferença significativa (p = 0,0012)

5 DISCUSSÃO

A literatura é escassa em relação à avaliação da transferência de imunidade, a concentração de imunoglobulinas e a concentração de GGT sérica em leitões. No entanto, em comparação com outras espécies estudadas, Feitosa et al. (2001) observaram que em bovinos, as concentrações séricas de imunoglobulinas têm sido utilizadas com a finalidade de monitorar a imunidade adquirida pela ingestão de colostro, uma vez que a falha na transferência de imunidade passiva está diretamente relacionada com maiores índices de mortalidade.

As concentrações médias obtidas para as atividades séricas de GGT nos leitões, antes e após a ingestão do colostro (Tabela 2), estão de acordo com os valores de referência (10 a 60U/L) para animais adultos da espécie suína (KANEKO et al., 1997). De acordo com os resultados da Tabela 2, diferentemente do esperado, a atividade sérica de GGT dos leitões foi significativamente inferior ($p < 0,05$) antes da ingestão do colostro quando comparada com as amostras obtidas 48 horas após o nascimento. Da mesma forma como observado em caprinos, quando a atividade sérica da GGT foi maior 24 horas após a ingestão do colostro, com diminuição significativa na sua atividade 48 e 72 horas após o fornecimento do colostro (SILVA et al., 2007).

Apesar das variações nas concentrações de GGT apresentarem ampla variação interindividual (BRAUN et al., 1983), aparentemente, o colostro das porcas não possui elevada atividade desta enzima. Esses resultados são diferentes dos obtidos por Thompson e Pauli (1981), que reportaram que a atividade elevada de GGT no soro sanguíneo de bezerros recém-nascidos é consequente à absorção integral das moléculas da enzima presentes no colostro. Além disso, a determinação da atividade da GGT sérica mostrou ser um meio alternativo para a identificação indireta de bezerros imunologicamente deficientes por uma transferência passiva de imunoglobulinas inadequada (FEITOSA et al., 2001).

Bouda et al. (1980) constataram elevada atividade sérica de GGT em bezerros alimentados com colostro. De acordo com Kaneko et al. (1997) o colostro de algumas fêmeas como as vacas, ovelhas e coelhas, possui elevada

atividade de GGT, que é prontamente absorvido e lançado no plasma dos recém-nascidos. Segundo Stockham e Scott (2011), o colostro de éguas contém relativamente pouca atividade da GGT, e a atividade desta enzima não aumenta após a amamentação em potros neonatos. No entanto, não há informações disponíveis na literatura, em relação à atividade da GGT no colostro de porcas.

Apesar de não ter sido observada uma correlação entre as concentrações séricas de IgG e GGT nos leitões avaliados neste estudo, Silva et al. (2007), notaram correlação positiva entre as concentrações séricas de proteína total com as concentrações de globulinas, gamaglobulinas e IgG, bem como das concentrações de GGT com a IgG, em caprinos neonatos às 24 e 48 horas de vida e de proteína total com globulinas, gamaglobulinas, GGT e IgG, 72 horas após o nascimento.

Por outro lado, o aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve (Tabela 1) demonstram que houve transmissão de anticorpos maternos para os leitões, uma vez que o epitélio dos neonatos é permeável a macromoléculas nas primeiras horas de vida (BIERHALS et al., 2010). No entanto, segundo estes mesmos autores, esta permeabilidade diminui gradativamente, tornando-se nula entre 24 e 36 horas, ocorrendo o “fechamento intestinal”, aparentemente causado por componentes do próprio colostro.

Ademais, no presente estudo foi observado aumento significativo ($p < 0,05$) (Tabela 1) nas concentrações de proteínas totais nas amostras coletadas 48 horas após a ingestão do colostro, devido ao aumento, também significativo ($p < 0,05$), nas concentrações de imunoglobulinas G de cadeia leve e pesada. De acordo com Kaneko et al. (1997), ao nascimento, potros e bezerros apresentam baixas concentrações de proteínas, mas após ingestão de colostro há um aumento nessas concentrações devido à absorção intestinal de imunoglobulinas. Leal et al. (2003) ao realizarem fracionamento das proteínas de bezerros por eletroforese em fitas de acetato de celulose, demonstraram que as concentrações séricas de gamaglobulinas apresentaram menores concentrações até oito horas após o nascimento, aumentando

gradativamente até o segundo dia de idade, da mesma forma como observado nos leitões do presente estudo.

Conforme investigações realizadas em caprinos, por Silva et al. (2007), a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, foi o método mais adequado para o fracionamento de proteínas, quando comparado a outros métodos de eletroforese, pois torna possível a identificação de frações proteicas mais específicas, inclusive a IgG de cadeia leve, que corresponde à fração específica dos anticorpos colostrais.

Observou-se a presença das frações transferrina e ceruloplasmina (Tabela 1) nos traçados eletroforéticos dos leitões antes e após a ingestão do colostro. A ceruloplasmina é uma proteína de fase aguda transportadora de ferro sérico (CERÓN e MARTINEZ-SUBIELA, 2004) e em suínos, a deficiência de cobre está associada à diminuição das concentrações de ceruloplasmina, com consequente acúmulo de ferro nos tecidos (HELLMAN e GITLIN, 2002). No presente estudo, esta fração proteica não apresentou alteração significativa ($p > 0,05$) de suas concentrações entre os dois momentos avaliados. Em suínos adultos, a ceruloplasmina apresenta elevações nas suas concentrações, como observado por Eckersall et al. (1996) ao avaliar em animais que receberam terebintina e desenvolveram reação inflamatória asséptica.

Uma proteína não identificada nominalmente, de 23kDa foi observada nos traçados eletroforéticos nos dois momentos avaliados. Esta fração apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) entre os animais antes e após a ingestão do colostro. De acordo com a Tabela 1, após a ingestão do colostro pelos leitões, houve aumento significativo ($p < 0,05$) nas concentrações desta proteína. Apesar da ausência de informações sobre a sequência gênica desta proteína, Murata et al. (2004) descreveram esta proteína como um monômero da cadeia alfa de haptoglobina em bovinos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a função desta proteína em leitões, uma vez que não há dados disponíveis na literatura sobre o exato papel desta fração proteica, apesar de estudos terem demonstrado a presença desta fração proteica em diferentes espécies (GONDIM et al., 2013; JULIANO et al., 2009).

Pode-se considerar que a grande vantagem da utilização da técnica SDS-PAGE em relação às demais técnicas de eletroforese, é a possibilidade de identificação de maior número de proteínas específicas, principalmente a imunoglobulina G e proteínas de fase aguda, como ceruloplasmina, transferrina e a proteína não identificada nominalmente de 23kDa. Além disso, enquanto as concentrações séricas de IgG permitem avaliar a imunidade do neonato, as PFAs auxiliam no diagnóstico precoce e no monitoramento de processos inflamatórios, comuns em recém-nascidos (FAGLIARI et al., 1998; MURATA et al., 2004; SILVA et al., 2007).

6 CONCLUSÕES

1. Houve aumento significativo ($p<0,05$) para as concentrações das proteínas séricas totais após a ingestão do colostro nos leitões avaliados. Este aumento ocorreu em função do aumento significativo ($p<0,05$) das concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve nos leitões após a ingestão do colostro.
2. As atividades séricas da enzima gama glutamiltransferase apresentaram diminuição significativa ($p<0,05$) 48 horas após a ingestão do colostro, sugerindo que a GGT não demonstrou ser um bom indicador para avaliar a imunidade passiva nos leitões.
3. Observou-se a presença da fração ceruloplasmina e transferrina no traçado eletroforético, em todos os leitões avaliados, antes e após a ingestão do colostro.
4. Uma proteína de 23 kDa, não-identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético dos leitões e apresentou aumento significativo ($p<0,05$) nos animais que ingeriram o colostro.

7 REFERÊNCIAS

ALAVA, M.A.; GONZÁLEZ-RAMÓN, N.; HEEGAARD, P.; GUZYLACK, S.; TOUSSAINT, M.J.M.; LIPPERHEIDE, C.; MADEC, F.; GRUYS, E.; ECKERSALL, P.D.; LAMPREAVE, F.; PIÑEIRO, A. Pig-Map, Porcine Acute Phase Proteins and Standardisation of assays in Europe. **Comparative Haematology International**, v.7, p.208-213, 1997.

ALDRED, A.R.; GRIMES, A.; SHREIBER, G.; MERCER, J.F. Rat ceruloplasmin. Molecular cloning and gene expression in liver, choroid plexus, yolk sac, placenta, and testis. **Journal of Biology Chemistry**, v.262, p.2875-78, 1987.

BIERHALS, T.; HEIM, G.; PIUCO, P.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F.P. Uso prático do manejo de uniformização de leitegadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.141-157, 2010.

BOUDA, J.; DVORAK, V.; MINKSOVA, E.; DVORAK, R. The activities of GOT, gamma-GT, alkaline phosphatase in blood plasma of cows and their calves fed from bulkets. **Acta Veterinaria Brno**, v.49, n.3-4, p.193-8, 1980.

BRAUN, J. P, BENARD, P., BURGAT, V., AND RICO, A. G. Gamma glutamyltransferase in domestic animals . **Veterinary Research Communication**, v.6, p.77-90, 1983.

BURGER, W.; EWALD, C.; FENNERT, E.M. Increase in C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration. **Journal Veterinay Medicine Series B**, v.45, p.1-6, 1998.

BUTLER, J.E. Bovine immunoglobulins: A review. **Journal of Dairy Science**. V.52, n.12, p. 1895-909, 1969.

CARTWRIGHT, G.E.; MARKOWITZ, H.; SHIELDS, S.; WINTROBE, M.M. Studies on copper metabolism XXIX: A critical analysis of serum copper and ceruloplasmin concentrations in normal subjects, patients with Wilson's disease

and relatives patients with Wilson's Disease. **American Journal of Medicine**, v.28, p.555-63, 1968.

CERÓN , J. J.; MARTINEZ-SUBIELA , S. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. **Veterinary Research**, v.35, p.671-679, 2004.

CRAY, C. **Acute phase proteins in animals**. Progress in Molecular Biology and Translational Science, v. 105, p. 113-150, 2012.

CRAY, C.; TATUM, L.M. Applications of protein electrophoresis in avian diagnostics. **Journal Avian Medical Surgery**, v.12, p.4-10, 1998.

CUNHA, D.A.; SANTOS, V.F.; RODRIGUES, G.Z.; GOMES, M.F.M. evolução da produção de carne suína no brasil: uma análise estrutural-diferencial. **Revista de Economia e Agronegócio**, v.6, n.3, 2009.

DALLANORA, D.; MACHADO, I.P. Manual de manejo em maternidade e creche. In: ALFIERI, A.F. **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas: Sanphar, p.262 – 359, 2010.

DAVIDSON, A.P.; STABENFELDT, G.H. Reprodução e lactação. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro:Elsevier, Seção 6. Cap. 39, p.503 – 518, 2008.

DU CLOS, T.W.; MOLD, C.; The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.289-293, 2001.

ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics and Dysproteinemias. In: Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed., San Diego: Academic Press, p.117-155, 2008.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F. J.; MCCOMB, C.; HOGARTH, C. J.; SAFI, S.; FITZPATRICK, J. L.; NOLAN, A. M.; WEBER, A.; MCDONALD, T. Acute phase

proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. **Veterinary Record**, v.148, p.35-41, 2001.

ECKERSALL, P.D.; SAINI, P.K.; McCOMB, C. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alfa 1-acidglycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.51, p.377-85, 1996.

EDWARD, R.N. Transporte fetal e neonatal de oxigênio. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro:Elsevier. p. 627 – 633, 2008.

EDWARDS, S.A., BROOM, D.M., COLLIS, C. Factors affecting levels of passive immunity in dairy calves. **British Veterinary Journal**, v.138, n.3, p.233-40, 1982.

EL GHMATI, S.M.; VAN HOEYVELD, E.M.; VAN STRIJP, J.A.G.; CEUPPENS, J.L.; STEVENS, E.A.M. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. **Journal of Immunology**, v.156, p.2542-2552, 1996.

ENDO, M.; SUZUKI, K.; SCHMID, K.; FOURNET, B.; KARAMANOS, Y.; MONTREUILL, J.; DORLAND, L.; VAN HALBEEK, H.; VLIEGENTHART, J.F.G. The structures and microheterogeneity of the carbohydrate chains of human plasma ceruloplasmin. A study employing 500-MHz ¹HNMR spectroscopy. **Journal of Biology Chemistry**, v.257, p.8755-60, 1982.

FAGLIARI, J. J.; RIZZOLLI, F. W.; SILVA, D. G. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 6, p. 1-4, 2006.

FAGLIARI, J.J.; McCLENAHAN, D.; EVANSON, O.A.; WEISS, D.J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1234-1237, 1998.

FAGLIARI, J. J.; OLIVEIRA, E. C.; PEGORER, M. F.; FERRANTE JÚNIOR, L. C.; CAMPOS FILHO, E. Relação entre o nível sérico de gamaglobulinas e as atividade de gamaglutamiltransferase, fosfatase alcalina e aspartatoaminotransferase de bezerros recém-nascidos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, n. 2, p. 105-112, 1996.

FEITOSA. F.L.F.; BIRGEL, E.H.; MIRANDOLA, R.M.S.; PERRI, S.H.V. Diagnostico de falha passiva de transferência de imunidade passiva em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforeticas, imunoglobulinas G e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p. 251 – 255, 2001.

FELDMAN, B.C.; ZINKIL, J.G.; JAIN, M.C. **Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 1344 p, 2000.

FIALHO, R. Competitividade das exportações brasileiras de carnesuína, no período de 1990 a 2004. Viçosa, MG: UFV 2006. 94p. **Dissertação** (Mestrado em Economia Aplicada) – Universidade Federal de Viçosa.

FLEMING, R.; GITLIN, J.D. Primary structure of rat ceruloplasmin and analysis of tissue-specific gene expression. During development. **Journal of Biology Chemistry**, v.265, p.7701-7, 1990.

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

GITLIN, J.D. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. **Journal of Biology Chemistry**, v.263, p.6281-87, 1988.

GITLIN, J.D.; BIASUCCI, A. Development of gamma G, gamma M, beta IC-beta IA, C 1 esterase inhibitor, ceruloplasmin, trasnferrin, hemopexin, haptoglobin, fibrinogen, plasminogen, alpha 1-antitrypsin, orosomuroid, beta-lipoprotein, alpha 2-macroglobulin, and prealbumin in the human conceptus. **Journal of Clinical Investigation**, v.48, p.1433-46, 1969.

GONDIM, M.R.; FOZ, N.S.B.; PEREIRA, M.C.; FAGLIARI, J.J.; OROZCO, C.A.G.; D'ANGELIS, F.H.F.; QUEIROZ-NETO, A.; FERRAZ, G.C. Acute phase

response of different positions of high-goal (elite) polo ponies. **Journal of Equine Veterinary Science** (*in press*), 2013.

GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels**. New York: Elsevier, 1995. 213 p.

GORNAL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **Journal Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

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

HEEGAARD, M.H.P; STOCKMARR, A.; PIÑEIRO, M.; CARPINTERO, R.; LAMPREAVE, F.; CAMPBELL, F.M.; ECKERSALL, P.D.; TOUSSAINT, M.J.M.; GRUYS, E.; SORENSEN, N.S. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. **Veterinary Research**, p.42- 50, 2011.

HEEGAARD, P.M.H.; KLAUSEN, J.; NIELSEN, J.P.; GONZÁLEZ-RAMÓN, N.; PIÑERO, M.; LAMPREAVE, F.; ALAVA, M.A. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin,, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of inflammation. **Comparative Biochemical Physiology Biochemical Molecular Biology**, v.119, p.365-3773, 1998.

HELLMAN, N.E.; GITLIN, E. Biochemical analysis of a missense mutation in aceruloplasmin. **Journal of Biology Chemistry**, v.277, p.1375-80, 2002.

KANEKO, J.J.; HARVEY, I.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals** 5th ed. San Diego: Academic Press, 932 p. 1997.

KLOMP, L.W.J.; DUGAN, L.L.; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin gene expression in the murine central nervous system. **Journal of Clinical Investigation**, v.98, p.207-15, 1996.

KRAMER, T.T.; GRIFFITH, R.W.; SAUCKE, L. Iron and transferrin in acute experimental *Salmonella cholera-suis* infection in pigs. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p.451-455, 1985.

ITOH, H.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; MOTOI, Y.; KIDOGUCHI, K.; FUNAYAMA, Y. The influence of age and health-status on the serum alpha1-acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen-free pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p.74-78, 1993.

JACOBSON, M.; LINDBERG, J.E.; LINDBERG, R.; SEGERSTAD, C.H.; Intestinal cannulation: Model for study of the midgut of the pig, **Comparative Medicine**, v.51, p.163-170, 2001.

JULIANO, R.S.; FIORAVANTI, M.C.S.; FAGLIARI, J.J.; SILVA, P.C.; SILVA, L.A.F. Proteinograma sérico de bovinos da raça Curraleiro. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 533-538, 2009.

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

LAW, J.H. Insects, oxygen, and iron. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.292, p.1191-1195, 2002.

LEAL, M.L.R., BENESI, F.J., LISBÔA, J.A.N., MIRANDOLA, R.M.S. Proteinograma sérico de bezerras saudáveis, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.138-145, 2003.

MACKIEWICZ, A.; GANAPATHI, M.K.; SCHULTZ, D.; KUSHNER, I. Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. **Journal of Experimental Medicine**, v.166, p.253-58, 1987.

MOLD, C.; RODRIGUEZ, W.; DUCLOS, T.W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc-gammaR. **Journal of Immunology**, v.169, p.7019-7025, 2002.

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

PAN, Y.; KATULA, K.; FAILLA, M.L. Expression of ceruloplasmin gene in human and rat lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1307, p.233-238, 1996.

PEPYS, M.B.; BALTZ, M.L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (Pentaxins) and serum amyloid A protein. **Advances in Immunology**, v.34, p.141-212, 1983.

PERINO, L.J.; SUTHERLAND, R.L.; WOOLLEN, N.E. Serum gamma-glutamyltransferase activity and protein concentration at birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.56-59, 1993.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, p.163 – 183, 2004.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; JENSEN, A.L.; HEEGAARD, P.M.H. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of porcine haptoglobin. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.48, p.513-523, 2001.

REECE, W.O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**, 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 946p, 2007.

ROSSBACHER, J.; WAGNER, L.; PASTERNAK, M.S. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. **Scandinavian Journal of immunology**, v.166, p.2002-2010, 1999.

SILVA, S.L.; FAGLIARI, J.J.; BAROZA, P.F.J.; CESCO, F.T.R.S.; JORGE, R.L.N. Avaliação da imunidade passiva em caprinos recém-nascidos alimentados com colostro de cabras ou colostro de vacas. **Ars Veterinaria, Jaboticabal**, v. 23, n.2, p.81-88, 2007.

STOCKHAM, S.I.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2.ed. 729 p. 2011.

THOMPSON, J.C.; PAULI, J.V. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in calves. **New Zealand Veterinary Journal**, v.29, n.12, p. 223-46, 1981.

TOHJO, H.; MIYOSHI, F.; UCHIDA, E.; NIIYAMA, M.; SYUTO, B.; MORITSU, Y.; ICHIKAWA, S.; TAKEUCHI, M. Polyacrilamide gel electrophoretic patterns of chicken serum in acute inflammation induced by intramuscular injection of turpentine. **Poultry Science**, v.74, p.648-655, 1995.

van MIERT, A.S.J.P.A.M., Pro-inflammatory cytokines in a ruminant model: pathophysiological, pharmacological, and therapeutic aspects. **Veterinary Quarterly**, v.175, p.41-50, 1995.

WAGENER, F.A.; EGGERT, A.; BOERMAN, O.C.; OYEN, W.J.; VERHOFSTAD, ABRAHAM, N.G. et al. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase, **Blood**, v.98, p.1802-1811, 2001.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecil sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of Biology Chemical**, v.214, p.4406-4412, 1969.

XU, L.; BADOLATO, R.; MURPHY, W.J.; LONGO, D.L.; ANVER, M.; HALE, S.; OPPENHEIM, J.J.; WANG, J.M. A novel biologic function of sérum amyloid A. Induction of T lymphocyte migrations and adhesion. **Journal of Immunology**, v.155, p.1184-1190, 1995.

YANG, F.; FRIEDRICHS, W.E.; deGRAFFENRIED, L.; HERBERT, D.C.; WEAKER, F.J.; BOWMAN, B.H.; COALSON, J.J. Cellular expression Of ceruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v.14, p.161-169, 1996.

Eletroforetograma de proteínas séricas na avaliação da imunidade de leitões na fase de maternidade

Electrophoretogram of serum proteins in the evaluation of immunity of piglets

Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt¹*, Paula Tussini Onida^I, Camila Peres Rubio^I e José Jurandir Fagliari^{II}

RESUMO

Avaliou-se o proteinograma sérico de leitões neonatos pela eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) em amostras de soro obtidas ao nascimento (antes da ingestão do colostro) e 48 horas após o nascimento. Foi também avaliada a eficácia da imunização passiva, após a ingestão do colostro, pela determinação da atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase (GGT) no soro desses animais. Amostras de 1,0mL de sangue foram coletadas por venopunção da jugular de 40 leitões, nestes dois momentos. Houve aumento significativo ($p<0,05$) para as concentrações das proteínas séricas totais após a ingestão do colostro devido o aumento significativo ($p<0,05$) das concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve nos leitões após a ingestão do colostro. As concentrações séricas da enzima GGT apresentaram diminuição significativa ($p<0,05$) após a ingestão do colostro. Foi observada a presença da fração ceruloplasmina no traçado eletroforético, antes e após a ingestão do colostro. Além disso, uma proteína de 23kDa, não-identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético dos leitões e apresentou aumento significativo ($p<0,05$) após a ingestão do colostro.

Palavras-chave: eletroforese; suínos; proteínas séricas; imunidade

¹ ^IDepartamento de Clínica Veterinária - Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Botucatu. Distrito de Rubião Junior, s/n 18618-970 - Botucatu, SP. E-mail: bethschmidt@fmvz.unesp.br. * Autor para correspondência.

^{II}Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Jaboticabal, SP.

SUMMARY

This study evaluated the serum protein concentrations of newborn piglets by means of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in serum samples obtained at birth before colostrum intake, and 48 hours after birth. The efficacy of passive immunization after ingestion of colostrum was also evaluated by the determination of gamma glutamyltransferase serum activities (GGT) of these animals. Samples of 1.0 mL of blood were collected by jugular venipuncture of 40 piglets in these two different moments. A significant increase ($p<0.05$) of total serum protein concentrations after ingestion of colostrum was found. There was also a significant increase ($p<0.05$) in serum concentrations of IgG (heavy and light chains) after ingestion of colostrum. Serum activities of GGT were significantly decreased ($p<0.05$) after ingestion of colostrum. The presence of ceruloplasmin was observed in all animals before and after colostrum intake. A 23kDa protein, was observed in all piglets and increased significantly ($p<0.05$) after colostrum intake.

Key words: Electrophoresis; Piglets; Serum proteins; Immunity.

INTRODUÇÃO

O tipo de placenta em fêmeas suínas não permite a transferência de anticorpos para os fetos durante a gestação (DALLANORA & MACHADO, 2010). Além de diferirem na quantidade de superfície uterina à qual estão aderidas, as placentas também diferem no número de camadas de células que separam o sangue materno do fetal (EDWARD, 2008). O metabolismo e a quantidade de proteínas presentes no soro de animais neonatos podem sofrer influência de diversos fatores, entre os quais se devem destacar a ingestão do colostro e a idade. Ao nascimento, principalmente potros, bezerros e leitões, exibem baixas concentrações de proteínas e após receberem o colostro, apresentam um aumento no total das proteínas devido à absorção intestinal de macromoléculas, incluídas as imunoglobulinas (FELDMAN et

1 al., 2000; BUTLER, 1969). Os anticorpos de origem materna transferidos ao neonato pelo
2 colostro são essenciais à sua sobrevivência (EDWARDS et al., 1982). As imunoglobulinas
3 estão presentes em altas concentrações no colostro, e pelo seu consumo, o recém-nascido
4 recebe imunidade passiva contra patógenos adquiridos pela mãe. Porém, os neonatos
5 geralmente apresentam um período limitado (em até 36 horas) no qual as imunoglobulinas
6 podem ser absorvidas pelo intestino (DAVIDSON & STABENFELDT, 2008).

7 Dentre os testes utilizados para verificar a transferência de imunidade passiva, a
8 eletroforese apresenta vantagens por permitir a identificação e a quantificação de
9 imunoglobulinas do tipo G (IgG), considerada a mais importante na imunização passiva, o
10 que permite orientar o manejo de animais hipogamaglobulinêmicos (FAGLIARI et al., 2006),
11 pois se não houver assistência imunológica materna adequada provida pelas imunoglobulinas
12 e outros fatores presentes no colostro, os neonatos têm grande chance de sucumbir a infecções
13 que seriam inócuas a animais adultos (REECE, 2007). Assim, a compreensão da dinâmica da
14 imunidade passiva em leitões é de extrema importância para a prevenção de doenças. Animais
15 recém-nascidos de algumas espécies apresentam elevada atividade sérica de gama
16 glutamiltransferase (GGT) após a ingestão do colostro. Em bezerros, a relação direta entre
17 GGT sérica e as concentrações de imunoglobulinas, permite afirmar que esta enzima está
18 diretamente relacionada ao sucesso da transferência de imunidade passiva (PARISH et al.,
19 1997; PERINO et al., 1993).

20 Desta forma, este estudo teve por objetivo avaliar o proteinograma sérico de leitões
21 neonatos, antes de ingerir o colostro (em até seis horas após o nascimento) e 48 horas após
22 seu nascimento, a fim de avaliar a utilidade da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo
23 dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e da atividade sérica da GGT como ferramentas para
24 detecção da eficácia da transferência da imunidade passiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de 1,0mL de sangue em tubos de plástico siliconizados (Vacutainer, Becton Dickinson®, Franklin Lakes, USA), sem anticoagulante pela venopunção da jugular de 40 leitões, provenientes de cinco porcas da linhagem Penarlan, de origem francesa, oriundos de uma granja no município de Águas da Prata/SP, em dois momentos distintos: até seis horas após o nascimento, ou seja, antes da ingestão do colostro, e 48 horas após o nascimento.

Para a determinação das concentrações das proteínas pelo método do SDS-PAGE, dosou-se primeiramente as concentrações das proteínas totais pelo método do biureto (GORNALL et al., 1949) utilizando-se kit bioquímico comercial (Labtest Diagnóstica®) e leitura em espectrofotômetro automático (Cobas Mira - Roche®). SDS-PAGE foi realizado em géis de acrilamida a 10%. O perfil das proteínas séricas totais foi obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio. O fracionamento eletroforético foi realizado de acordo com técnica descrita por LAEMMLI (1970), em um sistema de eletroforese unidimensional em géis de acrilamida com 4 a 10% de gradiente. As amostras de soro (10µL) foram diluídas em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de gel mix (10% água, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10mM de ácido etilenodiaminotetracético, 20mM Fosfato-tris de pH 7,4, 5% glicerol e 0,001% azul de bromofenol como corante). A corrente elétrica foi programada em 35 e 50mA, enquanto as amostras estavam nos géis de separação e empilhamento, respectivamente. Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de Azul de Coomassie Brilhante 0,2% por 10 minutos. Posteriormente o gel foi descorado em uma solução de metanol, ácido acético e água até o aparecimento das frações proteicas. As concentrações dessas frações foram determinadas de acordo com método descrito por FAGLIARI et al. (1998) utilizando-se videodensitômetro (9301PC Shimadzu, Tokyo, Japan). As proteínas foram identificadas utilizando-se marcadores (Sigma Chemical Co., St. Louis,

MO, USA) com pesos moleculares de 200,000; 116,000; 97,000; 66,000; 55,000; 45,000; 36,000; 29,000; 24,000 and 20,000 Da. Adicionalmente, proteínas purificadas (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) albumina, haptoglobina, ceruloplasmina e transferrina também foram utilizadas.

A atividade sérica da enzima gama glutamiltransferase foi determinada por método cinético colorimétrico com auxílio de kit bioquímico comercial (Katal®) e leitura em espectrofotômetro automatizado (Cobas Mira-Roche®).

Os dados dos eletroforetogramas (SDS-PAGE) e das atividades de gama glutamiltransferase, antes da ingestão do colostro e 48 horas após o nascimento, foram analisados pelo ANOVA e aqueles com diferença significativa foram submetidos ao Teste de Tukey com 5% de significância ($p < 0,05$) (Statview® 5.0).

RESULTADOS

Os resultados dos proteinogramas séricos dos leitões, obtidos pela técnica de SDS-PAGE, avaliados até seis horas após o nascimento, ou seja, antes da ingestão do colostro, e quarenta e oito horas após o nascimento estão apresentados na tabela 1. Os traçados eletroforéticos apresentaram quatro frações proteicas nos leitões antes da ingestão do colostro e seis frações proteicas após a ingestão do colostro. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os momentos avaliados para as concentrações séricas de proteína total, IgG cadeia leve e pesada e de uma proteína não identificada nominalmente, de peso molecular 23kDa. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) para as concentrações de ceruloplasmina, transferrina e albumina entre os momentos avaliados.

A tabela 2 apresenta os resultados da atividade sérica da GGT antes e após a ingestão do colostro pelos leitões. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois momentos avaliados.

1 **DISCUSSÃO**

2 A literatura é escassa em relação à avaliação da transferência de imunidade, a
3 concentração de imunoglobulinas e a concentração de GGT sérica em leitões. No entanto, em
4 comparação com outras espécies estudadas, FEITOSA et al. (2001) observaram que em
5 bovinos, as concentrações séricas de imunoglobulinas têm sido utilizadas com a finalidade de
6 monitorar a imunidade adquirida pela ingestão de colostro, uma vez que a falha na
7 transferência de imunidade passiva está diretamente relacionada com maiores índices de
8 mortalidade.

9 As concentrações médias obtidas para as atividades séricas de GGT nos leitões,
10 antes e após a ingestão do colostro (Tabela 2), estão de acordo com os valores de referência
11 (10 a 60U/L) para animais adultos da espécie suína (KANEKO et al., 1997). De acordo com
12 os resultados da tabela 2, diferentemente do esperado, a atividade sérica de GGT dos leitões
13 foi significativamente inferior ($p<0,05$) antes da ingestão do colostro quando comparada com
14 as amostras obtidas 48 horas após o nascimento. Da mesma forma como observado em
15 caprinos, quando a atividade sérica da GGT foi maior 24 horas após a ingestão do colostro,
16 com diminuição significativa na sua atividade 48 e 72 horas após o fornecimento do colostro
17 (SILVA et al., 2007).

18 Apesar das variações nas concentrações de GGT apresentarem ampla variação
19 interindividual (BRAUN et al., 1983), aparentemente, o colostro das porcas não possui
20 elevada atividade desta enzima. Esses resultados são diferentes dos obtidos por THOMPSON
21 & PAULI (1981), que reportaram que a atividade elevada de GGT no soro sanguíneo de
22 bezerros recém-nascidos é consequente à absorção integral das moléculas da enzima presentes
23 no colostro. Além disso, a determinação da atividade da GGT sérica mostrou ser um meio
24 alternativo para a identificação indireta de bezerros imunologicamente deficientes por uma
25 transferência passiva de imunoglobulinas inadequada (FEITOSA et al., 2001).

BOUDA et al. (1980) constataram elevada atividade sérica de GGT em bezerros alimentados com colostro. De acordo com KANEKO et al. (1997) o colostro de algumas fêmeas como as vacas, ovelhas e coelhas, possui elevada atividade de GGT, que é prontamente absorvido e lançado no plasma dos recém-nascidos. Segundo STOCKHAM & SCOTT (2011), o colostro de éguas contém relativamente pouca atividade da GGT, e a atividade desta enzima não aumenta após a amamentação em potros neonatos. No entanto, não foram encontradas informações na literatura consultada, em relação à atividade da GGT no colostro de porcas.

Apesar de não ter sido observada uma correlação entre as concentrações séricas de IgG e da atividade de GGT nos leitões avaliados neste estudo, SILVA et al. (2007), notaram correlação positiva entre as concentrações séricas de proteína total com as concentrações de globulinas, gamaglobulinas e IgG, bem como da atividade de GGT com a IgG, em caprinos neonatos às 24 e 48 horas de vida e de proteína total com globulinas, gamaglobulinas, GGT e IgG, 72 horas após o nascimento.

Por outro lado, o aumento significativo ($p<0,05$) nas concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve (Tabela 1) demonstram que houve transmissão de anticorpos maternos para os leitões, uma vez que o epitélio dos neonatos é permeável a macromoléculas nas primeiras horas de vida (BIERHALS et al., 2010). No entanto, segundo estes mesmos autores, esta permeabilidade diminui gradativamente, tornando-se nula entre 24 e 36 horas, ocorrendo o “fechamento intestinal”, aparentemente causado por componentes do próprio colostro.

Ademais, no presente estudo foi observado aumento significativo ($p<0,05$) (Tabela 1) nas concentrações de proteínas totais nas amostras coletadas 48 horas após a ingestão do colostro, devido ao aumento, também significativo ($p<0,05$), nas concentrações de imunoglobulinas G de cadeia leve e pesada. De acordo com KANEKO et al. (1997), ao nascimento, potros e bezerros apresentam baixas concentrações de proteínas, mas após

1 ingestão de colostro há um aumento nessas concentrações devido à absorção intestinal de
2 imunoglobulinas. LEAL et al. (2003) ao realizarem fracionamento das proteínas de bezerros
3 por eletroforese em fitas de acetato de celulose, demonstraram que as concentrações séricas de
4 gamaglobulinas apresentaram menores concentrações até oito horas após o nascimento,
5 aumentando gradativamente até o segundo dia de idade, da mesma forma como observado nos
6 leitões do presente estudo.

7 Conforme investigações realizadas em caprinos, por SILVA et al. (2007), a técnica de
8 SDS-PAGE, demonstra ser um método adequado para o fracionamento de proteínas, quando
9 comparado a outros métodos de eletroforese, pois torna possível a identificação de frações
10 proteicas mais específicas, inclusive a IgG de cadeia leve, que corresponde à fração específica
11 dos anticorpos colostrais.

12 Observou-se a presença das frações transferrina e ceruloplasmina (Tabela 1) nos
13 traçados eletroforéticos dos leitões antes e após a ingestão do colostro. A ceruloplasmina é
14 uma proteína de fase aguda transportadora de ferro sérico (CERÓN & MARTINEZ-
15 SUBIELA, 2004) e em suínos, a deficiência de cobre está associada à diminuição das
16 concentrações de ceruloplasmina, com consequente acúmulo de ferro nos tecidos
17 (HELLMAN & GITLIN, 2002). No presente estudo, esta fração proteica não apresentou
18 alteração significativa ($p>0,05$) de suas concentrações entre os dois momentos avaliados. Em
19 suínos adultos, a ceruloplasmina apresenta elevações nas suas concentrações, como observado
20 por ECKERSALL et al. (1996) ao avaliar em animais que receberam terebintina e
21 desenvolveram reação inflamatória asséptica.

22 Uma proteína não identificada nominalmente, de 23kDa foi observada nos traçados
23 eletroforéticos nos dois momentos avaliados. Esta fração apresentou diferença significativa
24 ($p<0,05$) entre os animais antes e após a ingestão do colostro. De acordo com a tabela 1, após
25 a ingestão do colostro pelos leitões, houve aumento significativo ($p<0,05$) nas concentrações

1 desta proteína. Apesar da ausência de informações sobre a sequência gênica desta proteína,
2 MURATA et al. (2004) descreveram esta proteína como um monômero da cadeia alfa de
3 haptoglobina em bovinos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a função
4 desta proteína em leitões, uma vez que não há dados disponíveis na literatura sobre o exato
5 papel desta fração proteica.

6 PODE-SE CONSIDERAR QUE A GRANDE VANTAGEM DA UTILIZAÇÃO DA TÉCNICA SDS-PAGE EM
7 RELAÇÃO ÀS DEMAIS TÉCNICAS DE ELETROFORESE, É A POSSIBILIDADE DE IDENTIFICAÇÃO DE MAIOR NÚMERO
8 DE PROTEÍNAS ESPECÍFICAS, PRINCIPALMENTE A IMUNOGLOBULINA G E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA, COMO
9 CERULOPLASMINA, TRANSFERRINA E A PROTEÍNA NÃO IDENTIFICADA NOMINALMENTE DE 23kDa. ALÉM
10 DISSO, ENQUANTO AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE IgG PERMITEM AVALIAR A IMUNIDADE DO NEONATO, AS
11 PFAS AUXILIAM NO DIAGNÓSTICO PRECOCE E NO MONITORAMENTO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS,
12 COMUNS EM RECÉM-NASCIDOS (FAGLIARI et al., 1998; MURATA et al., 2004; SILVA et al.,
13 2007).

14 **CONCLUSÃO**

16 Houve aumento significativo ($p < 0,05$) para as concentrações das proteínas séricas
17 totais após a ingestão do colostro nos leitões avaliados, que ocorreu em função do aumento
18 significativo ($p < 0,05$) das concentrações séricas de IgG de cadeia pesada e leve nos leitões
19 após a ingestão do colostro. As atividades séricas da GGT apresentaram diminuição
20 significativa ($p < 0,05$) 48 horas após a ingestão do colostro, sugerindo que a GGT não
21 demonstrou ser um bom indicador para avaliar a imunidade passiva nos leitões.

22 Observou-se a presença da fração ceruloplasmina e transferrina no traçado
23 eletroforético, em todos os leitões avaliados, antes e após a ingestão do colostro. Uma
24 proteína de 23 kDa, não-identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético
25 dos leitões e apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nos animais que ingeriram o colostro.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da FMVZ/UNESP – Câmpus de Botucatu, conforme protocolo nº 241/2011.

REFERÊNCIAS

BIERHALS, T. et al. Uso prático do manejo de uniformização de leitegadas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, p.141-157, 2010. Disponível em: <http://www.suinodec.com.br/arquivos_edicao/V_SINSUI2010_14_T_Bierhals_et_al.pdf>.

Acesso em: 20 de mai. 2013.

BOUDA, J. et al. The activities of GOT, Gamma-GT, alkaline phosphatase in blood plasma of cows and their calves fed from bulkets. *Acta Veterinaria Brno*, v.49, p.183-98, 1980.

BRAUN, J. P. et al. Gamma glutamyltransferase in domestic animals . **Veterinary Research Communication**, v.6, p.77-90, 1983. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02214900>>. Acesso em: 20 mai. 2013. doi:

10.1007/BF02214900.

BUTLER, J.E. Bovine immunoglobulins: A review. **Journal of Dairy Science**, v.52, n.12, p. 1895-909, 1969. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030269868712>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

CERÓN, J.J.; MARTINEZ-SUBIELA, S. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. **Veterinary Research**, v.35, p.671-679, 2004. Disponível em: <<http://www.vetres.org/articles/vetres/abs/2004/06/V4033/V4033.html>>.

Acesso em: 20 mai. 2013. doi: 10.1051/vetres:2004046.

1 DALLANORA, D.; MACHADO, I.P. Manual de manejo em maternidade e creche. In:
2 ALFIERI, A.F. **Tópicos em sanidade e manejo de suínos**. Campinas: Sanphar, p.262 – 359,
3 2010.

4 DAVIDSON, A.P.; STABENFELDT, G.H. Reprodução e lactação. In: CUNNINGHAM, J.G.
5 **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro:Elsevier, Seção 6. Cap. 39, p.503 – 518,
6 2008.

7 ECKERSALL, P.D. et al. The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alfa 1-
8 acidglycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. **Veterinary**
9 **Immunology and Immunopathology**, v.51, p.377-85, 1996. Disponível em: <
10 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165242795055274>>. Acesso em: 20 mai.
11 2013.

12 EDWARD, R.N. Transporte fetal e neonatal de oxigênio. In: CUNNINGHAM, J.G. **Tratado**
13 **de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro:Elsevier. p. 627 – 633, 2008.

14 EDWARDS, S.A. et al. Factors affecting levels of passive immunity in dairy calves. **British**
15 **Veterinary Journal**, v.138, n.3, p.233-40, 1982. Disponível em: <
16 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7093653>>. Acesso em: 20 mai. 2013. PMID: 7093653.

17 FAGLIARI, J.J. et al. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally
18 induced alimentary laminitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.59, p.1234-
19 1237, 1998.

20 FAGLIARI, J. J. et al. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa
21 obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina**
22 **Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 6, p. 1-4, 2006. Disponível em: <
23 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9781453>>. Acesso em: 20 mai. 2013. PMID: 9781453.

24 FELDMAN, B.C. et al. **Veterinary Hematology**. 5. ed. Philadelphia:Lippincott Williams &
25 Wilkins, 1344 p, 2000.

1 FEITOSA, F.L.F. et al. Diagnostico de falha de transferência passiva de imunidade passiva
2 em bezerros através da determinação de proteína total e de suas frações eletroforeticas,
3 imunoglobulinas G e da atividade da gama glutamil transferase no soro sanguíneo. **Ciência**
4 **Rural**, Santa Maria, v.31, n.2, p. 251 – 255, 2001. Disponível em: <
5 <http://www.scielo.br/pdf/%0D/cr/v31n2/a10v31n2.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2013. ISSN
6 0103-8478.

7 GORNAL, A.G. et al. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
8 **Journal Biological Chemistry**, v.177, p.751-766, 1949.

9 HELLMAN, N.E.; GITLIN, E. Biochemical analysis of a missense mutation in
10 aceruloplasmin. **Journal of Biology Chemistry**, v.277, p.1375-80, 2002. Disponível em: <
11 <http://www.jbc.org/content/277/2/1375.short>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

12 KANEKO, J.J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals** 5th ed. San Diego:
13 Academic Press, 932 p. 1997.

14 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
15 bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970. Disponível em: <
16 <http://bioinfcpcri.org/misc/nature.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2013.

17 LEAL, M.L.R. et al. Proteinograma sérico de bezerras saudáveis, da raça holandesa, no primeiro
18 mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40,
19 p.138-145, 2003. Disponível em: <
20 <http://www.scielo.br/pdf/%0D/bjvras/v40n2/v40n2a08.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2013. ISSN
21 printed: 1413-9596.

22 MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an
23 overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p.28 – 40, 2004. Disponível em: <
24 [http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233\(03\)00119-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1090-0233(03)00119-9)>. Acesso em: 20 mai. 2013.

1 REECE, W.O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**, 12.ed. Rio de Janeiro:
2 Guanabara-Koogan, 946p, 2007.

3 PARISH, S. M. et al. Evaluation of serum gamma-glutamyltransferase activity as a predictor
4 of passive transfer status in crias. **Journal of American Veterinary Medical Association**,
5 v.211, p.1165-1166, 1997. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9364234>>.
6 Acesso em: 20 mai. 2013.

7 PERINO, L.J. et al. Serum gamma-glutamyltransferase activity and protein concentration at
8 birth and after suckling in calves with adequate and inadequate passive transfer
9 immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v.54, n.1, p.56-59, 1993.
10 Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8093994>>. Acesso em: 20 mai. 2013.
11 PMID: 8093994.

12 SILVA, S.L. et al. Avaliação da imunidade passiva em caprinos recém-nascidos alimentados
13 com colostro de cabras ou colostro de vacas. **Ars Veterinaria, Jaboticabal**, v. 23, n.2, p.81-
14 88, 2007. Disponível em: < <http://www.arsveterinaria.org.br/index.php/ars/article/view/134>>.
15 Acesso em: 20 mai. 2013. ISSN 0102-6380.

16 STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. Rio de
17 Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 2.ed. 729 p. 2011.

18 THOMPSON, J.C.; PAULI, J.V. Colostral transfer of gamma glutamyl transpeptidase in
19 calves. **New Zealand Veterinary Journal**, v.29, n.12, p. 223-46, 1981. Disponível em: <
20 <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00480169.1981.34851#.UZqslKKG04c>>.
21 Acesso em: 20 mai. 2013. doi:10.1080/00480169.1981.34851.

Tabela 1 – Proteinograma sérico em leitões antes da ingestão do colostro e 48 horas após o nascimento.

Proteínas		Peso Molecular (kD)	Média ± desvio padrão	Valores mínimos	Valores Máximos
Proteína sérica	M1		2,7 ± 0,6*	1,8	4,9
total (g/dL)	M2		6,0 ± 1,1*	3,7	9,6
Ceruloplasmina	M1		46,0 ± 19,3	26,7	130,8
(mg/dL)	M2	93	42,8 ± 21,8	18,3	116,4
Transferrina	M1		512,7 ± 248,8	79,5	1.319,3
(mg/dL)	M2	76	467,8 ± 172,2	266,5	1.084,1
Albumina	M1		1,8 ± 0,3	1,1	2,9
(g/dL)	M2	60	2,0 ± 0,4	1,3	3,0
IgG cadeia	M1		0 ± 0*	0	0
pesada (mg/dL)	M2	55	2.253,4 ± 613,0*	1.293,5	3.748,5
IgG cadeia leve	M1		0 ± 0*	0	0
(mg/dL)	M2	22	607,7 ± 288,3*	39,4	1.117,5
	M1		95,7 ± 27,7*	45,7	160,0
23 kD**	M2	23	178,0 ± 48,9*	118,2	358,6

*diferença significativa ($p < 0,0001$); **proteína não identificada nominalmente. M1 – antes ingestão do colostro; M2 – após o nascimento.

1 Tabela 2 – Atividade sérica da gama glutamiltransferase (GGT) em leitões, antes da ingestão
 2 do colostro e 48 horas após o nascimento

	GGT	Média $\pm$ dp (U/L)	Valores mínimos	Valores máximos
	M1	44,4 $\pm$ 21,6 *	8,2	89,7
3	M2	31,0 $\pm$ 14,5 *	12,3	70,0

M1 – antes ingestão do colostro; M2 – após o nascimento. * Diferença significativa ($p = 0,0012$).

4

5

6

7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Onida, Paula Tussini.

Eletoforetograma de proteínas séricas na avaliação da imunidade de leitões na fase de maternidade / Paula Tussini Onida. – Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Orientador: Elizabeth M. dos Santos Schmidt

Capes: 50503030

1. Eletoforese. 2. Leitão (Suíno). 3. Suíno. 4. Sangue - Proteína.
5. Imunidade celular. 6. Patologia clínica veterinária.

Palavras-chave: Eletoforese; Imunidade; Proteínas séricas; Suínos.