

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

**CONCENTRAÇÕES SÉRICA E PERITONEAL DE
PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS
SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL,
TRATADOS OU NÃO COM LIDOCAÍNA**

Rodrigo Yanaka
Médico Veterinário

ARAÇATUBA – SP
2013

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

**CONCENTRAÇÕES SÉRICA E PERITONEAL DE PROTEÍNAS
DE FASE AGUDA EM EQUINOS SUBMETIDOS À
ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL, TRATADOS OU NÃO COM
LIDOCAÍNA**

Rodrigo Yanaka

Orientador: Prof. Adj. Francisco Leydson Formiga Feitosa

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária – Unesp, Campus de
Araçatuba, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Ciência
Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2013

Catálogo na Publicação(CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA/UNESP

Yanaka, Rodrigo

S586d

Concentrações sérica e peritoneal de proteínas de fase aguda em equinos submetidos à endotoxemia experimental, tratados ou não com lidocaína / Rodrigo Yanaka. -- Araçatuba: [s.n], 2013.
50 f. il.; + CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, 2013.

Orientador: Prof. Adj. Francisco Leydson Formiga Feitosa

1. Endotoxinas. 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida. 3. Equinos. 4. Lidocaína. 5. Lipopolissacarídeos. 6. Proteínas de fase aguda I. T.

CDD 636.0892



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Seção Técnica de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

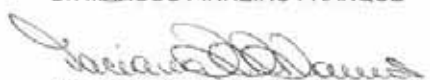
TÍTULO: Concentrações sérica e peritoneal de proteínas de fase aguda em equinos
submetidos à endotoxemia experimental, tratados ou não com lidocaína.

AUTOR: RODRIGO YANAKA

ORIENTADOR: Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL
(FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dr. MARGOS PINHEIRO FRANQUE

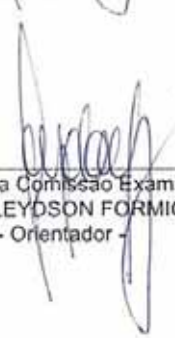

Dra. TACIANA RABELO RAMALHO RAMOS


Dr. PAULO SÉRGIO PATTO DOS SANTOS


Dra. JULIANA REGINA PEIRÓ


Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA

DATA DA REALIZAÇÃO: 3 de dezembro de 2013.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMIGA FEITOSA
- Orientador -

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

RODRIGO YANAKA – nascido em Tupã, em 13 de junho de 1979, graduação em medicina veterinária pela Universidade Estadual de Londrina em 2004, residência veterinária nas áreas de Clínica Médica, Cirurgia e Anestesiologia de Grandes Animais pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, 2005-2007. Mestrado em Ciência Animal, área de Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, em 2009. Professor Assistente do curso de medicina veterinária da Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, desde 2011.

Dedico à Valéria Cristina Garcia, que com
sua força, me motiva a sempre continuar
enfrentando os desafios da vida. E ao nosso
filho, João Antônio. O amor de vocês me faz
querer viver.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram.

À Valéria Cristina Garcia, parceira e incentivadora em todos os momentos.

À Francisco Leydson F. Feitosa, por aceitar mais uma vez me orientar, e ser um grande amigo.

À Professora Juliana R. Peiró, pela amizade, incentivo e a confiança depositada em mim neste trabalho.

À Fernanda Bovino pela amizade, incentivo e ajuda para que a conclusão deste doutorado acontecesse.

À Diogo G. de Camargo e Pedro Paulo F. Albuquerque pela amizade e apoio sempre.

Aos amigos de infância e da faculdade que estão sempre no coração e pensamentos.

Aos amigos garanhuenses, em especial Neuza de Barros Marques, Taciana R. R. Ramos, Marcos P. Franque e Elisângela Lima, Álvaro Bicudo e Edenilza Bicudo, que nos acolheram e já fazem parte da nossa família.

Aos professores e demais funcionários do Hospital Veterinário da Unesp, Campus de Araçatuba, pelo incentivo e amizade.

A todos os professores da pós-graduação com quem tive a oportunidade de conviver.

Aos companheiros de trabalho e amigos da UFRPE, pelo incentivo.

A os colegas e amigos da pós-graduação que compartilharam esta etapa.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciência Animal e a Seção de Pós-graduação desta unidade pelo apoio e suporte.

À Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, Campus de Araçatuba, por permitir que realizasse mais esta etapa acadêmica.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de auxílio à pesquisa (Processo n. 2009/15683-0).

SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
III. MATERIAL E MÉTODO.....	12
III.a. Seleção e preparo dos animais, colheita de amostras.....	12
III.b. Delineamento experimental.....	13
III.c. Eletroforese.....	14
III.d. Análise estatística.....	16
IV. RESULTADO.....	17
V. DISCUSSÃO.....	24
VI. CONCLUSÃO.....	29
VII. REFERÊNCIAS.....	30

CONCENTRAÇÕES SÉRICA E PERITONEAL DE PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM EQUINOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA EXPERIMENTAL, TRATADOS OU NÃO COM LIDOCAÍNA

RESUMO – As endotoxinas são frequentemente detectadas em alta concentração no líquido peritoneal de equinos com doença gastrointestinal aguda e no sangue de potros septicêmicos. As condições citadas anteriormente podem levar a processos inflamatórios e provocar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda. Os objetivos deste estudo foram determinar, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), as concentrações de proteínas de fase aguda (transferrina, ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) no soro e no líquido peritoneal de equinos submetidos à endotoxemia experimental, e avaliar os possíveis efeitos da administração da lidocaína sobre a produção destas proteínas depois da injeção intraperitoneal de endotoxina nestes animais. Para tanto, foram utilizados 12 animais distribuídos em dois grupos, o controle, tratado com solução de NaCl a 0,9%, e o experimental, tratado com infusão contínua de solução de lidocaína a 2% por 6 horas. Conclui-se que neste modelo experimental a administração intraperitoneal de endotoxina causou o aumento nas concentrações peritoneais de transferrina, ceruloplasmina e haptoglobina no grupo controle, da albumina em ambos os grupos, e da glicoproteína ácida no grupo tratado com infusão de lidocaína. Porém a ausência de alterações nas concentrações séricas de ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida indicam que a quantidade de endotoxina que chegou à corrente circulatória não foi suficiente para alterar as concentrações séricas destas proteínas. A infusão contínua de lidocaína interferiu nos valores peritoneais das proteínas mensuradas, tendo efeito anti-endotoxêmico.

Palavras-Chave: endotoxinas, eletroforese em gel de poliacrilamida, equinos, lidocaína, lipopolissacarídeos, proteínas de fase aguda

SERUM AND PERITONEAL CONCENTRATIONS OF ACUTE PHASE PROTEINS IN HORSES SUBMITTED TO EXPERIMENTAL ENDOTOXEMIA TREATED OR NOT WITH LIDOCAINE

SUMMARY – Endotoxins are often found in high concentration in the peritoneal fluid from horses with acute gastrointestinal disease and blood of septicemic foals. The conditions mentioned earlier can lead to inflammatory processes and cause changes in the concentrations of acute phase proteins. The objectives of this study were to determine by means of polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the concentrations of acute phase proteins (transferrin, ceruloplasmin, albumin, haptoglobin and acid glycoprotein) in serum and peritoneal fluid of horses submitted to experimental endotoxemia and evaluate the possible effects of the administration of lidocaine on the production of these proteins after intraperitoneal injection of endotoxin in these animals. To this end, 12 animals were distributed in two groups, control which was treated with 0.9% NaCl solution and the experimental which was treated with continuous infusion for 6 hours of 2% lidocaine solution. It is concluded that in this experimental model the intraperitoneal administration of endotoxin caused an increase in the concentrations of peritoneal transferrin, ceruloplasmin and haptoglobin in the control group, of albumin in both groups, and the acid glycoprotein in the group treated with infusion of lidocaine. However, the absence of changes in the concentrations of serum ceruloplasmin, serum albumin, haptoglobin and acidic glycoprotein indicate that the amount of the circulatory endotoxin was not enough to alter serum concentrations of these proteins. The continuous infusion of lidocaine interfered in peritoneal acute phase proteins values and had an anti-endotoxemic effect.

Keywords: acute phase proteins, endotoxins, equine, lidocaine, lipopolysaccharides, polyacrylamide gel electrophoresis

I. INTRODUÇÃO

Em comparação com outras espécies, os equinos são mais sensíveis aos efeitos da administração parenteral de endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) (MOORE, 2001; MORRIS et al., 1990), que podem provocar o aumento de citocinas endógenas relacionadas à resposta inflamatória (TANIGUCHI et al., 2000), como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), enzimas, mediadores inflamatórios e proteínas de fase aguda (PFAs), em resposta a determinados estímulos tóxico-infecciosos (GHISELLI et al., 2001).

As endotoxinas são frequentemente detectadas em alta concentração no líquido peritoneal de equinos com doença gastrointestinal aguda (MOORE, 1981) e no sangue de potros septicêmicos (BARTON; COLLATOS, 1999), devido a alterações na barreira mucosa intestinal, que permite a passagem de endotoxinas do lúmen intestinal para a corrente circulatória (WERNERS et al., 2005). As condições citadas anteriormente podem levar aos processos inflamatórios locais, e podem provocar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda no plasma e líquido peritoneal que podem ser identificadas e quantificadas pelo método de eletroforese (FAGLIARI et al., 1998). Portanto a detecção precoce da inflamação sistêmica é essencial para proporcionar o tratamento adequado (MACKAY, 2000). Sendo assim, a avaliação das concentrações destas proteínas, como o fibrinogênio, alfa-1-antitripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, haptoglobina, Amilóide sérica A, proteína C reativa, ceruloplasmina, transferrina e albumina, pode ser útil para detectar e monitorar a progressão e a gravidade de processos inflamatórios.

Existem relatos de efeitos benéficos da administração da lidocaína em coelhos após a indução experimental da endotoxemia, principalmente na diminuição da produção de citocinas (TANIGUCHI et al., 2000), dentre as quais a interleucina-6 (IL-6), responsável pela produção de proteínas de fase aguda no fígado.

A despeito da caracterização da atividade anti-inflamatória da lidocaína durante a endotoxemia em humanos e animais de laboratório, muito pouco se sabe sobre a dinâmica de sua concentração tecidual local e no líquido peritoneal, ou mesmo sobre estes efeitos na produção e liberação de proteínas de fase aguda, justificando a realização deste estudo.

Os objetivos deste estudo foram determinar as concentrações de proteínas de fase aguda (transferrina, ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) no soro e no líquido peritoneal de equinos submetidos à endotoxemia experimental e avaliar os possíveis efeitos da administração da lidocaína sobre a produção destas proteínas, depois da infusão intraperitoneal de endotoxina nestes animais.

II. REVISÃO DE LITERATURA

Em comparação com outras espécies, equinos são mais sensíveis aos efeitos da administração parenteral de LPS (MORRIS et al., 1990; MOORE, 2001). Vários autores utilizam os termos endotoxinas e lipopolissacarídeos como sinônimos. As endotoxinas, oriundas da membrana externa de bactérias Gram-negativas, são compostas por uma cadeia lateral de polissacarídeos relativamente constantes entre enterobacteriáceas, um oligossacarídeo central que confere antigenicidade específica e pelo lipídio A, conhecido como o componente tóxico da molécula de endotoxina (COLLATOS et al., 1995; LAZARON; DUNN, 2002; MACKAY et al., 1991; MOORE e BARTON, 1998; VALADÃO, 2005).

As endotoxinas são frequentemente detectadas em alta concentração no líquido peritoneal de equinos com doença gastrointestinal aguda (HARDIE; KRUSE-ELLIOT, 1990; MACKAY, 1992; MOORE, 1981; MOORE; MORRIS, 1992; MORRIS, 1991; MORRISON, 1983) e no sangue de potros septicêmicos (BARTON et al., 1993; BARTON e COLLATOS, 1999; COLLATOS et al., 1995; KING; GERRING, 1988), devido a alterações na barreira mucosa intestinal, a qual constitui a defesa primária contra a absorção de endotoxina, iniciadas por pequenos desequilíbrios no ciclo de fermentação dos cólons, facilitando a passagem de endotoxinas do lúmen intestinal para a corrente circulatória (COLLATOS ET al., 1995; KING; GERRING, 1988; MOORE, 1995; WERNERS et al., 2005). Portanto, os modelos experimentais para endotoxemia por meio da infusão intraperitoneal de LPS parecem estar relacionados mais intimamente com os problemas clínicos dos equinos do que a via intravenosa (BURROWS, 1979; PEIRÓ, 1997; PEIRÓ et al., 1999).

Ao atingir a corrente circulatória, o LPS interage com o receptor CD14, presente em monócitos/macrófagos e neutrófilos. A proteína ligante de LPS (LBP), uma proteína sérica de fase aguda, facilita a transferência do LPS para o receptor CD14 (FENTON; GOLENBOCK, 1998) ou auxilia na remoção do

LPS da circulação. Nas populações celulares que não expressam CD14, como as células endoteliais, os receptores solúveis (sCD14) atuam como ponte para o reconhecimento de superfície do complexo LPS-LBP. O receptor CD14 não possui uma porção citoplasmática e necessita do receptor “toll-like” 4 para fazer a transdução do sinal do complexo LPS-CD14 para o interior da célula (AKIRA, 2000; BARTON, 2000; KRUTZIC et al., 2001; MOORE, 2001).

Vários mediadores derivados das células do hospedeiro são responsáveis pela maioria das manifestações da endotoxemia, provocando o aumento da produção de citocinas endógenas, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), IL-8, IL-12 e interferon gama (INF- γ), as quais possuem um papel crítico nas respostas inflamatórias (HACK et al., 1997; TANIGUCHI et al., 2000). A ativação e estimulação celular ocorrem pelo TNF- α , que modula citocinas tais como interleucinas (IL-1, IL-6 e IL-8), enzimas, mediadores inflamatórios e PFAs em resposta a determinados estímulos tóxico-infecciosos (BEYAERT; FIERIS, 1998; GHISELLI et al., 2001). A concentração sérica do TNF- α eleva-se 15 a 30 minutos após a indução da endotoxemia, atingindo pico máximo ao redor de 60 a 90 minutos e diminuindo por volta de 4 horas, sendo, portanto, o mediador inicial da endotoxemia em equinos (BARTON et al., 1996; BEYAERT; FIERIS, 1998; BUENO et al., 1999; PEIRÓ et al., 1999).

Em humanos a proteína C-reativa e amilóide sérica A são as principais PFAs, enquanto que nos ratos as principais são a glicoproteína ácida (AGP), amilóide sérica A e haptoglobina (GOMEZ et al., 2008). A infusão intraperitoneal de lipopolissacarídeos em ratos ocasionou diminuição da resposta inflamatória aguda, algumas das PFAs como haptoglobina e glicoproteína ácida foram encontradas em menor quantidade (GOMEZ et al., 2008).

A IL-6 é uma citocina com uma extensa gama de atividades biológicas, pois ajuda a controlar a indução da resposta de fase aguda e também é um mediador para a troca de classe de imunoglobulinas. Também é capaz de influenciar várias respostas inflamatórias que possuem importância na

patogenia da endotoxemia e infecção bacteriana e é considerada a principal reguladora da resposta de proteínas de fase aguda (VAN DER POLL; VAN DEVENTER, 1998; VAN SNICK, 1990) como fibrinogênio, alfa-1-antiquimotripsina, alfa-1-glicoproteína ácida, haptoglobina, amilóide sérica A e proteína C reativa (CASTELL et al., 1988).

Em equinos, aumentos séricos da atividade da IL-6 ocorrem em casos de abdômen agudo de ocorrência natural em adultos e em septicemia por Gram-negativos em neonatos (MACKAY, 1992; MORRIS, 1991; MORRIS; MOORE, 1991). As condições citadas anteriormente podem levar aos processos inflamatórios locais, e provavelmente 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; SAQUETTI et al., 2008). Portanto a detecção precoce da inflamação sistêmica é essencial para proporcionar o tratamento adequado (MACKAY, 2000). Sendo assim, a avaliação destas proteínas pode ser útil em detectar e monitorar a progressão e a gravidade de processos inflamatórios.

A eletroforese consiste no método mais importante para identificar proteínas presentes no sangue (KANEKO, 2008). As eletroforeses em acetato de celulose e em gel de agarose foram utilizadas para analisar as concentrações de proteínas plasmáticas, mas essas técnicas são limitadas, porque podem identificar apenas de 5 a 7 grupos de proteínas (EDINGER et al., 1992; KIRK et al., 1975; MATTHEWS, 1982).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE), por outro lado, permite identificar mais de 20 frações proteicas, 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 somente foi usada na avaliação do soro e proteinograma de equinos acometidos por laminite (FAGLIARI; SILVA, 2002), ou obstrução experimental do cólon menor (SAQUETTI et al.,

2008), não tendo sido empregada para determinar alterações nas concentrações de proteínas de fase aguda em equinos portadores de endotoxemia experimental.

As proteínas de fase aguda são consideradas como potenciais indicadores da presença de enfermidades e também do bem-estar individual, da saúde do rebanho (GÄNHEIM et al., 2007), e para avaliar a resposta sistêmica do sistema imune decorrente de possíveis infecções (CERON et al., 2005; MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). As PFAs, também chamadas de “biomarcadores”, estão presentes na maioria das espécies, porém há diferença entre as espécies domésticas quanto ao aumento da concentração de determinada proteína quando ocorre inflamação. Na medicina veterinária, um uso potencial envolve a mensuração de proteínas de fase aguda e interpretação das concentrações das mesmas para se prever a morbidade ou a mortalidade de pacientes (ECKERSALL; BELL, 2010).

Geralmente, aumentos importantes nas concentrações plasmáticas de PFAs em equinos têm sido demonstrados com infecções bacterianas e virais (COHEN et al., 2005; HULTEN et al., 1999a), cirurgia (FAGLIARI et al., 2008; POLLOCK et al., 2005; SAQUETTI et al., 2008), cólica (VANDENPLAS et al., 2005) e artrite induzida experimentalmente (JACOBSEN, 2006). Concentrações de vários componentes da resposta de fase aguda geralmente aumentam juntas, embora nem todas aumentem uniformemente em todos os equinos com as mesmas enfermidades. A concentração de PFAs circulantes pode dar uma ideia objetiva da saúde de um animal, incluindo a gravidade de qualquer doença em desenvolvimento, e permitir a monitoração da resolução da enfermidade (CRISMAN et al., 2008). Em felinos, foi relatado que as PFAs são respostas a infecções por vírus específicos (PALTRINIERI, 2008). Porém as principais limitações da mensuração de PFAs para fins clínicos são o pobre diagnóstico específico para as diferentes enfermidades e o custo relativamente alto de cada teste (PALTRINIERI, 2006).

A amilóide sérica A equina é uma apolipoproteína de fase aguda que aumenta rapidamente, mais de 100 vezes, após lesão tecidual, infecção ou

inflamação (HULTEN et al., 1999b). Intervalos de referência para as concentrações plasmáticas de amilóide sérica A em equinos sadios varia de menor que 0,5 a 20 mg/L (HULTEN et al., 1999a; JACOBSEN; ANDERSEN, 2007). Sua concentração sanguínea aumenta atingindo picos cerca de 48 horas após o evento inflamatório (HULTEN; DEMMERS, 2002; PEPYS et al., 1989). Por meio de aparelhos comerciais disponíveis, utilizados para a mensuração da elevação do índice dessa proteína em resposta ao processo inflamatório, já se obtiveram resultados confiáveis que atendem aos propósitos clínicos de diagnóstico (JACOBSEN; HANSEN, 2008). A sensibilidade diagnóstica e o perfil cinético da amilóide sérica A faz com que ela seja um marcador ideal da inflamação e da lesão tecidual (CRISMAN et al., 2008), não só para equinos como também para felinos (PALTRINIERI, 2008) e caprinos (GONZÁLEZ et al., 2008) e até humanos (POLLOCK et al., 2005; SCHALM, 1979; TOPPER; PRASSE, 1998).

A ceruloplasmina é uma PFA ligadora, com importante papel em seu metabolismo e transporte do cobre, essencial à eritropoiese, e tem funções imunológica e removedora de radicais livres do oxigênio produzidos na inflamação (GRUYS et al., 1994; HIRVONEN, 2000).

A transferrina é uma proteína de fase aguda negativa (GRUYS et al., 1994) que 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 aumento da susceptibilidade à infecção (KEENE; JANDL, 1965; STAHL, 1987) e sua concentração também pode ser um requisito à proliferação de linfócitos T em humanos (HUNTER et al., 1984). Em cães acometidos por linfomas e submetidos à quimioterapia já foram constatados níveis relativamente elevados (VIEIRA et al., 2010).

Em equinos e outras espécies, a albumina também é uma proteína de fase aguda negativa (GRUYS et al., 1994; JACOBSEN; ANDERSEN, 2007), não devendo aumentar em resposta a estímulo inflamatório agudo

(HIRVONEN; PYORALA, 1998). Além da inflamação, a alimentação também pode influir na concentração de albumina (DON; KAYSENT, 2004).

A haptoglobina é o principal indicador de inflamação (mastites, enterites, pneumonias, endocardites e endometrites) nas diversas espécies de ruminantes, atingindo níveis extremos após dois dias do evento inflamatório (MURATA et al., 2004; PETERSEN, 2004). A haptoglobina, uma proteína ligadora da hemoglobina, está presente no soro de animais normais em níveis iguais ou menores que 100 µg/mL (GODSON et al., 1996; SKINNER et al., 1991) e sua concentração pode aumentar até 10 vezes, em resposta a uma infecção bacteriana (CRISMAN et al., 2008; SALONEN et al., 1996; SKINNER et al., 1991). Concentrações elevadas de haptoglobina foram observadas em equinos após cirurgias (KENT; GOODALL, 1991), artrite não-infecciosa (HULTEN et al., 2002), e laminite induzida por carboidrato (FAGLIARI et al., 1998). A haptoglobina é considerada um indicador sensível de infecção ou inflamação em equinos (KENT; GOODALL, 1991). Em cabras, foi observado um considerável aumento na concentração de fibrinogênio e pouca variação quanto à haptoglobina durante a resposta inflamatória aguda (GONZÁLEZ et al., 2008).

O fibrinogênio é uma das PFAs mais conhecidas. É sintetizado pelo fígado, sendo considerada uma PFA moderada com concentrações que aumentam 1 a 10 vezes ao longo de 24 a 72 horas após a indução da inflamação. Embora o fibrinogênio seja considerado uma proteína de fase aguda seus valores aumentam 24 horas após a indução da inflamação, podendo ou não atingir um pico por dois a três dias (ALLEN; KOLD, 1988; HULTEN et al., 2002; JACOBSEN et al., 2005; SCHALM et al., 1970). Devido sua quantificação ser relativamente fácil e barata, continua sendo amplamente utilizada na medicina veterinária para monitorar processos inflamatórios em equinos (CRISMAN et al., 2008). Em bezerros que sofreram fotossensibilização hepatógena, além das PFAs descritas acima estarem presentes, a α -antitripsina também estava em concentração elevada (FAGLIARI et al., 2007), enquanto o fibrinogênio, amilóide sérica A e ceruloplasmina foram evidenciados

em bovinos acometidos por theileriose tropical (NAZIFI et al., 2009). O estresse de transporte, manejo e desmama também podem contribuir com o aumento de amilóide sérica A e haptoglobina em bovinos adultos (JACOBSEN et al., 2008).

A glicoproteína ácida (AGP) é uma proteína que tem ação na parede dos microvasos durante a fase aguda, propriedades imunomoduladoras (SATO et al. 1995) e de reparo e cicatrização (THOMPSON et al., 1992). Duas funções principais são atribuídas à glicoproteína ácida, isto é, a ligação à fármacos e imunomodulação (FOURNIER et al., 2000). A AGP pode inibir a ativação de neutrófilos, aumentar a secreção do antagonista de receptor para IL-1 por macrófagos, e aumentar o “clearance” de lipopolissacarídeo por se ligar diretamente a ele e neutralizá-lo (FOURNIER et al., 2000; MOORE et al., 1997). Cães possuem níveis elevados de haptoglobina, ceruloplasmina e α -glicoproteína ácida quando submetidos a episódios de gastroenterite hemorrágica (KOGIKO et al., 2003). A glicoproteína ácida alfa-1 também está presente no soro e líquido peritoneal de felinos, sendo um importante indicador de inflamação, principalmente nos casos de peritonite infecciosa felina (PIF) (DUTHIE et al., 1997; GIORDANO et al., 2004).

A proteína C reativa é a principal proteína de fase aguda requisitada em exames bioquímicos laboratoriais em humanos (ECKERSALL; BELL, 2010). Em cães, já houve descrição de aumento relativo desta proteína quando estes animais foram acometidos por algumas doenças infecciosas (CERON et al., 2005), sendo portanto o principal indicador de inflamação nesta espécie (CASPI et al., 1987; GEBHARDT et al., 2009; OHNO et al., 2006). Em equinos, a proteína C reativa é considerada uma proteína de fase aguda moderada, com um aumento de duas a três vezes ao longo de vários dias. Esta proteína tem várias funções inflamatórias, incluindo a ativação da cascata do complemento, a indução de citocinas inflamatórias e a fagocitose. Possui também efeitos anti-inflamatórios, como a inibição da quimiotaxia e da geração de superóxido pelos neutrófilos, além de prevenir a aderência destes neutrófilos a células endoteliais (CRISMAN et al., 2008).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são utilizados para tratar

equinos com quadro de endotoxemia, contudo, estes fármacos exibem efeitos colaterais mesmo quando utilizados em doses terapêuticas (CUNNINGHAM; LEES, 1994; MACKAY et al., 1991; MORRESEY, 2001). Além disso, em alguns casos estas substâncias mascaram os sinais clínicos indicativos de endotoxemia, retardando a decisão para a cirurgia (MOORE, 1988). Portanto, faz-se necessária a avaliação de fármacos, inclusive de outras classes, possuem também efeitos anti-endotoxêmicos e anti-inflamatórios.

Peritonites, enterites, danos à serosa, distensão intestinal, endotoxemia e manipulação cirúrgica têm sido associados experimentalmente com aumento da estimulação simpática (DE WINTER et al., 1997; LEVINGSTON; PASSARO, 1990; MALONE et al., 2006). A lidocaína pode atuar prevenindo o reflexo inibitório em virtude de um ou mais desses fatores por bloqueio da transmissão através de nervos aferentes (MALONE et al., 2006; RITCHIE; GREENE, 1990), ou as alterações primárias de motilidade por meio de suas ações anti-inflamatórias, anti-endotóxicas, ou analgésicas (DOHERTY; FRAZIER, 1998; MACGREGOR et al., 1980; MALONE et al., 2006; SCHAUB et al., 1982).

O cloridrato de lidocaína é utilizado como anestésico local e regional e para tratamento clínico e preventivo de arritmias cardíacas em humanos (MAMA; STEFFEY, 2001; PLUMB, 2005). Na medicina veterinária equina foi utilizada no tratamento de íleo operatório (BRIANCEAU, 2002; COHEN, 2004; MALONE et al., 2006), porém, em estudo com cavalos com laminite não houve inibição dos eventos inflamatórios no tecido laminar após a infusão de lidocaína. (WILLIAMS et al., 2010). A lidocaína pode possuir papel analgésico e anti-inflamatório, porém seus mecanismos de farmacologia aplicada à clínica e cirurgia em equinos não são bem esclarecidos (COOK; BLIKSLAGER, 2008).

Em um modelo de endotoxemia em coelhos (TANIGUCHI et al., 2000), a lidocaína teve um efeito inibitório profundo nas respostas hemodinâmica e a citocinas, inclusive sobre a IL-6, quando foi administrada imediatamente após à endotoxina (TANIGUCHI et al., 1996). Embora os mecanismos exatos responsáveis por estes efeitos inibitórios ainda necessitem de investigação, os

autores concluem que seus resultados demonstraram a utilidade potencial da lidocaína como agente anti-inflamatório na endotoxemia.

III. MATERIAL E MÉTODO

III.a. Seleção e preparo dos animais, colheita de amostras

Doze cavalos foram selecionados após verificarem-se valores normais de contagem total e diferencial de leucócitos, proteína total e fibrinogênio no plasma e no líquido peritoneal, sendo da raça Mangalarga, machos, com idade entre 2 e 3 anos.

Os animais foram distribuídos em dois grupos, com seis animais cada: GC (controle) e GE (experimental). Todos receberam a mesma alimentação, água à vontade, e foram vermifugados com ivermectina 1%¹ (200 µg/kg, IM).

As amostras de líquido peritoneal e sangue foram colhidas antes da infusão intraperitoneal de LPS, momento basal (-10 minutos), e aos 20, 60, 120, 180, 240, 300 e 385 minutos após a infusão (MAI) intraperitoneal de LPS.

O líquido peritoneal foi colhido em tubos estéreis após tricotomia e antissepsia de uma área de 10x10 cm imediatamente caudal ao apêndice xifóide, e aplicação de 5 mL de bupivacaína² na pele e tecido subcutâneo. Realizou-se uma pequena incisão de pele e linha média com lâmina de bisturi para a inserção de uma cânula mamária na cavidade abdominal.

O sangue foi colhido, após antissepsia, por venopunção jugular, utilizando-se sistema a vácuo³ com tubos estéreis sem anticoagulante para separação do soro. Todas as colheitas foram coincidentes àquelas do líquido peritoneal.

Todas as amostras foram congeladas e mantidas a -70° C até o momento das dosagens.

Os animais de ambos os grupos receberam flunixinina meglumina⁴, na dose de 1,0 mg/kg/IM, ao término das observações e colheitas de amostras. Esse tratamento foi repetido por três dias consecutivos.

¹ Ivomec, Merial, Campinas, SP, Brasil.

² Neocaína, Abbott, São Paulo.

³ Vacutainer, BD, Plymouth, Reino Unido.

⁴ Banamine, Schering-Plough, Cotia, SP, Brasil.

III.b. Delineamento experimental

A endotoxemia foi induzida nos grupos pela infusão de 500 ng/kg de endotoxina de *E. coli* 055:B5⁵ diluída em 50 mL de solução de NaCl a 0,9%⁶. A suspensão foi administrada intraperitonealmente (i.p.) na região paralombar direita, via cânula mamária estéril, durante 5 minutos, de acordo com as normas de assepsia e antissepsia.

O delineamento experimental está resumido na Figura 1.

No grupo experimental a LPS i.p. foi administrada conforme descrito anteriormente. Após aguardar 20 minutos, foi administrada lidocaína 2%⁷ i.v. (1,3 mg/kg), durante 5 minutos, seguida da infusão de lidocaína 2%⁷ i.v. na taxa de 0,05 mg/kg/min., durante 6 horas.

No grupo controle a LPS foi administrada como no GE. Decorridos 20 minutos da aplicação da endotoxina, foi administrada a solução de NaCl a 0,9%⁶ i.v., em igual volume calculado para a lidocaína a 2%⁷, durante 5 minutos. Finalmente, infundiu-se um volume de solução de NaCl a 0,9%⁶ igual ao que seria infundido para a lidocaína 2%⁷ durante 6 horas.

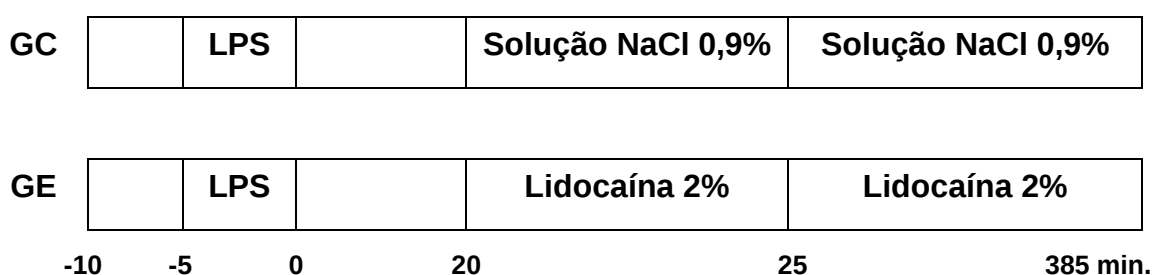


Figura 1 – Desenho esquemático do delineamento experimental para o grupo controle (GC) e grupo experimental (GE) com os momentos (em minutos) e intervalos da administração do lipopolissacarídeo (LPS) e

⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

⁶ Cloreto de sódio 0,9%, J. P. Indústria Farmacêutica S. A., Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁶ Cloreto de sódio 0,9%, J. P. Indústria Farmacêutica S. A., Ribeirão Preto, SP, Brasil.

⁷ Lidocaína a 2%, Ariston Indústrias Químicas e Farmacêuticas Ltda., São Paulo, SP, Brasil.

soluções de NaCl a 0,9% e lidocaína a 2%. A infusão de LPS iniciando no momento -5 minutos e terminando no momento 0. A administração de solução de NaCl 0,9% (GC) ou lidocaína 2% (GE) iniciou aos 20 MAI de LPS, durando 5 minutos, seguida da infusão por 6 horas de solução de NaCl 0,9% (GC) ou lidocaína 2% (GE).

Para o melhor controle da velocidade e tempo de infusão, as diferentes soluções utilizadas foram administradas por meio de uma bomba de infusão contínua para seringas com escala de 0,15 - 60 mL⁸.

III.c. Eletroforese

Por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi realizado o fracionamento das diferentes proteínas de fase aguda avaliadas. Para a confecção dos diferentes géis, foram utilizados produtos Sigma⁹.

O gel de empilhamento a 4% consistiu de 1,97 mL de água deionizada, de 300 µL de solução Tris-HCL 2 M, com o pH ajustado para 8,8, acrescido de 0,5 mL de Acrilamida/Bis (30%/2,6%), de 150 µL de Glicerol, de 61,5 µL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,3, e 61,5 µL de solução de SDS 10%. Foi polimerizado pela adição de 30 µL de persulfato de amônio a 10% e 6,5 µL de tetrametil-etilenodiamina (TEMED). Este gel, onde as amostras são aplicadas, possui porosidade maior que o gel de separação e tem a função de concentrar a amostra da proteína.

O gel de separação a 10%, onde ocorre o fracionamento das proteínas, consistiu de 5,95 mL de água deionizada, de 2,95 mL de solução Tris-HCL 2 M, com o pH ajustado para 8,8, acrescido de 5,25 mL de Acrilamida/Bis (30%/2,6%), de 850 µL de Glicerol, de 310 µL de solução de EDTA 0,5 M pH 8,3, e 310 µL de solução de SDS 10%. Foi polimerizado pela adição de 121 µL de persulfato de amônio a 10% e 13,5 µL de tetrametil-etilenodiamina (TEMED).

⁸ SAGE Syringe Pump, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA.

⁹ Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

A solução tampão de amostra consistiu de 10 mL de lauril sulfato de sódio a 10%, 4 mL de EDTA 0,5 M, 5 mL de triz-fosfato 0,617 M (pH 6,8), 3 mL de 2-mercaptoetanol, 10 mL de glicerol, 18 mL de água deionizada e 5 mg de azul de bromofenol.

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

Para o preparo das amostras de soro foram utilizados 10 µL de amostra pura em um tubo de polipropileno¹⁰ de 0,5 mL, adicionando-se 20 µL de tampão de amostra e 30 µL de solução tampão de fosfato salina.

Para o preparo das amostras de líquido peritoneal foram utilizados 40 µL de amostra pura em tubos de polipropileno¹⁰ aos quais foram adicionados 20 µL de tampão de amostra. As amostras foram fervidas por 10 minutos para desnaturação das proteínas e em seguida foram aplicadas ao gel.

Utilizou-se uma cuba de eletroforese e dois sistemas verticais de gel medindo 20 cm x 15 cm ligados à fonte de energia¹¹ programada a 20 mA enquanto as amostras estiveram no gel de empilhamento e aumentada para 30 mA quando as amostras chegassem ao gel de separação.

Os géis foram corados durante 90 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%), para a visualização do fracionamento proteico.

Os géis foram descorados “overnight” em uma solução contendo 25% de metanol, 10% de ácido acético glacial e 65% de água destilada, para retirar o excesso de corante e tornar as frações proteicas nítidas.

As concentrações das frações proteicas foram determinadas por um fotodocumentador¹² computadorizado. As frações de proteínas de fase aguda foram identificadas utilizando-se como referência um marcador de peso

¹⁰ Costar Polypropylen Tubes, UK.

¹¹ PowerPac 1000, Bio-Rad, UK.

¹² ImageQuant LAS 4000, GE Healthcare, USA.

molecular¹³ de 6.500 a 200.000 dáltons e pela comparação com a mobilidade eletroforética de proteínas purificadas¹⁴ (transferrina, ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida). Os valores das concentrações das proteínas foram determinados pela proporção dessas em relação aos valores da proteína total de cada momento, determinada por refratometria (FAGLIARI et al., 1998; SAQUETTI et al., 2008).

III.d. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas entre os momentos estudados, seguidos pelo teste de Friedman para comparar momentos em cada grupo e o teste de Mann-Whitney para comparar grupos em cada momento, considerando-se significativos valores com $p < 0,05$. Para a análise estatística foi utilizado programa computacional SAS¹⁵.

¹³ Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

¹⁴ Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA.

¹⁵ SAS Statistical Analysis System, SAS Institute, Cary, EUA.

IV. RESULTADO

Os valores referentes às concentrações médias séricas e peritoneais de proteínas de fase aguda (transferrina, ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) estão apresentados nas Tabelas 1 a 10.

Não houve alteração significativa ($p>0,05$) das concentrações séricas de transferrina em ambos os grupos ao longo do tempo. Contudo, a concentração sérica de transferrina estava aumentada significativamente ($p<0,05$) no momento basal (10 minutos antes da endotoxemia), aos 20, 240, 300 e 385 minutos após a infusão de endotoxina (MAI) no GE em relação ao GC nos mesmos momentos (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentrações séricas de transferrina (mg/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	13,88 (3,55- 28,08) ^B	16,31 (2,80- 35,0) ^B	11,61 (3,60- 50,37) ^A	9,24 (5,68- 65,80) ^A	20,80 (4,62- 54,12) ^A	19,49 (3,25- 52,92) ^B	14,81 (3,30- 26,60) ^B	13,90 (5,60- 34,32) ^B
GE (n=6)	58,54 (11,97- 105,60) ^A	59,76 (12,12- 97,65) ^A	45,95 (10,56- 87,57) ^A	54,27 (14,08- 79,38) ^A	40,01 (12-200) ^A	61,38 (40,02- 155,5) ^A	47,51 (17,11- 87,57) ^A	61,61 (26,32- 117,2) ^A

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

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

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

Não houve alteração significativa ($p>0,05$) das concentrações séricas de ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida em ambos os grupos ao longo do tempo, nem entre os dois grupos estudados (Tabelas 2 a 5).

Tabela 2 - Concentrações séricas de ceruloplasmina (mg/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	55,33 (21,78- 117,9)	57,28 (21,70- 168,3)	60,02 (30,36- 218,4)	67,73 (19,80- 221,1)	61,03 (24,42- 241,2)	50,17 (24,79- 86,10)	57,55 (28,29- 342,0)	45,50 (25,16- 178,5)
GE (n=6)	98,12 (77,22- 185,0)	104,5 (56,32- 159,9)	70,37 (48,00- 110,7)	62,04 (32,40- 170,1)	66,02 (31,62- 265,7)	71,23 (40,60- 216,1)	76,30 (39,90- 107,2)	89,23 (42,18- 133,9)

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

Tabela 3 - Concentrações séricas de albumina (g/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	2,22 (1,36- 3,27)	2,15 (1,54- 3,48)	2,14 (1,55- 3,44)	2,16 (1,53- 3,44)	2,23 (1,49- 3,56)	2,38 (1,52- 4,08)	2,31 (1,52- 3,73)	1,95 (1,47- 3,67)
GE (n=6)	2,43 (1,67- 2,74)	2,29 (1,80- 2,93)	2,31 (1,66- 3,14)	2,14 (1,64- 2,45)	2,28 (1,22- 2,81)	2,20 (2,03- 2,49)	2,35 (2,01- 2,76)	2,20 (1,86- 2,49)

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

Tabela 4 - Concentrações séricas de haptoglobina (mg/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	136,7 (81,84- 248,4)	125,4 (90,39- 240,8)	125,7 (95,85- 229,8)	115,9 (63,05- 228,9)	101,9 (80,52- 124,2)	123,5 (80,40- 272,2)	106,2 (76,70- 207,9)	120,4 (96,00- 226,8)

Continuação Tabela 4 - Concentrações séricas de haptoglobina (mg/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

GE (n=6)	123,2 (81,25- 204,1)	92,93 (63,51- 283,6)	90,52 (58,46- 225,7)	97,01 (64,96- 191,4)	132,5 (60,76- 198,0)	112,0 (54,56- 220,1)	88,45 (52,44- 189,4)	97,21 (59,94- 161,4)
---------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------	----------------------------

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

Tabela 5 - Concentrações séricas de glicoproteína ácida (mg/dL) de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	51,83 (31,02- 185,8)	57,95 (26,91- 224,0)	51,35 (39,60- 209,1)	52,29 (24,42- 238,0)	37,38 (13,65- 226,1)	47,87 (26,80- 224,6)	53,44 (26,00- 219,1)	50,24 (26,60- 231,7)
GE (n=6)	75,41 (33,15- 212,3)	66,90 (39,68- 204,8)	54,74 (34,56- 201,3)	58,82 (28,52- 174,7)	87,77 (29,14- 181,2)	74,60 (38,86- 171,1)	75,69 (34,20- 174,6)	88,83 (35,34- 190,2)

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

No líquido peritoneal, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) das concentrações de transferrina dos 240 aos 385 MAI em comparação ao momento basal no GC. Não houve alteração significativa ($p > 0,05$) das concentrações de transferrina no líquido peritoneal nos animais do GE ao longo do tempo. Também não foram encontradas alterações significativas ($p > 0,05$) das concentrações de transferrina no líquido peritoneal entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações de transferrina (mg/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	2,76 (0,96- 5,53) ^c	3,39 (2,25- 5,94) ^{b,c}	4,62 (1,25- 9,30) ^{b,c}	15,28 (7,80- 47,74) ^{b,c}	18,92 (2,61- 28,71) ^{a, b,c}	24,75 (9,36- 37,44) ^{a,b}	27,28 (11,22- 50,84) ^{a,b}	30,07 (9,60- 99,47) ^a
GE (n=6)	5,16 (2,30- 7,84)	4,44 (2,15- 8,70)	3,97 (2,16- 11,62)	8,53 (5,31- 23,04)	11,43 (1,80- 26,68)	12,27 (7,98- 26,73)	12,75 (3,78- 31,32)	14,28 (0-42,28)

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (teste de Friedman, $p < 0,05$).

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

As concentrações peritoneais de ceruloplasmina sofreram aumento significativo ($p < 0,05$) aos 385 MAI em relação ao momento basal e quando comparado com os momentos 20, 60 e 120 MAI no GC. Não foram encontradas alterações significativas ($p > 0,05$) das concentrações de ceruloplasmina no líquido peritoneal nos animais do GE entre os momentos avaliados. Na comparação dos dois grupos, observou-se que as concentrações peritoneais de ceruloplasmina foram significativamente menores ($p < 0,05$) nos animais do GE aos 300 MAI somente (Tabela 7).

Tabela 7 - Concentrações de ceruloplasmina (mg/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	6,50 (4,62- 11,16) ^{b,A}	6,43 (4,69- 9,17) ^{b,A}	5,92 (1,32- 8,40) ^{b,A}	11,18 (3,68- 29,04) ^{b,A}	16,13 (8,46- 37,20) ^{a,b,A}	17,82 (11,73- 25,92) ^{b,A}	20,82 (10,72- 24,99) ^{b,A}	23,46 (14,06- 41,04) ^{a,A}

Continuação Tabela 7 - Concentrações de ceruloplasmina (mg/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

GE (n=6)	5,58 (2,31- 9,40) ^A	7,12 (3,08- 9,65) ^A	5,03 (2,64- 8,12) ^A	11,86 (6,24- 29,04) ^A	11,80 (7,20- 21,06) ^A	11,03 (2,70- 19,95) ^A	12,24 (4,05- 18,70) ^B	13,93 (0-63,28) ^A
-------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--------------------------------------	--	--	--	--	---------------------------------

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (teste de Friedman, $p < 0,05$).

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

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

As concentrações peritoneais de albumina aumentaram significativamente ($p < 0,05$) dos 240 aos 385 MAI, quando comparados aos momentos anteriores no GC, e aos 300 MAI nos animais do GE quando comparado com os momentos Basal a 180 MAI. Entretanto, não foram encontradas alterações significativas ($p > 0,05$) das concentrações de albumina no líquido peritoneal entre os grupos (Tabela 8).

Tabela 8 - Concentrações de albumina (g/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	0,26 (0-0,45) ^c	0,24 (0-0,41) ^c	0,24 (0-0,35) _{b,c}	0,31 (0,19- 0,86) ^{b,c}	0,50 (0,14- 1,01) ^{b,c}	0,61 (0,23- 1,47) ^a	0,76 (0,32- 1,58) ^a	0,77 (0,24- 1,29) ^a
GE (n=6)	0,17 (0,15- 0,25) ^{b,c}	0,17 (0,13- 0,21) ^c	0,20 (0,15- 0,29) ^b	0,46 (0,39- 0,94) ^b	0,61 (0,43- 1,19) ^b	0,71 (0,63- 1,55) ^{a,b}	1,17 (0,51- 1,61) ^a	1,13 (0-1,74) _{a,b}

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (teste de Friedman, $p < 0,05$).

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

Em ambos os grupos, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) nas concentrações peritoneais de haptoglobina ao longo do tempo em relação ao momento basal, porém, o momento 385 MAI diferiu significativamente dos momentos 20 e 60 MAI no GC. Também não foram encontradas alterações significativas ($p>0,05$) das concentrações peritoneais de haptoglobina entre os grupos (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentrações de haptoglobina (mg/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	25,53 (0-56,1) a,b	26,81 (0-42,21) b	17,73 (0-39,30) b	29,17 (19,18- 55,44) a,b	45,42 (13,04- 133,2) a,b	54,96 (10,10- 114,8) a,b	59,37 (14,96- 157,7) a,b	63,27 (27,37- 144,3) a
GE (n=6)	17,85 (6,85- 30,66)	18,98 (3,68- 25,20)	16,10 (5,65- 22,54)	41,43 (15,21- 55,66)	34,90 (20,97- 79,50)	47,29 (15,01- 66,24)	47,30 (12,32- 166,9)	73,37 (0-144,6)

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

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

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

As concentrações peritoneais de glicoproteína ácida sofreram aumento significativo ($p<0,05$) aos 240 e 385 MAI em relação ao momento basal e 20 e 60 MAI no GE, enquanto no GC não se observaram alterações ($p>0,05$) nas concentrações desta proteína ao longo do tempo. Na comparação entre os grupos, as concentrações peritoneais de glicoproteína ácida estavam aumentadas ($p<0,05$) no momento basal nos animais do GC em relação ao GE (Tabela 10).

Tabela 10 - Concentrações de glicoproteína ácida (mg/dL) no líquido peritoneal de equinos, quantificadas em diferentes momentos antes e após serem submetidos à indução experimental de endotoxemia por via intraperitoneal e posteriormente tratados com infusão intravenosa contínua de solução de NaCl a 0,9%, grupo controle (GC), ou lidocaína a 2%, grupo experimental (GE)

Grupos	MAI							
	Basal	20	60	120	180	240	300	385
GC (n=6)	38,08 (2,22- 86,56) ^A	29,07 (22,94- 77,35) ^A	30,59 (4,06- 68,76) ^A	19,94 (8,96- 39,36) ^A	33,97 (15,30- 64,98) ^A	31,93 (5,22- 88,44) ^A	35,77 (8,56- 89,28) ^A	38,32 (8,12- 104,3) ^A
GE (n=6)	9,37 (2,00- 18,40) ^{b,c, B}	12,18 (1,44- 23,55) ^{b, A}	9,77 (1,35- 21,60) ^{b,c, A}	31,95 (5,20- 61,82) ^{a,b, A}	27,73 (15,48- 63,22) ^{a,b, A}	43,15 (17,67- 64,64) ^{a, A}	33,26 (14,52- 101,7) ^{a,b, A}	60,32 (0-116,1) ^{a, A}

Valores médios com intervalo mínimo e máximo entre parênteses.

Basal = 10 minutos antes da endotoxemia.

Letras minúsculas distintas na linha diferem entre si (teste de Friedman, $p < 0,05$).

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

MAI= minutos após a infusão de endotoxina.

V. DISCUSSÃO

Os achados mais relevantes foram que a infusão de endotoxina causou aumento ao longo do tempo nas concentrações peritoneais de transferrina, ceruloplasmina, albumina e haptoglobina no grupo controle e não no grupo experimental, tratado com lidocaína, permitindo inferir que a mesma teve efeito sobre a indução da endotoxemia. Porém, quando avaliadas as concentrações de glicoproteína ácida peritoneal, ocorreu o inverso, com aumento somente nos animais tratados.

A indução experimental da endotoxemia, por meio da administração intraperitoneal de LPS, causou alterações mais evidentes das proteínas de fase aguda mensuradas no líquido peritoneal do que no soro dos animais. Este modelo pode ser considerado efetivo para avaliação das proteínas no líquido peritoneal, como previamente demonstrado por Peiró et al. (1999) na avaliação da resposta inflamatória celular, porém estes autores observaram que o modelo utilizado também causa resposta celular no sangue periférico, no presente estudo apenas a concentração de transferrina variou no soro.

A endotoxina foi responsável pelo aumento da concentração peritoneal de transferrina 4 horas após sua infusão nos animais do grupo controle, em humanos o pico de transferrina ocorreu 3 horas após a aplicação intravenosa de endotoxina purificada de *E. coli* (Van EIJK et al., 2013). A transferrina é uma PFA negativa cujas concentrações caem durante a resposta de fase aguda (NGUYEN, 1999), após elevação inicial para reabsorção do ferro (WEBB ET al., 2010). Portanto, é possível que a elevação da transferrina peritoneal durante o processo inflamatório na cavidade abdominal induzida pela endotoxina neste estudo possa ser explicada como uma tentativa do organismo em prevenir a colonização bacteriana nestes animais ao limitar a disponibilidade de ferro para as bactérias (CERÓN et al., 2005; FLO et al., 2004), aumentando sua absorção pelos receptores de transferrina no duodeno e cólons, uma vez que a endotoxina administrada é um componente da parede bacteriana.

Recentemente, foram descritos a clonagem e a expressão do receptor para transferrina em diversos tecidos de equinos (WEBB et al., 2010). Estes autores demonstraram que a maior expressão para este receptor se localizava na medula óssea, seguido pelo duodeno e cólons. Sabe-se que no duodeno e nos cardiomiócitos, a expressão do receptor para transferrina possui um papel importante para reabsorver o ferro ligado à transferrina (WEBB et al., 2010). Como não foram observadas alterações no grupo tratado com lidocaína, pode-se inferir que a lidocaína teve efeito inibitório sobre esta PFA nas doses empregadas.

Nas amostras séricas as concentrações de transferrina foram maiores no grupo experimental (Tabela 1), este fato deve-se, provavelmente, a variação individual, visto que desde o momento basal, ou seja, antes da administração de LPS e solução de lidocaína, estes valores já estavam elevados quando comparados ao grupo controle, o que certamente influenciou os valores nos demais momentos.

Em trabalho realizado por Fagliari e Silva (2002) não foi possível mensurar a concentração plasmática de transferrina em equinos acometidos por abdome agudo (sede no intestino grosso) antes e após a laparotomia exploratória. Esta diferença em relação ao presente estudo pode estar relacionada aos momentos de colheita das amostras (até 6 horas no presente estudo versus a cada 24 horas nos animais com cólica), pois a transferrina é uma proteína de fase aguda que diminui sua concentração no soro (caráter negativo) depois de desencadeado o evento inflamatório (KANEKO, 2008; SAQUETTI et al., 2008; VIEIRA et al., 2010).

A elevação da ceruloplasmina peritoneal no grupo controle foi pequena em relação àquela observada no plasma de equinos portadores de abdome agudo (cólon maior) e submetidos à laparotomia (FAGLIARI et al., 2008). No presente estudo, a concentração peritoneal de ceruloplasmina aumentou apenas 385 minutos após a infusão de endotoxina nos animais do grupo controle, quando comparado ao momento basal (Tabela 7). Contudo, a ausência de alteração nas concentrações peritoneais desta proteína nos

animais tratados com lidocaína ao longo do tempo, associada ao fato da concentração de ceruloplasmina ter diminuído no mesmo momento (300 MAI) em relação aos animais do grupo controle, sugere a eficácia da infusão da lidocaína na inibição do aumento desta PFA.

Nos animais tratados com lidocaína, o aumento da concentração peritoneal de albumina ocorreu 1 hora após o início da elevação da concentração peritoneal desta proteína nos animais do grupo controle (Tabela 8). Este resultado sugere que a infusão de lidocaína pode ter auxiliado no retardo do extravasamento vascular desta proteína para a cavidade abdominal. Em um estudo prévio utilizando estes mesmos animais foi demonstrado que a concentração peritoneal de fibrinogênio foi significativamente menor nos animais tratados com lidocaína do que naqueles tratados com solução de NaCl a 0,9% (controle) ao longo de 6 horas (PEIRÓ et al., 2010).

A concentração sérica de albumina em cabras (GONZÁLEZ et al., 2008), felinos (OTTENJANN et al., 2006) e na maioria das espécies de mamíferos diminui cerca de 10-30% (MACKIEWICZ, 1997) após ter sido iniciada alguma condição inflamatória; porém no trabalho realizado a concentração sérica não variou, demonstrando que o processo inflamatório sistêmico foi leve.

Em equinos, as concentrações séricas de haptoglobina são utilizadas para diagnosticar e monitorar doenças inflamatórias nesta espécie (ALLEN; KOLD 1988), e são consideradas como marcadores sensíveis da inflamação, aumentando em resposta ao trauma cirúrgico (ALLEN; KOLD, 1988; AUER et al., 1989; EURELL et al., 1993). O que não ocorreu neste estudo, provavelmente em virtude de processo inflamatório menos intenso neste modelo experimental, quando comparado ao trauma cirúrgico. Embora a determinação das concentrações peritoneais desta PFA seja considerada um indicador mais sensível de processos inflamatórios na cavidade abdominal do que os valores séricos (EURELL et al., 1993), suas concentrações respondem mais lentamente à inflamação e variam muito em animais normais (POLLOCK et al., 2005). No presente estudo também foi observada resposta lenta à indução experimental da endotoxemia no grupo controle (Tabela 9), pois houve

elevação apenas aos 385 MAI em comparação aos 20 MAI.

A ceruloplasmina e a haptoglobina são até seis vezes mais sensíveis do que as contagens de leucócitos para se detectar inflamação, e estão aumentadas nos casos nos quais as contagens totais e diferenciais de leucócitos não sofreram alterações (SOLTER et al., 1991). Em um estudo prévio utilizando estes mesmos animais detectaram-se aumentos significativos da contagem de leucócitos totais em ambos os grupos entre 2 e 4 horas após a infusão da endotoxina (PEIRÓ et al., 2010). A ausência de alterações nas concentrações séricas destas duas PFAs demonstrou que o processo inflamatório sistêmico foi leve, porém houve resposta na avaliação do líquido peritoneal.

Em cães, as concentrações séricas de haptoglobina aumentaram somente após 48 horas da indução da endotoxemia (TVARIJONAVICIUTE et al., 2011). Isto pode ser explicado pelo fato destes autores terem utilizado dose e via de administração diferentes das empregadas neste estudo.

A glicoproteína ácida é considerada um agente anti-inflamatório e imunomodulador com atividades antineutrofílica e anticomplemento (CERÓN et al., 2005). Em um estudo prévio utilizando estes mesmos animais foi demonstrado que a contagem de células polimorfonucleares peritoneais aumentaram a partir de 3 até 6 horas após a infusão da endotoxina (PEIRÓ et al., 2010). Desta forma, a elevação da concentração peritoneal de glicoproteína ácida a partir de 4 horas tenha ocorrido para diminuir esta migração de polimorfonucleares para a cavidade abdominal, confirmando seu efeito anti-inflamatório que não foi inibido pela infusão da lidocaína, pois houve aumento significativo ao longo do tempo no grupo tratado (Tabela 10).

A glicoproteína ácida teve pouca variação nos animais deste estudo, concordando com os resultados de Fagliari e Silva (2002) que compararam o proteinograma plasmático de equinos hígidos com equinos acometidos por abdome agudo, antes e após laparotomia. Em cabras, esta proteína alcança picos quatro dias após o estímulo inflamatório (GONZÁLEZ et al., 2008); em felinos, a concentração da glicoproteína ácida aumenta 10 vezes mais em

relação ao momento basal em animais que passaram por condições inflamatórias naturais ou experimentais (KAJIKAWA et al., 1999; PALTRINIERI, 2008) e neoplasias (CORREA et al., 2001; SELTING et al., 2000) ou foram acometidos pelo vírus da imunodeficiência felina (FIV) (DUTHIE et al., 1997).

Alguns autores propuseram a divisão de PFAs do tipo I (induzida por IL-1 e TNF- α) e tipo II (induzida por IL-6) (BAUMANN; GAULDIE, 1994; CONTENT et al., 1985; DINARELLO, 1984; MACKIEWICZ, 1997; NAWROTH et al., 1986; PETERSEN et al., 2004). Em um estudo prévio utilizando estes mesmos animais, detectou-se o pico máximo da concentração de TNF- α 2 horas após a injeção intraperitoneal de LPS tanto no soro quanto no líquido peritoneal dos animais do grupo controle, enquanto os animais tratados com lidocaína tiveram concentrações de TNF- α menores do que no grupo controle (PEIRÓ et al., 2010). Portanto, os baixos níveis desta citocina poderiam ter sido responsáveis pela ausência de alteração nas concentrações séricas ou peritoneais de haptoglobina e da interleucina-6 (IL-6) (PEIRÓ et al., 2010) que é a principal reguladora da resposta de proteínas de fase aguda (VAN DER POLL; VAN DEVENTER, 1998; VAN SNICK, 1990).

VI. CONCLUSÃO

Conclui-se que neste modelo experimental a administração intraperitoneal de endotoxina causou o aumento nas concentrações peritoneais de transferrina, ceruloplasmina e haptoglobina no grupo controle, da albumina em ambos os grupos, e da glicoproteína ácida no grupo tratado com infusão de lidocaína. Porém a ausência de alterações nas concentrações séricas de ceruloplasmina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida indicam que a quantidade de endotoxina que chegou à corrente circulatória não foi suficiente para alterar as concentrações séricas destas proteínas. A infusão contínua de lidocaína interferiu nos valores peritoneais das proteínas mensuradas, tendo efeito anti-endotoxêmico.

VII. REFERÊNCIAS

- AKIRA, S. Toll-like receptors: lessons from knockout mice. **Biochem. Soc. Trans.**, v.28, p.551-556, 2000.
- ALLEN, B.V., KOLD, S.E. Fibrinogen response to surgical tissue trauma in horse. **Equine Vet. J.**, v.20, p.441-443, 1988.
- AUER, D. E., NG, et al. Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. **Vet. Record**, v.124, p.235-239, 1989.
- BARTON, M.H. Use of polymyxin B for treatment of endotoxemia in horses. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.**, v.22, n.11, p. 1056-1059, 2000.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C. Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. **J. Vet. Intern. Med.**, v.13, p.457-64, 1999.
- BARTON, M.H.; COLLATOS, C; MOORE, J.N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. **Equine Vet. J.**, v.28, n.3, p.382-89, 1996.
- BARTON, M.H; COLLATOS, C.; MOORE, J.N. Cytokine production in the serum and peritoneal fluid of horses with acute gastrointestinal disease. **J. Vet. Internal Med.**, v.7, p.146, 1993.
- BAUMANN, H. e GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today.**, v. 15, p. 74-80, 1994.
- BEYAERT, R.; FIERS, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. In: MIRE-SLUIJS, A., THORPE, R. (Eds). **Cytokines**. California: Academic Press, p.335-360, 1998.
- BRIANCEAU, P. Intravenous lidocaine and small-intestinal size, abdominal fluid, and out-come after colic surgery in horses. **J. Vet. Intern. Med.**, v.16, p. 736-741, 2002.
- BUENO, A.C. et al. Plasma and urine nitric oxide concentrations in horses given below a low dose of endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v.60, p.969-976, 1999.

- BURROWS, G.E. Equine *Escherichia coli* endotoxemia: comparison of intravenous and intraperitoneal endotoxin administration. **Am. J. Vet. Res.**, v.40, n.7, p.991-98, 1979.
- CASPI, D. et al. C-reactive protein in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.48, p.919-922, 1987.
- CASTELL, J.V. et al. Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of the acute phase proteins in human hepatocytes. **FEBS Lett.**, v.232, n.2, p.347-350, 1988.
- CERON, J.J. et al. Acute phase protein in dogs and cats, current knowledge and future perspectives. **Vet. Clin. Pathol.**, v.38, p.63-68, 2005.
- COHEN, N.D. et al. Study of serum amyloid A concentration as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. **Equine Vet. J.**, v.37, p.212-216, 2005.
- COHEN, N.D. Evaluation of risk factors associated with development of postoperative ileus in horses. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.225, p.1070-1078, 2004.
- COLLATOS, C. et al. Intravascular and peritoneal coagulation and fibrinolysis in horses with acute gastrointestinal tract diseases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.207, n.4, p.465-70, 1995.
- CONTENT, J. et al. Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leucocyte-derived factor. **Eur. J. Biochem.**, v.152, p.253-257, 1985.
- COOK, V.L., BLIKSLAGER, A. T. Use of systemically administered lidocaine in horses with gastrointestinal tract disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.232, p.1144-1146, 2008.
- CORREA, S.S. et al. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. **J. Am. Anim. Hosp. Assoc.**, v.37, p.153-158, 2001.
- 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, p. 1956-1963, 1990.

- CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W.K.; ZIMMERMAN, K.L. Blood proteins and inflammation in the horse. **Vet. Clin. North Am. Food Animal Pract.**, v.24, p.285-297, 2008.
- CUNNINGHAM, F.M., LEES, P. Advances in anti-inflammatory therapy. **Br. Vet. J.**, v.150, p.115-34, 1994.
- DE WINTER, B.Y. et al. Effect of adrenergic and nitrenergic blockade on experimental ileus in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.120, p.464-468, 1997.
- DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. **N. Engl J. Med.**, v.311, p.1423-1418, 1984.
- DOHERTY, T.J.; FRAZIER, D.L. The effect of intravenous lidocaine on halothane minimum alveolar concentration in ponies. **Equine Vet. J.**, v.30, p.300-303, 1998.
- DON, B.R.; KAYSENT, G. Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition. **Semin. Dial.**, v.17, p.432-437, 2004.
- DUTHIE, S. et al. Value of alpha 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. **Vet. Rec.**, v.141, p.299-303, 1997.
- ECKERSALL, P.D; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in Veterinary medicine. **Vet. J.**, v.185, p.23-27, 2010.
- EDINGER, V.H. et al. Electrophoretic serum protein petterns in laminitis horses. **Dtsch. Tierarztl Wochenschr**, v.99, p.426, 1992.
- EURELL, T. E. et al. The effect of exploratory laparotomy on the serum and peritoneal haptoglobin concentrations of the pony. **Can. J. Vet. Res.**, v.57, p.42-44, 1993.
- 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. 1234-37, 1998.
- FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.54, p.559-567, 2002.

- FAGLIARI, J.J. et al. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.6, p.1355-1358, 2007.
- FAGLIARI, J.J. et al. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos a laparotomia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.322-328, 2008.
- FENTON, M.J.; GOLENBOCK, D.T. LPS binding proteins and receptors. **J. Leukoc. Biol.**, v.64, p.25-32, 1998.
- FLO, T.H. et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. **Nature**, v.432, p.917-921, 2004.
- FOURNIER, T.; MEDJOUBI, N.N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochim. Biophys Acta**, v.1482, p.157-171, 2000.
- GÄNHEIM, C. et al. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **Vet. J.**, v.173, n. 10, p. 645-651, 2007.
- GEBHARDT, C. et al. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. **J. Vet. Emerg. and Crit. Care**, v.19, p.450-458, 2009.
- GHISELLI, R. et al. Therapeutic efficacy of the polymyxin-like peptide ranalexin in an experimental model of endotoxemia. **J. Surg. Res.**, v.100, p.183-188, 2001.
- GIORDANO, A. et al. Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. **Vet. J.**, v.167, p.38-44, 2004.
- GODSON, D.L. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Vet. Immunol.**, v.51, p. 277-92, 1996.
- GOMEZ, C.R. et al. Diminished acute phase response and increased hepatic inflammation of aged rats in response to intraperitoneal injection of lipopolysaccharide. **J. Gerontol.**, v. 63A, n. 12, 1299–1306, 2008.
- GONZÁLEZ, F.H.D. et al. Acute phase protein response in goats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.20, p.580-584, 2008.

- GORDON, A.H. Electrophoresis of proteins in poliacrylamide and starch gels. New York: **Elsevier Science Publishers** BV, p.213, 1975.
- GOUFFAUX, M. et al. Feline infectious peritonitis proteins of plasma and ascitic fluid. **Vet. Pathol.**, v.12, p.335-348, 1975.
- GRUYS, E. et al. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in the veterinary clinical chemistry: a review. **Vet. Bull.**, v.64, p.1009-18, 1994.
- HACK, C.E. et al. Role of cytokines in sepsis. **Adv. Immunol.**, v.66, p.101-195, 1997.
- HARDIE, E.M.; KRUSE-ELLIOT, K. Endotoxic shock. Part I: a review of causes. **J. Vet. Intern. Med.**, v.4, n.5, p.258-266, 1990.
- HIRVONEN, J. Acute phase response in dairy cattle. **Thesis**. Helsinki. ISSN 1457-1536 (eletronic), 951-45-9104-6 (press), 2000.
- HIRVONEN, J.; PYORALA, S. Acute phase response in diary cows with surgically-treated abdominal disorders. **Vet. J.**, v. 155, p. 53-61, 1998.
- HULTEN, C. et al. A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.68, p.267-281, 1999a.
- HULTEN, C.; DEMMERS, S. Serum amyloid A (SAA) as an aid in management of infection disease in the foal. Comparison with total leukocyte count, neutrophil count and fibrinogen. **Equine Vet. J.**, v.34, p.693-698, 2002.
- HULTEN, C. et al. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha-2-globulins during induced non-infectious arthritis in the horse. **Equine Vet. J.**, v.34, p.699-704, 2002.
- HULTEN, C. et al. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. **Acta Vet. Scand.**, v.40, p.323-333, 1999b.
- HUNTER, R.L. et al. Transferrin in disease. I: A potential prognostic indicator in patients undergoing bone marrow transplantation. **Am. J. Clin. Pathol.**, n. 84, p.581, 1984.

- JACOBSEN, S. et al. Use of serum Amyloid A (SAA) and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: A field study. **Equine Vet. J.**, v.37, p.552-556, 2005.
- JACOBSEN, S. Serum amyloid A isoforms in serum and synovial fluid in horses with lipopolysaccharide-induced arthritis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.110, p.353-330, 2006.
- JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P.H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Vet. Edu.**(*American Edition*), v.19, p.38-46, 2007.
- JACOBSEN, S. et al. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. **Vet. Res. Commun.**, v.32, n.7, p.575-582, 2008.
- JACOBSEN, S.; HANSEN, M.K. Evaluation of commercially available apparatus for measuring the acute phase protein serum amyloid A in horses. **Vet. Rec.**, v.163, p.327-330, 2008.
- KAJIKAWA, T. et al. Changes in concentration of serum amyloid A protein, alfa1-acid glycoprotein, haptoglobin and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **V. Immunol. Immunopathol.**, v.68, p.91-98, 1999.
- KANEKO, J.J. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, p.916, 2008.
- KEENE, W.R., JANDL, J.H. The sites of hemoglobin catabolism. **Blood**, n. 26, p.705, 1965.
- KENT, J.E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Vet. J.**, v.23, p.59-66, 1991.
- KING, J.N., GERRING, E.L. Detection of endotoxin in cases of equine colic. **Vet. Rec.**, v.123, p.269-71, 1988.
- KIRK, G.R., HUTCHESON, D.P., NEATE, S. Electrophoretic pattern of serum protein in clinically normal horses and ponies with laminitis. **Vet. Med. Small An. Clinician**, v.70, p.337-339, 1975.

- KOGIKO, M.M. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida em cães com gastrenterite hemorrágica. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.513-517, 2003.
- KRUTZIC, S.R. et al. The role of toll-like receptors in host defense against microbial infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v.13, p.104-108, 2001.
- LAZARON, V.; DUNN, D.L. Molecular biology of endotoxin antagonism. **World J. Surg.**, v.26, n.7, p. 790-798, 2002.
- LEVINGSTON, E.H.; PASSARO, E.P. Postoperative ileus. **Dig. Dis. Sci.**, v.35, p.121-132, 1990.
- MACGREGOR, R.R. et al. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. **Blood**, v.56, n.2, p.203-09, 1980.
- MACKAY, R.J. Association between serum cytotoxicity and selected clinical variables in 240 horses admitted to a veterinary hospital. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, p.748-52, 1992.
- MACKAY, R.J. et al. Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.533-38, 1991.
- MACKAY, R.J. Inflammation in horses. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.16, p.15–27, 2000.
- MACKIEWICZ, A. Acute phase proteins and transformed cells. **Int. Rev. Cytol.**, v.170, p.225-300, 1997).
- MALONE, E. et al. Intravenous continuous infusion of lidocaine for treatment of equine ileus. **Vet. Surg.**, v.35, p.60-66, 2006.
- MAMA, K.R.; STEFFEY, P. Local anesthetics. In: **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 8th ed., Ed: H.R. Adams, Iowa State University Press, Ames, Iowa. p.343-359, 2001.
- MATTHEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. **Equine Vet. J.**, v. 14, p.322-24, 1982.
- MOORE, D.F. et al. Alpha-1-acid (AAG, orosomucoid) glycoprotein: interaction with bacterial lipopolysaccharide and protection from sepsis. **Inflammation**, v.21, p.69-82, 1997.

- MOORE, J.N. Endotoxemia: Part I definition, characterization, and host defenses. **Compend Cont Educ.**, v.3, p.355-359, 1981.
- MOORE, J.N. II: a perspective on endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, San Diego, 2001. **Proceedings**. Lexington: American Association of Equine Practitioners, 2001, p.61-74.
- MOORE, J.N. Introduction to endotoxemia. In: ANNUAL AAEP CONVENTION, Lexington, 1995. **Proceedings**. Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1995, p.100-02.
- MOORE, J.N. Recognition and treatment of endotoxemia. **Vet. Clin. North Am. Equine Pract.**, v.4, n.1, p.105-13, 1988.
- MOORE, J.N.; BARTON, M.H. Endotoxemia. In: WATSON, T. **Metabolic and endocrine problems of the horse**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998. p.151-65.
- MOORE, R.M.; MORRIS, D.D. Endotoxemia and septicemia in horses: experimental and clinical correlates. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, v.200, p.361-374, 1992.
- MORRESEY, P.R. Synthesis of proinflammatory mediators in endotoxemia. **Comp. Cont. Edu. Pract. Vet.**, v.23, n.9, p.829-36, 2001.
- MORRIS, D. Endotoxemia in horses: A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. **J. Vet. Intern. Med.**, v.5, p.167-181, 1991.
- MORRIS, D.D. et al. Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. **Am. J. Vet. Res.**, v.51, p.1935-40, 1990.
- MORRIS, D.D.; MOORE, J.N. Tumor necrosis factor activity in serum from neonatal foals with presumed septicemia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.199, p.1584-89, 1991.
- MORRISON, D. Bacterial endotoxin and pathogenesis. **Rev. Infect Diseases**, v.5, p.733-747, 1983.
- MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Vet. J.**, v.168, p.28-40, 2004.

- NAWROTH, P.P. et al. Tumor necrosis factor/cachectin interacts with endothelial cell receptors to induce release of interleukin-1. **J. Exp. Med.**, v.162, p.1353-1375, 1986.
- NAZIFI, S. et al. Study on acute phase proteins (haptoglobin, serum amyloid A, fibrinogen, and ceruloplasmin) changes and their diagnostic values in bovine tropical theileriosis. **Parasitol. Res.**, v.105, n.1, p.41-46, 2009.
- NGUYEN, H.T. Transport proteins. **Clinical Chemistry of Laboratory animals**, 2nd ed., p.309-335, 1999.
- OHNO, K. et al. C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 68, p. 1275-1279, 2006.
- OTTENJANN, M. et al. Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax, or fat necrosis. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 20, p. 1143-1150, 2006.
- PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in Dogs and Cats. The Acute Phase Proteins. **Vet. Res. Commun.**, v. 31, suppl. 1, p.125-129, 2006.
- PALTRINIERI, S. The feline acute phase reaction. **Vet. J.**, v.177, p.26-35, 2008.
- PEIRÓ, J.R. **Endotoxemia experimental em equinos: avaliação clínico-laboratorial**. Jaboticabal: UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 1997. 89p. Dissertação (Mestrado).
- PEIRÓ, J.R. et al. Clinical and laboratory evaluation after intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS). **J. Equine Vet. Sci.**, v.19, n.3, p.187-191, 1999. Errata publicada no *J. Equine Vet. Sci.*, v.20, p.44, 1999.
- PEIRÓ, J.R. et al. Effects of Lidocaine Infusion during Experimental Endotoxemia in Horses. **J. Vet Intern Med.**, v.24, p.940-948, 2010.
- PEPYS, M.B. et al. Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. **Equine Vet. J.**, v.21, p.106-109, 1989.
- PETERSEN, H.H. et al. Application of acute phase protein measurement in veterinary clinical chemistry. **Vet. Res.**, v.35, p.163-187, 2004.
- PLUMB, D. Lidocaine HCl. In: **Plumb's Veterinary Drug Handbook**, 5th edn., Blackwell Publishing Professional, Ames, p.460-462, 2005.

- POLLOCK, P.J. et al. Effects of surgery on the acute phase response in clinically normal and diseased horses. **Vet. Rec.**, v.156, p.538-542, 2005.
- RITCHIE, J.M.; GREENE, N.M. Local anesthetics, in: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P.: Goodman and Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics** (ed. 8). New York, NY, Pergamon Press, p.311-331, 1990.
- SALONEN, M. et al. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. **Res. Vet. Sci.**, v.60, p.88-91, 1996.
- SAQUETTI, C.H.C. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.4, p.794-799, 2008.
- SATO, S., SUZUKI, T. e OKADA, KI. Supression of lymphocyte blastogenesis in cows with puerperal metritis and mastitis. **J. Vet. Med. Sci.**, v.57, p. 373-375, 1995.
- SCHALM, O.W. et al. Plasma protein: Fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses. Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. **The Calif. Vet.**, v.24, p.9-11, 1970.
- SCHALM, OW. Et al. Equine hematology. Part III. Significance of plasma fibrinogen concentration in clinical disorders in horses. **Equine Pract.**, v.1, p.22-28, 1979.
- SCHAUB, R.G. et al. Pulmonary vascular Damage in the Pony Induced by Endotoxin: Effect of Lidocaine. Lexington, K.Y., **American Association of Equine Practioners Newsletter**, pp.87-96, 1982.
- SELTING, K.A. et al. Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. **J. Vet. Intern. Med.**, v.14, p.503-506, 2000.
- SKINNER, J.G. et al. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **Vet. Rec.**, v.13, p.147-49, 1991.
- SOLTER, P.F. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.52, p.1738-1742, 1991.

STAHL, W.M. Acute phase protein response to tissue injury. **Critical care medicine**, v. 15, n. 6, p. 545-550, 1987.

TANIGUCHI, T. et al. Lidocaine attenuates the hypotensive and inflammatory response to endotoxemia in rabbits. **Crit. Care Med.**, v.24, n.4, p.642-46, 1996.

TANIGUCHI, T. et al. Effects of lidocaine administration on hemodynamics and cytokine responses to endotoxemia in rabbits. **Crit. Care Med.**, v.28, n.3, p.755-59, 2000.

THOMPSON et al., The value of acute phase protein measurements in clinical practice. **Ann. Clin. Biochem.**, v. 29, p.123-131, 1992.

TOPPER, M.J., PRASSE, K.W. Analysis of coagulation proteins as acute phase reactants in horses with colic. **Am. J. Vet. Res.**, v.59, p.542-545, 1998.

TVARIJONAVICIUTE, A. et al. Adiponectin and IGF-1 are negative acute phase proteins in a dog model of acute endotoxaemia. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 140, p.147-151, 2011.

VALADÃO, C.A.A. Endotoxemia no abdome equino: causas e consequências. **Anais do II Simpósio Internacional do Cavalo Atleta – IV Semana do cavalo**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p.39-45, 2005.

VAN DER POLL, T., VAN DEVENTER, S.J.H. The role of interleukin-6 in endotoxin-induced inflammatory responses. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v.397, p.365-77, 1998.

VAN EIJK, L. T. et al. The effect of iron loading and iron chelation on the innate immune response and subclinical organ injury during human endotoxemia, a randomized trial. **Haematol.**, v. 15, p. 1-19, 2013.

VAN SNICK, J. Interleukin-6: an overview. **Annu. Rev. Immunol.**, v.8, p.253-278, 1990.

VANDENPLAS, M.L. et al. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide-binding protein in horses with colic. **Am. J. Vet. Res.**, v.66, p.1509-1516, 2005.

VIEIRA, M.C. et al. Acute phase proteins in canine lymphoma during antineoplastic chemotherapy. **Braz. J. Vet. Pathol.**, v.3, p.86-92, 2010.

WEBB, T.L. et al. Cloning and tissue expression of the equine transferrin receptor. **Vet. Clin. Pathol.**, v.39, p.424-432, 2010.

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

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

WILLIAMS, J.M. et al. Effect of intravenous lidocaine administration on laminar inflammation in the black walnut extract model of laminitis. **Equine Vet. J.**, p.261-269, 2010.

WERNERS, A.H. et al. Endotoxaemia: a review with implications for the horse. **Equine Vet. J.**, v.37, p.371-383, 2005.