

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CORDEIROS**  
**NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS**

**Rafaela Speranza Baptista**  
**Médica Veterinária**

**ARAÇATUBA – SP**

**2016**

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CORDEIROS**  
**NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS**

**Rafaela Speranza Baptista**

**Orientador: Prof. Adjunto Luiz Claudio Nogueira Mendes**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bovino**

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

**ARAÇATUBA – SP**

**2016**

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

Baptista, Rafaela Speranza

B229pi

Proteinograma sérico de cordeiros nascidos a termo ou prematuros /  
Rafaela Speranza Baptista.  
Araçatuba: [s.n], 2016.  
28f. il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade  
de Medicina Veterinária, 2016

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Adjunto: Luiz Claudio Nogueira Mendes  
Co-orientadora: Profa. Dra. Fernanda Bovino

1. Neonatologia. 2.Eletroforese. 3. Proteína. 4. Transferrina I. T.

CDD 636.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araçatuba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Proteinograma sérico de cordeiros nascidos a termo ou prematuros

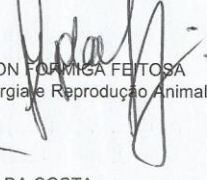
AUTORA: RAFAELA SPERANZA BAPTISTA

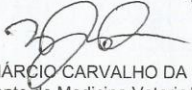
ORIENTADOR: LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES

COORIENTADORA: FERNANDA BOVINO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIA ANIMAL,  
área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. LUIZ CLAUDIO NOGUEIRA MENDES  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp

  
Prof. Dr. FRANCISCO LEYDSON FORMICA FEITOSA  
Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba - Unesp

  
Prof. Dr. MÁRCIO CARVALHO DA COSTA  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva / Centro de Ciências Agrárias - UEL

Araçatuba, 09 de dezembro de 2016.

## **DADOS CURRICULARES**

**RAFAELA SPERANZA BAPTISTA** – nascida em Bauru, São Paulo, em 27 de novembro de 1989. Graduada em Medicina Veterinária, pela Universidade Paulista – UNIP, Campus Bauru, em 2012. Residência em Clínica Médica de Grandes Animais pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2013-2014. Discente do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal pela mesma instituição desde 2015.

“ Nossa loucura é a mais sensata das emoções; tudo  
o que fazemos deixamos como exemplos para os  
que sonham um dia serem assim como nós:  
loucos... mas felizes! ”  
Mário Quintana

**À minha família que mesmo estando longe,  
sempre esteve por perto!**

## AGRADECIMENTOS

À minha base: pai, mãe e Gabi, aqueles que sempre me dão forças, apoiando as minhas conquistas e aos quais deverei minha eterna gratidão e respeito. Nunca acharei palavras para expressar o quanto amo vocês e não sei viver sem!

À toda a minha família, em especial ao Vô Nim, Vó Jura, Tio Nato, Tia Vana, Re, que vibram com todas as minhas conquistas e que estão diariamente nas minhas orações.

Ao meu orientador Luiz Claudio, que me inspirou e em quem sempre vou me espelhar. Muito obrigada por ter confiado em mim! Agradecerei sempre e por tudo, conselhos, puxões de orelha, que levarei comigo, por toda a vida.

À minha co-orientadora Fernanda, minha base longe de casa! Não sei nem por onde começar, enfim, muito obrigada pelo experimento, pela parceria no trabalho e na vida!

Aos ensinamentos, correções e principalmente a paciência da Professora Juliana Peiró, foram dias lá na “Sibéria”, e milhares de mensagens em busca do gel perfeito!

À professora Sílvia Helena Venturoli Perri pela realização das temidas análises estatísticas.

À Professora Flavia Lucas que sempre esteve por perto e foi de grande ajuda na minha banca da qualificação!

Ao Professor Leydson pelos ensinamentos e votos de confiança!

À Professora Lina por todo o carinho e apoio de sempre.

À nossa Equipe Eletroforética, Isa e Lilian, fomos guerreiras e malucas, claro! Obrigada pela companhia!

Aos que conquistaram um lugar especial em minha vida no “AraçaTexas”. Obrigada time.... Vocês sempre estiveram presentes nos momentos que levarei para sempre comigo!

Às minhas amigas, muito mais que parceiras, que me socorreram, estiveram por perto e colocaram seus “dedinhos” para que tudo desse certo, Naty

e Dani....

Ao Almir por toda a companhia!

À irmã que ganhei nessa cidade e ainda de brinde me trouxe uma princesa, Marília, minha eterna gratidão!

Aos companheiros do LEEGA que durante as análises sempre estiveram por perto seja para sanar alguma dúvida ou rir do que não estava dando certo!

Aos amigos que longo da vida foram importantes na tomada das minhas decisões e no decorrer da caminhada e que entenderam todas as minhas recusas e ausências em decorrência da distância e dos finais de semana apertados em Bauru!

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante a realização do meu mestrado.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão do apoio financeiro ao projeto de pesquisa (2011/18810-3).

À Deus, por me permitir nascer e crescer nessa família e nesse mundo cheio de amigos, que muito me orgulho. Peço que continue iluminando meus passos e de todos aqueles que eu amo. Meu São Francisco de Assis, protetor dos animais, pelos quais sempre peço aquela sua “forcinha”. Minha Nossa Senhora Aparecida, a qual sempre recorro nos momentos mais difíceis.

E não menos importante, agradeço a todos os animais que passaram e que um dia passarão por minha vida, pois sem eles essa profissão seria em vão. Continuarei lutando por essas vidas, aliviando a dor sempre que puder e defendendo com unhas e dentes o bem-estar dos meus pequenos e grandes, seja aqui na terra ou em outro lugar qualquer, pois tenho certeza que minha missão não termina aqui.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                  | Páginas |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....                                                                           | 11      |
| REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                                      | 11      |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                | 18      |
| CAPÍTULO 2 – TRANSFERRINA COMO MARCADOR DE MATURAÇÃO<br>PULMONAR EM CORDEIROS NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS ... | 25      |
| RESUMO .....                                                                                                     | 25      |
| TERMOS DE INDEXAÇÃO .....                                                                                        | 26      |
| INTRODUÇÃO .....                                                                                                 | 26      |
| MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                         | 26      |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                                      | 29      |
| CONCLUSÕES .....                                                                                                 | 30      |
| REFERÊNCIAS .....                                                                                                | 31      |

## **PROTEINOGRAMA SÉRICO DE CORDEIROS NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS**

**RESUMO** - Ao final da gestação o neonato deve estar preparado, por meio de modificações funcionais e estruturais de órgãos e sistemas para dar início à vida extra-uterina. Os animais prematuros nascem antes deste processo estar completo, apresentando falhas na maturação. O objetivo deste estudo foi tentar identificar por meio da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) proteínas de fase aguda, dentre elas, albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, glicoproteína ácida e imunoglobulinas A e G, que possam indicar a maturação no neonato prematuro. Os cordeiros foram divididos em seis grupos experimentais (parto normal, cesárea a termo, cesárea prematura, cesárea prematura com administração pré-parto materna de dexametasona, cesárea com administração de surfactante nos prematuros e cesárea prematura com administração pré-parto materna de dexametasona e surfactante ao neonato). Os resultados indicaram que após a administração de colostro, independente do tratamento, os valores séricos de proteína total e imunoglobulinas G aumentaram, indicando que há transferência de imunidade passiva através do trato gastrointestinal. A transferrina tem seus teores superiores em animais com idade gestacional superior, demonstrando potencial para ser utilizado como marcador de maturação neonatal.

**Palavras-chave:** neonatologia, cordeiros, eletroforese, proteína, transferrina.

## **SERUM PROTEIN CONCENTRATION OF LAMBS BORN AT TERM OR PREMATURE**

**ABSTRACT** - At the end of gestation the neonate should be prepared, with functional and structural modifications of organs and systems to initiate extrauterine life. Premature animals are born before this process is complete, presenting maturation failures. The aim of this study was to identify an acute phase protein, such as albumin, ceruloplasmin, transferrin, haptoglobin, acid glycoprotein and immunoglobulins A and G, that demonstrates that different treatments indicate a maturation in the premature neonate using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis technique (SDS-PAGE). The lambs were divided into six experimental groups (normal birth, full-term cesarean section at normal time of gestation, premature cesarean section, premature cesarean section whose mothers received prepartum dexamethasone, cesarean section giving surfactante to the prematures and premature cesarean giving prepartum dexamethasone to the mothers and surfactant to the neonate). The results indicated that after administration of colostrum, regardless of treatment, total serum protein and immunoglobulins increased, showing the transfer of passive immunity through the gastrointestinal tract. Transferrin has higher levels in animals with higher gestational age, demonstrating potential as a marker of neonatal maturation.

**Keywords:** neonatology, lambs, eletrophoresis, protein, transferrin.

## **CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

A adaptação à vida extra-uterina é um processo biológico que envolve modificações funcionais em todos os órgãos e sistemas do neonato, permitindo sua sobrevivência, uma vez que é separado da unidade materna útero-placentária. Os aspectos mais importantes para esta transição feto-neonatal são: expansão pulmonar para a realização das trocas gasosas; estabelecimento de circulação estável e similar à um adulto; manutenção da temperatura corporal e por fim, a adaptação metabólica à vida extra-uterina (TEIXEIRA et al., 2007).

Ao final da gestação, diversos órgãos fetais sofrem alterações reguladas pelo cortisol fetal, tais como a maturação pulmonar com secreção de material surfactante, a produção de glicose a partir de reservas de glicogênio e da gliconeogênese, e o aumento na produção de triiodotironina e catecolaminas, para aumentar o metabolismo e manter a temperatura corpórea. Portanto, no prematuro, além da imaturidade dos diversos órgãos, a menor liberação de cortisol pode influenciar os fatores metabólicos vitais para a sobrevivência do recém-nascido (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). A maturação dos órgãos e tecidos fetais é mais rápida durante as últimas duas semanas de gestação, na preparação final para os ajustes fisiológicos que são necessários à vida do cordeiro após expulsão do útero ao nascimento (MELLOR, 1991).

O sistema respiratório é o mais importante a ser considerado na abordagem do paciente prematuro, visto que seu desenvolvimento completo ocorre apenas no final da gestação. Em muitos casos, as anormalidades respiratórias resultam de deficiência do pulmão em realizar a transição completa de um órgão colapsado, cheio de fluido, para uma estrutura cheia de ar, responsável por trocas gasosas suficientes para todo o corpo (VAALA; HOUSE, 2006). O pulmão fetal deve estar apto a realizar trocas gasosas fora do útero, neste período (DETWEILER; RIEDESEL, 1993; NELSON, 1994). Os pneumócitos tipo II produzem quantidades suficientes de surfactantes que serão

responsáveis pela estabilidade alveolar após o nascimento (FREDDI et al., 2003; REBELLO et al., 2002). A composição química do surfactante pulmonar é semelhante entre as espécies de mamíferos (SHELLEY et al., 1994).

Logo após o parto, a respiração por fluido do feto deve rapidamente se tornar respiração aérea, já que cessam as trocas gasosas pela placenta; e, para isso, é necessária a maturação pulmonar, o estabelecimento da respiração pulmonar e ajuste cardiovascular (MELLOR, 1991).

A maturação do pulmão envolve não apenas a maturação do sistema surfactante, mas também a diminuição da espessura da barreira capilar alveolar, diminuição na permeabilidade alveolar epitelial e a maturação da parede torácica (VAALA; HOUSE, 2006).

O período gestacional da ovelha varia de 145 a 148 dias (JAINUDEEN; HAFEZ, 2004). Os animais prematuros são aqueles nascidos a partir de 137 dias, porém quanto mais próximo o parto de um período gestacional normal, maior a sobrevivência dos cordeiros (MOBINI et al., 2004).

Cordeiros prematuros, nascidos com 135 dias de gestação, apresentam severa deficiência de surfactante pulmonar, o que pode acarretar um quadro de hipoxemia, dismaturidade, infecção, depressão ou fraqueza (ventilação diminuída), aspiração de mecônio, enfisema bolhoso, hérnias e outras causas de fluido torácico ou massas teciduais (CEBRA; CEBRA, 2002).

O uso de corticosteroides nas mães no pré-parto é uma prática rotineira na medicina humana e reduz a incidência de síndrome do desconforto respiratório no recém-nascido, que é caracterizada como estado transitório de deficiência de surfactante e imaturidade estrutural dos pulmões (AGRONS et al., 2005; AVERY; MEAD, 1959; GLADSTONE et al., 1990). Em ovinos, a administração materna da dexametasona previamente ao parto mostrou-se eficaz na redução da taxa de mortalidade em cordeiros prematuros por promover melhora na condição clínica desses animais (ÁVILA et al., 2014).

As ações do glicocorticóide são: realizar maturação estrutural pulmonar, estimular a produção do fosfolípido do surfactante por pneumócitos tipo II,

facilitar a expressão de proteínas associadas ao surfactante e diminuir a permeabilidade microvascular (AGRONS et al., 2005; VAALA; HOUSE, 2006).

A utilização no pré-parto da dexametasona pode ser de grande valia na maturação pulmonar dos cordeiros, já que, exerce os mesmos efeitos observados em outras espécies, estimulando a produção de fosfolipídio do surfactante por células alveolares tipo II, facilitando a expressão de proteínas associadas ao surfactante, diminuindo a permeabilidade microvascular, acelerando a maturação pulmonar estrutural (VAALA; HOUSE, 2006).

Os surfactantes sintéticos e naturais são efetivos na prevenção e tratamento da síndrome do desconforto respiratório neonatal, promovendo não somente melhora rápida nos níveis gasosos pulmonares, mas também aumento da complacência pulmonar (GASTIASORO-CUESTA et al., 2006). Testes clínicos que comparam ambos os surfactantes se mostraram controversos, mas, de forma geral, aqueles derivados de animais foram mais eficazes (CUMMINGS et al., 1992; IKEGAMI et al., 1981; IKEGAMI; JOBE, 2002). Estudos descreveram os benefícios da utilização de múltiplas doses em relação à uma única aplicação (SOLL; ÖZEK, 1999), tratamento precoce ao invés de tratamento tardio e seletivo (YOST; SOLL, 1999), e o uso de surfactantes naturais sobre os sintéticos (SOLL; BLANCO, 2001).

A terapia com surfactantes em humanos reduziu a mortalidade neonatal com os melhores resultados obtidos em tratamentos profiláticos e precoces com surfactantes naturais em recém-nascidos prematuros, com risco de desenvolverem síndrome do desconforto respiratório (HALLIDAY, 2008). Estudos realizados por longos períodos não identificaram aumentos na incidência de sequelas pulmonares ou neurológicas em crianças sobreviventes (SINN et al., 2002).

Entretanto, na medicina veterinária os estudos com a utilização do surfactante em cordeiros prematuros não foram eficazes, sugerindo seu uso apenas se associado, por exemplo, à administração de dexametasona no período pré-parto nas mães. (BOVINO, 2015; SILVA, 2012).

Cordeiros prematuros podem ser utilizados como modelo experimental para diversos estudos de imaturidade pulmonar em neonatos humanos (BJORKLUNG et al., 2001; SOZO et al., 2006) destinando pouco enfoque em animais pecuários (ÁVILA, 2013).

As proteínas são macromoléculas compostas por aminoácidos com ligações covalentes, podendo ser polares ou apolares, de acordo com o pH, devido à distribuição elétrica resultante das ligações covalentes ou iônicas de grupos estruturais (SILVA et al., 2008).

O metabolismo e a quantidade de proteínas séricas nos neonatos sofrem influência de diversos fatores, destacando a ingestão do colostro e a idade. Ao nascimento, principalmente potros e ruminantes, exibem baixos teores protéicos e após receberem o colostro, apresentam aumento no total das proteínas devido à absorção intestinal de macromoléculas, incluídas as imunoglobulinas (BUTLER, 1969; COSTA et al., 2008; FELDMAN et al., 2000). Iniciando seguido de gradativa diminuição das taxas séricas de proteínas, decorrente do catabolismo das imunoglobulinas adquiridas passivamente do colostro materno, com posterior estabilização que reflete a produção endógena de imunoglobulinas pelo neonato (HUSBAND et al., 1972; TENNANT; GUERRA, 1969).

A eletroforese de proteínas séricas é um método laboratorial simples para separar as proteínas presentes no plasma em frações, de acordo com suas respectivas cargas elétricas (SILVA et al., 2008). O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação das proteínas dos fluidos corporais (ECKERSAL, 2008). Os princípios são baseados nos conhecimentos da composição química das proteínas e nos fatores como carga elétrica e peso molecular, que determinam sua migração eletroforética (NAOUM, 1990).

A separação das frações proteicas ocorre à medida que estas correm do pólo negativo (cátodo) para o positivo (ânodo). Com a coloração adequada, é possível revelar onde há maior concentração das frações, visualizando-se as bandas protéicas (SILVA et al., 2008). Durante o processo da eletroforese, deve-se manter o pH do meio constante com uso de soluções tampão, pois as

proteínas possuem característica anfótera, ou seja, alteram sua carga dependendo do pH em que se encontram (BRAMMER, 2001).

O uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a detecção de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, utilizando-se microquantidade de amostra, enquanto outras técnicas utilizadas como a fita de acetato de celulose ou filme de agarose permitem apenas a identificação de cinco a sete grupos de proteínas (EDINGER et al., 1992; GORDON, 1995; MATTEWS, 1982). Além disso, o gel de poliacrilamida é livre de cargas elétricas, ao contrário de outras matrizes, fornecendo bandas proteicas nítidas (GORDON, 1995).

A primeira resposta do sistema imunológico a um estímulo nocivo é a inflamação. Quando infecções e lesões teciduais superam as defesas locais, o organismo responde ativando uma ampla resposta sistêmica (GABAY; KUSHNER, 1999). Isto é conhecido como reação de fase aguda, onde há uma inflamação aguda e crônica, distantes do local da inflamação, envolvendo diversos órgãos, com alterações fisiológicas e bioquímicas, que expressam diversas proteínas, cada uma com seu aumento ou diminuição do teor sérico, as chamadas proteínas de fase aguda (CECILIANI et al., 2002; MURATA et al., 2004). As funções das principais proteínas estão descritas na Tabela 1.

Frente a um estímulo, as proteínas de fase aguda podem ser classificadas em positivas ou negativas. As proteínas de fase aguda positivas são aquelas que aumentam seus níveis frente a um estímulo, por exemplo glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina. As de fase aguda negativa tem seus níveis plasmáticos diminuídos frente a um desafio, são exemplo delas a albumina e a transferrina (HEINRICH et al., 1990; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

A albumina é a mais abundante proteína sérica, sintetizada e excretada pelos hepatócitos e tem como função armazenar e transportar outras proteínas para inúmeros componentes endógenos e exógenos. É responsável pela regulação da pressão osmótica. Seus valores podem estar aumentados em casos de desidratação e diminuídos nos casos de doenças que afetam fígado,

rins e trato gastrointestinal, má nutrição e hemorragias (ECKERSALL, 2008; KRAGH-HANSEN, 1981).

A glicoproteína ácida é uma proteína positiva, que não tem suas funções biológicas totalmente elucidadas; sabe-se que ela atua no transporte de alguns metabólitos endógenos no plasma, na atividade imunomoduladora através da inibição da fagocitose, ativação de neutrófilos e agregação plaquetária (CECILIANI et al., 2012; ECKERSALL, 2008). Em ovinos, desencadeia uma resposta moderada após a inflamação, mas isso persiste por um longo período após o estímulo inicial, o que poderia sugerir que ela poderia ter um papel como marcador de condições crônicas nessa espécie (ECKERSALL et al., 2007).

A haptoglobina é responsável pelo transporte de hemoglobina nas células do sistema mononuclear fagocitário, ligando a hemoglobina livre aos eritrócitos e assim, inibindo a atividade oxidativa. Outros efeitos propostos incluem a modulação da função de linfócitos e macrófagos e a inibição da atividade da catepsina. A concentração da haptoglobina aumenta em processos inflamatórios agudos, estresse e, às vezes, durante processos neoplásicos recentes (CECILIANI et al., 2012; ECKERSALL, 2008; MURATA et al., 2004).

A ceruloplasmina é uma ferroxidase que é o maior carreador proteico de cobre e atua também no metabolismo do ferro, exercendo atividades antioxidantes e citoprotetoras (PATEL et al., 2002; TOTHOVA et al., 2014). Apesar de possuir sítios de indução em diversos locais, é sintetizada primariamente no fígado (MAZUMDER et al., 1997; PAN et al., 1996). No pulmão a principal fonte desta proteína é no epitélio das vias aéreas (YANG et al., 1996). Atua como agente anti-inflamatório, reduzindo o número de neutrófilos no endotélio, atuando assim como “varredor” de peróxido extracelular (BROADLEY; HOOVER, 1989; SEGELMARK et al., 1997).

A transferrina é responsável pelo transporte do ferro do seu sítio de absorção ou catabolismo para os precursores das células vermelhas ou para os sítios de estocagem na medula óssea, fígado ou baço (BOWMAN et al., 1989). Pode estar envolvida na imunidade inata, por sequestrar os íons férricos evitando que os patógenos possam usá-los como nutrientes (LAW, 2002).

As imunoglobulinas atuam como anticorpos e são produzidas em resposta aos antígenos presentes no organismo, sendo altamente específico. O IgG é a principal imunoglobulina responsável frente a resposta de agente infecciosos e tóxicos. A IgA tem a função de proteção de mucosas, com secreção de anticorpos nos fluidos respiratórios, gastrointestinais e geniturinários. Ambas podem estar diminuídas em animais recém-nascidos antes da administração do colostro (ECKERSALL, 2008).

As imunoglobulinas sofrem processo de pinocitose pelas células epiteliais intestinais e são transportadas para o sistema linfático e, assim, para o sistema circulatório, tornando o neonato com uma “janela” de proteção imunológica (KRUSE, 1983; BESSI et al., 2002ab). Pouco se sabe do período ideal de absorção colostrar pelo intestino de neonatos ovinos. Têm-se relatos de aumento dos níveis de imunoglobulinas séricas quando a ingestão ocorre nas primeiras horas de vida e grande decréscimo de absorção após 24 horas. Isso se deve ao amadurecimento das células intestinais, ou melhor, pela troca por uma primeira geração de células adultas, maduras, caracterizadas pela impermeabilidade a macromoléculas (BESSI et al., 2002ab; KINDLEIN et al., 2008).

Diante do potencial crescimento da ovinocultura e por ser modelo experimental utilizado em prematuros humanos, o estudo das proteínas de fase aguda pelo método de eletroforese (SDS-PAGE) como marcadores de maturação neonatal tem grande destaque no cenário recente da neonatologia.

Tabela 1 – As principais proteínas descritas e sua função:

| Proteínas           | Função                                                           |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| Albumina            | Armazenar e transportar proteínas, regulação da pressão osmótica |
| Glicoproteína ácida | Transporte de metabólitos, atividade imunomoduladora             |
| Haptoglobina        | Transporte de hemoglobina                                        |
| Ceruloplasmina      | Transporte de cobre                                              |
| Transferrina        | Transporte de ferro                                              |
| Imunoglobulina A    | Proteção de mucosas                                              |
| Imunoglobulina G    | Resposta à agente infeccioso e tóxico                            |

## REFERÊNCIAS

- AGRONS, G.A.; COURTNEY, S.E.; STOCKER, T.; MARKOWITZ, R.I. Lung disease in premature neonates: radiologic-pathologic correlation. **AFIP Archives**, v.25, n.4 , p. 1047 – 1073, 2005.
- AVERY, M. E.; MEAD, J. Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. **American Journal of Diseases of Children**, v. 97, n. 5, p. 517-523, 1959.
- ÁVILA, F. **Avaliação clínico-laboratorial de cordeiros nascidos a termo e prematuros**. 2013. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2013.
- ÁVILA, L.G.; BOVINO, F.; CAMARGO, D.G.; SOUZA, N.C.; SANTOS, G.G.F.; DESCHK, M.; MENDES, L.C.N.; FEITOSA, F.L.F. Aplicação materna de glicocorticóide nos parâmetros vitais de cordeiros nascidos a termo e prematuros. **Ciência Rural**, v.44, n.6, p.1106-1112, 2014.
- BESSI, R.; PAULETTI, P.; D'ARCE, R.D.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. I. Estudo no intestino delgado proximal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2314 – 2324, 2002a.

- BESSI, R.; PAULETTI, P.; D'ARCE, R.D.; MACHADO NETO, R. Absorção de anticorpos do colostro em bezerros. II. Estudo no intestino delgado distal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.6, p.2325 – 2331, 2002b.
- BJORKLUNG, L. J.; INGIMARSSON, J.; CURSTEDT, T.; LARSSON, R.; ROBERTSON, B.; WERNER, O. Lung recruitment at birth does not improve lung function in immature lambs receiving surfactant. **Acta Anaesthesiologica**, v.45, p.986-993, 2001.
- BOVINO, F. **Abordagem clínica de cordeiros prematuros: avaliação de protocolos terapêuticos emergenciais para estimulação da atividade respiratória**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, 2015.
- BOWMAN, B.H.; YANG, F.M.; ADRIAN, G.S. Transferrin: evolution and genetic regulation of expression. **Advances in Genetic**.v.25, p.1-38, 1989.
- BRAMMER, S. P. **A técnica de eletroforese**: importância e aplicações em análises genéticas. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2001. 13p. Disponível: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_do06.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do06.htm)> . Acesso em: 30 nov 2016.
- BROADLEY, C.; HOOVER, R.L. Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. **American Journal of Pathology** v.135, p.647–655, 1989.
- BUTLER, J. E. Bovine Immunoglobulins: a review. **Journal Dairy Science**, v. 52, n. 12, p. 1895-1909, 1969.
- CEBRA, C.; CEBRA, M. Diseases of the hematologic, immunologic, and lymphatic systems (multisystem diseases). In: PUGH, D. G. **Sheep and goat medicine**. 1. ed., Philadelphia: Saunders, 2002, 468 p.
- CECILIANI, F.; CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics** v.75 p:4207-4231, 2012.
- CECILIANI, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The systemic reaction during inflammation: the acute phase proteins. **Protein & Peptide Letters**, v.9, p. 211–223, 2002.

- COSTA, M.C.; FLAIBAN, K.K.M.C.; CONEGLIAN, M.M.; FEITOSA, F.L.F.; BALARIN, M.R.S.; LISBÔA, J.A.N. Transferência de imunidade passiva em bezerros das raças Nelore e Limousin e proteinograma sérico nos primeiros quatro meses de vida. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, p. 410-416. 2008.
- CUMMINGS, J. J.; HOLM, B. A.; HUDAK, M. L.; HUDAK, B. B.; FERGUSON, W. H.; EGAN, E. A. A controlled clinical comparison of four different surfactant preparations in surfactant-deficient preterm lambs. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 145, n. 5, p. 999-1004, 1992.
- DETWEILER, D.K.; RIEDESEL, D.H. Regional and fetal circulations. In: SENSON, M.J.; REECE, O. **Dukes physiology of domestic animals**. 11.ed. New York: Cornell University Press, 1993, p.227.
- ECKERSALL, D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. New York: Elsevier, 2008, p.117-155.
- ECKERSALL, P.D.; LAWSON F.P., BENCE L., WATERSTON M.M., LANG T.L., DONACHIE W., FONTAINE M.C. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. **BMC Veterinary Research**. V. 3, p.35, 2007.
- EDINGER, V.H.; MILLER, I.; STANEK, C. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift** v.99, p.426-430, 1992.
- FELDMAN, B.C.; ZINKIL, J.G.; JAIN, M.C. **Veterinary hematology**, 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344 p.
- FREDDI, N.A.; PROENÇA FILHO, J.O.; FIORI, H.H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno em pediatria. **Jornal de Pediatria**, v.79, n.2, p.205-212, 2003.
- GABAY, C.; KUSHNER, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation **The New England Journal of Medicine**, v.340 p.448–454, 1999.
- GASTIASORO-CUESTA, E.; ALVAREZ-DIAZ, F. J.; REY-SANTANO, C.; ARNAIZ-RENEDO, A.; LOUREIRO-GONZALES, B.; VALLS-i-SOLER, A. Acute and sustained effects of lucinactant versus poractant- $\alpha$  on pulmonary gas

exchange and mechanics in premature lambs with respiratory distress syndrome.

**Pediatrics**, v. 117, n. 2, p. 295-303, 2006.

GLADSTONE, I. M.; RAY, A. O.; SALAFIA, C. M.; PÉREZ-FONTÁN, J.; MERCURIO, M. R.; JACOBS, H. C. Effect of artificial surfactant on pulmonary function in preterm and full-term lambs. **Journal of Applied Physiology**, v. 69, n. 2, p. 465-472, 1990.

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

HALLIDAY, H. L. Surfactants: past, present and future. **Journal of Perinatology**, v. 28, p. 47-56, 2008.

HEIRICH P.C.; CASTELL J.V.; ANDUS T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemistry**. v. 265, p. 621-636. 1990.

HUSBAND, A. J.; BRANDON, M. R.; LASCELLES, A. K. Absorption and endogenous production of immunoglobulins in calves. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 50, n. 4, p. 491-498, 1972.

IKEGAMI, M.; JOBE, A. H. Injury responses to different surfactants in ventilated premature lamb lungs. **Pediatric Research**, v. 51, n. 6, p. 689-695, 2002.

IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.; JACOBS, H.; JONES, S. J. Sequential treatments of premature lambs with an artificial surfactant and natural surfactant. **Journal of Clinical Investigation**, v. 68, n. 2, p. 491-496, 1981.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 141-155.

KINDLEIN, L.; PAULETTI, P.; BAGALDO, A.R.; RODRIGUES, A.P.O.; MACHADO-NETO, R. Efeito da suplementação de colostro enriquecido sobre as características morfológicas da mucosa intestinal de bezerros neonatos. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.36, p.31 – 34, 2008.

KRAGH-HANSEN, U. Molecular aspects of ligand binding to serum albumin. **Pharmacological Reviews**, v.33, n.1, p.17-53, 1981.

- KRUSE, P.E. The importance of colostral immunoglobulin and their absorption from the intestine of the newborn animals. **Annales de Recherches Veterinaires**, v.14, n.4, p.349 – 353, 1983.
- LAW, J.H. Insects, oxygen, and iron. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 292, n. 5, p. 1191-1195, 2002.
- MARTÍNEZ-SUBIELA S.; TECLES F.; PARRA M.D.; CERÓN J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **Anales de Veterinaria de Murcia**. v. 17, p. 97-114. 2001.
- MATTEWS, A.G. Serum protein electrophoresis in horses and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.14, p.322-324, 1982.
- MAZUMDER, B.; MUKHOPADHYAY, C.K.; PROK, A.; CATHCART, M.K.; FOX, P.L. Induction of ceruloplasmin synthesis by IFN-gamma in human monocytic cells. **Journal of Immunology** v.159, p.1938–1944, 1997.
- MELLOR, D. J. 1: Physiology of the perinatal period. In: MARTIN, W. B.; AITKEN, I. D. **Diseases of sheep**. 2. ed., Oxford: Blackwell, 1991, p. 3-8.
- MOBINI, S.; HEATH, A. M.; PUGH, D. G. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: PUGH, D. G. **Clínica de ovinos e caprinos**. 1. ed., São Paulo: Roca, 2004, p. 145-208.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase protein in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p28-40, 2004.
- NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. São Paulo: Editora Santos, 1990. 174p.
- NELSON, N. In: AVERY, G.B.; FLETCHER, M.A.; MACDONALD, M.G. **Neonatology pathophysiology and management of the newborn**, 4ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1994.
- 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.
- PATEL, B.N.; DUNN, R.J.; JEONG, S.Y.; ZHU, Q.; JULIEN, J.P.; DAVID, S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. **Journal of Neuroscience** v.22, p6578–6586, 2002.

- REBELLO, C.M.; PROENÇA, R.S.M.; TROSTER, E.J.; JOBE, A.H. Terapia com surfactante pulmonar exógeno – o que é estabelecido e o que necessitamos determinar. **Jornal de Pediatria**, v.78, Supl.2, 2002.
- SEGELMARK, M.; PERSSON, B.; HELLMARK, T.; WIESLANDER, J. Binding and inhibition of myeloperoxidase (MPO): a major function of ceruloplasmin? **Clinical and Experimental Immunology** v.108, p.167–174, 1997.
- SHELLEY, S.A.; PACIGA, J.E.; BALIS, J.U. Lung surfactant phospholipids in different animal species. **Lipids**, 19, p. 857-862, 1984.
- SILVA, L.C.G. **Aplicação preventiva do surfactant porcino (Instituto Butantan®) intra-traqueal no desempenho clínico e pulmonar de neonatos ovinos prematuros**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2012.
- SILVA, R.O.P.; LOPES, A.F.; FARIA, R.M.D. Eletroforese de proteínas séricas: interpretação e correlação clínica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v.18, n.2, p.116-122, 2008.
- SINN, J.K.H.; WARD, M.C.; HENDERSON-SMART, D.J. Developmental outcome of preterm infants after surfactant therapy: systematic review of randomised controlled trials. **Journal of Paediatrics and Child Health**, v. 38, n. 6, p. 597–600, 2002.
- SOLL, R.F.; BLANCO, F. Natural surfactant extract versus synthetic surfactant for neonatal respiratory distress syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2001. Disponível em: <<http://www.nichd.nih.gov/cochrane/soll2/soll.htm>>. Acesso em 29 nov 2016.
- SOLL, R.; ÖZEK, E. Multiple versus single dose natural surfactant extract for severe neonatal respiratory distress syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2, 1999. Disponível em: <<http://www.nichd.nih.gov/cochrane/soll/soll.htm>>. Acesso em 29 nov 2016.
- SOZO, F.; WALLACE, M.J.; HANNA, M.R.; FLECKNOE S.J.; COCK, M.L.; MARIITZ, G.S.; HARDING, R.; HOOPER, S.B. Alveolar epithelial cell differentiation and surfactant protein expression after mild preterm birth in sheep. **Pediatric Research**, v. 59, n. 1, p. 151-156, 2006.

- TEIXEIRA, A.; ROCHA, G.; GUIMARÃES H. Transição fetal neonatal no recém-nascido de muito baixo peso. **Acta Pediatrica Portuguesa**, v.36, n.6, p.250-256, 2007.
- TENNANT, B.; GUERRA, M. R. Neonatal alterations in serum gamaglobulin levels of Jersey and Holstein-Friesian calves. **American Journal of Veterinary Research**, v. 51, n. 2, p. 345-354, 1969.
- TOTHOVA, C.; NAGY, G.; KOVAC, G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. **Veterinarni Medicina** v.61, n.9, p.475-496. 2014.
- VAALA, W. E.; HOUSE, J. K. O período periparto. In: SMITH, B. P. **Medicina interna de grandes animais**. 3. ed. Barueri: Manole, 2006, p. 257-265.
- 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.
- YOST, C.C.; SOLL, R.F. Early versus delayed selective surfactant treatment for neonatal respiratory distress syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 4, 1999. Disponível em: <<http://www.nichd.nih.gov/cochrane/Yost/yost.htm>>. Acesso em 29 nov 2016.

## CAPÍTULO 2 – TRANSFERRINA COMO MARCADOR DE MATURAÇÃO PULMONAR EM CORDEIROS NASCIDOS A TERMO OU PREMATUROS

### Transferrina como marcador de maturação pulmonar em cordeiros nascidos a termo ou prematuros

Rafaela Speranza Baptista<sup>1\*</sup>, Fernanda Bovino<sup>1</sup>, Daniela S. Denadai<sup>1</sup>, Natalia Machado Rahal<sup>1</sup>, Silvia Helena V. Perri<sup>1</sup>, Francisco Leydson F. Feitosa<sup>1</sup>, Juliana R. Peiró<sup>1</sup>, Luiz Claudio N. Mendes<sup>1</sup>

**ABSTRACT.** – Baptista, R.S., Bovino, F., Denadai D.S., Rahal, N.M., Perri, S.H.V., Feitosa, F.L.F.F., Peiró, J.R., Mendes L.C.N. 2016. **[Transferrin as a marker of pulmonary maturation in lambs born at term or premature]** Transferrina como marcador de maturação pulmonar em cordeiros nascidos a termo ou prematuros. *Pesquisa Veterinária Brasileira* xx (x) p. xx-xx. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Rua Clóvis Pestana 793, Dona Amélia, Araçatuba, SP, 1605-680, Brasil. E-mail: [rafa.baptista@terra.com.br](mailto:rafa.baptista@terra.com.br)

The aim of this study was to search for one or more acute phase protein that could indicate signs of maturation in the premature neonate by quantifying the serum acute phase proteins using electrophoresis (SDS-PAGE) technique which allows identification of immunoglobulin A, ceruloplasmin, haptoglobin, acid glycoprotein, transferrin, albumin, light and heavy chain immunoglobulin G comparing the profile of proteinograms from term to preterm lambs submitted to different protocols that stimulate respiratory activity. Six groups were used: PN (n = 9): lambs born from normal birth; CN (n = 7): lambs born from caesarean section at normal time of gestation; CP (n = 6): lambs born from premature cesarean without any type of treatment; DEX (n = 9) preterm lambs whose mothers received prepartum dexamethasone; SURF (n = 6) preterm lambs treated with surfactant; DEXSURF (n = 6): preterm lambs treated with surfactant whose mothers received prepartum dexamethasone. The evaluations were performed immediately after birth (M<sub>0</sub>), after 24 and 48 hours (M<sub>24</sub> and M<sub>48</sub>). Samples were processed with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and the gels were subsequently evaluated by a specific software. Albumin, immunoglobulins, and serum total protein of the lambs were elevated, regardless of the group, after colostrum ingestion. Transferrin evidenced the highest serum values refer to a longer gestational period, indicating signs of neonatal maturation, with no difference between treatments of preterms.

INDEX TERMS: Eletrophoresis, SDS-PAGE, sheep, neonatology.

Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

1 – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Rua Clóvis Pestana 793, Dona Amélia, Araçatuba, SP, 1605-680, Brasil. \*Autor para correspondência: [rafa.baptista@terra.com.br](mailto:rafa.baptista@terra.com.br) E-mails: [ferbovino@yahoo.com.br](mailto:ferbovino@yahoo.com.br), [daniela.denadai@hotmail.com](mailto:daniela.denadai@hotmail.com), [shvp@fmva.unesp.br](mailto:shvp@fmva.unesp.br), [leydsonf@fmva.unesp.br](mailto:leydsonf@fmva.unesp.br), [jpeiro@fmva.unesp.br](mailto:jpeiro@fmva.unesp.br), [lmendes@fmva.unesp.br](mailto:lmendes@fmva.unesp.br)

**RESUMO.** - O objetivo do estudo foi procurar uma ou mais proteínas de fase aguda que possam indicar sinais de maturação no neonato prematuro através da quantificação sérica das proteínas de fase aguda pela técnica de eletroforese (SDS-PAGE), que permite a identificação de imunoglobulina A, ceruloplasmina, haptoglobina, glicoproteína ácida, transferrina, albumina e as imunoglobulinas G de cadeias leve e pesada pela comparação do perfil dos proteinogramas de cordeiros nascidos a termo com os prematuros submetidos a diferentes protocolos terapêuticos para estimular a atividade respiratória. Constituíram-se seis grupos: PN (n=9): cordeiros nascidos de parto normal; CN (n=7): cordeiros nascidos de cesariana em tempo normal de gestação; CP (n=6): cordeiros nascidos de cesariana prematura sem nenhum tipo de tratamento; DEX (n=9) cordeiros prematuros cujas mães

receberam dexametasona pré-parto; SURF (n=6) cordeiros prematuros tratados com surfactante; DEXSURF (n=6): cordeiros prematuros tratados com surfactante cujas mães receberam dexametasona pré-parto. As avaliações foram realizadas nos momentos imediatamente após o nascimento (M<sub>0</sub>), após 24 e 48 horas (M<sub>24</sub> e M<sub>48</sub>). As amostras processadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e os géis posteriormente avaliados por meio de um software específico. A albumina, as imunoglobulinas e a proteína total dos cordeiros tiveram elevação, independentemente dos grupos, após a ingestão de colostro. A transferrina evidenciou que os maiores valores séricos são referentes a um maior período gestacional, indicando sinais de maturação neonatal, sem diferença entre os tratamentos dos grupos de animais prematuros.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Eletroforese, SDS-PAGE, ovinos, neonatologia.

## INTRODUÇÃO

Ao deixar o útero, os neonatos são expostos a diversos desafios. Os ruminantes, de forma geral, não são capazes inicialmente de ter uma resposta imune eficiente, devido à imaturidade imunológica humoral e celular. Desta maneira, são totalmente dependentes da assistência imunológica materna, que é fornecida através do colostro pela forma das imunoglobulinas oriundas do colostro (Barrington & Parish, 2001).

O período gestacional da ovelha pode variar de 145 a 148 dias (Jainudeen & Hafez, 2004), sendo considerados prematuros os cordeiros nascidos com menos de 138 dias (Mobini et al., 2004, Radostits et al., 2007). A prematuridade está associada à imaturidade de diversos órgãos, o que pode acarretar problemas no desenvolvimento do sistema respiratório, no metabolismo e enfermidades infecciosas (Vaala & House, 2006).

As proteínas são componentes da base estrutural de todas as células e tecidos, além de participar de reações bioquímicas fisiológicas. Suas análises vêm sendo motivos de estudos crescentes desde a década de 90, principalmente do grupo chamado proteínas de fase aguda, onde obtêm-se diagnósticos, prognósticos e monitorização do tratamento dos animais domésticos (Eckersall, 2008).

Frente a um estímulo, as proteínas de fase aguda podem ser classificadas em positivas ou negativas. As proteínas de fase aguda positivas são aquelas que aumentam seus níveis frente a um estímulo, por exemplo glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina. As de fase aguda negativa tem seus níveis plasmáticos diminuídos frente a um desafio, são exemplo delas a albumina e a transferrina (Heinrich et al., 1990, Martínez-Subiela et al., 2001).

A eletroforese é o método de escolha para a separação analítica das proteínas, pela movimentação de suas moléculas carregadas em um campo elétrico (Gordon, 1995, Eckersall, 2008). A técnica utilizando o gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é relativamente simples e de baixo custo, possibilitando até a visualização de baixas concentrações proteicas utilizando pouca quantidade da amostra (Fagliari & Silva, 2002).

O objetivo do estudo foi procurar uma ou mais proteínas de fase aguda que possam indicar sinais de maturação no neonato prematuro por meio da quantificação sérica destas pela técnica de eletroforese (SDS-PAGE), pela comparação do perfil dos proteinogramas de cordeiros nascidos a termo com os prematuros submetidos a diferentes protocolos terapêuticos para estimular a atividade respiratória.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unesp, Campus de Araçatuba, registrado sob número de protocolo CEUA 959/2012.

Foram utilizados 43 cordeiros mestiços da raça Suffolk oriundos do rebanho experimental da faculdade distribuídos aleatoriamente em seis grupos experimentais:

**Grupo PN:** nove cordeiros nascidos a termo por parto normal.

**Grupo CN:** sete cordeiros nascidos por meio de cesariana eletiva, em tempo normal de gestação (144 dias).

**Grupo CP:** seis cordeiros prematuros nascidos por meio de cesarianas eletivas realizadas aos 137 dias de gestação.

**Grupo DEX:** nove cordeiros prematuros nascidos por meio de cesarianas eletivas realizadas aos 137 dias de gestação, cujas mães receberam 16 mg de dexametasona<sup>1</sup>, por via intramuscular, 36 horas antes da cirurgia (135 dias).

**Grupo SURF:** seis cordeiros prematuros nascidos por meio de cesarianas eletivas realizadas aos 137 dias de gestação tratados com administração única de surfactante<sup>2</sup> (100mg/kg) por instilação traqueal, imediatamente após o nascimento.

**Grupo DEXSURF:** seis cordeiros prematuros nascidos por meio de cesarianas eletivas realizadas aos 137 dias de gestação tratados com administração única de surfactante (100mg/kg) por instilação traqueal, imediatamente após o nascimento, cujas mães receberam 16 mg de dexametasona, por via intramuscular, 36 horas antes da cirurgia (135 dias).

As ovelhas foram mantidas em piquete, alimentadas à base de silagem de milho e ração comercial para ovinos uma vez ao dia, ao longo do período gestacional. Cerca de 15 dias antes do parto, foram levadas às baias e mantidas até os 60 dias pós-parto.

Para facilitar o manejo, as parições foram concentradas num mesmo período adotando-se um protocolo de sincronização estral com esponjas de progesteronas vaginais<sup>3</sup>, seguidas da administração intramuscular de gonadotrofina coriônica equina<sup>4</sup> e prostaglandina<sup>5</sup>. O reprodutor utilizado foi marcado na região peitoral com uma mistura de pó colorido xadrez e óleo, iniciando com cores mais claras para cores mais escuras, reforçada a cada dois dias, e a cor trocada a cada 15 dias. Exame ultrassonográfico abdominal<sup>6</sup> para confirmação da gestação foi realizado entre 45 e 60 dias da última data de cobertura.

Para os animais que integraram o grupo de parto normal, estimou-se o mês de parição, sendo necessária a permanência do pesquisador no local para detectar o momento exato do parto e, então, realizar as avaliações.

Nos animais submetidos a cesarianas eletivas realizou-se bloqueio anestésico paravertebral proximal com cloridrato de lidocaína<sup>7</sup> e anestesia epidural lombossacra com sulfato de morfina<sup>8</sup>. Os procedimentos foram realizados com a ovelha em decúbito lateral direito, para incisão no flanco esquerdo, conforme técnica descrita por Tibary e Van Metre (2004).

Os cordeiros provenientes de parto normal permaneceram com as mães, ingerindo colostro à vontade. Os oriundos de cesariana receberam colostro via mamadeira (15% P.V.), proveniente de um pool feito a partir de banco de colostro bovino, submetido à quantificação prévia de proteínas. Nos cordeiros que não apresentavam reflexo de sucção a administração foi realizada por meio de sonda oroesofágica.

As avaliações iniciaram-se imediatamente após o nascimento, sendo que os animais que receberam surfactante, tiveram suas coletas após a administração do mesmo, e até às 48 horas de vida. Os animais pertencentes aos grupos tratados com surfactante (SURF e DEXSURF) foram obrigatoriamente intubados com sonda orotraqueal números 2,5 ou 3,0, para administração do surfactante, antes da ruptura do cordão umbilical, estes animais foram ventilados (30 movimentos/min) no máximo por um período de 30 minutos. A dose de surfactante utilizada foi de 100mg/kg (8 a 16ml), com administração única, e o volume total, dividido em três porções sendo que durante a infusão do medicamento, o cordeiro foi posicionado em três diferentes decúbitos (lateral direito, dorsal e lateral esquerdo). Nos animais dos outros grupos (CN, CP e DEX) observou-se, logo após a retirada do cordeiro do útero, se estes apresentavam movimentos respiratórios espontâneos;

<sup>1</sup>Azium – MSD Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Survanta – Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. – São Paulo, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Progespon – MSD Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Novormon – MSD Saúde Animal – São Paulo, SP, Brasil.

<sup>5</sup>Lutalyse – Zoetis Brasil – São Paulo, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Aparelho de Ultrasson DP 200 Vet - Mindray– DPS Equipamentos – São Paulo, São Paulo, Brasil.

<sup>7</sup>Xylestin – Cristália produtos químicos e farmacêuticos LTDA. Itapira, São Paulo, Brasil.

<sup>8</sup>Dimorf – Cristália produtos químicos farmacêuticos LTDA. – Itapira, São Paulo, Brasil.

caso não estivessem respirando, eram submetidos à sondagem orotraqueal. Todos os neonatos que precisaram de alguma intervenção, instituíam-se a terapia suporte por meio da utilização de respirador manual<sup>9</sup> neonatal acoplado à sonda endotraqueal, fornecimento de oxigênio (1L/min), manutenção da temperatura (com cobertores e bolsas térmicas).

As amostras de sangue para as análises foram coletadas por punção da veia jugular com agulha hipodérmica 25 x 0,7 mm acoplada a tubos Vacutainer®<sup>10</sup> siliconizados sem anticoagulante para volume de 10mL, nos respectivos momentos: M<sub>0</sub>, M<sub>24</sub> e M<sub>48</sub>. O sangue colhido foi mantido à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até a coagulação e retração do coágulo. Foi, em seguida, centrifugado a 3.000 r.p.m., durante cinco minutos, para melhor separação do soro. Este foi transferido para frascos de polipropileno, tipo “eppendorf”, em alíquotas que foram congeladas a -20°C até o processamento por eletroforese.

O descongelamento para o processamento ocorreu à temperatura ambiente e a concentração da proteína sérica total foi determinada utilizando-se um refratômetro clínico<sup>11</sup>, segundo Thomas (2000), antes da mensuração eletroforética.

Para o fracionamento das proteínas séricas foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) conforme proposto por Laemmli (1970), sendo a corrida realizada em cuba<sup>12</sup> vertical, sistema com um gel de poliacrilamida com diferentes concentrações ligadas a uma fonte de energia<sup>13</sup>. As proteínas das amostras foram primeiramente desnaturadas na presença de 2-mercaptoetanol e do detergente dodecil sulfato de sódio. Após a colocação das amostras no gel, dava-se início a corrida com 20mA por gel até transpassar o gel de separação; a partir de então, aumentou-se 25% do valor da amperagem quando as amostras atingiram o limite do gel de corrida.

Após a separação das proteínas, os géis foram corados por duas horas com uma solução à base de Coomassie Blue 0,2%<sup>14</sup>, metanol, ácido acético glacial e água deionizada, em um agitador horizontal<sup>15</sup>. Posteriormente, iniciou-se o processo de descoloração, que durou 12 horas numa solução já utilizada anteriormente à base de metanol e ácido acético glacial, sendo transferida para uma cuba contendo uma solução recém preparada até a coloração do gel atingir um tom de azul bem fraco. Os géis ficaram aguardando a leitura em refratárias de vidro recobertos por água deionizada.

A digitalização dos géis foi realizada por meio do fotodocumentador ImageQuant LAS 4000<sup>16</sup>, e as proteínas foram identificadas com auxílio de referência o peso molecular de 6.500 a 20.000 daltons<sup>17</sup> com o programa ImageQuant TL<sup>18</sup>. Foram avaliadas oito frações proteicas: imunoglobulina A, ceruloplasmina, transferrina, albumina, imunoglobulina G de cadeia pesada, haptoglobina, glicoproteína ácida e imunoglobulina G de cadeia leve.

Os animais foram separados em dois grandes grupos para a análise estatística, o grupo dos nascidos a termo, sendo PN e CN, e os nascidos provenientes de cesariana: grupos CN, CP, DEX, SURF e DEXSURF. As variáveis transferrina, albumina e proteína total foram submetidos à análise de variância com medidas repetidas, sendo as médias comparadas pelo pós-teste de Tukey. As outras variáveis não apresentaram distribuição normal e foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis para comparar os grupos em cada momento e o teste de Friedman para comparar os momentos em cada grupo, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. Os valores de p foram considerados significativos quando menores que 5% e as análises foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System)<sup>19</sup>.

<sup>9</sup> Ambú neonatal - Reanimador manual em silicone completo com reservatório – 250 mL – Protec. Cotia, São Paulo, Brasil.

<sup>10</sup> BD Brasil, São Paulo, Brasil.

<sup>11</sup> Atago Clinical Refractometer Master-SUR/NM, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

<sup>12</sup> Cuba SE 600 Ruby®, Amersham Biosciences-GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP.

<sup>13</sup> Power Pac 1000, Bio-Rad, UK

<sup>14</sup> Brilliant Blue R - Sigma Aldrich Química Brasil, Jurubatuba, São Paulo, Brasil.

<sup>15</sup> Agitador horizontal EL 445, Grupo Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP.

<sup>16</sup> GE Healthcare Brasil, Barueri, São Paulo, Brasil.

<sup>17</sup> SigmaMaker, wide range-Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA.

<sup>18</sup> GE Healthcare Brasil, Barueri, São Paulo, Brasil.

<sup>19</sup> SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para compor os grupos experimentais foram necessários acompanhar 32 partos sendo 11 gemelares. O número total de cordeiros nascidos foi de 43 cordeiros dentre os quais 22 eram machos e 21 fêmeas, com peso médio ao nascimento de 3,74 kg ( $\pm 0,86$ ).

O colostro apresenta altas quantidades de mediadores inflamatórios que podem induzir uma reação de fase aguda no neonato, podendo passar por meio da mamada colostrálica ao recém-nascido, pelo intestino, estimulando a produção de proteínas de fase aguda no fígado. Essa reação é um mecanismo importante para a adaptação do recém-nascido à vida extra-uterina e posterior homeostase (Orro et al., 2008). Portanto, pode-se esperar uma resposta inflamatória, no pós-parto, ao recém-nascido. Algumas proteínas de fase aguda como a haptoglobina, a glicoproteína ácida e a ceruloplasmina estão presentes inicialmente no colostro e depois no leite de diversas espécies animais, sendo algumas moléculas absorvidas intactas pelo intestino (Harada et al., 2002, Talukder et al., 2002).

Vários fatores desempenham papéis nas concentrações séricas das proteínas de fase aguda após o parto, incluindo: síntese fetal e estimulação da produção dessas proteínas pelo parto, ingestão de colostro e a capacidade de síntese hepática das proteínas (Brunn et al. 1998, McDonald et al., 2001).

Antes da ingestão do colostro, as concentrações séricas de proteína total foram maiores ao nascimento em cordeiros de PN em relação àqueles nascidos de CN (PN:  $4,11 \pm 0,26$ g/dL e CN:  $3,34 \pm 0,46$ g/dL). As concentrações no parto normal foram semelhantes às descritas por Turquino (2010) em cordeiros providos de cruzamentos entre raças com aptidão para carne ao nascimento. Após a ingestão do colostro, as concentrações de proteína total aumentaram às 24 e 48 horas em relação aos valores descritos ao nascimento em ambos os grupos a termo, sendo obtidos resultados semelhantes entre estes grupos. (Quadro 1).

Nos animais nascidos de cesariana, as concentrações séricas proteicas apresentaram o mesmo padrão, não havendo diferença estatística entre os grupos avaliados (Quadro 2), apenas entre os momentos, onde imediatamente após o nascimento todos os animais do estudo apresentaram os menores valores séricos da proteína total elevando-se nos momentos seguintes, demonstrando que independente do tratamento, todos os cordeiros foram capazes de absorver as proteínas ingeridas no colostro e repassá-las a corrente circulatória.

Os teores séricos de albumina não sofreram alterações entre os grupos de parto normal e nem de cesariana, desde o momento do parto até as 48 horas de vida (Quadros 1 e 2). Apenas no grupo CN estes teores séricos aumentaram conforme o tempo, corroborando com os achados de Leal et al. (2013) que relatam que esses teores aumentam conforme a faixa etária.

A concentração sérica de transferrina imediatamente após o nascimento apresentou valores diferentes nos grupos a termo (PN:  $673,54 \pm 206,72$ mg/dL e CN:  $963,66 \pm 183,69$ mg/dL) (Quadro 1). Essa diferença pode ser justificável pois apesar dos dois grupos serem animais a termo, os animais de cesariana não necessariamente teriam nascido no dia em que foi determinada a data do parto (144 dias).

Os animais provenientes de cesariana apresentaram diferenças significativas quanto às concentrações séricas da transferrina (Quadro 2). Os maiores valores no  $M_0$  foram descritos no grupo CN e os menores no grupo DEX. Nos momentos seguintes ( $M_{24}$  e  $M_{48}$ ), os maiores valores foram também do grupo CN, sugerindo que esta proteína pode indicar maturidade nos cordeiros, visto que os maiores valores encontrados são em animais a termo, quando comparados aos prematuros com os diversos tipos de tratamento.

O grupo DEX foi o único que apresentou diferença estatística entre os momentos avaliados no estudo, onde apesar de apresentar os mais baixos valores séricos de transferrina ao nascer, apresentou às 48 horas as maiores médias dentre os prematuros, reforçando os resultados de Bovino (2015) que conclui que o uso da dexametasona ajuda na maturação pulmonar destes animais.

As concentrações séricas de ceruloplasmina tiveram diferença apenas ao nascimento com os maiores valores no grupo CN (Quadro 3). Ao comparar os grupos de cesariana, nos  $M_0$  e  $M_{24}$  a diferença foi entre o grupo CN com os prematuros com exceção do DEX. O epitélio das vias aéreas é a principal fonte de ceruloplasmina no pulmão (Yang et al., 1996), mas os valores não foram

significativos para indicar algum tipo de maturação ou diferenciação dos animais nascidos a termo ou prematuros.

Os teores de haptoglobina sérica não tiveram diferença entre os grupos a termo e ao nos grupos nascidos por cesariana, a diferença foi apenas às 24 horas com os maiores valores descritos no grupo CN e os menores no CP (Quadro 4). O aumento e a expressão da haptoglobina são utilizados como biomarcadores precoce de sepse em neonatos humanos (Buhimschi et al. 2011).

Embora as concentrações de glicoproteína ácida não variaram entre nenhum dos grupos do estudo, os valores descritos foram maiores em prematuros. Essa é uma proteína de fase aguda positiva, produzida pelas células epiteliais pulmonares (Lecchi et al., 2009) sendo utilizada como marcador inflamatório para potros neonatos de alto risco (Haetinger, 2014).

Não ocorreram diferenças entre os tempos nas concentrações séricas de imunoglobulina A nos grupos nascidos a termo (Quadro 3), enquanto os animais dos grupos CN e DEXSURF possuíam os maiores valores em relação aos DEX e SURF ao nascer. O grupo DEXSURF apresentou as maiores concentrações se comparado ao DEX às 24 horas (Quadro 4). Apesar do relato de que as concentrações séricas de IgA aumentem gradativamente em bezerros após a ingestão de colostro, não encontrando os mesmos achados no presente estudo (Costa et al, 2009; Rocha, 2010).

As concentrações séricas de imunoglobulina G de cadeia pesada apresentaram às 24 e 48 horas os maiores valores no grupo de PN (Quadro 3). Os animais dos grupos de cesariana não apresentaram diferença (Quadro 4), justificável pelo fato de que todos os animais nascidos por cesariana receberam colostro bovino logo ao nascer até a recuperação cirúrgica das mães, com volume controlado, enquanto os cordeiros PN permaneceram com as mães.

Nos animais a termo, os níveis de imunoglobulina G de cadeia leve ao nascimento foram maiores no CN enquanto, às 24 horas, os maiores valores descritos foram no grupo PN. Apesar da diferença entre os momentos ter sido relatada apenas no grupo PN, onde os maiores valores foram descritos nos M<sub>24</sub> e M<sub>48</sub>, os mesmos aumentos podem ser vistos no grupo CN (Quadro 3). Quando a comparação ocorreu entre os animais de cesariana, observou-se maiores teores nos animais CN, sugerindo melhor desenvolvimento imunológico dos animais a termo, em todos os neonatos avaliados.

Os animais nascidos de parto normal apresentaram os maiores valores de imunoglobulinas G, possivelmente, por permanecerem permaneciam com as mães durante todo o tempo, sem qualquer controle do volume ingerido de colostro, diferente dos animais provenientes de cesariana, que recebiam, via mamadeira, volume conhecido de colostro a cada duas horas. Foi comparada a administração de colostro bovino e ovino via mamadeira em cordeiros e os maiores valores séricos de imunoglobulina G foram encontrados em animais que ingeriram maiores volumes de colostro, sem diferença quanto à espécie (Moretti et al., 2010).

As proteínas de fase aguda desempenham grande importância no período neonatal, entretanto, os mecanismos específicos funcionais de cada uma delas não estão completamente elucidados nos recém-nascidos (Murata et al., 2004, Orro et al., 2008). As análises de proteínas no período pós-parto são escassas, vários autores descrevem padrões, principalmente de bovinos, mas só de animais adultos e/ou com alguma doença, existindo assim uma falta de dados relacionados à fisiologia desse perfil proteico usando as frações eletroforéticas (Thotova et al., 2016). Ao se tratar do mesmo perfil em prematuros, poucos trabalhos relatam dados obtidos com a técnica de gel de agarose ou fita de acetato celulose, geralmente de uma proteína específica, demonstrando a importância deste estudo.

## CONCLUSÕES

Maiores valores de transferrina foram associados a um maior tempo de gestação, indicando seu potencial como um possível marcador de maturação no neonato, não havendo diferença entre nenhum dos demais protocolos realizados nas mães e nos cordeiros prematuros.

**Agradecimentos.**- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por concessão de apoio financeiro ao projeto de pesquisa (2011/18810-3).

## REFERÊNCIAS

- Barrington G.M. & Parish S.M. 2001. Bovine neonatal immunology. *Vet. Clin. North Am. Food Anim.* 17,3:463-476.
- Bovino F. 2015. Abordagem clínica de cordeiros prematuros: avaliação de protocolos terapêuticos emergenciais para estimulação da atividade respiratória. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba.
- Brunn C.F., Sanchez J.C. Hochstrasser D.F. Marhaug G. & Husby G. 1998. A tow-dimensional electrophoretic study
- Buhimschi C.S., Bhandari V. Dulay A.T., Nayeri U.A., AbdelRazeq S.S., Pettker C.M., Thung S., Zhao G., Han Y.W., Bizzarro M. & Buhimschi I.A. 2011. Proteomics Mapping of Cord Blood Identifies Haptoglobin “Switch-On” Pattern as Biomarker of Early-Onset Neonatal Sepsis in Preterm Newborns. *PLoS One* 6,10, e26111, doi:10.1371/journal.pone.0026111
- Costa M.C., Flaiban K.K.M.C., Coneglian M.M., Feitosa F.L.F., Balarin M.R.S. & Lisbôa J.A.N., 2008. Transferência de imunidade passiva em bezerros das raças Nelore e Limousin e proteinograma sérico nos primeiros quatro meses de vida. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28:410-416.
- Eckersall D. 2008. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. Kaneko J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6ed. Elsevier: 117-155.
- Fagliari J.J. & Silva S.L. 2002. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. *Arq. Bra. Med. Vet. e Zootec.* 54,6:559-586.
- Gordon A. H. 1995. Electrophoresis of proteins in polyacrilamide and starch gels. Elsevier: 213.
- Haetinger, C. 2014. Proteínas de fase aguda no periparto de éguas com placentite e seus respectivos neonatos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Harada E., Araki Y., Furumura E., Takeuchi T., Sttizyo K., Yajima T. & Kuwata T. 2002. Characteristic transfer of colostrums-derived biologically active substances into cerebrospinal fluid via blood in natural suckling neonatal pigs. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 49:358–364.
- Heirich P.C., Castell J.V. & Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem.* 265:621-636.
- Jainudeen M.R. & Hafez E.S.E. 2004. Gestação, fisiologia pré-natal e parto. In: Hafez B. & Hafez E.S.E. *Reprodução animal*, 7ed. Manole: 141-155.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Leal M.L.R., Benesi F.J., Lisboa J.A.N. & Mirandola R.M.S. 2003. Proteinograma sérico de bezerras sadias da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. *Braz. J. Res. anim. Sci.* 40,2:139-145.
- Lecchi C., Avallone G., Giurovich M., Roccabianca P. & Ceciliani F. 2009. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. *Vet. J.* 180,2:256–258.
- Martínez-Subiela S., Tecles F., Parra M.D. & Cerón J.J. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principals aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *An. Vet.* 17:97-114.
- McDonald T.L., Larson M.A., Mack D. & Webera A. 2001. Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary-associated serum alyloid A3 (M-SAA3) into colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83:28-40.
- Mobini S., Heath A.M. & Pugh D.G. 2004. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: Pugh D.G. *Clínica de ovinos e caprinos* 1ed. Roca:145-208.
- Moretti D.B., Kindlein L., Pauletti P. & Machado-Neto R. 2010. IgG absorption by Santa Ines lambs fed Holstein bovine colostrum or Santa Ines ovine colostrum. *Animal* 4,6:933–937.
- Murata H, Shimada N & Yoshioka M. 2004. Current research on acute phase protein in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 168:28-40.
- of serum amyloid A and C-reactive protein in infants and childrens. *Eletrophoresis* 19,5:279-283.
- Orro T., Jacobsen S., LePage J.P., Niewold T. & Alasuutari S. 2008. Temporal changes in serum concentrations os acute phase in newborn dairy calves. *Vet. Journal* 176:182-187.

- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats, 10ed. Elsevier Saunders:2156.
- Rocha T.G. 2010. Avaliação da transferência de imunidade passiva em bezerros de vacas da raça canchim. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.
- Talukder M.J., Takeuchi T. & Harada E. 2002. Transport of colostral macromolecules into the cerebrospinal fluid via plasma in newborn calves. *Journal of Dairy Science* 85:514–524.
- Thomas, J.S. 2000. Overview of plasm protein. In: Feldman, B.V., Zinkl, J.L., Jain, N.C. *Veterinary Hematology*, 5ed. Baltimore: 891-898.
- Tibary A. & Van Metre D. Surgery of the sheep and goat reproductive system and urinary tract, p.527-547. In: Fubini S.L. & Ducharme N.G. *Farm animal surgery*. Saunders: St. Louis. 2004.
- Tothova C, Nagy G., Kovac G. & Nagyova V. 2016. Changes in the concentration of serum proteins in calves during the first month of life. *Journal of Applied Animal Research* 44,1:338-346.
- Turquino C.F. 2010. Transferência de imunidade passiva e comportamento de cordeiros de corte recém-nascidos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.
- Vaala W.E. & House J.K. 2006. O período periparto. In: Smith B.P. *Medicina interna de grandes animais*, 3ed. Manole:257-265.
- Yang F., Friedrichs W.E., Degraffenried L., Herbert D.C., Weaker F.J., Bowman B.H. & Coalson J.J., 1996. Cellular expression of ceruloplasmin in baboon and mouse lung during development and inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 14:161–169.

Quadro 1 – Concentrações séricas de proteínas obtidas por eletroforese (transferrina, albumina) e da proteína total de cordeiros nascidos parto normal em tempo normal de gestação (PN) e de cesariana em tempo normal de gestação (CN), nas primeiras 48 horas de vida. Os valores representam as médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrões (S).

| VARIÁVEL                             | MOMENTOS<br>(horas)   | GRUPOS |                                |    |                               |
|--------------------------------------|-----------------------|--------|--------------------------------|----|-------------------------------|
|                                      |                       | PN     |                                | CN |                               |
|                                      |                       | n      | $\bar{x} \pm S$                | n  | $\bar{x} \pm S$               |
| <b>Transferrina<br/>(mg/dL)</b>      | <b>M<sub>0</sub></b>  | 9      | 673,54 ± 206,72 <sup>B</sup>   | 7  | 963,66 ± 183,69 <sup>A</sup>  |
|                                      | <b>M<sub>24</sub></b> | 9      | 908,56 ± 402,99                | 6  | 1245,18 ± 446,67              |
|                                      | <b>M<sub>48</sub></b> | 9      | 758,08 ± 256,30 <sup>B</sup>   | 6  | 1299,55 ± 537,36 <sup>A</sup> |
| <b>Albumina<br/>(mg/dL)</b>          | <b>M<sub>0</sub></b>  | 9      | 1876,21 ± 378,33 <sup>b</sup>  | 7  | 1674,01 ± 324,28              |
|                                      | <b>M<sub>24</sub></b> | 9      | 2199,16 ± 562,86 <sup>ab</sup> | 6  | 2073,18 ± 567,39              |
|                                      | <b>M<sub>48</sub></b> | 9      | 2327,33 ± 297,07 <sup>a</sup>  | 6  | 2164,37 ± 882,92              |
| <b>Proteína<br/>total<br/>(g/dL)</b> | <b>M<sub>0</sub></b>  | 9      | 4,11 ± 0,26 <sup>Ab</sup>      | 7  | 3,34 ± 0,46 <sup>Bb</sup>     |
|                                      | <b>M<sub>24</sub></b> | 9      | 6,42 ± 1,21 <sup>a</sup>       | 6  | 5,57 ± 1,05 <sup>a</sup>      |
|                                      | <b>M<sub>48</sub></b> | 9      | 6,30 ± 1,01 <sup>a</sup>       | 6  | 5,63 ± 0,85 <sup>a</sup>      |

<sup>Aa</sup> médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

Quadro 2 – Concentrações séricas de proteínas obtidas na eletroforese (transferrina, albumina) e da proteína total de cordeiros nascidos de cesariana em tempo normal de gestação (CN), cesariana prematura aos 137 dias (CP), cesariana prematura após administração de dexametasona (DEX), cesariana prematura tratados com surfactante (SURF) e cesariana prematura tratadas com dexametasona associado a surfactante (DEXSURF) nas primeiras 48 horas de vida. Os valores representam médias ( $\bar{x}$ ) e desvios padrões (S).

| VARIÁVEL                    | MOMENTOS<br>(horas) | Grupos |                               |    |                                |     |                                |      |                                |         |                                |
|-----------------------------|---------------------|--------|-------------------------------|----|--------------------------------|-----|--------------------------------|------|--------------------------------|---------|--------------------------------|
|                             |                     | CN     |                               | CP |                                | DEX |                                | SURF |                                | DEXSURF |                                |
|                             |                     | n      | $\bar{x} \pm S$               | n  | $\bar{x} \pm S$                | n   | $\bar{x} \pm S$                | n    | $\bar{x} \pm S$                | n       | $\bar{x} \pm S$                |
| Transferrina<br>(mg/dL)     | M <sub>0</sub>      | 7      | 963,66 ± 183,69 <sup>A</sup>  | 6  | 419,73 ± 31,22 <sup>B</sup>    | 9   | 135,25 ± 146,65 <sup>Cb</sup>  | 6    | 423,84 ± 39,19 <sup>B</sup>    | 6       | 408,48 ± 30,82 <sup>B</sup>    |
|                             | M <sub>24</sub>     | 6      | 1245,18 ± 446,67 <sup>A</sup> | 4  | 408,90 ± 58,67 <sup>B</sup>    | 7   | 321,80 ± 169,45 <sup>Bb</sup>  | 0    | †                              | 4       | 475,22 ± 55,66 <sup>B</sup>    |
|                             | M <sub>48</sub>     | 6      | 1299,55 ± 537,36 <sup>A</sup> | 4  | 352,48 ± 244,14 <sup>B</sup>   | 7   | 544,76 ± 81,56 <sup>Ba</sup>   | 0    | †                              | 4       | 380,10 ± 259,22 <sup>B</sup>   |
| Albumina<br>(mg/dL)         | M <sub>0</sub>      | 7      | 1674,01 ± 324,28 <sup>B</sup> | 6  | 2707,76 ± 116,69 <sup>Aa</sup> | 9   | 2075,72 ± 348,84 <sup>AB</sup> | 6    | 2724,09 ± 152,84 <sup>AB</sup> | 6       | 2503,59 ± 595,70 <sup>AB</sup> |
|                             | M <sub>24</sub>     | 6      | 2073,18 ± 567,39              | 4  | 2525,36 ± 174,02 <sup>a</sup>  | 7   | 2324,84 ± 326,68               | 0    | †                              | 4       | 2858,79 ± 607,59               |
|                             | M <sub>48</sub>     | 6      | 2164,37 ± 882,92              | 4  | 2396,36 ± 372,31 <sup>a</sup>  | 7   | 2337,34 ± 319,43               | 0    | †                              | 4       | 2723,15 ± 554,70               |
| Proteína<br>total<br>(g/dL) | M <sub>0</sub>      | 7      | 3,34 ± 0,46 <sup>b</sup>      | 6  | 4,07 ± 0,20 <sup>b</sup>       | 9   | 3,73 ± 0,35 <sup>b</sup>       | 6    | 3,17 ± 1,07                    | 6       | 4,03 ± 0,39 <sup>b</sup>       |
|                             | M <sub>24</sub>     | 6      | 5,57 ± 1,05 <sup>a</sup>      | 4  | 5,20 ± 0,57 <sup>a</sup>       | 7   | 4,74 ± 0,38 <sup>a</sup>       | 0    | †                              | 4       | 6,10 ± 0,60 <sup>a</sup>       |
|                             | M <sub>48</sub>     | 6      | 5,63 ± 0,85 <sup>a</sup>      | 4  | 5,15 ± 0,73 <sup>a</sup>       | 7   | 4,76 ± 0,51 <sup>a</sup>       | 0    | †                              | 4       | 5,95 ± 0,41 <sup>a</sup>       |

† óbito

<sup>Aa</sup> médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

Quadro 3 – Concentrações séricas de proteínas de fase aguda obtidas por eletroforese (IgA, ceruloplasmina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina, glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve) de cordeiros nascidos de parto normal (PN) e cesariana em tempo normal de gestação – 144 dias (CN), nas primeiras 48 horas de vida. Os valores representam mediana (Md), mínimo (Min) e máximo (Máx).

| VARIÁVEL<br>(mg/dL)         | MOMENTOS<br>(horas) | GRUPOS |                       |                   |    |                     |                  |
|-----------------------------|---------------------|--------|-----------------------|-------------------|----|---------------------|------------------|
|                             |                     | PN     |                       |                   | CN |                     |                  |
|                             |                     | n      | Md                    | Min - Máx         | n  | Md                  | Min - Máx        |
| <b>IgA</b>                  | M <sub>0</sub>      | 9      | 0,00                  | 0,00 – 185,44     | 7  | 53,60               | 29,70 – 78,12    |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 54,72                 | 0,00 – 255,20     | 6  | 59,97               | 21,60 – 129,92   |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 86,70                 | 0,00 – 235,60     | 6  | 59,76               | 17,02 – 151,64   |
| <b>Ceruloplasmina</b>       | M <sub>0</sub>      | 9      | 127,60 <sup>A</sup>   | 40,48 – 327,21    | 7  | 56,70 <sup>B</sup>  | 16,32 – 70,92    |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 88,00                 | 69,70 – 161,20    | 6  | 84,94               | 69,96 – 141,44   |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 155,04                | 0,00 – 250,41     | 6  | 64,89               | 47,04 – 298,84   |
| <b>IgG de cadeia pesada</b> | M <sub>0</sub>      | 9      | 435,01 <sup>b</sup>   | 320,40 – 462,44   | 7  | 313,20              | 301,10 – 503,64  |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 1642,20 <sup>Aa</sup> | 977,50 – 2022,12  | 6  | 840,83 <sup>B</sup> | 600,60 – 1628,64 |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 1456,21 <sup>Aa</sup> | 975,00 – 1801,20  | 6  | 719,34 <sup>B</sup> | 653,66 – 1152,36 |
| <b>Haptoglobina</b>         | M <sub>0</sub>      | 9      | 0,00                  | 0,00 – 121,44     | 7  | 0,00                | 0,00 – 64,50     |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 0,00                  | 0,00 – 183,30     | 6  | 55,36               | 2,70 – 125,28    |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 94,32                 | 0,00 – 144,84     | 6  | 19,68               | 1,44 – 135,78    |
| <b>Glicoproteína ácida</b>  | M <sub>0</sub>      | 9      | 0,00                  | 0,00 – 160,68     | 7  | 0,00                | 0,00 – 39,0      |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 0,00                  | 0,00 – 132,24     | 6  | 11,91               | 5,94 – 88,44     |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 0,00                  | 0,00 – 92,88      | 6  | 18,78               | 0,00 – 40,02     |
| <b>IgG de cadeia leve</b>   | M <sub>0</sub>      | 9      | 0,00 <sup>Bb</sup>    | 0,00 – 117,04     | 7  | 117,80 <sup>A</sup> | 80,08 – 171,60   |
|                             | M <sub>24</sub>     | 9      | 1006,40 <sup>Aa</sup> | 1006,40 – 1532,04 | 6  | 938,44 <sup>B</sup> | 658,68 – 1256,50 |
|                             | M <sub>48</sub>     | 9      | 605,00 <sup>a</sup>   | 605,00 – 1766,16  | 6  | 974,79              | 427,18 – 1705,80 |

<sup>Aa</sup> medianas seguidas de letras diferentes, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Dunn (p<0,05).

Ausência de letras indica que não houve diferença estatística.

Quadro 4 – Concentrações séricas de proteínas de fase aguda obtidas pela eletroforese (IgA, ceruloplasmina, IgG de cadeia pesada, haptoglobina, glicoproteína ácida, IgG de cadeia leve) de cordeiros nascidos de cesariana em tempo normal de gestação (CN), cesariana prematura aos 137 dias (CP), cesariana prematura após administração de dexametasona (DEX), cesariana prematura tratados com surfactante (SURF) e cesariana prematura tratadas com dexametasona associado a surfactante (DEXSURF) nas primeiras 48 horas de vida. Os valores representam mediana (Md), mínimo (Min) e máximo (Máx).

| VARIÁVEL<br>(mg/dL)  | MOMENTOS<br>(horas) | Grupos |                     |                  |    |                      |                  |     |                     |                  |      |                   |              |         |                      |                  |
|----------------------|---------------------|--------|---------------------|------------------|----|----------------------|------------------|-----|---------------------|------------------|------|-------------------|--------------|---------|----------------------|------------------|
|                      |                     | CN     |                     |                  | CP |                      |                  | DEX |                     |                  | SURF |                   |              | DEXSURF |                      |                  |
|                      |                     | n      | Md                  | Min - Máx        | n  | Md                   | Min - Máx        | n   | Md                  | Min - Máx        | n    | Md                | Min - Máx    | n       | Md                   | Min - Máx        |
| IgA                  | M <sub>0</sub>      | 7      | 53,60 <sup>A</sup>  | 29,70 – 78,12    | 6  | 28,98 <sup>AB</sup>  | 0,00 – 82,00     | 9   | 0,00 <sup>B</sup>   | 0,00 – 34,56     | 6    | 0,00 <sup>B</sup> | 0,0 – 0,00   | 6       | 0,00 <sup>A</sup>    | 0,00 – 77,90     |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 59,97 <sup>AB</sup> | 21,60 – 129,92   | 4  | 102,72 <sup>AB</sup> | 92,64 – 113,36   | 7   | 0,00 <sup>B</sup>   | 0,00 – 117,72    | 0    | †                 | †            | 4       | 119,94 <sup>A</sup>  | 67,84 – 150,40   |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 59,76               | 17,02 – 151,64   | 4  | 92,64                | 0,00 – 116,0     | 7   | 0,00                | 0,00 – 107,46    | 0    | †                 | †            | 4       | 89,73                | 0,00 – 139,20    |
| Ceruloplasmina       | M <sub>0</sub>      | 7      | 56,70 <sup>A</sup>  | 16,32 – 70,92    | 6  | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 0,00      | 9   | 40,40 <sup>AB</sup> | 0,00 – 76,02     | 6    | 0,00 <sup>B</sup> | 0,0 – 0,00   | 6       | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 0,00      |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 84,94 <sup>A</sup>  | 69,96 – 141,44   | 4  | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 50,88     | 7   | 52,80 <sup>AB</sup> | 0,00 – 122,50    | 0    | †                 | †            | 4       | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 67,84     |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 64,89               | 47,04 – 298,84   | 4  | 31,25                | 0,00 – 92,25     | 7   | 96,35               | 0,00 – 124,55    | 0    | †                 | †            | 4       | 56,70                | 0,00 – 110,70    |
| IgG de cadeia pesada | M <sub>0</sub>      | 7      | 313,20              | 301,20 – 503,64  | 6  | 366,15               | 320,97 – 604,56  | 9   | 654,80              | 266,04 – 1018,08 | 6    | 366,15            | 320,9–888,48 | 6       | 357,86               | 335,16 – 465,12  |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 840,83              | 600,60 – 1628,64 | 4  | 866,16               | 817,44 – 1598,40 | 7   | 903,00              | 695,64 – 1105,92 | 0    | †                 | †            | 4       | 1102,08              | 903,24 – 1872,64 |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 719,34              | 653,66 – 1152,36 | 4  | 829,25               | 645,00 – 1534,50 | 7   | 887,50              | 570,72 – 978,42  | 0    | †                 | †            | 4       | 1006,47              | 774,00 – 1793,28 |
| Haptoglobina         | M <sub>0</sub>      | 7      | 0,00                | 0,00 – 64,50     | 6  | 0,00                 | 0,00 – 41,58     | 9   | 0,00                | 0,00 – 165,12    | 6    | 0,00 <sup>A</sup> | 0,0 – 135,84 | 6       | 0,00 <sup>A</sup>    | 0,00 – 45,54     |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 55,36 <sup>A</sup>  | 2,70 – 125,28    | 4  | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 0,00      | 7   | 0,00 <sup>AB</sup>  | 0,00 – 28,16     | 0    | †                 | †            | 4       | 0,00 <sup>AB</sup>   | 0,00 – 85,12     |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 19,68               | 1,44 – 135,78    | 4  | 0,00                 | 0,00 – 0,00      | 7   | 29,16               | 0,00 – 86,00     | 0    | †                 | †            | 4       | 0,00 <sup>A</sup>    | 0,00 – 49,28     |
| Glicoproteína ácida  | M <sub>0</sub>      | 7      | 0,00                | 0,00 – 39,00     | 6  | 44,60                | 0,00 – 110,88    | 9   | 132,66 <sup>A</sup> | 0,00 – 211,20    | 6    | 0,00 <sup>A</sup> | 0,0 – 1,25   | 6       | 42,12 <sup>A</sup>   | 0,00 – 121,44    |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 11,91               | 5,94 – 88,44     | 4  | 32,24                | 0,00 – 77,76     | 7   | 0,00 <sup>A</sup>   | 0,00 – 65,88     | 0    | †                 | †            | 4       | 58,88 <sup>A</sup>   | 0,00 – 103,68    |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 18,78               | 0,00 – 40,02     | 4  | 23,50                | 0,00 – 72,90     | 7   | 0,00 <sup>A</sup>   | 0,00 – 0,00      | 0    | †                 | †            | 4       | 47,72 <sup>A</sup>   | 0,00 – 87,48     |
| IgG de cadeia leve   | M <sub>0</sub>      | 7      | 117,80 <sup>A</sup> | 80,08 – 171,60   | 6  | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 0,00      | 9   | 0,00 <sup>B</sup>   | 0,00 – 96,40     | 6    | 0,00 <sup>B</sup> | 0,0 – 0,00   | 6       | 0,00 <sup>B</sup>    | 0,00 – 0,00      |
|                      | M <sub>24</sub>     | 6      | 938,44 <sup>A</sup> | 658,68 – 1256,50 | 4  | 756,44 <sup>AB</sup> | 630,24 – 1334,40 | 7   | 560,16 <sup>B</sup> | 371,80 – 1006,02 | 0    | †                 | †            | 4       | 949,44 <sup>AB</sup> | 707,20 – 1579,52 |
|                      | M <sub>48</sub>     | 6      | 974,79 <sup>A</sup> | 427,18 – 1705,80 | 4  | 598,43 <sup>AB</sup> | 526,75 – 1470,02 | 7   | 544,31 <sup>B</sup> | 313,32 – 958,50  | 0    | †                 | †            | 4       | 718,11 <sup>AB</sup> | 645,00 – 1558,40 |

† óbito

<sup>Aa</sup> medianas seguidas de letras diferentes maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Dunn (p<0,05).

Ausência de letras indica que não houve diferença estatística.