

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO E SUA RELAÇÃO COM A
REPARAÇÃO ÓSSEA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*) SUBMETIDOS À OSTECTOMIA PARCIAL DO
RÁDIO**

Karina Calciolari

Médica Veterinária

2019

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

**PROTEINOGRAMA SÉRICO E SUA RELAÇÃO COM A
REPARAÇÃO ÓSSEA EM COELHOS (*Oryctolagus
cuniculus*) SUBMETIDOS À OSTECTOMIA PARCIAL DO
RÁDIO**

Karina Calciolari

Orientador: Prof. Dr. Associado Bruno Watanabe Minto

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

2019

C144p Calciolari, Karina
Proteinograma sérico e sua relação com a reparação óssea em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) submetidos à ostectomia parcial do rádio / Karina Calciolari. -- Jaboticabal, 2019
44 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Bruno Watanabe Minto

1. Inflamação. 2. Fraturas Ósseas. 3. Ortopedia Veterinária.
4. Proteinograma. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

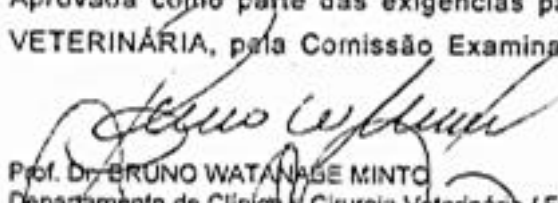
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

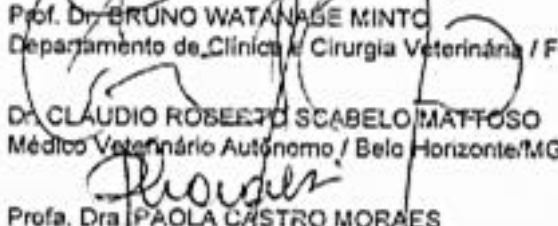
TÍTULO DA TESE: PROTEINOGRAMA SÉRICO E SUA RELAÇÃO COM A REPARAÇÃO ÓSSEA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) SUBMETIDOS À OSTECTOMIA PARCIAL DO RÁDIO

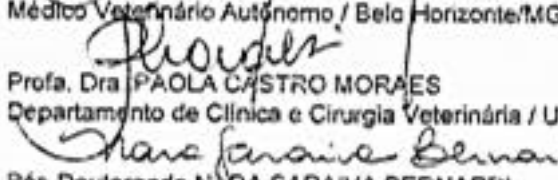
AUTORA: KARINA CALCIOLARI

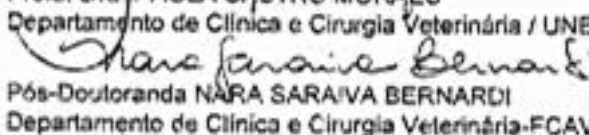
ORIENTADOR: BRUNO WATANABE MINTO

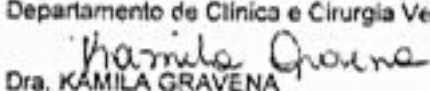
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIRURGIA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. BRUNO WATANABE MINTO
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Dr. CLAUDIO ROBERTO SCABELO MATTOSO
Médico Veterinário Autônomo / Belo Horizonte/MG


Profa. Dra. PAOLA CASTRO MORAES
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / UNESP / FCAV - Jaboticabal


Pós-Doutoranda NARA SARAIVA BERNARDI
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP


Dra. KAMILA GRAVENA
Coordenadora de Defesa Agropecuária da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo / Botucatu/SP

Jaboticabal, 21 de outubro de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

KARINA CALCIOLARI – nascida em São Carlos /SP, em 16 de outubro de 1987, filha de Leonelo Antônio Calciolari e Aparecida Donizetti Rabello Calciolari. Graduada em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Universidade Estadual Paulista (UNESP) em dezembro de 2011 sob orientação do prof. Dr. Bruno Watanabe Minto e coorientação do prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto. Especialista em Clínica e Cirurgia de Grandes Animais (aprimoramento) pelo curso de pós-graduação *Latu Sensu* da Universidade de Franca (UNIFRAN) Franca /SP, sob orientação do prof. Dr. José Abdo de Andrade Hellú, obtendo título em janeiro de 2014. Mestre em Cirurgia Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Jaboticabal sob orientação do prof. Dr. José Correa de Lacerda Neto e coorientação da Dra. Kamila Gravena obtendo o título em fevereiro de 2016. No mesmo ano deu início ao curso de pós-graduação *Stricto Sensu* (doutorado) na mesma área de interesse e instituição sob orientação do prof. Dr. Bruno Watanabe Minto com término previsto para dezembro de 2019.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”.

(Albert Einstein)

DEDICATÓRIA

Dedico esse manuscrito a todos animais que fizeram parte da minha jornada acadêmica até hoje, em especial aos cavalos... a razão por ter iniciado na profissão... e a razão por permanecer nela. Dedico a todos que fizeram parte da minha vida. Ao primeiro e querido Goldy, com quem entrei no mundo equino e que me ensinou sobre superação. À Tinker Bell que me deu forças para acreditar que podemos dar o melhor de nós, mesmo em situações difíceis. Ao meu doce Karamelo, a realização de um sonho e quem me levou a desejada prova de 1 metro, me ensinou sobre foco, perseverança, dedicação... e com quem aprendi o quanto dói perder alguém tão amado... À geniosa Kiara, minha querida pimenta, chegou em uma hora adversa, cheia de forças e opinião. Ela me ensinou o quanto dela tenho dentro de mim... e que é possível se adaptar. Dedico a cada cavalo que cuidei e que me deram a honra de crescer pessoal e profissionalmente.

Dedico também a todos professores que trouxeram “luz” a minha jornada, sem eles nunca teria chegado até aqui!

“Lâmpada para os meus pés é a tua palavra e, luz para os meus caminhos.”

(Salmo 119.105)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente queria agradecer a Deus por permitir e me dar forças na realização desse doutorado.

Agradeço ao professor Bruno, meu orientador, quem abraçou uma causa que não era dele e me deu a oportunidade de realizar um projeto e defendê-lo como Tese. Professora obrigada por me receber e me ajudar nessa jornada!!! Agradeço também aos professores e profissionais que dispuseram de tempo e conhecimento para melhorar esse manuscrito no exame de qualificação e defesa: Paola, Luis Gustavo, Nara, Kamila e Cláudio.

A minha família, que independente dos caminhos que fui escolhendo nesses 12 anos de medicina veterinária, sempre acabaram me apoiando.

Aos amigos, primeiramente a Adrielly que deu espaço dentro do seu projeto e permitiu o desenvolvimento dessa Tese. Foram 9 meses de trabalho intenso sem a qual não teria sido possível. Agradeço também ao Julian, Pedro, Dayvid e Felipe que deram muito apoio durante esse período.

A veterinária, os cavalos e Jaboticabal me permitiram fazer amigos inestimáveis como a Lisiane, pessoa que esteve presente em um dos momentos mais difíceis que passei durante o doutorado, me deu o ombro e nunca me deixou desistir. Agradeço também a Nara que sempre me ajudou e deu apoio durante toda pós-graduação, a Kamila pela parceria e sempre me estimular a escrever. Ao Marcio e o Darcio que sempre me receberam e me proporcionaram momentos de alegria com os cavalos. Agradeço aos amigos que deixo em Jaboticabal e que de alguma forma colaboraram com essa jornada.

Aos técnicos do laboratório: Renata, Paulo, Cláudia e Eduardo que foram determinantes para as análises desse projeto. Agradeço também ao professor Alan Panosso que auxiliou no processamento das análises estatísticas.

Agradeço ao CNPQ o qual foi determinante para realização dessa pesquisa e ao professor Carlos Valadão por nos disponibilizar seu laboratório onde os procedimentos cirúrgicos foram efetuados.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO:.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE IMAGENS (CAPÍTULO 2).....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Resposta Inflamatória.....	2
2.1.1 Leucograma	3
2.1.1.1. Neutrófilos	3
2.1.1.2. Eosinófilos	4
2.1.1.3. Basófilos.....	4
2.1.1.4. Linfócitos	4
2.1.1.5. Monócitos	4
2.1.1.6. Leucograma de Estresse.....	5
2.2 Proteínas de Fase Aguda.....	5
2.2.1 Proteína C Reativa (pCR)	7
2.2.2 Haptoglobina.....	8
2.2.3 Fibrinogênio	9
2.2.4 Ceruloplasmina	9
2.2.5 Albumina	9
2.2.6 Transferrina.....	10
2.2.7 Métodos de Aferição de PFAs	10
2.3 Traumatologia e Resposta Inflamatória.....	15
3. OBJETIVOS GERAIS.....	17
3.1 Objetivos específicos.....	17
4. HIPÓTESEE.....	18
5. JUSTIFICATIVA	18
6. REFERÊNCIAS.....	19

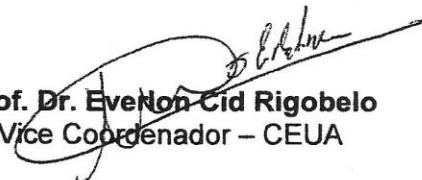
CAPÍTULO 2 – Artigo científico nas normas do periódico Ciência Rural - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria - ISSN Eletrônico: 1678-4596.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT	25
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS.....	39
CAPÍTULO 3 – Considerações Finais	44

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Uso do decanoato de nandrolona no tratamento de não união óssea em fraturas do rádio. Estudo experimental em coelhos"**, protocolo nº 019155/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Bruno Watanabe Minto, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 07 de dezembro de 2017.

Vigência do Projeto	05/03/2018 a 05/03/2020
Espécie / Linhagem	<i>Oryctolagus cuniculus</i> / Leporina - Nova Zelândia
Nº de animais	48
Peso / Idade	4 Kg / 170 dias
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Biotério da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho"

Jaboticabal, 07 de dezembro de 2017.


Prof. Dr. Evenon Cid Rigobelo
 Vice Coordenador – CEUA

**PROTEINOGRAMA SÉRICO E SUA RELAÇÃO COM A REPARAÇÃO
ÓSSEA EM COELHOS (*Oryctolagus cuniculus*) SUBMETIDOS À
OSTECTOMIA PARCIAL DO RÁDIO**

RESUMO - Os traumas ósseos desencadeiam resposta inflamatória aguda e consequentemente alteram a concentração sérica das proteínas de fase aguda (PFAs), podendo essas serem um parâmetro para avaliação da evolução do processo inflamatório relacionado a ortopedia. Objetivou-se avaliar a efetividade da mensuração de PFAs como um biomarcador laboratorial para diagnóstico e acompanhamento da inflamação relacionada a regeneração óssea. Foram utilizados 22 coelhos, machos jovens sendo realizado ostectomia parcial do osso do rádio direito. Para acompanhamento da evolução do processo inflamatório foram realizados hemograma, mensuração de PFAs (Albumina, Ceruloplasmina, Haptoglobina, Proteína C Reativa e Transferrina) e acompanhamento radiológico. Foi observado a melhor correlação da haptoglobina e da transferrina junto ao processo inflamatório e achados radiológicos frente as demais PFAs mensuradas. A haptoglobina apresentou pico máximo 24 horas dos pós operatório e a transferrina após 36 horas, entretanto essa última PFA já mostrou indícios de alteração (diminuiu) já nas primeiras 6 horas do pós-cirúrgico, antecipadamente a resposta leucocitária. Conclui-se que o conjunto haptoglobina, transferrina e leucograma apresentaram resultados promissores ao diagnóstico e prognóstico de processos inflamatórios relacionados a ortopedia.

Palavras-Chave: Fraturas ósseas, inflamação, ortopedia veterinária, proteinograma

**SERUM PROTEINOGRAM AND ITS RELATION TO BONE REPAIR IN
RABBIT (*Oryctolagus cuniculus*) SUBMITTED TO PARTIAL RADIO
OSTECTOMY**

ABSTRACT - The bone traumas trigger an acute inflammatory response. This inflammatory response alters the serum concentration of several acute phase proteins (PFAs). The PFAs which may be a parameter to evaluate the evolution of the inflammatory process related to orthopedics. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of PFA measurement as a laboratory biomarker for diagnosis and follow-up of inflammation related to bone regeneration. Partial osteotomy of the right radius bone was performed in 22 young male rabbits. There were performed blood count, PFAs measurement (Albumin, Ceruloplasmin, Haptoglobin, C-Reactive Protein and Transferrin) and radiological follow-up to follow up the evolution of the inflammatory process. There was observe a best correlation between haptoglobin and transferrin with the inflammatory process and radiological findings compared to the other measured PFA. Heptoglobin showed a maximum peak 24 hours after surgery and transferrin after 36 hours, however this last PFA has already shown signs of alteration (decreased) in the first 6 hours after surgery, in advance of leukocyte response. It was concluded that haptoglobin, transferrin and white blood cells presented promising results for the diagnosis and prognosis of inflammatory processes related to orthopedics.

Keywords: bone fractures, inflammation, proteinogram, veterinary orthopedics.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média ($\pm$) de leucócitos totais (LT), neutrófilos segmentados (NS) , eosinófilos, monócitos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) mensurados sangue venoso total de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso do rádio direito nos momentos pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico..... 34
- Tabela 2. Valores médios seguidos do desvio padrão da média ($\pm$) das proteínas de fase aguda: proteína C reativa ($\text{mg/dL} \times 10^{-1}$), ceruloplasmina ($\text{mg/dL} \times 10^{-1}$), haptoglobina (mg/dL), albumina (mg/dL) e transferrina (mg/dL) mensuradas no soro de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos momentos (M): pré-cirúrgico (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico. 35

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Concentração sérica de algumas proteínas de fase aguda em animais de companhia em comparação a contagem de células brancas (leucócitos totais), adaptado de Kjelgaard-Hansen e Jacobsen (2011). 7
- Figura 2. Imagem fotográfica do gel de poliacrilamida submetido a fracionamento eletroforético após ser corado com solução de azul de coomassie e posteriormente retirado o excesso de corante. A imagem ilustra o posicionamento da solução marcadora (seta) e 17 amostras de soro de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)..... 11
- Figura 3. Imagem obtida após densitometria computadorizada a partir da leitura do gel de poliacrilamida submetido a fracionamento eletroforético apresentando solução marcadora (seta) e 17 amostras de soro de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*)..... 11
- Figura 4. Gráfico resultante da análise (programa computacional Marca Pontos®) da imagem computadorizada obtida por videodensitômetro do gel de poliacrilamida submetido a corrida eletroforética contendo amostra de soro de um coelho (*Oryctolagus cuniculus*)..... 12
- Figura 5. Imagem ilustrativa adaptada de Arosa e colaboradores (2012) sobre ensaios de dispersão de luz no qual a nefelometria mede a luz dispersa pelos imunocomplexos (ângulo de 90°) e a turbidimetria a luz refletida num ângulo de 180°..... 14

LISTA DE IMAGENS (CAPÍTULO 2)

- Imagem 1. A) Exposição da diáfise distal do rádio direito de coelho após incisão de pele e divulsão de músculo adjacente, paramarcação do local da ostectomia com especímetro. B) Uso de serra oscilatória para corte da diáfise média proximal do rádio direito. C) Segmento de um centímetro de extensão seccionado da diáfise do rádio *in locu* D). Fragmento retirado e falha óssea de um centímetro. 28
- Imagem 2. Radiografia craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) do membro torácico direito de coelho imediatamente após a cirurgia de ostectomia parcial da diáfise média proximal do rádio. Identificação da óssea (fragmento ósseo foi retirado) de aproximadamente um centímetro (vermelho). 29
- Imagem 3. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito com escore 1 (0 a 25% de preenchimento regenerativo da falha óssea). 31
- Imagem 4. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito. Escore 2 (25% a 50% de preenchimento regenerativo da falha óssea). 31
- Imagem 5. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito. Escore 3 (50 a 75% de preenchimento regenerativo da falha óssea). 32
- Imagem 6. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito. E 4 (75% a 100% de preenchimento regenerativo da falha óssea da falha óssea foi preenchida (regeneração). 32
- Imagem 7. Avaliação radiográfica de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito divididos em dois grupos: Meloxicam (receberam administração de meloxicam) e Controle (sem meloxicam) nos momentos pós-cirúrgico imediato (M0) e posteriores avaliações quinzenais, 15, 30 e 45 dias de pós-cirúrgico (M15d, M30d e D45d). A mensuração foi efetuada por escores de 1 a 4 onde 1 houve 0 a 25% da falha óssea preenchida com calo ósseo, 2: 25% a 50 %, 3: 50 a 75% e o 4: 75 a 100%. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$). 33
- Imagem 8. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) mensurados no soro de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico. 36
- Imagem 9. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{l}$) mensurados no soro de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos

momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico. 36

Imagem 10. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e hemoglobina (g/dL) mensurados no sangue de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico. 38

LISTA DE ABREVIATURAS

µg: Microgramas

BID: Duas vezes ao dia

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CrCd: Craniocaudal

dL: Decilitro

ELISA: Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

IM: Intramuscular

kDa: Quilodaltons

kg: Quilogramas

LT: Leucócitos Totais

M: Momento

M0: Momento pré-cirúrgico

M15d: 15 dias do pós-cirúrgico

M21d: 21 dias do pós-cirúrgico

M24h: 24 horas do pós-cirúrgico

M30d: 30 dias do pós-cirúrgico

M36h: 36 horas do pós-cirúrgico

M45d: 35 dias do pós-cirúrgico

M6h: 6 horas do pós-cirúrgico

M7d: 7 dias do pós-cirúrgico

Mg: Miligramas

ML: Mediolateral

mL: Mililitro

NS: Neutrófilo Segmentado

pCR: Proteína C reativa

PFAs: Proteínas de fase aguda

PO: Pós-cirúrgico

RPM: Rotações por minuto

SC: Subcutânea

SID: Uma vez ao dia

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1. INTRODUÇÃO

A homeostase corporal pode ser afetada a partir de um estímulo nocivo desencadeando um processo inflamatório, local ou disseminado, o qual leva a uma resposta de fase aguda (Gruys et al., 2006, Rubio et al., 2015). A resposta inflamatória aguda é mediada por proteínas (maioria glicoproteínas) que podem aumentar (positivas) ou diminuir (negativas) diante da inflamação. Dentre essas estão as proteínas de fase aguda (PFAs), sendo a proteína C reativa (pCR), o fibrinogênio, a haptoglobina e a ceruloplasmina as mais estudadas (Kent, 1992, Cerón et al., 2005, Marnell et al., 2005).

As diferentes espécies animais respondem de forma única aos procedimentos inflamatórios, apresentando variações diferentes para determinadas PFAs. As proteínas que se destacam significativamente são nomeadas de PFAs maioritárias. Portanto para obter o diagnóstico mais preciso e com menor influência possível de outros fatores, o ideal é aferir a PFA maioritária específica de cada espécie (Jain, 1986). Vários fatores podem influenciar as concentrações basais de determinadas PFA tais como a obesidade, doenças hepáticas, renais, intestinais, parasitárias e até mesmo a gestação interferindo no diagnóstico (Kuribayashi et al., 2003, Cerón et al., 2005, Eckersall e Bell, 2010, Nemzek et al., 2012). Em cães por exemplo, o uso de fármacos anti-inflamatórios como carprofeno, meloxicam e butorfanol não apresentam ação sobre os valores de pCR, tornando essa PFA fidedigna como biomarcador na avaliação de tratamentos. Já os glicocorticoides levam ao aumento da haptoglobina. Diante disto é essencial a análise do protocolo terapêutico em conjunto a PFA, para diferenciar a da influência do estado geral do paciente e protocolo medicamentoso utilizado (Martínez-Subiela et al., 2004).

Procedimentos cirúrgicos geram alteração na homeostase, desencadeando série de respostas de fase aguda no intuito de promoverem o restabelecimento da normalidade corporal. A magnitude da alteração da concentração sérica das PFA é diretamente relacionada ao grau de lesão ou ao trauma tecidual, como por exemplo, a pCR que pode auxiliar na determinação da gravidade da afecção e no prognóstico (Surter et al., 2002, Cerón et al., 2005,

Nemzek, 2012). As PFAs, em geral, não respondem especificamente para cada afecção, dificultando a utilização destas para diagnosticar patologias subclínicas. Entretanto tendo-se em mente a PFA primária, os fatores externos envolvidos a suspeita clínica definida, pode-se ter uma ferramenta de alta sensibilidade para diagnosticar processos subclínicos e para efetuar o acompanhamento clínico da afecção (Céron et al., 2005).

No intuito de desenvolver métodos diagnósticos mais precoces, a medicina atual tem como seus maiores desafios tornar as PFA em biomarcadores adequados, para isso estudos intensivos com PFA estão sendo realizados tanto em humanos como animais. Apesar de ser resposta inespecífica, essa avaliação favorece o monitoramento de pacientes, fornecendo importantes informações quanto à gravidade e extensão da afecção, além de auxiliar no diagnóstico de apresentações subclínicas (Murata et al., 2004, Paltrinieri, 2007). Na medicina veterinária há poucos estudos relacionando processos ortopédicos com o proteinograma sérico e perfil hematológico, podendo ser alternativa e/ou adicional a verificação da eficiência de protocolos escolhidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta Inflamatória

O organismo entende como estímulo nocivo qualquer alteração que afete a homeostase: alterações orgânicas como inflamação, lesão tecidual, traumas ou cirurgias. Estas levam a uma série de reações sistêmicas orgânicas e metabólicas, inicialmente não específicas, representada pela resposta de fase aguda que é seguida das reações imunológicas específicas (Gruys et al., 2006, Cruvinel et al., 2010, Rubio et al., 2015). O organismo apresenta diversas frentes de proteção durante a resposta de fase aguda, podendo estas serem de origem neurológica, hematológica ou ativação do sistema imune. A reação de origem neurológica (hipófise e hipotálamo) leva a alterações orgânicas como piroxia e aumento de cortisol, já a de origem hematológica leva à ativação de leucócitos, fibroblastos e células endoteliais, havendo liberação de citocinas. Por último, a ativação do sistema imune leva ao aumento linfocitário, além da produção

hepática de proteínas específicas, denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (Gruys et al., 2006). Tanto a resposta hematológica, quanto a do sistema imune leva a liberação de diversos mediadores inflamatórios que alteram a produção das PFA (Kent, 1992, Murata et al., 2004). Sendo assim, as PFA são consideradas biomarcadores relacionados diretamente a reação (Eckersall e Bell, 2010).

2.1.1 Leucograma

O leucograma é caracterizado pela análise da composição da série branca do sangue denominada leucócitos. Os leucócitos são células atuantes predominantemente nos tecidos. Estes são classificados como granulócitos ou agranulócitos. Os granulócitos apresentam granulação no citoplasma específica que a partir da coloração e formas é possível distingui-los fazendo parte desse grupo os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Os linfócitos e os monócitos não possuem essa granulação citoplasmática, fazendo parte dos agranulócitos (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.1. Neutrófilos

Os neutrófilos são caracterizados pelo citoplasma abundante com grânulos que se coram com corantes neutros apresentando núcleo dividido em lobos ou segmentado. Possui função de fagocitose, defendendo assim o organismo de bactérias, vírus e demais partículas estranhas. Cerca de 50% dos leucócitos estão em capilares e pequenos vasos compreendendo um “pool” marginal, o qual não aparece na contagem total de leucócitos realizado em exames laboratoriais. Estímulos nocivos que levam a liberação de adrenalina mobiliza a porção leucocitária do “pool” marginal para corrente sanguínea. Em casos de lesões ou infecções (bactérias, vírus) os neutrófilos são atraídos para o local devido a compostos quimiotáticos liberados pelas células lesadas (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.2. Eosinófilos

Os eosinófilos são células particularmente com citoplasma repleto de grânulos grandes e que se coram com corantes ácidos. São menos numerosos que os neutrófilos sendo responsáveis pela fagocitose de complexo antígeno-anticorpo. Condições alérgicas, choque anafilático e parasitismo são caracterizados por aumento na contagem eosinofílica. Já o estresse está associado ao quadro de eosinopenia, estando relacionada ao aumento do cortisol circulante (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.3. Basófilos

Os basófilos são encontrados na corrente sanguínea em quantidade reduzida, tem citoplasma com grânulos que coram perante corantes alcalinos. São associados a reações de hipersensibilidade uma vez que atuam no foco inflamatório liberando heparina, histamina, serotonina e enzimas lisossômicas auxiliando o combate do agente nocivo (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.4. Linfócitos

Os linfócitos são células numerosas formadas a partir de tecidos linfoides como linfonodos, placas de Peyer, baço, amígdalas e timo. Apresentam núcleo grande, redondo, que se cora fortemente e pouco citoplasma. Atuam no processo imunitário havendo linfócitos do tipo T e do tipo B. Os linfócitos T trabalham tanto na resposta humoral com anticorpos como na imunidade mediada por células; são atuantes nos processos alérgicos, células tumorais, vírus, fungos e bacilos. Os linfócitos B são relacionados a imunidade humoral (produção de globulinas) e produção de anticorpos. Aumento no cortisol sanguíneo (endógeno ou administração de esteroides) induzem o aumento desse tipo celular (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.5. Monócitos

Os monócitos são pouco numerosos, relativamente grandes, citoplasma finamente granular e núcleo único. Têm função fagocítica importante uma vez

que possuem sistemas enzimáticos que atuam sobre fragmentos de tecidos e reações inflamatórias crônicas. São denominados macrófagos ao saírem da corrente sanguínea para agir em tecidos lesionados. Trabalham em conjunto com os linfócitos T, os quais liberam fatores quimiotáticos ou de inibição de macrófagos. Atuam sobre bactérias, vírus, restos celulares e células tumorais (Swenson e Reece 1996).

2.1.1.6. Leucograma de Estresse

Alterações fisiológicas decorrente de um episódio estressante podem estimular a o aumento do cortisol circulante e consequentemente modificações na homeostase. São condições condizentes com estresse fisiológico a insuficiência renal, cetoacidose diabética, desidratação, doença inflamatória e dor (associada a traumas) (Trall, 2007). Nesses casos é possível observa um fenômeno descrito como leucograma de estresse, que é caracterizado pela alteração da quantidade de algumas células sanguíneas circulante (neutrofilia, linfopenia, monocitose e eosinopenia). Os neutrófilos em geral são liberados na sua forma madura e há diminuição da migração destes para os tecidos. O cortisol alto diminui a porcentagem de linfócitos circulantes, podendo ser decorrente da alteração da circulação linfática, redistribuição e em alguns casos como a no hipoadrenocorticismismo ocorre linfólise. Em gatos observa-se a monocitose associada ao estresse principalmente em traumas dolorosos como atropelamento (Meyes, 1995, Bush, 2004).

2.2 Proteínas de Fase Aguda

As PFAs são sintetizadas pela via hepática e, em sua maioria, são glicoproteínas, sendo classificadas como positivas ou negativas. As positivas, como a proteína C reativa (pCR), fibrinogênio, haptoglobina, ceruloplasmina, apresentam aumento da concentração sanguínea perante estímulo inflamatório (Kent, 1992, Cerón et al., 2005, Marnell et al., 2005). Estas ainda são divididas em maiores, moderadas e menores a partir da proporção de aumento perante o processo inflamatório:

- **Maiores:** observa-se aumento da concentração sanguínea de 100 a 1000 vezes em comparação ao inicial num período de 24 a 48 horas após estímulo e possuem tempo de meia vida curto.
- **Moderadas:** apresentam aumento de 5 a 10 vezes comparado ao inicial, sendo que o aumento e a diminuição da concentração sérica são mais lentos que as PFAs maiores, estando presente nos processos crônicos (pico ocorre dentro de 48 a 72 horas).
- **Menores:** aumentam sua concentração lentamente, 50 a 100% a mais dos valores basais (Murata et al. , 2004; Cerón et al, 2005; Eckersall e Bell, 2010, Tothova et al., 2014).

As PFA negativas apresentam decréscimo de pelo menos 25% na concentração sérica comparada ao seu basal em resposta ao processo inflamatório, fazendo parte destas a albumina e transferrina (Cerón et al., 2005, Paltrinieri, 2007, Eckersall e Bell, 2010).

Caracteriza-se também as PFAs como maioritárias, tendo cada espécie (até mesmo raças em cães) um tipo de proteína que se destaca frente as demais no processo inflamatório das demais. Esta é uma das maiores dificuldades que a medicina veterinária se depara ao estudar as PFAs. Tendo em vista essa informação, é necessário definir o comportamento das PFA espécie-específica antes de fazer estudo comparativos entre espécies. Um exemplo é a pCR que em humanos e cães apresentam valores expressivos, sendo amplamente estudada; já nos equinos estes valores são menores; e nos felinos e bovinos são insignificantes (Kjelgaard-Hansen e Jacobsen, 2011).

Vem-se estudando intensivamente as PFAs, tanto na medicina como na veterinária, uma vez que estas favorecem o monitoramento de pacientes, fornecendo importantes informações quanto à gravidade e extensão da doença com caráter inflamatório ou infeccioso. Ainda podem auxiliar no diagnóstico de afecções subclínicas, sendo possível detectar alterações nas concentrações séricas antes mesmo de ser observado aumento leucocitário (Murata et al., 2004, Paltrinieri, 2007). A concentração sérica das PFAs é dependente da magnitude do processo inflamatório, podendo ser utilizada como fator de monitoramento e evolução do tratamento. Na Figura 1 observa-se um exemplo (adaptado) do comportamento de PFAs (maioritária) comparada com a contagem leucocitária (Kjelgaard-Hansen e Jacobsen, 2011).

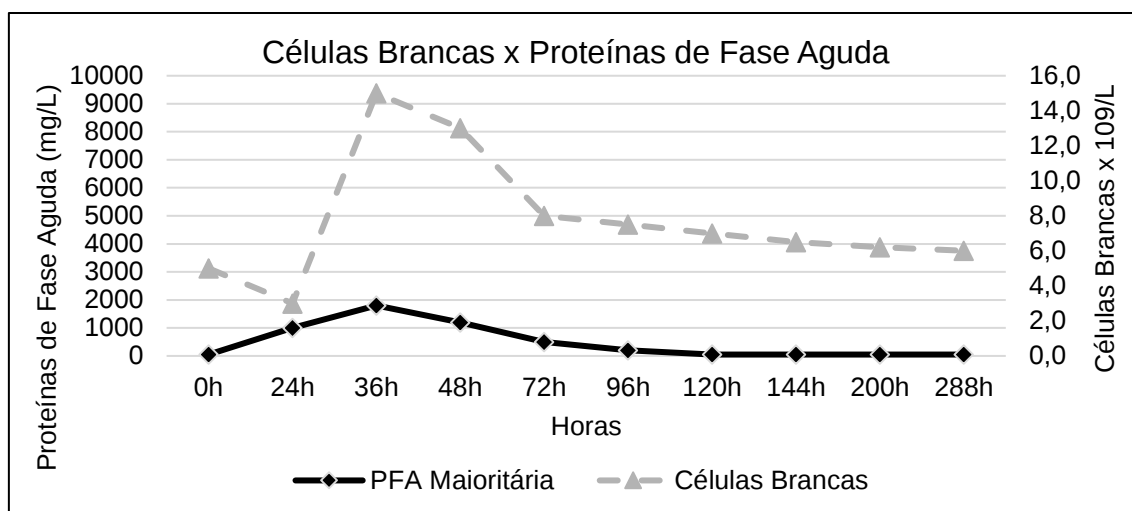


Figura 1. Concentração sérica de algumas proteínas de fase aguda em animais de companhia em comparação a contagem de células brancas (leucócitos totais), adaptado de Kjeldgaard-Hansen e Jacobsen (2011).

2.2.1 Proteína C Reativa (pCR)

A pCR (100 kDa - quilodaltons), possui atividade imunomoduladora, antibacteriana e anti-inflamatória, sendo utilizada como um biomarcador, que favorece o diagnóstico e até prognóstico de algumas doenças inflamatórias ou infecciosas (Cerón et al., 2005, Paltrinieri, 2007). Esta PFA tem a capacidade de iniciar o processo fagocítico para eliminação de bactérias pela ativação do sistema complemento (Agrawal et al., 2002). Após estímulo nocivo é possível observar aumento na concentração de pCR circulante dentro de 4 a 6 horas, dobrando em 8 horas e com pico máximo dentro de 36 a 50 horas, entretanto, sua meia vida é curta, sendo de aproximadamente 19 horas (Mitaka, 2005).

Em cães, atualmente, é utilizada como parâmetro para monitorar o grau e evolução de processos patológicos assim como, a eficácia do tratamento (Plickert et al., 2011, Garvican et al., 2012). Em estudo realizado em humanos, realizou-se artroplastia total em pacientes com osteoartrose do joelho, sendo identificado valores aumentados de pCR no período pré-cirúrgico, pico imediato após o procedimento e redução após 48 horas da cirurgia. A concentração de pCR normalizou-se após 4 semanas do procedimento cirúrgico, chegando a valores inferiores ao basal com 60 dias (Carvalho et al., 2006). Em estudo realizado com coelhos identificou valores de pCR entre 0 a 2 mg/dL (miligramas/decilitro) para animais clinicamente saudáveis (Cray et al., 2015).

Alguns fatores podem influenciar a concentração basal dessa proteína, tais como a idade (Eckersall e Bell, 2010, Nemzek et al., 2012) e a gestação (Kuribayashi et al., 2003), entretanto o gênero não traz alterações (Kuribayashi et al., 2003, Cerón et al., 2005). Apesar dessa proteína ser caracterizada e purificada nos cães na década de 70, o desenvolvimento de kits de mensuração espécie-específicas só se iniciou na década 80 e 90 chegando à comercialização no século XXI. Mesmo com diversos estudos, constatando sua aplicabilidade para diagnóstico e prognóstico clínico, a pCR ainda não faz parte da rotina de exames na medicina veterinária (Kjelgaard-Hansen e Jacobsen, 2011).

A maioria dos medicamentos tradicionalmente utilizados como tratamento e suporte as afecções inflamatórias não influenciam nas PFAs dominantes de cada espécie (Kjelgaard-Hansen e Jacobsen, 2011). O uso de fármacos como glicocorticoides, carprofeno, meloxicam e butorfanol não apresentam ação sobre os valores de pCR em cães, tornando essa PFA fidedigna como biomarcador na avaliação de tratamentos nessa espécie (Martínez e Subiela et al., 2004).

Condições patológicas como doenças inflamatórias e infecciosas (babesiose, erlichiose, parvovirose, neoplasias, doenças respiratórias, digestivas e algumas doenças neurológicas) alteram os índices basais da pCR (Cerón et al., 2005). A obesidade também pode ser fator relevante sobre a concentração de pCR uma vez que em estudo com cães associou diretamente a diminuição séria dessa PFA com perda de peso em cães obesos (German et al., 2009).

Procedimentos cirúrgicos são relacionados ao aumento da pCR, sendo o grau de aumento diretamente relacionado a intensidade do trauma cirúrgico (Cerón et al., 2005, Nemzek, 2012). Yamamoto e colaboradores (1993) concluíram em um estudo comparando diversos procedimentos cirúrgicos que nos procedimentos ortopédicos, onde há maior injúria muscular ou óssea, os valores dessa proteína são superiores do que ao comparar com outras cirurgias.

2.2.2 Haptoglobina

A haptoglobina (81 kDa) é relacionada ao transporte de hemoglobina, favorecendo a recuperação de íons ferro durante a defesa contra microrganismos. Apresenta aumento significativo dentro de 72 horas após

procedimento cirúrgico, o seu pico ocorre após 120 horas, seguido de declínio gradual (Conner et al., 1988, Dabrowski et al., 2007). O uso de glicocorticoides, assim como o estresse, podem elevar os valores de haptoglobina circulante (Martínez e Subiela et al., 2004); já quadros hemolíticos podem causar decréscimo (Yang et al., 2003), sendo importante a análise em conjunto dos achados hematológicos, demais PFA e anamnese para diagnóstico consistente.

2.2.3 Fibrinogênio

O fibrinogênio (340 kDa) é uma betaglobulina moderada, que apresenta o aumento da sua concentração por vários dias, atingindo o pico entre o quinto e sétimo dia do início da inflamação (Jain, 1986). Apesar de ser utilizado para determinação de processos inflamatórios, não é a principal PFA nos animais e pode ser influenciado por coagulopatias, havendo decréscimo nos níveis séricos e mascarando resultados (Kjelgaard e Hansen, 2011).

2.2.4 Ceruloplasmina

A ceruloplasmina (125 kDa) é responsável pelo transporte de cobre, consequentemente atuante na cascata de coagulação, favorecendo a cicatrização e produção de colágeno, além disso atua na cascata de coagulação. A ativação da ceruloplasmina está diretamente relacionada à alteração dos níveis séricos de cobre. Tem a capacidade de minimizar a formação de superóxido por neutrófilos polimorfonucleares, os quais levam a danos teciduais (Martínez e Subiela et al., 2002, Cerón et al. , 2005). Esta proteína atinge pico plasmático significativo em cães após indução do processo inflamatório diferentemente dos humanos (Cornner, 1988). Em um estudo com cadelas submetidas a ovariosalpingohisterectomia observou-se pico dessa proteína após 72 horas de pós-cirúrgico (PO), sendo o aumento significativamente maior do que no momento pré-cirúrgico (Serin e Ulutas, 2010).

2.2.5 Albumina

A albumina (66 kDa) é a PFA mais abundante no sangue, sendo responsável por 75% da pressão oncótica e constituindo 35 a 50% do teor

proteico do plasma de cães saudáveis, além de participar no transporte de algumas moléculas, tais como ácidos graxos, colesterol, bilirrubina, óxido nítrico e íons (Kaneko et al., 2008).

2.2.6 Transferrina

A transferrina (76 kDa) está ligada ao transporte de ferro no sangue e tem ação antibacteriana e antiviral, atuando juntamente com a haptoglobina que apresenta ação de defesa ao se ligar a hemoglobina férrica circulante indisponibilizando-a (efeito bacteriostático) (Cerón et al., 2005). Além da produção hepática, foi descrito também a produção desta pelos pulmões, tecido adiposo, baço e rins (Ebersole e Cappelli, 2000), sendo que lesões nesses órgãos ou inflamação aguda ou crônica podem resultar em concentrações séricas diminuídas dessa proteína (Eckersall e Bell, 2010).

2.2.7 Métodos de Aferição de PFAs

O fracionamento eletroforético é um dos mais confiáveis métodos de identificação de proteínas séricas (Fagliari et al., 2008). Fagliari e colaboradores (1997), utilizando a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, identificaram 19 frações no proteinograma sérico de equinos com laminite e, posteriormente, 18 em soro de bezeros com fotossensibilização hepatógena (Fagliari et al., 2007). Schmidt e colaboradores (2011) tiveram sucesso também na utilização do fracionamento eletroforético em estudo com cadelas submetidas a ovariectomia.

A técnica de fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi descrita por Laemmli (1970). Esta baseia-se na utilização de amostras de soro que são alocados em gel de poliacrilamida e realização de corrida eletroforética. Após fracionamento o gel é corado durante 10 minutos em solução de azul de coomassie, constituída por 50% de metanol, 40% de água, 9,75% de ácido acético glacial e 0,25% de azul de coomassie. Em seguida este é colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações proteicas ficassem nítidas (Figura 2).

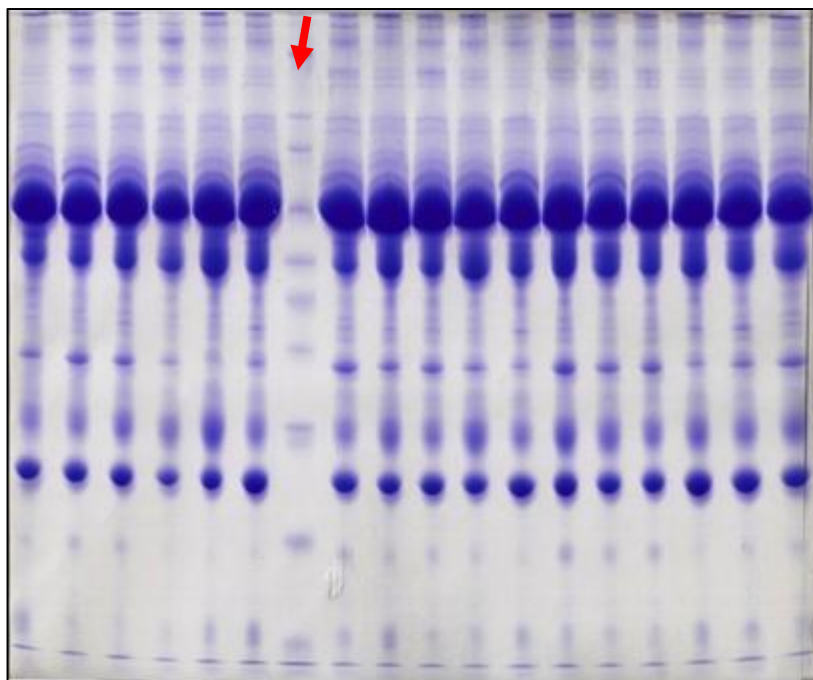


Figura 2. Imagem fotográfica do gel de poliacrilamida submetido a fracionamento eletroforético após ser corado com solução de azul de coomassie e posteriormente retirado o excesso de corante. A imagem ilustra o posicionamento da solução marcadora (seta) e 17 amostras de soro de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

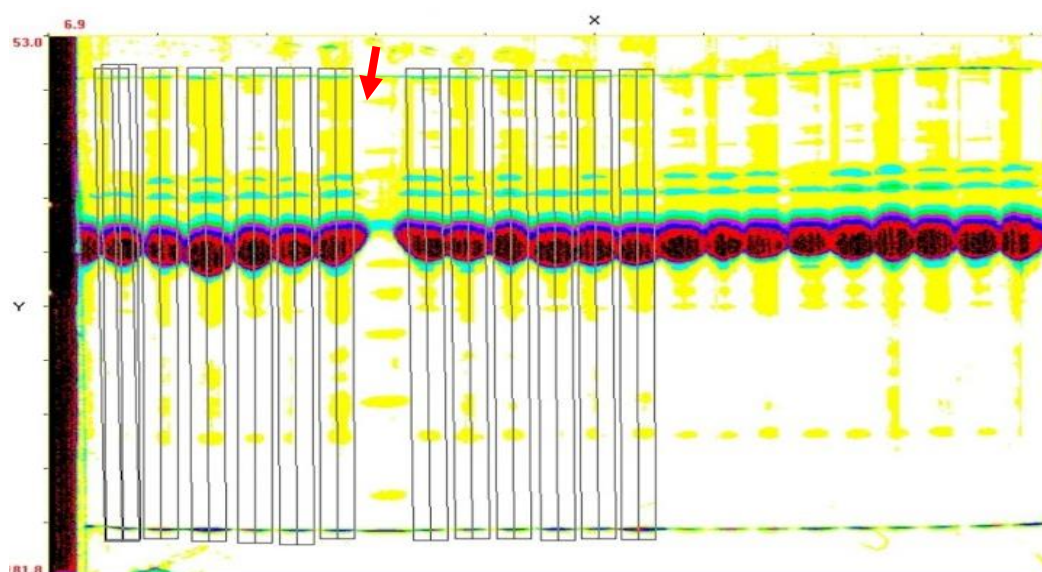


Figura 3. Imagem obtida após densitometria computadorizada a partir da leitura do gel de poliacrilamida submetido a fracionamento eletroforético apresentando solução marcadora (seta) e 17 amostras de soro de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

A leitura do gel é realizada por videodensitômetro, que primeiramente gera uma imagem computadorizada (programa computacional Scanning®) do gel (Figura 3). Esta imagem é convertida em um gráfico a partir dos pesos

moleculares pelo programa Marca Pontos® (Figura 4), possibilitando a comparação das amostras com uma solução marcadora (setas nas Figuras 2 e 3) com proteínas purificadas e peso moleculares pré-definidos (Battisti et al., 2013).

A albumina, por exemplo, que é uma das proteínas mais abundantes no soro (Kaneko et al., 2008) é exemplificada pelo pico número 12 na Figura 4. As concentrações de cada proteína foram calculadas manualmente a partir das porcentagens das PFAs cada gráfico em proporção a proteína total mensurada no soro.

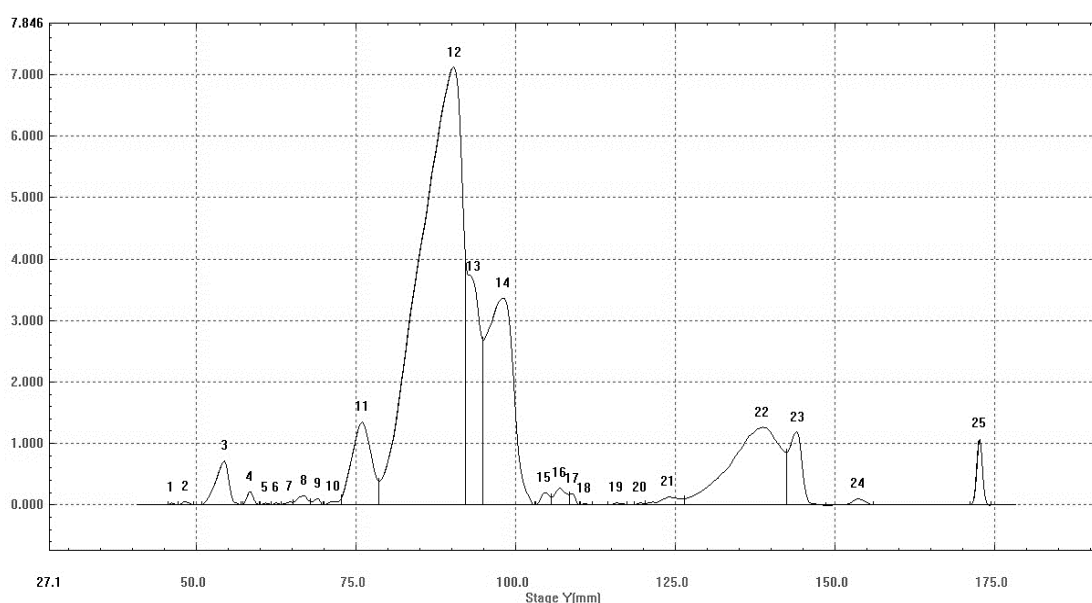


Figura 4. Gráfico resultante da análise (programa computacional Marca Pontos®) da imagem computadorizada obtida por videodensitômetro do gel de poliacrilamida submetido a corrida eletroforética contendo amostra de soro de um coelho (*Oryctolagus cuniculus*).

Queiroz e colaboradores (2016) descrevem que algumas PFAs podem ser quantificadas por métodos alternativos a eletroforese, como ELISA, imunoturbidimetria (técnica mais utilizada em humanos), nefelometria e radioimunoensaio.

O teste comercial ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) pode ser realizado para determinação de proteína C reativa e haptoglobina (Bathennoethen et al., 2008). A análise baseia-se em reações enzimáticas onde detecta-se ação antígeno-anticorpo. Há placa própria para o exame, na qual é fixada anticorpo monoclonal bloqueado específico para espécie, então

adicionado padrões em concentrações conhecidas e o soro (diluído em proporções pré-definidas). A placa é encubada, lavada e adicionado em cada poço um anticorpo monoclonal (anti-pCR, por exemplo). Repete-se o processo de incubação e lavagem, adiciona-se solução de substrato na qual há reação por 15 minutos sendo então interrompida pela adição de solução bloqueadora. A leitura é realizada com leitor de ELISA no qual avalia-se a densidade óptica no qual a intensidade da cor produzida é proporcional a concentração de pCR presente no soro (Almeida, 2006). Um contra da utilização do ELISA na rotina de análises é o tempo demandado para realização (Kjelgaard-Hansen, 2003).

O método turbidimétrico, também utilizado especificamente para a pCR, consiste na aglutinação de pCR presente na amostra com partículas de látex recobertas com anticorpo. Essa aglutinação leva a alterar a turbidez da amostra proporcionalmente a quantidade da proteína que está presente. Quantifica-se a turbidez a partir da absorbância em analisador de automático ou semiautomático (BATTISTI et al., 2013). Anzillero e colaboradores (2013) obtiveram resultados promissores com essa técnica relatando ser um método diagnóstico eficiente, de fácil execução e de custo significativamente reduzido. Kits tanto para humanos assim como específicos para cães foram testados para dosagem de pCR na medicina veterinária, nestes obteve-se resultados satisfatórios e de baixo custo. Entretanto, os kits espécie-específicos para cães não estão disponíveis comercialmente tornando o custo do exame inviável (Eckersall, 1995, Kjelgaard-Hansen e Jacobsen, 2003). Já os testes com anticorpo monoclonal para humanos quando usado para cães apresentam resultados variáveis, exigindo calibração a cada novo lote utilizado para maior confiabilidade nos resultados (Céron, 2008).

A nefelometria, assim como a turbidimetria, baseia-se na mensuração da difração da luz por uma amostra. O método nefelométrico mede a proporção de aglutinação de partículas recobertas com anticorpos a partir da intensidade da luz dispersa (ângulo de 90°- dispersão lateral) utilizando aparelho específico (absorbância) para técnica, já a turbidimetria mensura a luz refletida em um ângulo de 180° (Figura 5) (Arosa et al., 2012, Carneiro et al., 2017).

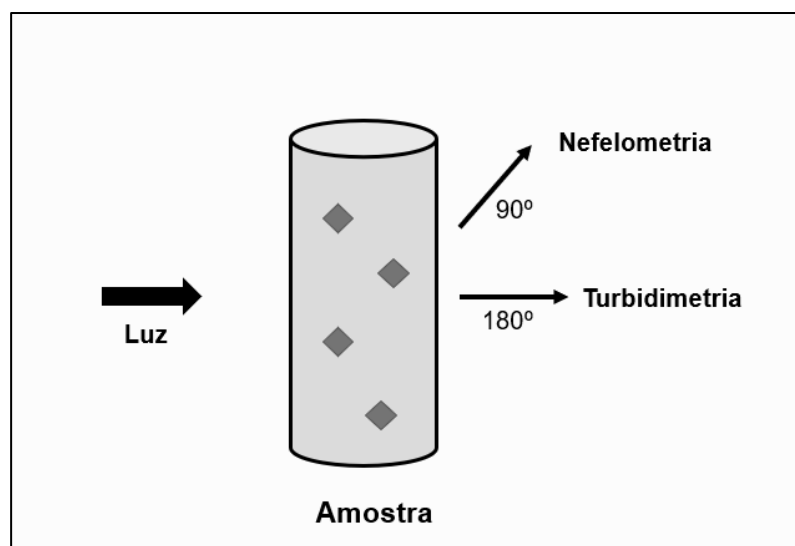


Figura 5. Imagem ilustrativa adaptada de Arosa e colaboradores (2012) sobre ensaios de dispersão de luz no qual a nefelometria mede a luz dispersa pelos imunocomplexos (ângulo de 90°) e a turbidimetria a luz refletida num ângulo de 180° .

O radioimunoensaio é um teste que mensura a quantidade do material de interesse na amostra (PFA específica) a partir da competição de antígenos presentes nesta com antígenos previamente marcados com isótopos radioativos por um mesmo anticorpo. Define-se uma quantidade conhecida de anticorpos específicos ao qual é adicionado antígeno marcado e posteriormente uma amostra de soro a ser analisado. O antígeno da amostra compete pelos sítios de ligação da amostra com os antígenos marcados. Quanto maior a quantidade de antígenos na amostra, maior a formação de imunocomplexos. A amostra é lavada e resultando porcentagem de antígenos marcados os quais são mensurados por leitor radiométrico, sendo a quantidade de radioatividade inversamente proporcional a quantidade de antígeno na amostra. Essa técnica oferece sensibilidade (dosagens baixas podem ser detectadas) e especificidade altas (Kindt, 2007).

Ainda há escassez na literatura com relação a métodos comparativos de mensuração de PFA, não havendo consenso internacional nem elucidação de qual a melhor técnica a ser abordada em cada espécie e tipo de PFA (Eckersall e Bell, 2010).

2.3 Traumatologia e Resposta Inflamatória

Os traumas, assim como a regeneração óssea, são intensamente estudados no intuito de entender melhor e desenvolver técnicas mais eficientes para tratamento de fraturas (Marsell e Einhorn, 2011). Os procedimentos cirúrgicos promovem estímulo nocivo ao organismo e alterações da homeostase devido ao trauma tecidual (Surter et al., 2002). Esse estímulo e a lesão local desencadeiam resposta de fase aguda levando a diversas alterações metabólicas. A magnitude da alteração da concentração sérica das PFA está diretamente relacionada ao grau de lesão ou trauma tecidual (aumento das PFA positiva) decorrente do procedimento cirúrgico (Murata, 2004). Alves et al. (2010) observaram maior concentração de PFAs em gatas submetidas a ovariectomia convencional do que por videolaparoscopia. Levando-se em consideração que o processo de regeneração óssea envolve uma série de alterações hematológicas, ação de agentes pró-inflamatórios e que as PFAs têm valor diagnóstico e prognóstico relevantes, o estudo da relação entre estes pode favorecer a escolha e até mesmo a antecipação de tratamentos mais eficientes (Rubio e Schmidt, 2014).

No intuito de instaurar o retorno da função do osso lesionado, o processo de regeneração é a evolução mais comum das fraturas sem tratamento cirúrgico. A regeneração óssea é uma cicatrização indireta que envolve várias reações bioquímicas, proliferação celular e conseqüentemente o desenvolvimento de novo tecido, que consiste principalmente de ossificação endocondral (Gerstenfeld et al., 2006, Al-Aql et al., 2008,). Já a reparação ocorre quando há estabilidade, proximidade entre as estruturas, favorecendo a restauração da continuidade dos tecidos, sem haver formação de calo ósseo necessariamente, sendo mais comum na consolidação direta por meio de fixação do foco lesionado (Al-Aql et al., 2008, Marsell e Einhorn, 2011).

O processo de regeneração óssea apresenta algumas fases pré-definidas que envolvem desde um processo inflamatório local até remodelação óssea (Peng et al., 2005). Na primeira fase há resposta inflamatória imediata com recrutamento de células mesenquimais que se diferenciam em condrócitos, essa fase é seguida pela formação de material cartilaginoso que mineraliza formando um osso primário que posteriormente sofrerá remodelação (Gerstenfeld et al.,

2006). A fase aguda da inflamação tem seu pico nas primeiras 24 horas seguindo seu ciclo até sete dias. Esta fase envolve a ação de fatores inflamatórios, de crescimento e angiogênicos liberados por plaquetas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células mesenquimais presentes no hematoma que se forma no local, da lesão (Gerstenfeld et al., 2003, Sousa, 2003). Este hematoma é o início do processo onde há acúmulo de fibrina formando um tecido de granulação a partir do qual há formação endocondral entre as extremidades da fratura e periósteo. Esse tecido se organiza primeiramente em um calo cartilaginoso que sofre mineralização, ossificação e posterior remodelamento (Rahn, 2002). Ao mesmo tempo em que há desenvolvimento do calo cartilaginoso e remodelamento, fatores angiogênicos (entre eles fatores de crescimento provenientes de plaquetas) estão atuantes para que novos vasos possam fazer o suprimento sanguíneo do osso em regeneração (Heldin e Westermarck, 1999).

Em modelos animais o calo mineralizado começa a se formar a partir dos 14 dias após o trauma. A substituição para osso esponjoso e o processo de remodelamento pode ter início a partir da terceira semana pós trauma e levar até anos para finalizar (Wendeborg, 1961). Há casos em que há boa vascularização, porém, instabilidade focal, pois apesar de haver formação de calo cartilaginoso, esse não evolui para calcificação, formando-se não união óssea hipertrófica (Green et al., 2005).

O objetivo com este estudo foi avaliar a efetividade da mensuração das proteínas da fase aguda mais conhecidas (albumina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinogênio, proteína C reativa, transferrina) como um parâmetro laboratorial inovador e complementar para acompanhamento da inflamação relacionada a regeneração óssea. Para isto exames tradicionais, com resultados previamente comprovados, como leucograma para diagnóstico da inflamação e a avaliação radiográfica para quantificação da regeneração óssea, foram utilizados em comparativo com a concentração das PFA.

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a efetividade da mensuração de PFAs como biomarcador laboratorial complementar para diagnóstico e acompanhamento da inflamação relacionada a regeneração óssea.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar os valores de normalidade das PFA (albumina, ceruloplasmina, haptoglobina, transferrina e proteína C reativa) para coelhos jovens (4 a 5 meses de idade) da raça Nova Zelândia Brancos.
- Avaliar a evolução da concentração sérica de PFAs em coelhos durante o pós-cirúrgico (45 dias) de procedimento ortopédico experimental (ostectomia parcial do rádio).
- Correlacionar os achados da concentração sérica de PFAs de coelhos submetidos a ostectomia parcial do rádio com hemograma e avaliação radiográfica.
- Verificar a aplicabilidade da mensuração das PFAs como novo parâmetro para acompanhamento do processo inflamatório relacionado a procedimentos ortopédicos.
- Determinar uma PFA majoritária para coelhos dentre as avaliadas.

4. HIPÓTESES

Têm-se com hipótese principal desse estudo que concentração sérica das PFAs em animais submetidos a procedimentos ortopédicos aumentem ou diminuam (dependendo de ser positivas ou negativas) significativamente, sendo um método diagnóstico complementar eficiente para escolha e acompanhamento de protocolos cirúrgicos.

Cogita-se que as PFAs respondam mais rapidamente a processos inflamatórios do que leucograma, favorecendo a antecipação do tratamento.

5. JUSTIFICATIVA

A ortopedia é uma das áreas mais estudadas na medicina veterinária, com constante busca por procedimentos mais eficientes, em paralelo observa-se o investimento crescente no estudo das PFAs como biomarcador de alterações fisiopatológicas, nos quais têm resultados promissores. Tendo em vista isto, torna-se necessário a busca de métodos diagnóstico eficientes que possam antecipar a presença de intercorrências, como inflamação e/ou falha na regeneração óssea, relacionados a técnica aplicada e resposta individual.

6. REFERÊNCIAS

Agrawal, A., SimPON, MJ, Black, S, Carey, MP, Samols, DA (2002) C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal c-polysaccharide. **The Journal of Immunology**. 169(6):3217–3222.

Al-Aql, ZS, Alaghl, AS, Graves, DT, Gerstenfeld, LC, Einhorn, TA (2008) Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**. 87(2):107-118.

Almeida, HA. Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultrasonográficas no conceito durante o período gestacional em cadelas da raça boxer. 67f. Tese (Doutorado em Ciências) – USP, São Paulo.

Alves AE, Ribeiro APC, Di Filippo PA, Apparicio MF, Fagliari JJ, Vicente ERR (2010). Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted nonconventional or videolaparoscopic ovariectomy. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**. 62:86-9.

Anziliero, D, Bassi, E, Pain, Km, Valle, Sfv, Kreutz, Lc (2013). Determinação dos níveis séricos de proteína c reativa (CRP) em cães com alterações dos parâmetros hematológicos. **Ciência Animal Brasileira**.14(2): 265-272.

Arosa FA, Cardoso EM, Pacheco FC (2012). **Fundamentos da Imunologia**. 2 ed. Portugal: Lidel. P.28-35.

Bathen-Noethen A, Carlson R, Menzel D, Mischke R, Tipold A (2008). Concentrations of Acute-Phase Proteins in Dogs with Steroid Responsive MeningitisArteritis. **Journal of veterinary internal medicine**. 22(5):1149- 1156.

Battisti, MKB, Silva, DM, Reusing MSO, Beltrame, OC, Schmidt, EMS, Fagliari JJ, Dittrich, RI, Guérios, ED (2013). Proteínas de fase aguda em cadelas com neoplasia mamária. **Ciência Rural**. 43(5):902-907.

Bush, BM (2004) **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Roca, P. 117-128.

Carneiro MC, Silva AF, Bizidelli DAFM (2017). Informe técnico - Método Turbidimétrico. **Analizando**. (22): 1-3.

Carvalho Jr, LC, Santos, RL, Mendonça, CJA, Campos, TC, Andrade, MAP (2006) Avaliação da variação da temperatura cutânea, proteína C reativa e velocidade de hemossedimentação na artroplastia total do joelho primária, isenta de complicações. **Acta ortopedia brasileira**. 14(3):161-164.

Cerón, J, Eckersall, P, Martínez-Subiela, S (2005) Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**.34(2):85–99.

Cray, C, McKenny, S, BA, Perritt, EBS, Arheart KL (2015). Utility of IGM titers with igg and c-reactive protein quantitation in the diagnosis of suspected

encephalitozoon cuniculi infection in rabbits. **Journal of Exotic Pet Medicine**. 24:356–360.

Cruvinel, W, Mesquita Jr, D, Araújo, JAP, Catelan, TTT, Souza, AWS, Silva, NP, Andrade, LEC (2010) Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**. 50(4): 434–461.

Cornner JG, Eckersall PD, Fergusson J, Douglas TA (1988) Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research Veterinary Science**. 45:107-710.

Dabrowski R, Wawron W, Kostro K (2007) Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in health bitches and those with pyometra. **Theriogenology**. 67:321-327.

Swenson MJ, Reece WO. (1996) **Dukes Fisiologia dos Animais Domésticos** 11 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. P.30-43.

Ebersole J, Cappelli D (2000) Acute phase reactants in infectious and inflammatory diseases. **Periodontology**. 23:19-49.

Eckersall PD, Conner JG, Harvie J (1991) An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet Res Commun*.15:17–24.

Eckersall, PD (1995) Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. **Comparative Haematology International**, 5(2): 93–97.

Eckersall, PD, Bell, R (2010) Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**. 185(1):23–27.

Fagliari, JJ, Passipieri, HT, Okuda, SL, Silva, PC (2007) Serum protein concentration, including acute phase proteins in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59:1355-1358.

Fagliari, JJ, McClenahan, D, Evanson, OA (1997) Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. **American Journal Veterinary Research**, 59:1234-1237.

Garvican E, German A, Innes J, (2012) Biomarkers in clinical medicine In.: Tobias K, Johnston S. **Veterinary Surgery: Small Animal**. Canada: Saunders p.29-40

German, A, Hervera, M, Hunter, L, Holden, S, Morris, P, Biourge, V, Trayhurn, P (2009) Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines afterweight loss in obese dogs. **Domestic Animal Endocrinology**. 37(4): 214–226.

Gerstenfeld, LC, Cullinane, DM, Barnes, GL, Graves, DT, Einhorn, TA (2003) Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**. 88:873-884.

Gerstenfeld, LC, Alkhiary, YM, Krall, EA, Nicholls, FH, Stapleton, SN, Fitch, JL (2006) Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**.54:1215-1228.

Green, E, Lubahn, JD, Evans, J (2005) Risks factors treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. **Journal of Surgical Orthopaedic Advances**. 14(2):64-72

Gruys, E, Toussaint, M, Niewold, T, Koopmans, S, Van Dijk, E, Meloen, R (2006) Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**.108(3):229–232.

Heldin, CH, Westermark, B (1999) Mechanism of action and in vivo role of platelet derived growth factor. **Physiological Reviews**.79(4)1283-1316.

Jain NC (1986) **Schalm's veterinary hematology**. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger.

Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML (2008) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6 ed. Burlington: Academic Press. P. 117-155, 157-172.

Kent, J (1992) Acute phase proteins: Their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**. 148(4):279–282.

Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA, (2007) **Kuby Immunology**. 6 ed WH Freeman and Company. New York.

Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT, Jensen AL (2003) Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. **Journal Veterinary Medicine- A Physiological Pathologic Clinical Medicine**. 50:164–168.

Kjelgaard-Hansen M, Jacobsen S (2011) Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. 31:51-70.

Kuribayashi, T, Shimada, T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M, Yamamoto Y, Yamamoto S (2003) Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental animals**, 52(5): 387–390.

Laemmli, UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.

Marnell, L, Mold, C, Du Clos, T (2005) C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology**, 117(2):104–111.

Marsell, R, Einhorn, TA (2011) The biology of fracture healing. **Injury**. 42(6):551-555.

Martínez-Subiela, S, Ginel, P, Cerón, J (2004) Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **The Veterinary Record**, 154(26):814–817.

Meyer, DJ, Coles, EH, Rich, LJ (1995) **Medicina de Laboratório Veterinária Interpretação e Diagnóstico**. 1. ed., São Paulo: Roca. P. 27-29.

Mitaka, C (2005) Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. **Clinical Chemical Acta**. 351(1–2): 17–29.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**. 168:28-40.

Nemzek J, Cotroneo, Hampton A (2012) Inflammatory Response In.: Tobias K, Johnston S. **Veterinary Surgery: Small Animal**, Canada, Saunders. vol.1, p.1-15.

Paltrinieri, S (2007) Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, 31(1): 125–129.

Plickert, H, Einspanier, R, Arndt, G, Brunnberg, L, Kohn, B (2011) Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein. **Veterinary Clinical Pathology**, 40(3):384-388.

Queiroz, LLQ, Castro, LTS, Ariza, PC, Santos, M, Fioravanti, MCS. (2016) Proteínas de fase aguda (PFA) em cães. **Enciclopédia Biosfera**. v.13(23): 1085-1096.

Rahn, BA (2002) Bone healing: histological and physiologic concepts. In.: Fackelman, GE. **Bone in clinical orthopedics**. Thieme: Stuttgart. p.287-326.

Rubio CP, Schmidt EMS. (2014). Proteínas de fase aguda em cães: Possíveis aplicações em cirurgia. **Veterinária e Zootecnia**. 21(4): 492-502.

Rubio, C, Schmidt, E, Santos, G, Lima, A, Rodrigues, T, Dállo, R, Barbosa, L (2015) Acute phase response following ovariohysterectomy in female dogs. **Comparative Clinical Pathology**. 24(4):797–804.

Serin G, Ulutas PA (2010) Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrous bitches after ovariohysterectomy. **Vet. Rec.** 166(1):20-22.

Sousa, VL (2003) **Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (*Canis familiaris*)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo.

Schmidt EMS, Lima AFM, Thomazini CM, Moraes LF, Campoy G, Garcia CZ, Luna, SPL, Fagliari, JJ (2011) Serum protein concentrations in female dogs submitted to ovariohysterectomy determined by means of SDS-page electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology**. 40(4):607-607.

TRALL, MA (2007). **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. 1. ed. São Paulo: Roca.,p.135.

Tothova, C, Nagy, O, Kovac, G (2014). Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. **Veterinarian Medicina**, 59(4): 163–180.

Wendeberg, BO (1961) Mineral Metabolism of Fractures of the Tibia in Man Studied with External Counting of Sr^{85} , **Acta Orthopaedica Scandinavica**, 32(52): 3-81

Yamamoto S, Shida T, Miyaji S, Santsuka H, Fujise H, Mukawa K, Furukawa E, Nagae T, Naiki M (1993) Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Vet res Commun** 17:85-93.

Yang FM, Haile DJ, Berger FG, Herbert, EVB, Ghio, AJ (2003) Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. **American Journal of Physiology-Lung Cell Molecular Physiology**. 284(2):402-409.

**CAPÍTULO 2 – Artigo científico nas normas do periódico Ciência Rural -
Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da
Universidade Federal de Santa Maria - ISSN Eletrônico: 1678-
4596**

**Proteinograma sérico e sua relação com a reparação óssea em coelhos (*Oryctolagus
cuniculus*) submetidos à ostectomia parcial do rádio**

Karina Calciolari^{1*}, Adrielly Dissenha¹, Julián André Sanjuán Galíndez¹, Dayvid Vianêis Farias
de Lucena¹, Renata Haddad Pinho², Felipe Rocha dos Santos¹, Bruno Watanabe Minto¹

RESUMO- Os traumas ósseos desencadeiam resposta inflamatória aguda e consequentemente alteram a concentração sérica das proteínas de fase aguda (PFAs), podendo essas serem um parâmetro para avaliação da evolução do processo inflamatório relacionado a ortopedia. Objetivou-se avaliar a efetividade da mensuração de PFAs como um biomarcador laboratorial para diagnóstico e acompanhamento da inflamação relacionada a regeneração óssea. Foram utilizados 22 coelhos, machos jovens sendo realizado ostectomia parcial do osso do rádio direito. Para acompanhamento da evolução do processo inflamatório foram realizados hemograma, mensuração de PFAs (Albumina, Ceruloplasmina, Haptoglobina, Proteína C Reativa e Transferrina) e acompanhamento radiológico. Foi observado a melhor correlação da haptoglobina e da transferrina junto ao processo inflamatório e achados radiológicos frente as demais PFAs mensuradas. A haptoglobina apresentou pico máximo 24 horas dos pós operatório e a transferrina após 36 horas, entretanto essa última PFA já mostrou indícios de alteração (diminuiu) já nas primeiras 6 horas do pós cirúrgico, antecipadamente a resposta leucocitária. Conclui-se que o conjunto

¹ ¹ Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP- Câmpus de Jaboticabal/SP- Brasil.

*Autor para correspondência: karinaveterinaria@yahoo.com

² Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP - Câmpus de Botucatu/ SP- Brasil

haptoglobina, transferrina e leucograma apresentaram resultados promissores ao diagnóstico e prognóstico de processos inflamatórios relacionados a ortopedia.

Palavras Chave: Inflamação, fraturas ósseas, ortopedia veterinária, proteinograma.

**Serum proteinogram and its relation to bone repair in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)
submitted to partial radio ostectomy**

ABSTRACT- The bone traumas trigger an acute inflammatory response. This inflammatory response alters the serum concentration of several acute phase proteins (PFAs). The PFAs which may be a parameter to evaluate the evolution of the inflammatory process related to orthopedics. The objective of this study was to evaluate the effectiveness of PFA measurement as a laboratory biomarker for diagnosis and follow-up of inflammation related to bone regeneration. Partial ostectomy of the right radius bone was performed in 22 young male rabbits. There were performed blood count, PFAs measurement (Albumin, Ceruloplasmin, Haptoglobin, C-Reactive Protein and Transferrin) and radiological follow-up to follow up the evolution of the inflammatory process. There was observe a best correlation between haptoglobin and transferrin with the inflammatory process and radiological findings compared to the other measured PFA. Haptoglobin showed a maximum peak 24 hours after surgery and transferrin after 36 hours, however this last PFA has already shown signs of alteration (decreased) in the first 6 hours after surgery, in advance of leukocyte response. It was concluded that haptoglobin, transferrin and white blood cells presented promising results for the diagnosis and prognosis of inflammatory processes related to orthopedics.

Keywords: bone fractures, inflammation, proteinogram, veterinary orthopedics.

INTRODUÇÃO

Os traumas assim como a regeneração óssea são intensamente estudados no intuito de melhor entendimento e desenvolver técnicas mais eficientes para o tratamento de fraturas (MARSELL & EINHORN, 2011). A cicatrização óssea envolve um processo inflamatório com ação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e angiogênicos liberados por plaquetas, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células mesenquimais presentes no hematoma que se forma no local da lesão (GERSTENFELD et al., 2003, SOUSA, 2003, PENG et al., 2005). Na resposta inflamatória imediata (pico em 24 horas seguindo até 7 dias) há acúmulo de fibrina formando tecido de granulação (hematoma local) a partir do qual há formação endocondral entre as extremidades da fratura e o periósteo. Esse tecido se organiza primeiramente em calo cartilaginoso que sofre mineralização, ossificação e posterior remodelamento (RAHN, 2002, GERSTENFELD et al., 2006, AL-AQL et al., 2008).

O processo inflamatório é inicialmente regulado por uma resposta aguda (GRUYS, 2006, RUBIO et al., 2015) onde proteínas produzidas pelo fígado sofrem estimulação celular, como de leucócitos, que liberam citocinas orientando o desenvolvimento do processo inflamatório (KENT, 1992, GRUYS et al., 2005, CRUVINEL et al., 2010). Essas proteínas, nomeadas proteínas de fase aguda, podem ser positivas (aumentam frente ao processo inflamatório), como a proteína C reativa (pCR), haptoglobina e ceruloplasmina ou negativas (diminuem a concentração sérica) como a albumina e transferrina (KENT, 1992, CERÓN et al., 2005, MARNELL et al., 2005, ECKERSALL & BELL, 2010). Ainda há a denominação maioritárias para a PFA que mais se destaca em cada espécie perante um processo inflamatório. Havendo, portanto, uma dificuldade na medicina veterinária pela variedade de espécies e raças para o uso comparativo interespecies (KJELGAARD-HANSEN & JACOBSEN, 2011).

As PFAs têm importante foco de estudo uma vez que favorecem o monitoramento de pacientes assim como o diagnóstico precoce de afecções subclínicas. Em geral quando comparadas ao pico leucocitário, as PFAs tendem a apresentar resposta sérica adiantada (dose dependente), favorecendo o diagnóstico precoce de algumas afecções (MURATA et al., 2004, PALTRINIERI, 2007, KJELGAARD-HANSEN & JACOBSEN, 2011). Fatores como a idade (ECKERSALL & BELL, 2010, NEMZEK et al., 2012), gestação (KURIBAYASHI et al., 2003), obesidade (GERMAN et al., 2009), uso de anti-inflamatórios, doenças pré existentes (hemolíticas, digestivas, respiratórias) e o estresse pode alterar os valores de algumas PFAs (CERÓN et al., 2005).

Este estudo objetivou avaliar a efetividade da mensuração de proteínas de fase aguda mais conhecidas (albumina, ceruloplasmina, haptoglobina, proteína c reativa, transferrina) como um parâmetro laboratorial complementar para acompanhamento da inflamação relacionada a regeneração óssea.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se 22 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), hípidos, da raça Nova Zelândia Branco, machos, idade entre 160 a 180 dias, com peso de 3,8 quilos ($\pm 0,3$). Os leporídeos foram mantidos em gaiolas individuais e desverminados com solução oral de toltrazuril³ na dose de 15,0 mg/kg (2 dias seguidos com repetição após 5 dias). A alimentação foi com ração comercial⁴, feno de tifton (*Cynodon spp.*) e água *ad libitum*. Este trabalho foi aprovado pelo comissão de ética no uso de animais (CEUA) sob o número de protocolo 019155/17.

Para o procedimento cirúrgico os coelhos foram pré-medicados com meperidina na dose de 5,0 mg/kg por via intramuscular (IM) e induzidos com isoflurano 3V% por meio de máscara facial e posterior intubação orotraqueal. O membro torácico direito foi

³ Baycox® 5%, Bayer, São Paulo/Brasil.

⁴ Fri-Coelho, FRI-RIBE, Trouw Nutrition, São Paulo/Brasil.

tricotomizado e realizada antissepsia (clorexidine 2% e 0,5%). Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, realizou-se incisão de 2,5 centímetros da pele na região craniomedial do rádio e divulsão da musculatura adjacente, possibilitando visualização da diáfise média proximal do rádio direito. Com especímetro (Imagem 1A) demarcou-se a extensão de um centímetro na diáfise do rádio para realização da ostectomia parcial com o uso de uma serra oscilatória⁵ (Imagem 1B e 1C). O fragmento cortado juntamente com o seu perióstio foi retirado formando uma falha óssea (Imagem 1D).

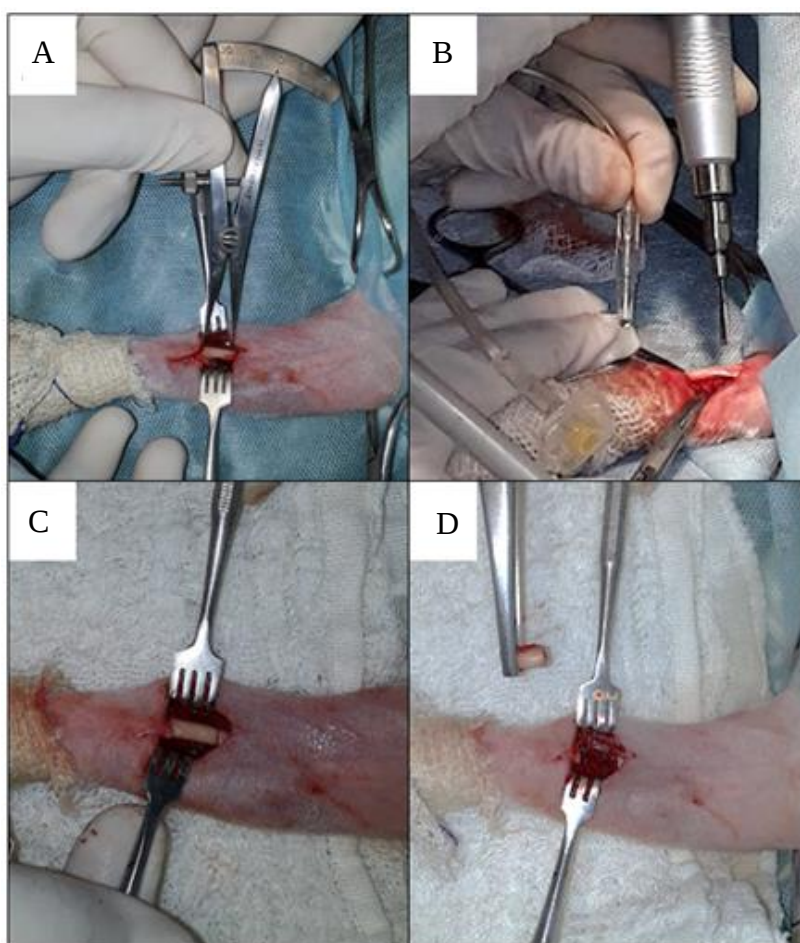


Imagem 1. A) Exposição da diáfise distal do rádio direito de coelho após incisão de pele e divulsão de músculo adjacente, paramarcação do local da ostectomia com especímetro. B) Uso de serra oscilatória para corte da diáfise média proximal do rádio direito. C) Segmento de um centímetro de extensão seccionado da diáfise do rádio *in situ* D). Fragmento retirado e falha óssea de um centímetro.

⁵ Dentscler, São Paulo/Brasil

Posteriormente a musculatura e a pele foram suturadas com nylon 4-0 em padrão simples sepado e wolf respectivamente. No pós-cirúrgico (PO) foi administrado enrofloxacin⁶ (5,0 mg/kg) no subcutâneo (SC) uma vez ao dia (SID) por 7 dias, morfina⁷ 2,0 mg/kg, IM, 4 horas de PO e nos dias subsequentes cloridrato de tramadol⁸ na dose de 5,0 mg/kg, SC, 2 vezes ao dia (BID) por três dias e SID por mais 2 dias.

O membro torácico direito dos animais foi avaliado radiologicamente nas posições craniocaudal e mediolateral imediatamente após a cirurgia (Imagem 2) e posteriormente em intervalos de 15 dias (M15d, M30d e M45d). As características radiográficas foram quantificadas em escore de 1 a 4 para a grau de formação de calo ósseo (adaptado de An et al., 1999, Öztürk et al., 2008), por dois avaliadores que não tinham conhecimento dos grupos e tempo de pós-cirúrgico (avaliação às cegas). Sendo o escore 1 caracterizado por 0 a 25% da falha óssea preenchida com calo ósseo, Escore 2: 25% a 50 %, Escore 3: 50 a 75% e o Escore 4: 75 a 100%.



Imagem 2. Radiografia craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) do membro torácico direito de coelho imediatamente após a cirurgia de ostectomia parcial da diáfise média proximal do rádio. Identificação da óssea (fragmento ósseo foi retirado) de aproximadamente um centímetro (vermelho).

⁶ Zelotril 10%, Agener União, Brasil

⁷ Sulfato de morfina pentaidratado, Cristália, Brasil.

⁸ Tramal®, Grunenthal, Alemanha.

Foram colhidos três mililitros (mL) de sangue venoso, mediante punção da veia jugular externa, em tubos estéreis com e sem ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) em momentos (M) pré-determinados: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do PO. Os hemogramas foram realizados em analisador hematológico veterinário⁹ e contagem diferencial dos leucócitos manualmente em lâminas para microscopia óptica. O soro foi obtido a partir da centrifugação dos tubos sem EDTA a 5.000 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos. A partir deste foi mensurada a proteína total com espectrofotômetro semiautomático¹⁰ e o proteinograma sérico pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida⁴.

O hemograma e proteinograma foram analisados pelo teste de Tukey e a análise radiográfica pelo teste Kruskal-Wallis, ambos testes ao nível de significância de 5%. Para tanto, foram utilizados os pacotes “agricolae” e “ExpDes”, ambos do programa computacional R (R CORE TEAM, 2018).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em M15d (Imagem 3) observou-se pouca ou nenhuma alteração regenerativa na imagem radiográfica (escore 1), isso corrobora com a fase inflamatória ativa da cicatrização óssea (GERSTENFELD et al., 2003), sendo descrita que em modelos animais juntamente com a formação de calo mole entre 7 a 9 dias (EINHORN, 1998).

⁹ SYSMEX, pocH-100iVDiff®, Japão

¹⁰ BIO-PLUS, LABQUEST, São Paulo, Brasil

⁴ Sigma Chemical Co, Saint Louis, MO, USA

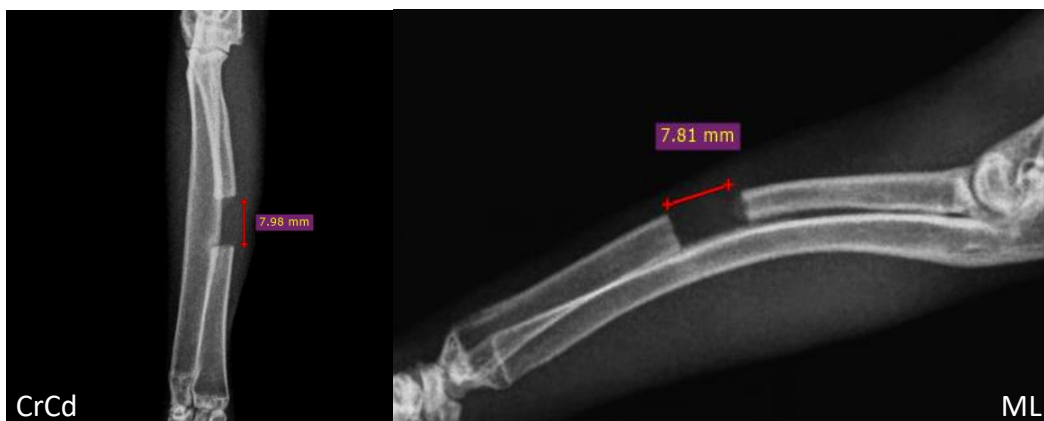


Imagem 3. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito com escore 1 (0 a 25% de preenchimento regenerativo da falha óssea).

Já em M30d e M45d os animais apresentaram escores de 2 a 4 (Imagem 4,5 e 6) os quais apresentam regeneração óssea a partir das epífises de onde fez-se a falha: regeneração indireta (GERSTENFELD et al., 2006). É durante esse processo que diversas atividades biológicas estão ativas como proteínas (PENG et al., 2005), linfócitos e neutrófilos (SOUSA, 2003).



Imagem 4. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a ostectomia parcial do osso radial direito. Escore 2 (25% a 50% de preenchimento regenerativo da falha óssea).



Imagem 5. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a osteotomia parcial do osso radial direito. Escore 3 (50 a 75% de preenchimento regenerativo da falha óssea).



Imagem 6. Imagens radiográficas nas posições craniocaudal (CrCd) e mediolateral (ML) de coelho submetido a osteotomia parcial do osso radial direito. E 4 (75% a 100% de preenchimento regenerativo da falha óssea da falha óssea foi preenchida (regeneração)).

Na Imagem 7 observou-se que em M15d apenas 28% dos animais evoluíram para o escore 2, não havendo diferença estatística do M0. Esse achado corrobora com a afirmação de RAHN (2002) o qual descreve que inicialmente há uma fase inflamatória e formação de um calo cartilaginoso (pouco visível radiograficamente), podendo ser observado mineralização a partir de duas semanas da lesão (WENDEBERG, 1961). Já no M30d, 54% dos coelhos apresentaram escore 2, 36 % escore 3 e o restante escore 4, sendo esses resultados significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de M0p e M15d. Em M45d os animais apresentaram maior porcentagem de escore 3 e 4 que os anteriores sendo igual estatisticamente ($p > 0,05$) ao M30d, e diferente ($p \leq 0,05$) de M0 e M15d.

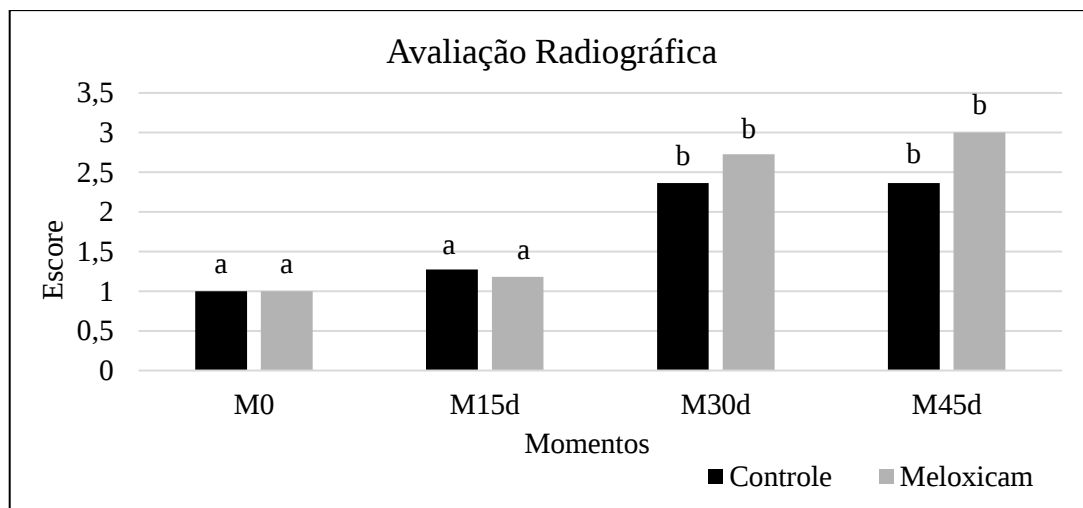


Imagem 7. Avaliação radiográfica de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito divididos em dois grupos: Meloxicam (receberam administração de meloxicam) e Controle (sem meloxicam) nos momentos pós-cirúrgico imediato (M0) e posteriores avaliações quinzenais, 15, 30 e 45 dias de pós-cirúrgico (M15d, M30d e D45d). A mensuração foi efetuada por escores de 1 a 4 onde 1 houve 0 a 25% da falha óssea preenchida com calo ósseo, 2: 25% a 50 %, 3: 50 a 75% e o 4: 75 a 100%. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Na avaliação na série branca do hemograma, descrita na Tabela 1 não foi observado diferença significativa entre os momentos para leucócitos totais (LT), neutrófilos segmentados (NS) e eosinófilos. Já os monócitos e linfócitos apresentaram decréscimo significativo no M6h e M24h comprado ao basal (M0) caracterizando um leucograma de estresse como descrito por Meyes (1995) e Bush, 2004. Apesar das variações desses parâmetros nas primeiras horas de PO eles encontram-se dentro do padrão de normalidade para a espécie (SPINELLI et al., 2012) e dentro da fisiologia processo inflamatório.

Tabela 1. Valores médios e desvio padrão da média ($\pm$) de leucócitos totais (LT), neutrófilos segmentados (NS), eosinófilos, monócitos e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$) mensurados sangue venoso total de coelhos submetidos a osteotomia parcial do osso do rádio direito nos momentos pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico.

Momento	LT	NS	Eosinófilos	Monócitos	Linfócitos
M0	6,93 $\pm$ 0,83	2,73 $\pm$ 0,68	0,05 $\pm$ 0,05	0,08 $\pm$ 0,02 ^{abc}	4,07 $\pm$ 0,85 ^{ab}
M6h	7,47 $\pm$ 1,35	2,58 $\pm$ 1,20	0,02 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,03 ^d	1,05 $\pm$ 0,89 ^c
M24h	7,03 $\pm$ 1,05	1,89 $\pm$ 0,72	0,03 $\pm$ 0,04	0,05 $\pm$ 0,04 ^{cd}	1,76 $\pm$ 0,68 ^c
M36h	7,04 $\pm$ 1,49	2,82 $\pm$ 0,72	0,03 $\pm$ 0,05	0,10 $\pm$ 0,04 ^a	3,99 $\pm$ 0,89 ^{ab}
M7d	6,74 $\pm$ 1,11	2,12 $\pm$ 0,52	0,02 $\pm$ 0,03	0,09 $\pm$ 0,03 ^{ab}	4,52 $\pm$ 0,76 ^{ab}
M15d	7,05 $\pm$ 1,32	2,21 $\pm$ 0,53	0,04 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,02 ^{abc}	4,72 $\pm$ 1,05 ^{ab}
M21d	6,99 $\pm$ 0,88	2,16 $\pm$ 0,45	0,03 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,01 ^{abc}	4,81 $\pm$ 0,90 ^{ab}
M30d	7,60 $\pm$ 1,18	2,46 $\pm$ 0,45	0,06 $\pm$ 0,06	0,09 $\pm$ 0,02 ^{ab}	4,99 $\pm$ 1,01 ^a
M45d	8,08 $\pm$ 1,25	1,69 $\pm$ 0,83	0,05 $\pm$ 0,05	0,06 $\pm$ 0,02 ^{bcd}	3,51 $\pm$ 0,88 ^b

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 2 nota-se a pCR menor ($p \leq 0,05$) em M6h, M24h, M36h, M21d e M30d comparado ao M0, um achado diferente do descrito na literatura para a maioria das espécies (CÉRON et al, 2005, MITAKA et al 2005, PALTRINIERI, 2007, ECKERSALL & BELL, 2010) uma vez que essa proteína é caracterizada como positiva, apresentou caráter de negativa para os coelhos nesse trabalho.

Os valores médios de ceruloplasmina foram menores em M15d e M21d e diferentes ($p \leq 0,05$) do M0; e o maior valor numérico em M24h (Tabela 2). FREITAS et al, (2011) identificou aumento gradativo dessa PFA em coelhos infectados com *Eimeria stiedai*, sendo os valores obtidos dose dependentes com a evolução processo inflamatório que esse parasita causa. Os resultados desse autor condizem com os encontrados, porém, nesse estudo houve o intuito de comparar o basal com o pico inflamatório e sua resolução diferentemente da inflamação ascendente que a *Eimeria* causa.

As médias de albumina (Tabela 3), apesar de se comportar como uma PFA negativa como reportado por KANEKO (2009), não houve diferença estatística durante o pico da fase inflamatória mostrando-se ineficiente neste caso para o acompanhamento do processo inflamatório (Tabela 3).

Observou-se o pico de haptoglobina no M24h (Tabela 3) maior e diferente estatisticamente ($p \leq 0,05$) de M0. Sabe-se que a haptoglobina pode aumentar decorrente ao estresse (MARTÍNEZ & SUBIELA et al., 2004), podendo justificar os valores basais maiores que M45d uma vez que os animais foram transportados para cirurgia(M0), coleta de sangue (M0) e avaliação radiológica (M0,M15d, M30 e M45d) fora do ambiente onde foram adaptados. A dor, também considerada um fator estressante, desencadeia aumento de cortisol circulante (TRALL, 2007) que juntamente com o ápice do processo inflamatório (KENT, 1992, MURATA et al., 2004) é responsável pelo aumento PFAs como observado em M24h. Tais achados sugerem que esse conjunto de fatores significaram um estímulo estressante superior ao de transporte ou contenção para produção de haptoglobina.

Tabela 2. Valores médios seguidos do desvio padrão da média ($\pm$) das proteínas de fase aguda: proteína C reativa (mg/dL x 10^{-1}), ceruloplasmina (mg/dL x 10^{-1}), haptoglobina (mg/dL), albumina (mg/dL) e transferrina (mg/dL) mensuradas no soro de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos momentos (M): pré-cirúrgico (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico.

M	Proteína C Reativa	Ceruloplasmina	Albumina	Haptoglobina	Transferrina
M0	0,018 $\pm$ 0,007 ^{ab}	0,175 $\pm$ 0,06 ^a	3,635 $\pm$ 0,08 ^{ab}	0,168 $\pm$ 0,13 ^{bcde}	0,372 $\pm$ 0,09 ^a
M6h	0,009 $\pm$ 0,003 ^c	0,154 $\pm$ 0,06 ^{ab}	3,733 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,165 $\pm$ 0,04 ^{bcde}	0,342 $\pm$ 0,02 ^{ab}
M24h	0,009 $\pm$ 0,002 ^c	0,186 $\pm$ 0,05 ^a	3,445 $\pm$ 0,04 ^{bc}	0,375 $\pm$ 0,09 ^a	0,332 $\pm$ 0,03 ^{abc}
M36h	0,009 $\pm$ 0,003 ^c	0,163 $\pm$ 0,05 ^{ab}	3,549 $\pm$ 0,03 ^{abc}	0,210 $\pm$ 0,08 ^{abcd}	0,297 $\pm$ 0,03 ^{bc}
M7d	0,013 $\pm$ 0,005 ^{abc}	0,127 $\pm$ 0,03 ^{ab}	4,070 $\pm$ 0,04 ^a	0,138 $\pm$ 0,05 ^{cde}	0,346 $\pm$ 0,10 ^{ab}
M15d	0,012 $\pm$ 0,004 ^{bc}	0,100 $\pm$ 0,03 ^b	3,770 $\pm$ 0,04 ^{ab}	0,324 $\pm$ 0,22 ^{ab}	0,337 $\pm$ 0,05 ^{ab}
M21d	0,010 $\pm$ 0,004 ^c	0,095 $\pm$ 0,03 ^b	3,659 $\pm$ 0,05 ^{ab}	0,279 $\pm$ 0,25 ^{abc}	0,321 $\pm$ 0,05 ^{ab}
M30d	0,011 $\pm$ 0,004 ^c	0,170 $\pm$ 0,07 ^{ab}	3,032 $\pm$ 0,06 ^{cd}	0,090 $\pm$ 0,10 ^{de}	0,252 $\pm$ 0,04 ^{cd}
M45d	0,019 $\pm$ 0,005 ^a	0,131 $\pm$ 0,03 ^{ab}	2,750 $\pm$ 0,04 ^d	0,070 $\pm$ 0,01 ^e	0,213 $\pm$ 0,07 ^d

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si ($p \leq 0,05$).

A caracterização do leucograma de estresse de Meyes (1995) e (Bush, 2004) condizem com a linfopenia observada em M6h e M24h juntamente com o pico máximo de haptoglobina em M24h (Imagem 8). Houve um segundo pico em M15d, porém sem diferença significativa de M0, coincidindo com o transporte para a segunda avaliação radiológica. Harvey e West (1987) descrevem que a haptoglobina tem função moduladora de linfócitos podendo ser observado a correlação do estresse, linfócitos e concentração de

haptoglobina (Imagem 8). Apesar dos linfócitos não sugestionarem algum tipo de estresse ligado ao segundo pico de haptoglobina (M15d), foi possível observar na Imagem 9 que a contagem de NS apresentou pequeno aumento numérico nesse momento. Em M30d e M45d é possível sugerir que os animais estavam mais adaptados ao transporte e contenção uma vez que os valores dessa PFA foram menores.

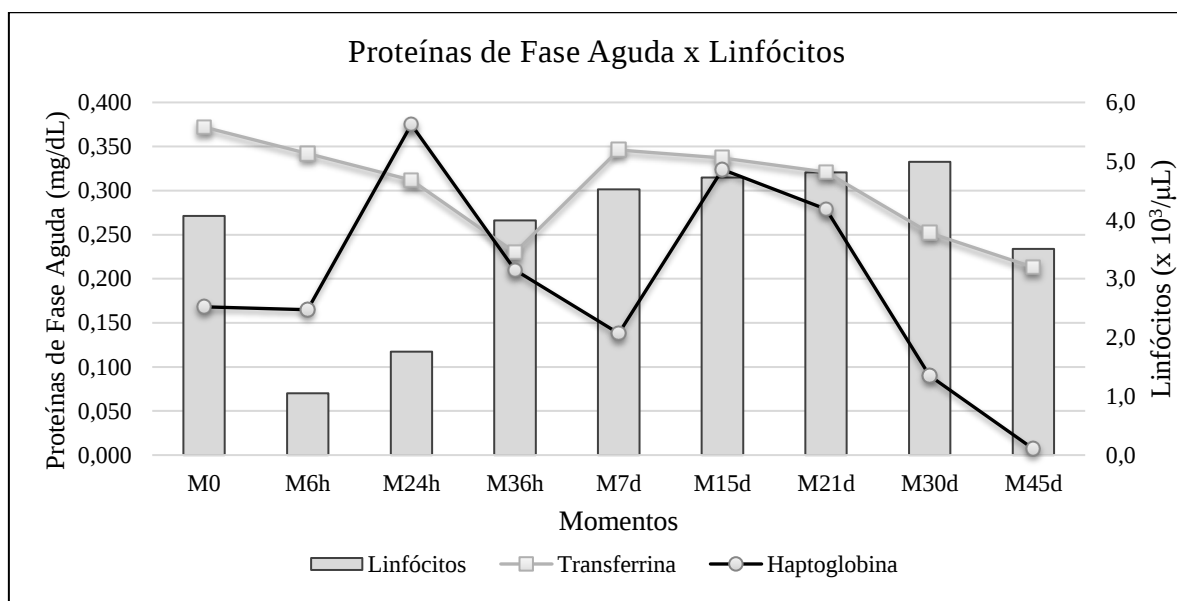


Imagem 8. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) mensurados no soro de coelhos submetidos a osteotomia parcial do osso radial direito nos momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico.

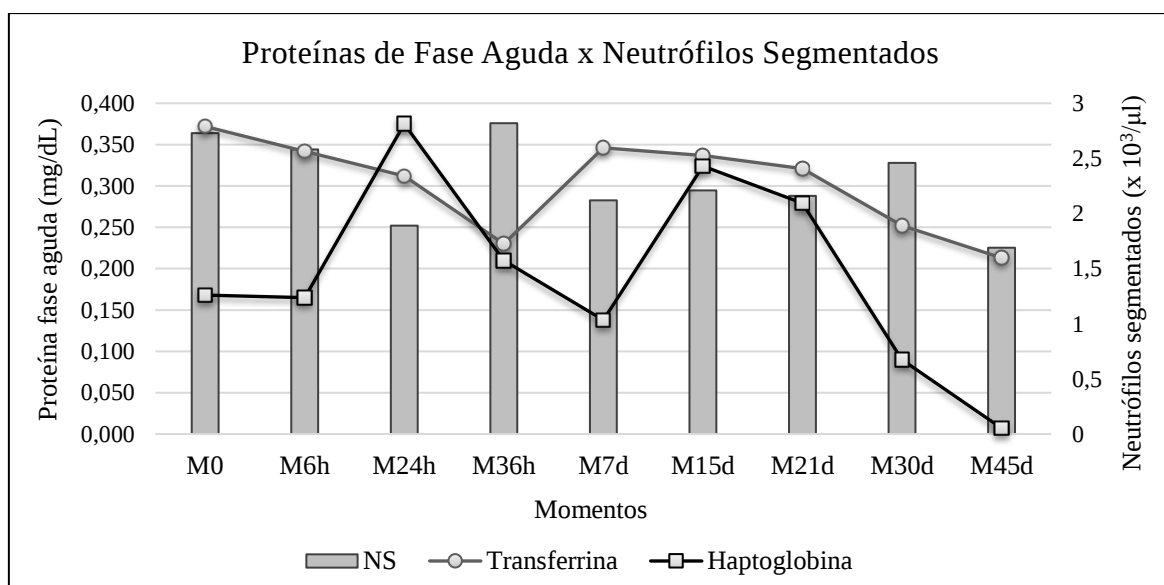


Imagem 9. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e neutrófilos segmentados ($\times 10^3/\mu\text{L}$) mensurados no soro de coelhos submetidos a osteotomia parcial do osso radial direito nos momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico.

A transferrina apresentou decréscimo desde os primeiros momentos avaliados atingindo pico negativo em M36h sendo diferente ($p \leq 0,05$) de M0 (Tabela 3). A análise comparativa do perfil inflamatório do ponto de vista leucométrico (concentração de neutrófilos segmentados) e PFAs na Imagem 9 revela que a transferrina apresenta resposta a inflamação já no M6h, momento o qual os NS estão sendo sequestrados ao foco inflamatório e apresentam decréscimo na concentração sérica como descrito por SWENSON e REECE 1996. Apesar do pico máximo da transferrina ser mais tardio em comparação a haptoglobina foi possível observar indícios logo no M6h, mostrando-se mais sensível a resposta de fase aguda (Imagem 8) corroborando com as afirmações de Murata et al., (2004), Céron et al., (2005), Paltrinieri, (2007) que as PFAs podem antecipar o diagnóstico de afecções mesmo quando ainda em caráter subclínica.

Observou-se que a concentração de hemoglobina foi menor no M36h, momento o qual a transferrina apresentou o pico negativo significativo ($p \leq 0,05$) (Imagem 10). Os achados condizem com a descrição de KANEKO (2009) o qual descreve a transferrina como negativa, sendo observado decréscimo nas suas concentrações no M24h e M36h concomitante ao pico da fase inflamatória (M36h), tendo essa PFA resultados semelhantes aos descritos em outras espécies tornando-as fidedignas para avaliação da evolução do processo inflamatório. Céron e colaboradores (2005) descrevem que a transferrina está ligado ao transporte de ferro que constitui a hemoglobina e ação antibacteriana e antiviral juntamente com a haptoglobina, As coletas de sangue sucessivas podem terem influenciado na concentração de transferrina em M36h, entretanto o pico de haptoglobina em M24h demonstra que já havia um processo inflamatório e responsável pela alteração sérica das PFAs. Sendo assim a avaliação em conjunto das PFAs com o hemograma favorece o diagnóstico mais preciso.

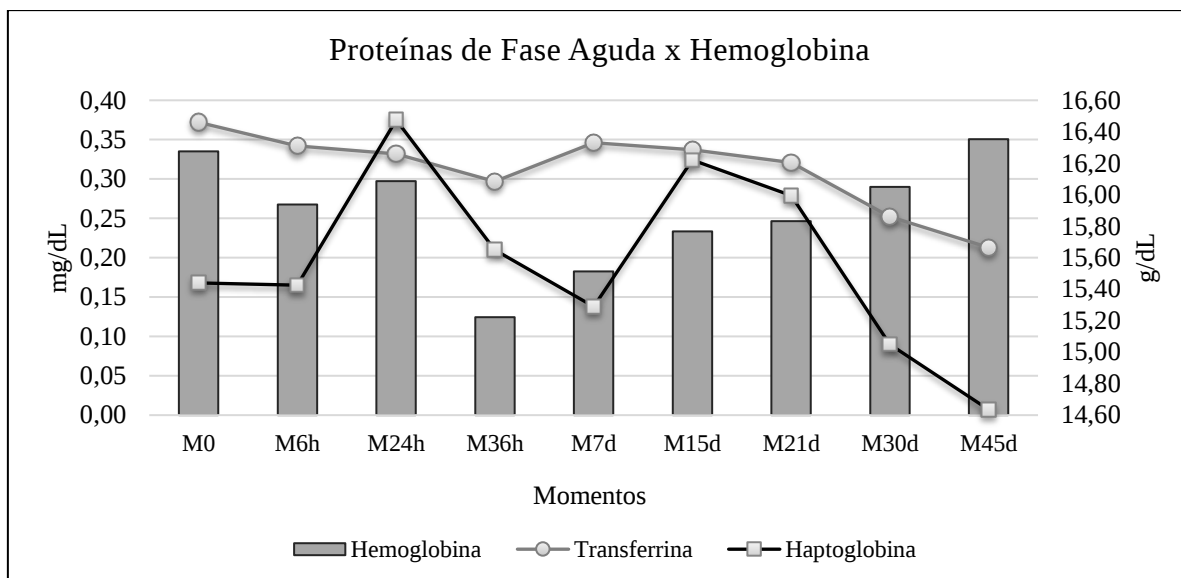


Imagem 10. Gráfico comparativo entre médias transferrina, haptoglobina (mg/dL) e hemoglobina (g/dL) mensurados no sangue de coelhos submetidos a ostectomia parcial do osso radial direito nos momentos: pré-operatório (M0), 6, 24 e 36 horas (M6h, M24h e M36h), 7, 15, 21, 30 e 45 dias (M7d, M15d, M21d, M30d e M45d) do pós-cirúrgico.

CONCLUSÕES

A haptoglobina e a transferrina foram as PFA que apresentaram melhor relação com achados leucométricos e radiológicos, favorecendo o diagnóstico. O estresse foi um fator que influenciou nos resultados de PFA como a haptoglobina, mas a avaliação em conjunto com o leucograma auxiliou ao diagnóstico da influência direta do estresse ou pelo processo inflamatório. Em geral as PFAs apresentam correlação positiva com o procedimento ortopédico avaliado auxiliando no diagnóstico e prognóstico.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, A. et al. C-reactive protein mutant that does not bind to phosphocholine and pneumococcal c-polysaccharide. **The Journal of Immunology**, v.169, n.6, p.3217–3222. 2002. Disponível em < <https://www.jimmunol.org/content/jimmunol/169/6/3217.full.pdf> > Acessado em 20 set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.6.3217>
- ALENCAR, M.M. et al. Margin of safety of Meloxicam in dogs: deleterious effects on blood cells and gastrointestinal tract. **Ciência Rural**. v.33, p.525–32.2003. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782003000300021> Acessado em 20 set. 2019. DOI. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782003000300021>
- AMIN, H. M. et al. Hematological and Biochemical Effects of Meloxicam in Male Albino Rats. **Current Science International**. v.6, n.01 , p.23-33.2017. Disponível em < <http://www.curreweb.com/csi/csi/2017/23-33.pdf> > Acessado em 20 set. 2019.
- AL-AQL, Z.S. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction. **Journal of Dental Research**. v.87, n.2. p.107-118. 2008. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3109437/> > Acessado em 20 set. 2019. DOI: 10.1177/154405910808700215
- CERÓN, J. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**.v.34, n.2, p.85–99. 2005. Disponível em < [https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x?sid=nlm%3a%20pubmed) > Acessado em 20 set. 2019. DOI <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x>
- CRUVINEL, W. et al. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira Reumatologia**. v.50, p.4, p.434–461. 2010. Disponível em < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0482-50042010000400008 > Acessado em 20 set. 2019. DOI. <http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042010000400008>.
- DIMITRIOU, R. et al. Current concepts of molecular aspects of bone healing. **Injury**, Bristol, v.36, p.1392-1404, 2005. Disponível em < [https://www.injuryjournal.com/article/S0020-1383\(05\)00276-7/fulltext](https://www.injuryjournal.com/article/S0020-1383(05)00276-7/fulltext) > Acessado em 20 set. 2019. DOI. 10.1016/j.injury.2005.07.019

ECKERSALL, P.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**. v.185, n.1, p.23–27. 2010. Disponível em < [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310001176](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023310001176?via%3Dihub) ?via%3Dihub> Acessado em 20 set. 2019. DOI. 10.1016/j.tvjl.2010.04.009

FREITAS, F.L.C, **Avaliação Fisiopatológica De Coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) Infectados Experimentalmente Com Oocistos Esporulados De *Eimeria Stiedae* (Apicomplexa: Eimeriidae)**. 2009. 67f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FREITAS, F. L.C. et al. Systemic inflammatory response indicators in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) experimentally infected with sporulated oocysts of *Eimeria stiedae* (Apicomplexa: Eimeriidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online)**, v. 20, n. 2, p. 121-126, 2011. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S198429612011000200006&lng=pt&nrm=iso> Acessado em 20 set. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612011000200006>.

GERMAN, A. et al. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. **Domestic Animal Endocrinology**. v.37, n.4, p.214–226. 2009. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073972400900071X?via%3Dihub>.> Acessado em 20 set. 2019. DOI.10.1016/j.domaniend.2009.07.001

GERSTENFELD, L.C. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial and temporal aspects of its regulations. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.88, p.873-884. 2003. Disponível em <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.10435>.> Acessado em 20 set. 2019. DOI.10.1002/jcb.10435

GERSTENFELD, L.C. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**. v..54, p.1215-1228. 2006. Disponível em <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1369/jhc.6A6959.2006?urlver=Z39.882003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed> Acessado em 20 set. 2019. DOI.10.1369/jhc.6A6959.2006

GRUYS, E, Monitoring health by values of acute phase proteins. **Acta Histochemica**.v.108, p.3. p.229–232. 2006. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/>

science/article/pii/S0065128106000365?via%3Dihub> Acessado em 20 set. 2019. DOI: 10.1016/j.acthis.2006.03.009

HARVEY, J. W.; WEST, C. L. Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentration in dogs. **Veterinary Pathology**, v.24, n.1, p.90-92, 1987. Disponível em <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/030098588702400115>> Acessado em 20 set. 2019. DOI:10.1177/030098588702400115

KANEKO, J. et al. **Clinical biochemistry of domestic animals**. Burlington: Academic Press. P.2008. 117-155p, 6 ed.

KENT, J. Acute phase proteins: Their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**. v.148, n.4, p. 279–282. 1992. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1379866>>. Acessado em 20 set. 2019 DOI: 10.1016/0007-1935(92)90081-B

KJELGAARD-HANSEN M; JACOBSEN, S. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.35, p.51-70. 2011. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272271210001447?via%3Dihub>> Acessado em 20 set. 2019 DOI: 10.1016/j.cll.2010.10.002

KURIBAYASHI, T. et al. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental animals**, v.52, n.5. p. Disponível em <https://www.jstage.jst.go.jp/article/expanim/52/5/52_5_387/_article> Acessado em 20 set.2019. DOI:10.1538/expanim.52.387387–390. 2003.

MARNELL, L. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology**, v.117, n.2, p.104–111. 2005. Disponível em<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1521661605002809?via%3Dihub>> Acessado em 20 set. 2019. DOI:10.1016/j.clim.2005.08.004

MARSELL, R.; EINHORN, T.A. The biology of fracture healing. **Injury**. v.42, v.6, p.551-555. 2011. Disponível em<[https://www.injuryjournal.com/article/S0020-1383\(11\)00125-2/fulltext](https://www.injuryjournal.com/article/S0020-1383(11)00125-2/fulltext)> Acessado em 20 set. 2019. DOI. 10.1016/j.injury.2011.03.031

MITAKA, C (2005) Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectioussystemic inflammatory response syndrome. **Clinical Chemical Acta**. v.351, n.1–2, p. 17–29. Disponível em<<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii>

/S0009898104004292?via%3Dihub> Acessado em 20 set. 2019.
DOI.10.1016/j.cccn.2004.08.018

MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, v.168, n.1. p.28–40. 2004. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009898104004292?via%3Dihub>> Acessado em 20 set. 2019. DOI. 10.1016/j.cccn.2004.08.018

NEMZEK, J. Inflammatory Response In.: Tobias K, Johnston S. **Veterinary Surgery: Small Animal**, Canada, Saunders. 2012. 1-15p.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v.31, n.1, p.125–129.2007. Disponível em <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11259-007-0107-3>> Acessado em 20 set. 2019. DOI.10.1007/s11259-007-0107-3

PLICKERT, H. Evaluation of a pointof-care test for canine C-reactive protein. **Veterinary Clinical Pathology**. v.40, n.3, p.384-388. 2011. Disponível em <http://www.vpdiagnostico.com.br/assets/uploads/files/file_5a8ec2150feeacrp_veterinaria_evaluation_of_a_point_of_care_test_for_canine_c_reactive_protein.pdf> Acessado em 20 set. 2019. DOI:10.1111/j.1939-165X.2011.00339.x

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2008 URL <https://www.R-project.org/>.

RAHN, B.A. Bone healing: histological and physiologic concepts. In.: Fackelman, GE. **Bone in clinical orthopedics**. Thieme: Stuttgart. 2002. 287-326p.

RUBIO, C, et al. Acute phase response following ovariohysterectomy in female dogs. **Comparative Clinical Pathology**. v.24, n.4.p.797–804. 2015 Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2018001102124> Acessado em 20 set. 2019. DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-5132>

SOUSA, V. L. **Efeitos do ultra som de baixa intensidade sobre a consolidação óssea em fratura de ossos longos (rádio e ulna, tíbia e fíbula) em cães (Canis familiaris)**. 2003. 127f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo. São Paulo.

SPINELLI, M.O. et al. Parâmetros hematológicos normais em coelhos Nova Zelândia do biotério da faculdade de Medicina da USP. **RESBCAL**, v.1, n.3, p.224-228,2012. Disponível em <<http://www.sbcal.org.br/old/upload/arqupload/artigo2numero3-5368f.pdf>> Acessado em 20 set. 2019.

WENDEBERG, WO (1961) Mineral Metabolism of Fractures of the Tibia in Man Studied with External Counting of Sr^{85} , Acta **Orthopaedica Scandinavica**, 32:sup52, 3-81, DOI: [10.3109/ort.1961.32.suppl-52.01](https://doi.org/10.3109/ort.1961.32.suppl-52.01) Acessado em 20 set. 2019.

CAPÍTULO 3 – Considerações Finais

A partir do resultados obtidos e conclusões resultante do estudo comparativo a outros autores pode-se concluir alguns pontos:

- O leucograma é indispensável para avaliação do paciente e que as PFAs auxiliam o acompanhamento do pós-cirúrgico ortopédico.
- As PFAs apresentam uma importância diagnóstica e prognóstica favorável, sendo necessários estudos mais aprofundados dentro das diversas proteínas encontradas na análise eletroforética para determinar a que melhor se encaixaria como proteína majoritária.
- Apesar do método de eletroforese ser preciso, após a utilização deste para definição das PFAs de maior importância para determinada espécie seria ideal o desenvolvimento de métodos de diagnóstico rápido, eficientes e de custo reduzido.
- A haptoglobina apesar de sofrer influência do estresse trazendo resultados falso positivos, se associada aos resultados do leucograma e outras PFAs podem auxiliar no prognóstico.
- Estudos complementares realizados com correção cirúrgica buscando a consolidação direta e animais que só receberam tratamento por mobilização (sem procedimento cirúrgicos) tornam-se necessários para avaliar melhor a resposta das PFA perante a diferentes tipos de protocolos ortopédicos.