

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LEUCOGRAMA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DE CADELAS  
SUBMETIDAS À OVARIOSSALPINGOHISTERECTOMIA PELAS  
TÉCNICAS CONVENCIONAL E MINIMAMENTE INVASIVA

CAMILA PERES RUBIO

Botucatu – SP  
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

LEUCOGRAMA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DE CADELAS  
SUBMETIDAS À OVARIOSSALPINGOHISTERECTOMIA PELAS  
TÉCNICAS CONVENCIONAL E MINIMAMENTE INVASIVA

CAMILA PERES RUBIO

Dissertação apresentada junto ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária como parte dos  
requisitos para obtenção do título de  
Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Ass. Dra. Elizabeth  
Moreira dos Santos Schmidt

Nome da Autora: Camila Peres Rubio

Título: LEUCOGRAMA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DE CADELAS SUBMETIDAS À OVARIOSSALPINGOHISTERECTOMIA PELAS TÉCNICAS CONVENCIONAL E MINIMAMENTE INVASIVA.

## COMISSÃO EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Elizabeth M. dos Santos Schmidt

Presidente e Orientadora

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>. Rosangela Locatelli Dittrich

Membro

Departamento de Medicina Veterinária

Universidade Federal do Paraná – Curitiba

Prof.Dr. José Jurandir Fagliari

Membro

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

FMVZ – UNESP – Jaboticabal

Data da Defesa: 18 julho de 2013.

*“Os momentos mais esplêndidos da vida não são os chamados dias de êxito,  
mas sim, aqueles dias em que saindo do desânimo e do desespero, sentimos  
erguer-se dentro de nós, um desafio: a vida e a  
promessa de futuras realizações”*

*Gustave Flaubert*

## DEDICATÓRIA

À minha orientadora e amiga Beth, pela  
confiança depositada em mim, por me  
ajudar a descobrir o verdadeiro  
significado da pesquisa e por sua  
dedicação em me colocar numa nova  
caminhada repleta de desafios e futuras  
realizações.

Muito Obrigada!

Ao meu noivo, Thalles por me ajudar a  
enfrentar os diferentes desafios que  
surgiram nessa caminhada, por seu  
indispensável auxílio à essa pesquisa,  
pelos infinitos momentos de alegria que  
passamos juntos, por ser o meu porto  
seguro durante todo esse período e  
principalmente por seu amor.

À toda sua família, pelo carinho e apoio  
principalmente nos momentos mais  
importantes.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus por minha vida, por ter me guiado por este caminho com saúde e apoio das pessoas que eu amo.

À Pós-Graduação da FMVZ da UNESP de Botucatu por todos os serviços prestados.

À Professora Dra. Regina K. Takahira por todo o suporte fornecido para utilização do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, UNESP de Botucatu.

Aos colegas Márcio José Figueira e Adriana Lopes Figueira (Auxiliares Técnicos do Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, câmpus de Botucatu) e ao Paulo César da Silva (Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, câmpus de Jaboticabal) pelos ensinamentos, suporte técnico e colaboração com essa pesquisa.

Ao Professor Dr. Luciano Barbosa do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências – Unesp, câmpus de Botucatu, por seu auxílio ao realizar as análises estatísticas do trabalho.

À professora Dr<sup>a</sup> Sheila Canevese Rahal do Departamento de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária da FMVZ – Unesp, Câmpus de Botucatu e à professora Dr<sup>a</sup> Priscylla Tatiana C. Guimarães Okamoto do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, Câmpus de Botucatu, por sua valiosa contribuição e participação na minha banca do exame de qualificação.

À professora Dr<sup>a</sup> Rosângela Locatelli Dittrich do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Paraná - Curitiba, e ao professor Dr. José Jurandir Fagliari do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FMVZ - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, por participarem da minha banca de defesa de mestrado de forma tão ilustre, proveitosa e carinhosa.

Aos amigos Médicos Veterinários Rodrigo Dálio e Juliano Itimura, por me fornecerem auxílio e contribuírem de forma imprescindível para essa pesquisa.

Ao colega Médico Veterinário Dr. Alfredo F. M. Lima por sua importante colaboração com o desenvolvimento dessa pesquisa.

À amiga Médica Veterinária Gisele J. Santos, por seu auxílio, paciência e dedicação nessa pesquisa.

Às colegas do Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ, Unesp de Botucatu, Carol, Kati e Claudinha, pelo auxílio durante as análises laboratoriais e à Ana e Renata por me incentivarem a iniciar o mestrado.

Ao Daniel Ornelas por sua ajuda com as imagens fotográficas.

À todos os funcionários que, de alguma forma, ajudaram na confecção deste trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

Aos meus tios Jussara e Elias, e primas Gabriela e Bruna, pelo carinho que tiveram comigo ao me acolher em sua casa durante esses anos.

À minha orientadora Beth, agradeço com muito carinho, por ter me ajudado e literalmente me orientado em cada etapa alcançada durante estes dois anos e meio de mestrado e por sua enorme dedicação na correção deste trabalho.

E por último um agradecimento especial à minha família por manter inabalável o seu suporte desde o início desse percurso.

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis do leucograma nos diferentes momentos de cada grupo (G1 e G2) de cadelas submetidas a OSH.....                        | 25 |
| Tabela 2 – Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis do leucograma nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas a OSH.....                                              | 26 |
| Tabela 3 – Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis das concentrações séricas da proteína total e suas frações nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH..... | 29 |
| Anexo A – Hemograma e concentrações de fibrinogênio e da proteína plasmática total nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH.....                                                           | 80 |
| Anexo B – Valores de referências para cães.....                                                                                                                                                         | 81 |

## LISTA DE FIGURAS

|             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1A – | Abraçadeira (seta preta) utilizada durante a ligadura do pedículo ovariano na técnica de OSH minimamente invasiva em cadelas.....                                                                                                                                                                                                                     | 19 |
| Figura 1B – | Fio de náilon (seta branca) utilizada durante a ligadura do pedículo ovariano na técnica de OSH convencional em cadelas.....                                                                                                                                                                                                                          | 19 |
| Figura 2 –  | Gel com as frações proteicas após ser descorado em solução de metanol, ácido acético e água. Setas pretas: exemplos de algumas das frações proteicas observadas nas amostras de cadelas submetidas ao estudo. Padrão da amostra: 1= 200 kDa; 2= 116 kDa; 3= 97 kDa; 4= 66 kDa; 5= 55 kDa; 6= 45 kDa; 7= 36 kDa; 8= 29 kDa; 9= 24 kDa; 10= 20 kDa..... | 22 |
| Figura 3 –  | Porcentagem de alteração das concentrações séricas da proteína total e suas frações no grupo de cadelas submetidas à OSH convencional. (T1) 24h antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.....                                                            | 31 |
| Figura 4 –  | Porcentagem de alteração das concentrações séricas da proteína total e suas frações do grupo de cadelas submetidas à OSH minimamente invasiva. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.....                                               | 33 |
| Figura 5 –  | Porcentagem de aumento das concentrações séricas da ceruloplasmina nos momentos dos grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.....                                                            | 34 |
| Figura 6 –  | Porcentagem de aumento e diminuição das concentrações séricas da $\alpha_1$ -antitripsina nos momentos dos grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.....                                     | 35 |

## LISTA DE ABREVIACÕES

OSH – ovariossalpingohisterectomia

G1 – grupo 1

G2 – grupo 2

T1 – pré-operatório

T2 – 24 horas

T3 – 48 horas

T4 – sete dias

IM - intramuscular

IV - intravenoso

UI – unidade internacional

Kg – quilograma

g – grama

mg – miligrama

µg – micrograma

L – litro

mL – mililitro

dL – decilitro

µL – microlitro

kDa - kilodáton

mA – miliampere

FB – fibrinogênio

CRP – proteína C reativa

SAA – amiloide A sérico

AGP –  $\alpha_1$ -glicoproteína àcida

Cp – ceruloplasmina

Hp – haptoglobina

PST – proteína total sérica

IgA – imunoglobulina A

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

TNF-  $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa

ALT – alanina aminotransferase

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

PBS – tampão-fosfato salino

PFA – proteína de fase aguda

pH – potencial hidrogeniônico

SDS – dodecil sulfato de sódio

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

dp – desvio padrão

ANOVA – Análise de Variância

WMW – Wilcoxon-Mann-Whitney

Unesp – Universidade Estadual Paulista

FCAV – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

SP – São Paulo

MG – Minas Gerais

MO – Missouri

USA – Estados Unidos

APA – Associação de Proteção aos Animais do município de Botucatu

## SUMÁRIO

|                                                                                                                          | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| RESUMO .....                                                                                                             | 1      |
| ABSTRACT .....                                                                                                           | 2      |
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                                                                       | 3      |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA .....                                                                                            | 6      |
| 2.1 OBJETIVOS .....                                                                                                      | 16     |
| 2.1.1 Objetivo Geral .....                                                                                               | 16     |
| 2.1.2 Objetivos Específicos .....                                                                                        | 16     |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                               | 17     |
| 3.1 Animais .....                                                                                                        | 17     |
| 3.2 Protocolo anestésico e antimicrobiano .....                                                                          | 18     |
| 3.3 Técnica de OSH minimamente invasiva .....                                                                            | 18     |
| 3.4 Técnica de OSH convencional .....                                                                                    | 19     |
| 3.5 Colheita de amostras sorológicas.....                                                                                | 20     |
| 3.6 Técnicas para realização do hemograma .....                                                                          | 20     |
| 3.7 Técnica para determinação da concentração sérica de creatinina e da atividade da ALT.....                            | 20     |
| 3.8 Técnica para determinação do teor de fibrinogênio .....                                                              | 20     |
| 3.9 Técnica para determinação do teor de proteína plasmática total                                                       | 20     |
| 3.10 Técnicas para determinação do proteinograma sérico .....                                                            | 21     |
| 3.10.1 Determinação das concentrações séricas de proteína total .....                                                    | 21     |
| 3.10.2 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas .....                                                          | 21     |
| 3.11 Delineamento experimental .....                                                                                     | 22     |
| 4 RESULTADOS .....                                                                                                       | 24     |
| 4.1 Leucograma .....                                                                                                     | 24     |
| 4.1.1 Leucograma nos diferentes momentos, para cada técnica cirúrgica .....                                              | 24     |
| 4.1.2 Leucograma nas duas técnicas cirúrgicas.....                                                                       | 24     |
| 4.2 Proteinograma sérico .....                                                                                           | 27     |
| 4.2.1 Concentrações séricas das proteínas totais e suas frações nos diferentes momentos, em cada técnica cirúrgica ..... | 27     |
| 4.2.2 Concentrações séricas das proteínas totais e suas frações, nas duas técnicas cirúrgicas .....                      | 28     |

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 5 DISCUSSÃO .....           | 30 |
| 6 CONCLUSÕES .....          | 40 |
| 7 REFERÊNCIAS .....         | 41 |
| 8 TRABALHO CIENTÍFICO ..... | 54 |
| Anexos .....                | 78 |

RUBIO, C.P. **Leucograma e proteínas de fase aguda de cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia pelas técnicas convencional e minimamente invasiva.** Botucatu, 2013. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

Trinta cadelas foram submetidas à ovariosalpingohisterectomia por duas técnicas distintas: a convencional, por laparotomia com uso de fio de náilon (G2) e a minimamente invasiva, com uso de abraçadeiras de náilon para ligadura dos pedículos ovarianos e corpo uterino (G1). Amostras de sangue foram obtidas em quatro momentos: pré-operatório (T1), 24 horas (T2), 48 horas (T3) e sete dias (T4) após os procedimentos cirúrgicos. Objetivou-se avaliar e comparar o leucograma e as concentrações séricas das proteínas totais e suas frações de cadelas submetidas às duas técnicas cirúrgicas, utilizando-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Notou-se aumento significativo ( $p < 0,001$ ) da contagem total de leucócitos e do número de neutrófilos segmentados no T2 dos dois grupos em relação ao T1. Verificou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da concentração de ceruloplasmina no T3 do G1 em comparação ao T1 e diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da  $\alpha_1$ -antitripsina nos momentos T3 e T4 em relação ao T1 no G1. As concentrações séricas de uma proteína de 23kDa não-identificada nominalmente foram significativamente menores ( $p < 0,05$ ) no T3 do G2, em relação ao T1, e foram observadas concentrações significativamente aumentadas ( $p < 0,05$ ) da proteína sérica total no T2 em relação ao T1 no G2. As concentrações da ceruloplasmina no T2 e da haptoglobina nos momentos T2, T3 e T4 em relação ao T1 foram significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) no G1 quando comparadas ao G2. Estes resultados mostraram que o emprego da abraçadeira de náilon promoveu uma maior resposta inflamatória quando comparada ao fio de náilon para ligadura dos pedículos ovarianos e corpo uterino em cadelas nos momentos avaliados.

**Palavras-chave:** proteínas de fase aguda, ceruloplasmina, haptoglobina, abraçadeira de náilon, cirurgia

RUBIO, C.P. **Leucogram and acute phase proteins of female dogs submitted to convencional and minimal invasive ovariosalpingohysterectomy.** Botucatu, 2013. 81p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **ABSTRACT**

Thirty healthy adult female dogs were submitted to ovariosalpingohysterectomy by two different techniques: laparotomy, with the use of nylon sutures (G2) and minimal invasive, with the use of nylon cable ties (G1) for the ligation of ovarian pedicles and uterine stump. Blood samples were obtained in four different moments: before surgery (T1) and 24 hours (T2), 48 hours (T3) and 07 days (T4) after surgery, to evaluate and compare the leucogram and total serum protein and its fractions concentrations of the female dogs submitted to two surgical procedures, using polyacrylamide gel electrophoresis by means of sodium dodecyl sulfate-containing (SDS-PAGE). There was a significant increase ( $p<0.001$ ) in white blood cell count and neutrophils in the T2 in both groups when compared to T1. The ceruloplasmin concentration was significantly increased ( $p<0.05$ ) in the T3 of G1 when compared to T1. There was a significant decrease ( $p<0.05$ ) on  $\alpha_1$ -antitrypsin concentrations on T3 and T4 when compared to T1 of G1. The non identified protein of 23kDa concentrations were significantly decreased ( $p<0.05$ ) in the T3 of G2 when compared to T1. The total serum protein concentrations were significantly increased ( $p<0.05$ ) in the T2 of G2 when compared to T1. The ceruloplasmin and haptoglobin concentrations in the T2 and T2, T3 and T4, respectively, were significantly increased ( $p<0.05$ ) when compared to G2. These results indicated that the use of the nylon cable ties made more intense inflammatory response when compared to use of the nylon suture for the ligation of ovarian pedicles and uterine stump in the females dogs on the moments evaluated.

**Key words:** acute phase proteins, ceruloplasmin, haptoglobin, nylon cable ties, surgery

## 1 INTRODUÇÃO

As proteínas de fase aguda (PFA) são um grupo de proteínas do sangue que apresentam alteração nas suas concentrações em animais acometidos por infecções, inflamações, trauma cirúrgico ou mesmo o estresse (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004; CERÓN et al., 2005). São consideradas componentes da resposta imune inata não-específica, envolvidas no restabelecimento da homeostasia e contenção do crescimento microbiano antes do desenvolvimento de uma resposta imune adquirida frente a um desafio (MURATA et al., 2004; GRUYS et al., 2005). Na reação inflamatória ocorrem alterações denominadas respostas de fase aguda. Essas respostas são induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias que atuam como mensageiros entre o local da lesão e a síntese e liberação das proteínas de fase aguda (PFAs) principalmente pelos hepatócitos (PETERSEN et al., 2004; KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN, 2011). Uma PFA é definida como uma proteína que sofre alteração na sua concentração sérica em pelo menos 25% durante a resposta às citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL)-6, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), secretadas no momento da inflamação. A determinação de suas concentrações séricas pode, portanto, ser usada para obter informações diagnósticas, prognósticas e no monitoramento da resposta a uma terapia, se as amostras forem colhidas nos momentos adequados (MURATA et al., 2004; ECKERSALL e BELL, 2010).

A resposta de fase aguda é uma reação sistêmica do organismo a um distúrbio local ou sistêmico causado por infecção, injúria tecidual, trauma ou cirurgia, crescimento neoplásico ou distúrbios imunológicos. No local em que há invasão de microorganismos e dano tecidual, são iniciadas respostas pelo próprio tecido associadas à produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios. Esses ativam receptores em diferentes células-alvos levando a uma reação sistêmica, resultando em ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, redução da secreção do hormônio de crescimento e alterações orgânicas clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, equilíbrio do nitrogênio negativo e catabolismo de células musculares, além de outras alterações como leucocitose, aumento do cortisol sanguíneo e alterações na concentração de proteínas de fase aguda, por modificações no metabolismo

hepático (ECKERSALL, 2008). Dentro de poucas horas após a inflamação, o padrão das proteínas sintetizadas pelo fígado é alterado, resultando no aumento da concentração de algumas proteínas sanguíneas, as PFA positivas, e diminuição na síntese de outras, as PFA negativas (GRUYS et al., 2005).

As PFAs positivas apresentam respostas principais (ou maiores), moderadas e menores. As principais possuem baixa concentração ( $<1 \mu\text{g/L}$ ) em animais saudáveis e aumentam em 100 a 1000 vezes na concentração sob estimulação, ocorrendo pico em 24 a 48 horas, quando então diminuem rapidamente durante a fase de recuperação do animal. As respostas de fase aguda moderadas são aquelas que aumentam em cinco a 10 vezes sob ativação, com pico após dois a três dias, e diminuem suas concentrações mais lentamente que as PFA principais. As PFA com respostas menores são aquelas que aumentam gradualmente a sua concentração entre 50 a 100% (ECKERSALL e BELL, 2010). As PFAs negativas são aquelas em que suas concentrações diminuem pelo menos 25% do seu valor basal na resposta a inflamação. Nos cães, as principais PFA negativas são a albumina e a transferrina (PALTRINIERI, 2007; ECKERSALL e BELL, 2010).

Em cães, há diferenças na magnitude e também no tempo da resposta ao distúrbio inflamatório. As concentrações das principais PFAs positivas, como a Proteína C-Reativa (CRP) e o Amilóide A Sérico (SAA), aumentam rapidamente após um estímulo inflamatório e declinam de forma muito rápida após a resolução do processo. As concentrações das PFAs moderadas (haptoglobina,  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida e ceruloplasmina) aumentam de forma mais lenta após o estímulo inflamatório e retornam ao valor normal mais gradualmente (CERÓN et al., 2005; ECKERSALL e BELL, 2010).

As concentrações das PFAs na circulação estão relacionadas à gravidade do distúrbio e a extensão do dano tecidual. Apesar de serem denominadas de PFAs, há secreção e expressão contínua dessas proteínas em processos crônicos. No entanto, a concentração sanguínea dessas proteínas pode ser alterada de acordo com a evolução dessas condições (ECKERSALL, 2008).

Para otimizar o procedimento cirúrgico, é necessário identificar marcadores úteis para avaliar a intensidade do trauma causado pelo procedimento. A resposta ao estresse cirúrgico é um conjunto de reações hormonais, metabólicas e inflamatórias que ocorrem após a cirurgia, para permitir que o

organismo se adapte ao trauma e os tecidos lesados se recuperem (JACOBSEN et al., 2009).

Para minimizar o trauma cirúrgico, as técnicas cirúrgicas estão sendo aperfeiçoadas. Técnicas minimamente invasivas, como cirurgias endoscópicas, causam menor inflamação pós-operatória quando comparadas à técnicas cirúrgicas convencionais correspondentes (SUTER et al., 2002; JACOBSEN et al., 2009). Com o propósito de minimizar os traumas cirúrgicos, otimizar o tempo de cirurgia e, principalmente, diminuir os custos operacionais, as abraçadeiras de náilon estão sendo utilizadas como método hemostático prévio para ligadura dos pedículos ovarianos e uterino nas OSH em cadelas (SILVA et al., 2004). A técnica minimamente invasiva com a abraçadeira de náilon apresenta facilidades se comparada com a técnica tradicional, principalmente em relação a não utilização de pinças hemostáticas no pedículo e material de sutura, o que a torna mais prática para as campanhas de controle populacional (LIMA et al., 2010). Silva et al. (2004) utilizaram abraçadeira de náilon na hemostasia preventiva de veias e artérias na ovariohisterectomia de cadelas e concluíram ser um método alternativo de hemostasia preventiva sem ocorrências de complicações pós-operatórias.

O procedimento cirúrgico promove um trauma tecidual, que por sua vez induz uma reação inflamatória localizada e generalizada (resposta de fase aguda), além de uma reação imunossupressora e metabólica. A determinação da dinâmica destas reações pode auxiliar a quantificar o grau de trauma tecidual induzido pela cirurgia, compreender melhor diferenças nos processos inflamatórios entre procedimentos distintos e monitorar de forma mais adequada o período pós-operatório (SUTER et al., 2002).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

O fibrinogênio (FB) é uma betaglobulina, considerado uma proteína de fase aguda moderada, sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e IL-6) e do TNF- $\alpha$  liberados pelo processo inflamatório (ANDREWS et al., 1994). Está também envolvido na hemostasia, fornecendo substrato para formação de fibrina, e, na reparação tecidual, fornece uma matriz para a migração de células inflamatórias (MURATA et al, 2004). É utilizado em bovinos e ovinos como um indicador confiável da presença de inflamação, infecção bacteriana ou trauma cirúrgico (PFEFFER et al., 1993; CHERYK et al., 1998) e em equinos para auxílio no diagnóstico de inflamação (HELD et al., 1990). Segundo Jain (1986), durante o processo de inflamação aguda, a concentração plasmática desta proteína aumenta por vários dias, atingindo um pico entre o quinto e sétimo dia e o grau de hiperfibrinogenemia pode refletir a gravidade da inflamação. Para cães, valores superiores aos de referência podem indicar processo inflamatório desde que a hemoconcentração não esteja presente (SUTTON e JOHNSTONE, 1977). Em cadelas, pode ser útil como diagnóstico precoce de gestação (CONCANNON et al., 1996). A determinação do fibrinogênio plasmático é comumente usada, mas pode ser influenciada por outros fatores, além do processo inflamatório. A diminuição da concentração do fibrinogênio pode ser causada por consumo em coagulopatias ou pelo aumento da permeabilidade vascular, que pode mascarar uma hiperfibrinogenemia induzida por inflamação e tornar a interpretação dos resultados difícil (KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN, 2011).

A proteína C-reativa (CRP) possui peso molecular de 100 kilodáltons (kDa) (cinco subunidades de 20 kDa cada) (YUKI et al., 2010). Esta proteína tem papel importante na proteção contra infecção, eliminação de dano tecidual e regulação da resposta inflamatória (MOLD et al., 2002). Ela inibe a quimiotaxia e a “explosão respiratória” de neutrófilos (MORTENSEN e ZHONG, 2000), liga-se diretamente a vários microorganismos, degenerando células e restos celulares, ativando o sistema complemento pela via clássica C1q e atua também como opsonina (GRUYS et al, 2005).

Assim como em humanos, é conhecida como um marcador útil da inflamação aguda em cães. A CRP em cães apresenta rápida e precoce elevação na sua concentração e um declínio muito rápido, sendo assim um teste útil para indicar a situação do animal no momento da colheita da amostra. O soro de cães saudáveis contém menos de 5 mg/L de CRP. No entanto, após o estímulo inflamatório promovido por uma cirurgia, observa-se um aumento na sua concentração em quatro horas e o pico de sua concentração ocorre em 24 horas (CASPI et al, 1984; CERÓN et al., 2005). Após trauma cirúrgico em cães, observa-se aumento de 95 vezes na concentração da CRP e elevação de duas a três vezes nas concentrações de haptoglobina e ceruloplasmina (CERÓN et al., 2005).

Geralmente, a concentração da CRP em cães está correlacionada com a extensão e atividade da inflamação ou intensidade do trauma cirúrgico. Observa-se aumento nas concentrações de CRP antes de quaisquer alterações hematológicas, sendo em muitos casos este aumento o único indicador de um processo inflamatório (CASPI et al., 1987).

Yamamoto et al. (1993) realizaram um estudo em 29 cães submetidos a diferentes tipos de cirurgia. A concentração da CRP aumentou de forma significativa na maioria dos cães 24 a 48 horas após os procedimentos, sendo as menores concentrações observadas no grupo de animais submetidos a ovariectomia convencional e suas concentrações diminuíram significativamente quando as suturas cirúrgicas foram removidas. Dabrowski et al. (2009) demonstraram que houve um aumento significativo com relação ao período pré-operatório, nas concentrações de CRP, 24 horas após ovariectomia, em cadelas para tratamento de piometra, com e sem complicações no período pós-operatório. No entanto, as concentrações de CRP do grupo de animais sem complicações diminuíram em até 48 horas após o procedimento, e no grupo com complicações pós-operatórias, as concentrações de CRP começaram a diminuir sete dias após o procedimento cirúrgico. Dabrowski et al. (2007) demonstraram que cadelas saudáveis submetidas a ovariectomia apresentaram um aumento máximo e significativo na concentração de CRP 24 horas após o procedimento cirúrgico, com rápido declínio nos outros dias.

Serin e Ulutas (2010) verificaram que as concentrações da CRP aumentaram significativamente, em relação aos valores pré-operatórios, 24, 48 horas e sete dias após ovariectomia em cadelas saudáveis. Em outro estudo, a concentração da CRP foi significativamente maior do que os valores pré-cirúrgicos em cadelas 12 horas após serem submetidas a cirurgia de ovariectomia, e também significativamente maior do que os animais do grupo controle, os quais receberam apenas anestesia. Nos animais submetidos à cirurgia, as concentrações da CRP também estiveram significativamente elevadas no período de 28 e 36 horas após o procedimento (BURTON et al., 1994). Em cães submetidos a trauma cirúrgico decorrente de implante de enxerto de aorta abdominal, a concentração da CRP aumentou rapidamente após o procedimento, sendo que seu pico ocorreu em até 24 horas (CONNER et al., 1988).

Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), também denominada de orosomucóide, é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 43 kDa, sintetizada e secretada principalmente por hepatócitos (FOURNIER et al., 2000; ECKERSALL, 2008; YUKI et al., 2008). Foi demonstrado que linfócitos produzem AGP, o que pode explicar sua concentração sérica elevada em cães e gatos com linfoma (GAHMBERG e ANDERSON, 1978). A produção extrahepática de AGP foi observada também em humanos nos rins, intestino e coração, e por diferentes tipos de leucócitos (FOURNIER et al., 2000). Em adição, a AGP pode-se originar da próstata e aparecer no fluido seminal (POLAND et al., 2002).

A função biológica da AGP ainda permanece limitada, mas é uma PFA com função na imunomodulação e inflamação (FOURNIER et al., 2000; HOCHPIED et al., 2003.). É conhecida por suprimir a função imune, como a fagocitose de neutrófilos e blastogênese de linfócitos por modular os efeitos da IL-1, IL-6 e do TNF- $\alpha$  (BAUMANN e GAULDIE, 1994). Sua concentração sérica altera-se significativamente após um processo inflamatório (KURIBAYASHI et al., 2003). Em estudos realizados por Ganrot (1973), nos quais avaliou a AGP em cães saudáveis, observou-se, ao se induzir o processo inflamatório, rápido e significativo aumento desta proteína, com duração média de aproximadamente 5,5 dias. Hagman (2011) observou que a concentração média de AGP em cadelas com piometra era quatro vezes maior do que em cadelas saudáveis.

Hayashi et al. (2001) observaram que o procedimento de ovariectomia aumentou a concentração sérica da CRP, assim como da AGP.

A concentração de AGP em cães saudáveis pode variar conforme a idade, o ambiente, a raça e com a gestação (YUKI et al., 2010). Em suínos e bovinos, por exemplo, a concentração é elevada nos recém-nascidos e diminui com a maturidade (ITOH et al., 1993a; ITOH et al., 1993b). Em cães filhotes, a concentração da AGP é baixa e aumenta gradualmente com a idade (FOURNIER et al., 2000). Yuki et al. (2010) verificaram que a concentração da AGP era 70% menor em recém-nascidos em relação a cães adultos saudáveis e que não houve diferença entre os sexos. Kuribayashi et al. (2003) demonstraram que em cadelas gestantes a concentração da AGP dobrou em relação a concentração média de cadelas não gestantes e saudáveis. Isto ocorre devido uma reação inflamatória induzida por invasão endometrial embrionária (CERÓN et al., 2005).

Yuki et al. (2010) relataram que a concentração sérica da AGP esteve mais elevada em cães com infecções, especialmente agudas, além de ser um marcador útil para avaliar o curso de distúrbios inflamatórios, uma vez que o processo de reparação continua ocorrendo se a concentração da AGP permanecer aumentada.

A ceruloplasmina (Cp) é uma  $\alpha_2$ -glicoproteína considerada uma PFA moderada em cães (CERÓN e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004). Possui peso molecular de 151 kDa e é sintetizada principalmente por hepatócitos (HELLMAN e GITLIN, 2002). Esta proteína é a principal proteína de ligação do metal cobre no sangue. Atua como um agente antiinflamatório devido a sua capacidade de minimizar a formação de radical aniônico superóxido, gerado por leucócitos polimorfonucleares durante a inflamação e que poderia causar danos teciduais (BROADLEY e HOOVER, 1989). Solter et al. (1991) comprovaram que tanto a Cp como a haptoglobina, são seis vezes mais sensíveis do que a concentração de fibrinogênio e a contagem de leucócitos na detecção de processos inflamatórios em cães. Em cães, ocorreu um aumento intenso na concentração de Cp após um trauma cirúrgico, decorrente de implante de enxerto de aorta abdominal, ocorrendo pico duas a três vezes acima do valor de referência 96 horas após o procedimento (CONNER et al., 1988). No estudo realizado por Serin e Ulutas (2010) a concentração da Cp

aumentou significativamente, em relação aos valores pré-cirúrgicos, após ovariectomia em cadelas, com pico em até 72 horas após o procedimento.

A haptoglobina (Hp) é uma PFA moderada em cães e possui peso molecular de 81 kDa (SHIM et al., 1971). A maioria das suas atividades está relacionada à formação do complexo Hp-hemoglobina. Atua também regulando as reações da imunidade inata sobre os leucócitos (resposta antiinflamatória) e possui efeito bacteriostático direto, ou seja, a Hp torna o ferro indisponível para a bactéria que o necessita para seu crescimento (CECILIANI et al., 2012). Pulmão, tecido adiposo, baço e rins também podem produzir a Hp (DOBRYSYCKA, 1997; EBERSOLE e CAPPELLI, 2000). Em modelos experimentais de mastite, autores demonstraram que há produção de Hp na glândula inflamada, sendo possível detectá-la em amostras do leite (ECKERSALL et al., 2006).

A Hp canina é particularmente sensível aos glicocorticóides. Assim, concentrações elevadas desta proteína podem ser encontradas após o tratamento com glicocorticóides (HARVEY e WEST, 1987; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2004). Foi demonstrado aumento nas concentrações de Hp e fibrinogênio em cães com hiperadrenocorticism, com ou sem inflamação (McGROTTY et al., 2005; CALDIN et al., 2009). Couto et al. (2009) demonstraram que cães da raça Greyhound sadios apresentaram concentrações séricas menores de Hp do que cães de outras raças, sugerindo assim, que deve-se estar atento ao interpretar resultados de PFA nas diferentes raças de cães.

Pela determinação da concentração da Hp, se realizada em conjunto com o amilóide A sérico (SAA), pode-se diferenciar condições inflamatórias agudas e crônicas, com maior e melhor eficácia do que a contagem de neutrófilos segmentados e bastonetes (HORADAGODA et al., 1999). A resposta da Hp em cães ao trauma cirúrgico segue o mesmo curso de humanos, com pico nas suas concentrações 120 horas após a cirurgia, seguido por declínio gradual (CONNER et al., 1988). Ao contrário do que ocorre em bovinos, a Hp em cães é um constituinte normal do soro e seus níveis dobram após uma cirurgia (ECKERSALL e CONNER, 1988). Em ruminantes, a Hp é considerada a

principal PFA, pois sua concentração pode aumentar 100 vezes em 48 horas diante de uma inflamação (ECKERSALL e BELL, 2010).

Em cadelas que foram submetidas a ovariectomia para tratamento de piometra, as concentrações de Hp apresentaram-se significativamente aumentadas naquelas com complicações no período pós-operatório. No grupo de cadelas sem complicações no período pós-operatório, as concentrações de Hp se mantiveram semelhantes aos valores da avaliação pré-cirúrgica (DABROWSKI et al., 2009). Serin e Ulutas (2010) observaram aumento significativo nas concentrações da Hp 48 e 72 horas após o procedimento de ovariectomia em cadelas, em relação aos valores pré-operatórios. Dabrowski et al. (2007) observaram um aumento significativo na concentração da Hp somente 72 e 120 horas após a ovariectomia em cadelas saudáveis, em relação aos valores pré-cirúrgicos.

O amiloide A sérico (SAA) é uma proteína com um peso molecular de 15 kDa (CERÓN et al., 2005). Seu papel fisiológico na defesa durante a inflamação não é bem conhecido, mas inclui a detoxificação de endotoxinas, inibição de linfócitos, inibição da proliferação de células endoteliais, inibição de agregação plaquetária e inibição da adesão do linfócito T à proteína da matriz celular (URIELI-SHOVAL et al., 2000). O SAA está envolvido no recrutamento quimiotático de células inflamatórias ao local da infecção (XU et al., 1995).

O SAA possui três isoformas denominadas SAA1, SAA2 e SAA3. As duas principais isoformas circulantes são o SAA1 e SAA2, os quais são produzidos pelo fígado durante a resposta de fase aguda. A isoforma SAA3 é sintetizada principalmente em tecidos extrahepáticos (CECILIANI et al., 2012). Eckersall et al. (2006) demonstraram que a concentração de SAA3 mamária (M-SAA3) estava significativamente maior nas células epiteliais secretoras das glândulas mamárias infectadas por bactérias patogênicas. Portanto, além de sua produção hepática, há também produção em tecidos como intestino, rim, medula óssea, adipócitos (quando há hiperglicemia) e glândula mamária (em casos de mastite) em diferentes espécies animais, servindo como potencial marcador local de atividade inflamatória (LIN et al., 2001; CERÓN et al., 2005; CECILIANI et al., 2012).

Em cães, o SAA é considerado uma das principais PFAs por sua concentração elevada durante a resposta de fase aguda e por seu rápido

declínio com a resolução do distúrbio inflamatório (CERÓN et al., 2005). Segundo Dabrowski et al. (2007), as concentrações de CRP e SAA refletem a ativação do sistema imune e podem ser usadas para avaliar o estado de saúde de cadelas ou monitorar complicações pós-operatórias, pois cadelas com piometra apresentaram concentrações muito elevadas de CRP e SAA, como resultado de uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos e macrófagos. Após a ovariectomia, essas concentrações diminuíram gradativamente, demonstrando a resolução do processo e a diminuição da resposta inflamatória à agressão cirúrgica.

Em gatos, o SAA é um indicador de atividade inflamatória ou infecciosa, especialmente em estágios adiantados, pois sua resposta é bem rápida nesses animais (KAJIKAWA et al., 1999). Em equinos, o SAA também é considerado como a principal proteína de fase aguda (JACOBSEN e ANDERSEN, 2007).

A  $\alpha_1$ -antitripsina é uma proteína inibidora de protease com resposta de fase aguda moderada em cães. Ela é sintetizada principalmente no fígado durante a resposta inflamatória para remover proteases que são liberadas por fagócitos e outras células do sistema imune no local da injúria minimizando os efeitos prejudiciais ao tecido (MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008). Em humanos, as concentrações desta proteína aumentam por trauma, hemorragia, neoplasia e durante a gestação (CRYSTAL, 1990).

Conner et al. (1988) observaram que as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina não aumentaram significativamente em cães submetidos a um procedimento cirúrgico para implantar enxerto de aorta abdominal. Os autores sugeriram que a ausência de resposta da proteína após cirurgias em cães junto ao fato da  $\alpha_1$ -antiquimotripsina, outra PFA em humanos do grupo de antiproteases, estar ausente no plasma canino, poderia indicar que o sistema inibidor de proteases que age durante a resposta de fase aguda no cão difere deste mesmo sistema no homem, uma vez que as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina dobraram após procedimento cirúrgico de colecistectomia nesta espécie. Hughes et al. (1995) observaram que as concentrações séricas desta proteína não apresentaram diferenças entre cães saudáveis e hospitalizados, no entanto, verificaram que cadelas saudáveis castradas possuíam concentrações significativamente menores que cadelas saudáveis não castradas.

A transferrina, considerada uma PFA negativa em mamíferos, é uma glicoproteína sanguínea responsável pelo transporte de ferro na circulação. Em cães e gatos, a determinação das suas concentrações tem sido usada amplamente para a avaliação do metabolismo do ferro e homeostase (CERÓN et al., 2005). Concentrações diminuídas de transferrina podem ser consequência da sua produção inadequada por danos nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica (ECKERSALL, 2008). Em um estudo realizado em humanos, a concentração da transferrina diminuiu no período pós-operatório de cirurgias abdominais (BUTTENSCHOEN et al., 2001).

A magnitude do aumento das proteínas de fase aguda foi relacionada à intensidade do trauma cirúrgico, sendo ampla quando ocorre uma lesão tecidual mais severa, tal como uma cirurgia ortopédica (CASPI et al., 1987; MURATA et al., 2004).

Como anteriormente citado, Serin e Ulutas (2010), demonstraram que a CRP, Hp e Cp podem ser utilizadas como marcadores diagnósticos de rotina para avaliar complicações pós-operatórias, assim como monitorar a recuperação, pois verificaram rápida elevação nas concentrações destas proteínas após ovariectomia e declínio gradual das concentrações de Hp e Cp, coincidindo com a recuperação das cadelas.

Existem vários métodos validados para a determinação das concentrações das PFAs em cães. A concentração de CRP em cães geralmente é determinada através de imunoensaio usando anticorpos CRP específicos para cães, e vários formatos foram desenvolvidos e descritos, como o método de imunoturbidimetria, ELISA, imunodifusão, teste de aglutinação em látex ou por meio de kits comerciais (ECKERSALL et al., 1989; ECKERSALL et al., 1991; YAMAMOTO et al., 1994; TAGATA et al., 1996; KJELGAARD-HANSEN et al., 2003a; KJELGAARD-HANSEN et al., 2003b). Para determinar a concentração do SAA em cães é usado o método de ELISA, aglutinação em látex por imunoturbidimetria ou por kit comercial para ELISA (YAMAMOTO et al., 1994; MARTÍNEZ-SUBIELA e CERÓN, 2005; CHRISTENSEN et al., 2012).

As concentrações da Hp podem ser determinadas por nefelometria, por espectrofotometria ou através de Kit comercial para analisador bioquímico (HARVEY e WEST, 1987; WEIDMEYER e SOLTER, 1996; MARTÍNEZ-

SUBIELA e CERÓN, 2005). A concentração da AGP pode ser determinada por imunodifusão radial simples ou pelo método de imunoturbidimetria, e um dos métodos de determinação da Cp é por espectrofotometria (ECKERSALL et al., 1999; KURIBAYASHI et al., 2003; CERÓN e MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004).

Outra forma de determinar as concentrações das PFAs é pela eletroforese. Esta técnica é uma ferramenta importante para o fracionamento de proteínas do sangue. Atualmente, em termos de pesquisa, a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) vem sendo utilizada, apesar de não estar ainda totalmente validada para as diferentes espécies de animais domésticos. Com esta técnica, as proteínas são agrupadas numa série de bandas definidas pela sua massa molecular relativa (ECKERSALL, 2008).

De qualquer forma, a separação das proteínas séricas pela técnica do SDS-PAGE já revelou alterações nas bandas de proteínas causadas por patologias em pôneis e cães (FAGLIARI et al., 1998; KIRAL et al., 2004), mas este método ainda não está amplamente difundido em laboratórios diagnósticos (ECKERSALL, 2008).

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

Nesse contexto, o emprego da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) é de grande valia, pois se trata de uma técnica relativamente simples e de baixo custo, possibilitando a visualização de concentrações séricas extremamente baixas e a identificação de várias proteínas (GORDON, 1995), entre 20 a 30 proteínas, inclusive proteínas de fase aguda da resposta inflamatória e imunoglobulinas.

Alves et al. (2010) identificaram, ao utilizar a eletroforese por SDS-PAGE, 29 proteínas no proteinograma sérico de gatas submetidas à ovariectomia convencional e por videolaparoscopia e observaram resposta inflamatória mais

intensa nas fêmeas submetidas a ovariectomia convencional, evidenciada pela elevação nas concentrações de ceruloplasmina, hemopexina, haptoglobina e  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida no traçado eletroforético.

Schmidt et al. (2011) também utilizaram a eletroforese por SDS-PAGE e identificaram, em cadelas submetidas a ovariohisterectomia, diminuição nas concentrações de ceruloplasmina após o procedimento cirúrgico, indicando uma possível relação entre a síntese desta proteína e a ausência do 17-beta estradiol.

A principal aplicação das PFAs em animais de companhia está, possivelmente, na realização de exames de triagem que avaliem as condições de saúde do animal, pois a ampla natureza de condições que estimulam a sua produção torna-se uma vantagem, uma vez que permitiria investigações adicionais para auxiliar no diagnóstico da patofisiologia do processo inflamatório, caso os resultados desses exames fossem positivos. Outra aplicação importante de testes que incluem PFAs é para confirmação do estado de saúde do animal a ser utilizado em procedimentos experimentais, não somente para verificar condições de bem-estar do animal, mas também para garantir o estado de saúde semelhante desses animais antes do início dos experimentos (ECKERSALL, 2004).

Como a concentração sanguínea das PFAs é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual e/ou de inflamação (CERÓN et al., 2005), espera-se que animais com complicações pós-operatórias apresentem concentrações protéicas mais elevadas (GRUYS et al., 1994). Assim, as PFAs podem ser utilizadas como ferramentas para avaliar a intensidade e monitorar a resposta inflamatória no período pós-operatório (DABROWSKI et al., 2007).

## **2.1 OBJETIVOS**

### **2.1.1 Objetivo Geral**

O objetivo do presente estudo foi verificar a resposta inflamatória em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia por duas técnicas distintas: minimamente invasiva, com o emprego de abraçadeiras auto-estáticas de náilon, e por laparotomia, com a utilização de fio náilon, como métodos de ligadura de pedículos ovarianos e coto uterino.

### **2.1.2 Objetivos Específicos**

Verificar a intensidade da resposta inflamatória pela avaliação do leucograma e das concentrações das proteínas de fase aguda em cadelas comparando-se as duas técnicas de ovariossalpingohisterectomia, minimamente invasiva e convencional.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (194/2011 - CEUA) da FMVZ, UNESP - Câmpus de Botucatu (Anexo).

#### **3.1 Animais**

Foram utilizadas 30 cadelas saudáveis, sem raça definida, com idade entre um ano e meio e sete anos pesando em média 10 Kg. Os animais foram considerados em condição de higiene após as avaliações clínica e laboratorial.

Como avaliação pré-operatória, amostras de soro foram obtidas antes do procedimento cirúrgico e foram submetidas à determinação da concentração de creatinina e da atividade de alanina aminotransferase (ALT). Nas amostras de sangue total foram obtidos o hemograma e o teor plasmático de fibrinogênio e da proteína total.

Os resultados do hemograma e os valores de fibrinogênio e da proteína plasmática total dos animais dos dois grupos (G1 e G2) estavam dentro dos valores de referência para a espécie (JAIN, 1993) (Anexo A). As cadelas do G1 apresentaram concentração sérica de creatinina entre 0,50 e 0,72 mg/dL e atividade sérica da enzima ALT entre 23 e 48 UI/L; as cadelas do G2 apresentaram concentração sérica de creatinina entre 0,57 e 1,02 mg/dL e atividade sérica da enzima ALT entre 26 e 39 UI/L. Portanto, todos os valores estavam de acordo com os limites de referência para a espécie (KANEKO et al., 2008) (Anexo B).

Os animais foram mantidos em jejum sólido de 12 horas e hídrico de três horas antes da ovariossalpingohisterectomia (OSH) e foram distribuídos em dois grupos com 15 cadelas cada. No grupo 1 (G1) foi realizada a OSH pela técnica minimamente invasiva com o uso de abraçadeiras auto-estáticas de náilon (CASTRO et al., 2004; SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2010) e no grupo 2 (G2) foi realizada a OSH convencional utilizando-se fio de náilon (STONE, 2007).

### **3.2 Protocolo anestésico e antimicrobiano**

Em todos os animais foi utilizada a associação de acepromazina (0,05 mg/Kg) e morfina (0,5 mg/Kg) por via intramuscular (IM), e meloxicam (0,2 mg/Kg) também IM, como pré-anestésicos. Após 15 minutos da administração dos medicamentos acima, foi realizada a canulação da veia cefálica e posterior infusão de solução fisiológica (10 mL/Kg/hora). Em seguida, a anestesia geral foi induzida através da administração da associação de cetamina (10 mg/Kg) e diazepam (0,5 mg/Kg) por via intravenosa (IV). Quando necessário, os animais receberam cetamina (3 mg/Kg) IV para manutenção da anestesia. Após o término do procedimento cirúrgico, todos os animais receberam Pentabiótico Veterinário® na dose de 0,1 mL/Kg IM (Fort-Dodge, Campinas, SP, Brasil) como medida profilática.

### **3.3 Técnica de OSH minimamente invasiva**

Para a realização das cirurgias do G1 os animais foram posicionados em decúbito dorsal e a região abdominal ventral foi submetida à tricotomia e antisepsia com álcool iodado. Foram efetuadas incisões de pele de aproximadamente dois centímetros, na linha média, caudal a cicatriz umbilical. A cavidade abdominal foi acessada por incisão na linha alba. Com auxílio de um gancho de ovário, estes e os respectivos pedículos foram exteriorizados e ligados com abraçadeiras auto-estáticas de náilon e, em seguida, foi efetuada a ligadura do corpo uterino acima da cérvix utilizando-se o mesmo tipo de material (Figura 1A). A síntese da parede abdominal foi realizada com sutura tipo Sultan, do tecido subcutâneo com sutura tipo simples e da pele com pontos simples isolados. O fio usado para a síntese em todas as etapas foi o mononáilon agulhado 2-0 ou 3-0 (CASTRO et al., 2004; SILVA et al., 2004; LIMA et al., 2010). Não foi observada nenhuma intercorrência no pós-operatório e a sutura de pele de todas as cadelas foi removida sete dias após a OSH.

O procedimento cirúrgico deste grupo de animais foi realizado por um único cirurgião no Centro Cirúrgico de Pequenos Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu, sendo as cadelas

oriundas da Associação de Proteção aos Animais do município de Botucatu (APA), cujos proprietários tinham interesse em realizar OSH eletiva em seus animais.

### 3.4 Técnica de OSH convencional

No G2, a OSH foi realizada por laparotomia (técnica convencional) e a ligadura dos pedículos ovarianos e corpo uterino foram efetuadas utilizando-se fio náilon agulhado 2-0 (Figura 1B). A sutura da camada muscular, do subcutâneo e da pele seguiu-se da mesma forma do G1, assim como o tipo de fio utilizado (STONE, 2007). Não foi observada nenhuma intercorrência no pós-operatório e a sutura de pele de todos os animais deste grupo também foi removida no sétimo dia de pós-operatório.

Neste grupo de animais, o procedimento cirúrgico foi realizado em uma clínica particular por um único cirurgião em todos os animais. As cadelas eram provenientes do município de Ipaussu, SP, cujos proprietários tinham interesse em realizar OSH eletiva.

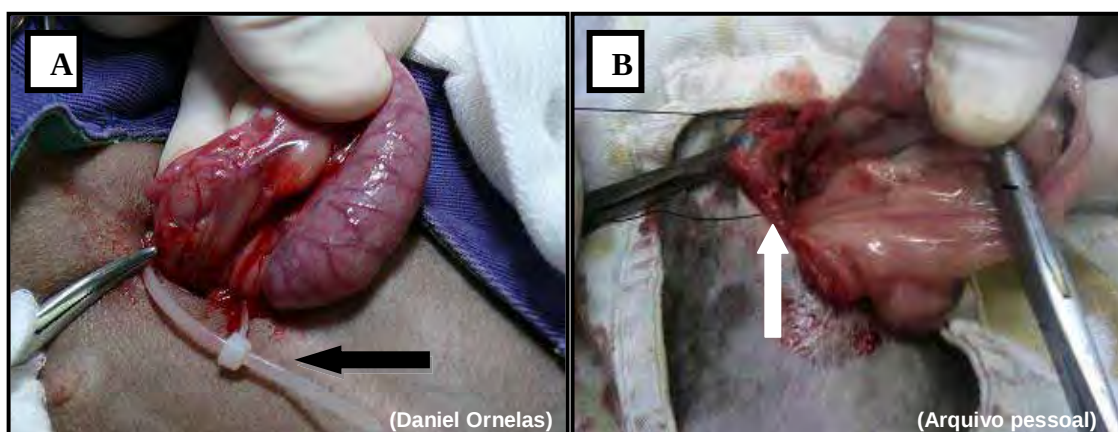


FIGURA 1A: Abraçadeira (seta preta) utilizada durante a ligadura do pedículo ovariano na técnica de OSH minimamente invasiva em cadelas. FIGURA 1B: Fio de náilon (seta branca) utilizado durante a ligadura do pedículo ovariano na técnica de OSH convencional em cadelas.

### **3.5 Colheita de amostras de soro**

Amostras de sangue de todos os animais foram obtidas mediante punção jugular ou cefálica, em tubos sem anticoagulante, para obtenção do soro, e com o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), para obtenção de sangue total, em quatro momentos distintos: pré-operatório, ou seja, 24 horas antes da OSH (T1), 24 horas (T2), 48 horas (T3) e sete dias (T4) após a realização do procedimento cirúrgico.

### **3.6 Técnicas para realização do hemograma**

O hemograma foi realizado em aparelho automatizado (Ebram 18 Hemascreen®). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Panótico Rápido onde foram contadas 100 células estabelecendo-se o percentual de cada componente celular (JAIN, 1986).

### **3.7 Técnica para determinação da concentração sérica de creatinina e da atividade da ALT**

As concentrações séricas de creatinina e da ALT foram determinadas por kits bioquímicos comerciais (Katal® - Belo Horizonte, MG) com leitura em espectrofotômetro automatizado (Cobas Mira - Roche®).

### **3.8 Técnica para determinação do teor de fibrinogênio**

A determinação do fibrinogênio plasmático foi feita pela técnica de precipitação térmica (JAIN, 1986).

### **3.9 Técnica para determinação do teor de proteína plasmática total**

A concentração plasmática de proteína total foi determinada por refratometria (JAIN, 1986).

### **3.10 Técnicas para determinação do proteinograma sérico**

#### **3.10.1 Determinação das concentrações séricas de proteína total**

As concentrações séricas da proteína total (PST) foram determinadas pelo método do biureto (GORNALL et al., 1949) nas amostras de todos os momentos (24 antes da OSH, 24 horas, 48 horas e sete dias após o procedimento cirúrgico) utilizando-se kit bioquímico comercial (Katal<sup>®</sup> - Belo Horizonte, MG) e leitura em espectrofotômetro automatizado (Cobas Mira - Roche<sup>®</sup>). Essas análises foram realizadas no Laboratório Clínico do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, Câmpus de Botucatu.

#### **3.10.2 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas**

O perfil das proteínas séricas totais foi obtido em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). O fracionamento eletroforético foi realizado de acordo com técnica descrita por LAEMMLI (1970), em um sistema de eletroforese unidimensional em géis de poliacrilamida com 4 a 10% de gradiente. As amostras de soro (10µL) foram diluídas em 30µL de tampão-fosfato (PBS) e 20µL de gel mix (10% água, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10mM de ácido etilenodiaminotetracético, 20mM fosfato-tris de pH 7,4, 5% glicerol e 0,001% azul de bromofenol como corante). A corrente elétrica foi programada em 35 e 50mA, enquanto as amostras estavam nos géis de separação e empilhamento, respectivamente. Após o fracionamento, o gel foi corado em solução de azul de coomassie brilhante 0,2% por duas horas. Posteriormente, o gel foi descorado em solução de metanol, ácido acético e água até o aparecimento das frações proteicas (Figura 2). As concentrações dessas frações foram determinadas de acordo com método descrito por Fagliari et al. (1998) utilizando-se videodensitômetro (9301PC Shimadzu, Tokyo, Japan). As proteínas foram identificadas utilizando-se marcadores (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) com pesos moleculares de 200.000; 116.000; 97.000; 66.000; 55.000; 45.000; 36.000; 29.000 e 20.000 dáltons (Figura 2). Adicionalmente, também foram utilizadas proteínas purificadas (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) albumina, haptoglobina,

ceruloplasmina e transferrina. Essas análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da FCAV – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.

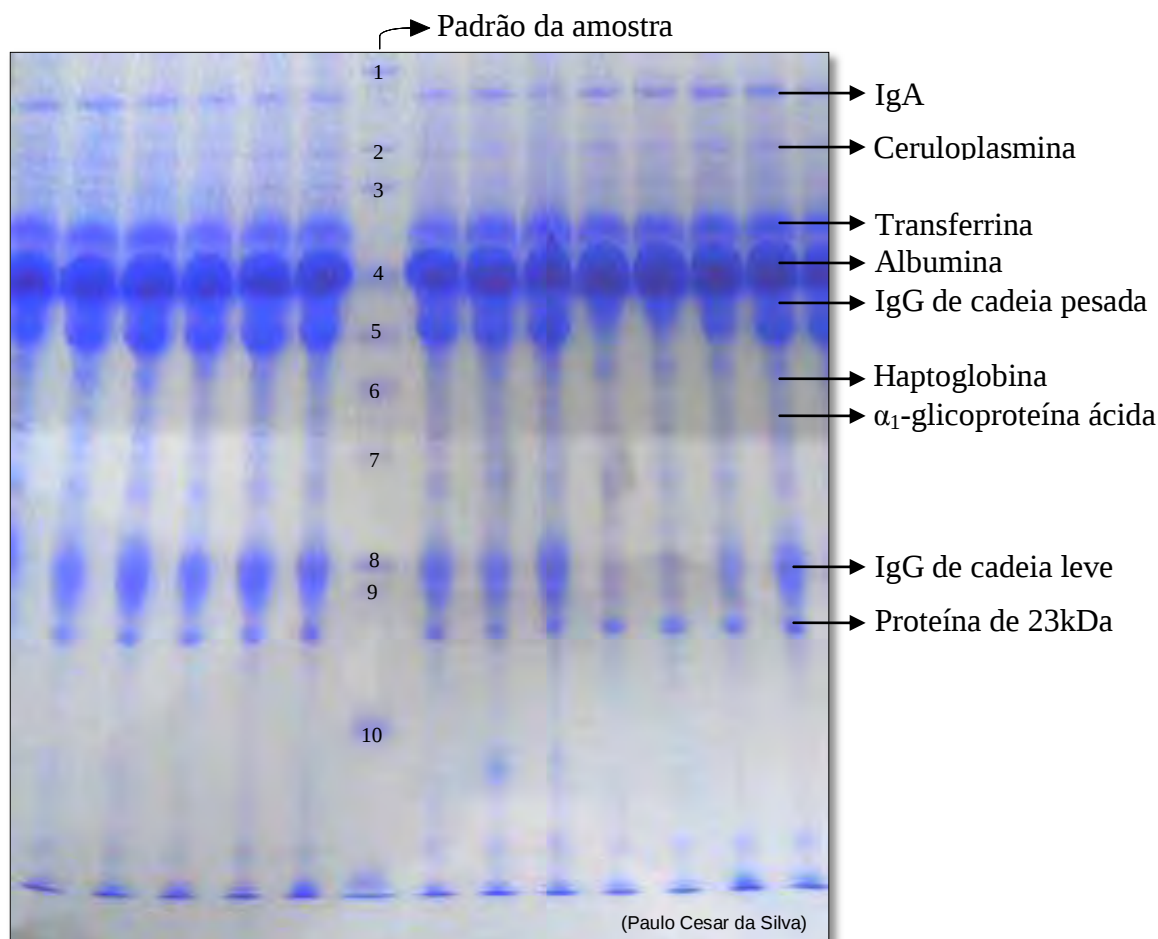


FIGURA 2: Gel com as frações proteicas após ser descorado em solução de metanol, ácido acético e água. Setas pretas: exemplos de algumas das frações proteicas observadas nas amostras de cadelas submetidas ao estudo. Padrão da amostra: 1= 200 kDa; 2= 116 kDa; 3= 97 kDa; 4= 66 kDa; 5= 55 kDa; 6= 45 kDa; 7= 36 kDa; 8= 29 kDa; 9= 24 kDa; 10= 20 kDa.

### 3.11 Delineamento experimental

Na análise dos dados utilizaram-se testes paramétricos e não paramétricos, levando-se em consideração a natureza das variáveis estudadas. Para avaliar os resultados entre os quatro momentos (24 horas antes da OSH, 24 horas, 48 horas e sete dias após os procedimentos cirúrgicos) no mesmo grupo de animais utilizou-se a Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas e, quando os pressupostos necessários à análise de variância

paramétrica não foram cumpridos e/ou alcançados, utilizou-se o teste não paramétrico de Friedman.

Para comparar os resultados entre os dois grupos de animais (G1 e G2), utilizou-se o teste t de Student, e como teste substituto ao t de Student, utilizou-se o teste não-paramétrico de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW), pois os pressupostos para a aplicabilidade do teste t Student são mais exigentes, ou seja, as populações de onde as amostras provêm têm distribuição normal. No entanto, para o teste de WMW as duas amostras são aleatórias e as observações independentes tanto entre quanto dentro das amostras, e a variável de interesse tem uma distribuição subjacente contínua.

Os dados foram analisados com 5% de significância ( $p < 0,05$ ).

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Leucograma**

#### **4.1.1 Leucograma nos diferentes momentos, para cada técnica cirúrgica**

Foi observado aumento ( $p < 0,001$ ) no número de leucócitos e de neutrófilos segmentados no T2, ou seja, 24 horas após a cirurgia do G1 (Tabela 1).

Nos animais do G2 notou-se aumento ( $p < 0,001$ ) no número de leucócitos e de neutrófilos segmentados também no T2, ou seja, 24 horas após o procedimento cirúrgico (Tabela 1).

Em relação ao número de neutrófilos bastonetes, foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em alguns momentos nos dois grupos, porém não houve desvio nuclear de neutrófilos à esquerda nos momentos avaliados (Tabela 1).

#### **4.1.2 Leucograma nas duas técnicas cirúrgicas**

Os grupos apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) no número de leucócitos no T4, ou seja, sete dias após o procedimento cirúrgico. Em relação aos números de neutrófilos segmentados, notou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os dois grupos apenas no T1. Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos números de linfócitos em todos os momentos. Em relação aos números de eosinófilos, verificou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no T3 e T4. Em relação ao número de neutrófilos bastonetes, ocorreu diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nos momentos T1, T2 e T4 (Tabela 2).

TABELA 1. Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis do leucograma nos diferentes momentos de cada grupo (G1 e G2) de cadelas submetidas a OSH

|                              | Momentos avaliados         |                                   |                                   |                                 | Valores de referência para cães (Jain, 1993) |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|
|                              | Pré-cirúrgico (T1)         | 24 horas após o procedimento (T2) | 48 horas após o procedimento (T3) | 7 dias após o procedimento (T4) |                                              |
| Leucócitos totais (µL)       |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 15.500 (14.000 - 17.125) z | 17.600 (13.650 - 22.075) x        | 14.300 (11.300 - 18.649) y        | 11.400 (9.225 - 14.625) y       | 6.000 - 17.000                               |
| G2                           | 13.970 ± 4.134 a           | 22.481 ± 6.517 b                  | 16.862 ± 4.015 a                  | 14.756 ± 4.137 a                |                                              |
| Neutrófilos bastonetes (µL)  |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 0 (0 - 97,5) x             | 113 (0 - 251,5) y                 | 0 (0 - 0) x                       | 0 (0 - 0) x                     | 0 - 300                                      |
| G2                           | 0 (0 - 0) x                | 0 (0 - 0) y                       | 0 (0 - 191,5) y                   | 0 (0 - 135) y                   |                                              |
| Neutrófilos segmentados (µL) |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 12.012 (10.660 - 13.881) z | 14.490 (10.494 - 18.900) x        | 9.798 (8.562 - 11.715) y          | 8.260 (8.260 - 9.420) y         | 3.000 - 11.500                               |
| G2                           | 9.160 ± 3.055 a            | 17.853 ± 5.967 b                  | 11.376 ± 3.276 a                  | 9.530 ± 3.620 a                 |                                              |
| Linfócitos (µL)              |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 1.384 (870 - 2.510)        | 1.846 ±1.047                      | 2.088 ±1.330                      | 2430 ±1.353                     | 1.000 - 4.800                                |
| G2                           | 4.329 (2.234 - 5.055)      | 3.280 ±1.439                      | 3.965 ± 2.225                     | 4038 ±1.752                     |                                              |
| Monócitos (µL)               |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 578 ± 340                  | 849 ± 759                         | 718 ± 585                         | 470 ± 343                       | 150 - 1.350                                  |
| G2                           | 468 (126 - 691)            | 459 (443 - 780)                   | 659 (394 - 854)                   | 465 (153 - 669)                 |                                              |
| Eosinófilos (µL)             |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 1.141 (401 - 1.897)        | 784 (284 - 2.510)                 | 1845 ± 1.480                      | 1.133 ± 654                     | 100 - 1.250                                  |
| G2                           | 370 (0 - 938)              | 371 (37 - 802)                    | 662 ±1.066                        | 533 ± 648                       |                                              |
| Basófilos (µL)               |                            |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                           | 0                          | 0                                 | 0                                 | 0                               | Raros                                        |
| G2                           | 0                          | 0                                 | 0                                 | 0                               |                                              |

G1: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia minimamente invasiva. G2: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia convencional. Médias e desvio padrão ou medianas e intervalo entre quartis seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre momentos (p<0,05). Média e desvio padrão (ANOVA): a, b, c. Mediana e intervalo entre quartis (Teste de Friedman): x, y, z.

TABELA 2. Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis do leucograma nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas a OSH

|                                                     | Momentos avaliados      |                                   |                                   |                                 | Valores de referência para cães (Jain, 1993) |
|-----------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------------------------------|
|                                                     | Pré-cirúrgico (T1)      | 24 horas após o procedimento (T2) | 48 horas após o procedimento (T3) | 7 dias após o procedimento (T4) |                                              |
| <b>Leucócitos totais (/<math>\mu</math>L)</b>       |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 15.500 $\pm$ 4.486      | 17.600 $\pm$ 7.921                | 14.300 $\pm$ 6.655                | 11.400 $\pm$ 4.468 A            | 6.000 - 17.000                               |
| G2                                                  | 13.970 $\pm$ 4.134      | 22.481 $\pm$ 6.517                | 16.862 $\pm$ 4.015                | 14.756 $\pm$ 4.137 B            |                                              |
| <b>Neutrófilos bastonetes (/<math>\mu</math>L)</b>  |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 0 (0 - 97) X            | 113 (0 - 251) X                   | 0 (0 - 0)                         | 0 (0 - 0) X                     | 0 - 300                                      |
| G2                                                  | 0 (0 - 0) Y             | 0 (0 - 0) Y                       | 0 (0 - 191)                       | 0 (0 - 135) Y                   |                                              |
| <b>Neutrófilos segmentados (/<math>\mu</math>L)</b> |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 12.012 $\pm$ 3.404 A    | 14.490 $\pm$ 5.519                | 9.798 $\pm$ 4.319                 | 8.260 $\pm$ 2.682               | 3.000 - 11.500                               |
| G2                                                  | 9.160 $\pm$ 3.055 B     | 17.853 $\pm$ 5.967                | 11.376 $\pm$ 3.276                | 9.530 $\pm$ 3.620               |                                              |
| <b>Linfócitos (/<math>\mu</math>L)</b>              |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 1.384 (870 - 2.510) X   | 1.846 $\pm$ 1.047 A               | 2.088 $\pm$ 1.330 A               | 2430 $\pm$ 1.353 A              | 1.000 - 4.800                                |
| G2                                                  | 4.329 (2.234 - 5.055) Y | 3.280 $\pm$ 1.439 B               | 3.965 $\pm$ 2.225 B               | 4038 $\pm$ 1.752 B              |                                              |
| <b>Monócitos (/<math>\mu</math>L)</b>               |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 578 $\pm$ 340           | 849 (367 - 1.045)                 | 718 (363 - 752)                   | 470 (280 - 576)                 | 150 - 1.350                                  |
| G2                                                  | 468 $\pm$ 378           | 459 (443 - 780)                   | 659 (394 - 854)                   | 465 (153 - 669)                 |                                              |
| <b>Eosinófilos (/<math>\mu</math>L)</b>             |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 1.141 (401 - 1.897)     | 784 (284 - 2.510)                 | 1845 $\pm$ 1.480 A                | 1.133 $\pm$ 654 A               | 100 - 1.250                                  |
| G2                                                  | 370 (0 - 938)           | 371 (37 - 802)                    | 662 $\pm$ 1.066 B                 | 533 $\pm$ 648 B                 |                                              |
| <b>Basófilos (/<math>\mu</math>L)</b>               |                         |                                   |                                   |                                 |                                              |
| G1                                                  | 0                       | 0                                 | 0                                 | 0                               | Raros                                        |
| G2                                                  | 0                       | 0                                 | 0                                 | 0                               |                                              |

G1: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia minimamente invasiva. G2: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia convencional. Médias e desvio padrão ou medianas e intervalo entre quartis seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos (p<0,05). Média e desvio padrão (t de Student): A, B. Mediana e intervalo entre quartis (Wilcoxon-Mann-Whitney): X, Y.

## **4.2 Proteinograma sérico**

### **4.2.1 Concentrações séricas das proteínas totais e suas frações nos diferentes momentos, em cada técnica cirúrgica**

Nos animais do G1 (OSH minimamente invasiva) notou-se aumento ( $p<0,05$ ) nas concentrações de ceruloplasmina (Cp) no T3, ou seja, 48 horas após a cirurgia quando comparadas ao T1 (pré-operatório). As concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina no G1 nos momentos T3 e T4 (48 horas e sete dias após a cirurgia) diminuíram ( $p<0,05$ ) quando comparadas às concentrações observadas no T1 (Tabela 3).

Nos animais do G2 (OSH convencional) foi observado aumento ( $p<0,05$ ) nas concentrações séricas de proteína total no T2 quando comparadas às concentrações do T1. Para as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina nos momentos T2 e T3 também foram observadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ). Para as concentrações de uma proteína não identificada de 23kDa no momento T3 também foram observadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ) e para concentrações da albumina foram observadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ) no T4 em relação aos momentos T2 e T3 (Tabela 3).

As concentrações das frações proteicas: IgA, transferrina, albumina, haptoglobina (Hp),  $\alpha_1$ -glicoproteína ácida (AGP) e da proteína não identificada de 23kDa não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos quatro momentos avaliados do G1 (Tabela 3).

As concentrações das frações proteicas: IgA, Cp, transferrina, Hp e AGP não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) nos quatro momentos avaliados do G2 (Tabela 3).

### **4.2.2 Concentrações séricas das proteínas totais e suas frações, nas duas técnicas cirúrgicas**

Comparando os mesmos momentos entre os dois grupos, notou-se diferença significativa ( $p<0,001$ ) nas concentrações da PST nos momentos T1, T2 e T3. As concentrações de AGP e da proteína não identificada nominalmente de 23kDa mostraram diferença significativa ( $p<0,05$ ) para todos

os momentos. Em relação às concentrações da Cp, notou-se diferença significativa ( $p < 0,05$ ) apenas no T2, ou seja, 24 horas após os procedimentos cirúrgicos. As concentrações de  $\alpha 1$ -antitripsina e Hp apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os grupos nos momentos T2, T3 e T4, ou seja, 24 horas, 48 horas e sete dias após os procedimentos cirúrgicos (Tabela 3).

Por outro lado, as concentrações séricas de IgA, transferrina e albumina não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) para os quatro momentos avaliados entre as duas técnicas cirúrgicas utilizadas (Tabela 3).

**TABELA 3. Médias, medianas e respectivos desvio padrão e intervalo entre quartis das concentrações séricas da proteína total e suas frações nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH**

| Proteínas e grupos                                     | Momentos avaliados               |                                   |                                   |                                  |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                                                        | Pré-cirúrgico (T1)               | 24 horas após o procedimento (T2) | 48 horas após o procedimento (T3) | 7 dias após o procedimento (T4)  |
| <b>Proteína sérica total (g/dL)</b>                    |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 6,8 ± 0,6 (6,4 - 7,3) A          | 6,6 (6,4 - 7,1) X                 | 6,7 (6,2 - 7,1) X                 | 6,8 (6,4 - 7,4)                  |
| G2                                                     | 7,6 ± 1,0 aB                     | 8,6 ± 0,9 (7,8 - 9,3) bY          | 7,5 ± 1,0 (6,6 - 8,2) aY          | 7,2 ± 1,0 (6,5 - 8,1) a          |
| <b>Albumina (g/dL)</b>                                 |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 3,3 ± 0,4 (2,5 - 3,6)            | 3,2 ± 0,4 (2,8 - 3,5)             | 3,0 (2,7 - 3,7)                   | 3,2 ± 0,4 (2,9 - 3,7)            |
| G2                                                     | 2,9 ± 0,2 ab                     | 3,1 ± 0,4 a                       | 2,9 ± 0,4 (2,7 - 3,4) b           | 2,5 ± 0,5 b                      |
| <b>IgA (mg/dL)</b>                                     |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 34,46 ± 19,33                    | 33,49 ± 15,31                     | 32,16 ± 15,13                     | 34,33 ± 17,85                    |
| G2                                                     | 20,33 (17,14 - 24,00)            | 19,03 (12,10 - 24,38)             | 19,50 (13,51 - 25,94)             | 20,29 (15,35 - 25,03)            |
| <b>α<sub>1</sub>-glicoproteína ácida (AGP) (mg/dL)</b> |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 22,6 (17,4 - 37,4) X             | 29,4 (19,1 - 37,5) X              | 24,3 (18,8 - 36,2) X              | 29,9 ± 12,1 (22,8 - 38,8) A      |
| G2                                                     | 13,2 (10,5 - 25,0) Y             | 10,8 (9,8 - 21,6) Y               | 12,4 (6,3 - 17,5) Y               | 14,1 ± 7,3 (8,4 - 17,9) B        |
| <b>Proteína de 23kDa (mg/dL)</b>                       |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 546,7 ± 160,6 A                  | 494,2 ± 159,2 A                   | 528,4 ± 126,0 A                   | 470,8 ± 150,6 A                  |
| G2                                                     | 848,7 ± 249,2 (711,5 - 897,0) xB | 801,9 ± 117,4 (756,2 - 893,1) xB  | 716,3 ± 125,7 (682,8 - 777,9) yB  | 864,9 ± 165,0 (781,4 - 938,3) xB |
| <b>Ceruloplasmina (Cp) (mg/dL)</b>                     |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 24,6 ± 15,8 a                    | 34,2 ± 9,5 (29,7 - 39,9) abX      | 39,8 ± 16,5 b                     | 31,8 ± 13,2 ab                   |
| G2                                                     | 13,6 ± 15,8 (4,0 - 20,1)         | 18,18 (11,4 - 25,3) Y             | 23,2 ± 18,9 (13,8 - 47,7)         | 25,2 ± 13,7 (9,7 - 31,8)         |
| <b>α<sub>1</sub>-antitripsina (mg/dL)</b>              |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 205,2 ± 100,0 (148,2 - 300,0) x  | 179,0 (138,6 - 309,4) xX          | 145,4 (131,3 - 267,3) yX          | 133,4 ± 85,5 (118,5 - 249,5) y A |
| G2                                                     | 274,3 ± 67,8 ab                  | 300,6 ± 104,7 (208,7 - 397,2) aY  | 252,0 ± 80,5 (194,0 - 313,7) bY   | 262,1 ± 84,3 abB                 |
| <b>Haptoglobina (Hp) (mg/dL)</b>                       |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 27,3 (19,9 - 39,3)               | 27,4 ± 10,8 (23,0 - 36,9) A       | 30,2 ± 10,7 (19,9 - 34,5) A       | 29,2 ± 9,7 (21,0 - 35,1) A       |
| G2                                                     | 18,6 (14,7 - 22,5)               | 20,6 ± 9,6 (14,6 - 21,3) B        | 17,3 ± 6,7 (13,8 - 22,8) B        | 16,1 ± 7,0 (11,8 - 22,1) B       |
| <b>Transferrina (mg/dL)</b>                            |                                  |                                   |                                   |                                  |
| G1                                                     | 223,52 ± 121,52                  | 254,83 ± 94,70                    | 248,66 ± 76,75                    | 278,30 ± 111,73                  |
| G2                                                     | 303,46 ± 123,24                  | 279,83 ± 117,65                   | 287,94 ± 122,06                   | 304,95 ± 140,57                  |

G1: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia minimamente invasiva. G2: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia convencional. Médias e desvio padrão ou medianas e intervalo entre quartis seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre os momentos (p<0,05). Média e desvio padrão (ANOVA): a, b, c. Mediana e intervalo entre quartis (Teste de Friedman): x, y, z. Médias e desvio padrão ou medianas e intervalo entre quartis seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre grupos (p<0,05). Média e desvio padrão (t de Student): A, B. Mediana e intervalo entre quartis (Wilcoxon-Mann-Whitney): X, Y.

## 5 DISCUSSÃO

As cadelas submetidas à OSH convencional apresentaram 13% de aumento ( $p<0,05$ ) nas concentrações da PST ultrapassando os valores de referência para cães 24 horas após o procedimento cirúrgico (Figura 3). O aumento das concentrações da PST pode ocorrer em função de desidratação, mas também em consequência da inflamação, da mesma forma que ocorre com suas frações. Neste caso, sugere-se que ocorreu aumento em função do processo inflamatório causado pelo procedimento cirúrgico, pois no caso de desidratação, as concentrações de albumina também estariam proporcionalmente aumentadas (ECKERSALL, 2008)

As concentrações da PST no G2 estiveram significativamente superiores ( $p<0,001$ ) quando comparadas às concentrações do G1 nos momentos T1, T2 e T3. Neste caso não é possível afirmar que esta diferença significativa entre os grupos tenha sido em função do procedimento cirúrgico, pois isso ocorreu também no período pré-operatório. Segundo Cerón et al. (2005), fatores ambientais podem influenciar nas concentrações da CRP de um cão saudável, podendo levar portanto, à grandes variações intraindividuais. Porém, não existem estudos que mostrem essa relação entre o habitat do animal à uma possível variação nas concentrações da PST, apenas com suas frações. Assim, sugere-se que as origens diferentes das cadelas (Botucatu e Ipaussu) possam ter sido um fator de alteração também desta proteína, uma vez que não houve um controle em relação a alimentação e ambiente dos animais avaliados principalmente no T1 e no T4.

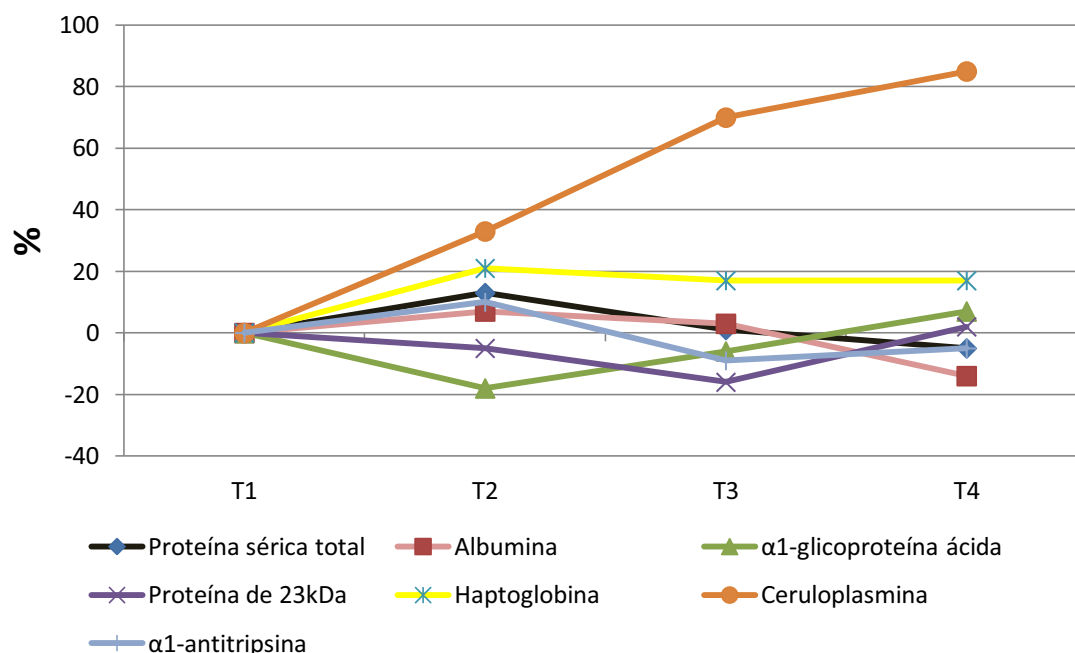


FIGURA 3: Porcentagem de alteração das concentrações séricas da proteína total e suas frações no grupo de cadelas submetidas à OSH convencional. (T1) 24h antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.

A albumina é uma PFA negativa em cães, ou seja, sua concentração diminui durante a resposta de fase aguda a uma infecção, inflamação e ao trauma, devido a uma diminuição na sua produção pelos hepatócitos. A concentração da albumina diminui gradualmente, sendo essa redução mais evidente em distúrbios inflamatórios crônicos em função da meia-vida plasmática da albumina em cães ser de aproximadamente oito dias (ECKERSALL, 2008). Portanto, uma hipoalbuminemia inflamatória pode não ser observada até que a inflamação persista por pelo menos vários dias em cães (STOCKHAM e SCOTT, 2011).

Neste estudo, a concentração da albumina diminuiu 14%, permanecendo abaixo do limite de referência (2,60-3,30 g/dL) para cães sete dias após o procedimento de OSH convencional (Figura 3), sugerindo que isso tenha ocorrido em função da reação inflamatória causada pelo trauma cirúrgico. O mesmo não foi observado no grupo de cadelas submetidas à OSH minimamente invasiva. Estudo anterior relatou que as concentrações da albumina diminuíram em cães com inflamação induzida experimentalmente (YAMASHITA et al., 1994). Entretanto, Nakamura et al. (2008) discordam em usar as concentrações da albumina como marcador inflamatório em cães, pois

suas concentrações podem ser alteradas na desidratação e condições nutricionais inadequadas.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas para as concentrações da AGP entre os momentos de cada grupo, o que difere do observado por Hayashi et al. (2001) que verificaram aumento da concentração desta proteína após o procedimento de OSH em cadelas e por Alves et al. (2010), que observaram aumento significativo nas concentrações da AGP ao comparar duas técnicas cirúrgicas de OSH em gatas.

A AGP suprime a função imune ao modular os efeitos das interleucinas 1, 6 e do TNF- $\alpha$  durante um processo inflamatório. Em consequência disso, suas concentrações séricas alteram-se significativamente (BAUMANN e GALDIE, 1994). No presente estudo as concentrações da AGP do G1 (OSH minimamente invasiva) apresentaram-se significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos quando comparadas aos momentos do G2 (OSH convencional). Porém, sugere-se que isso ocorreu devido às mesmas causas supracitadas, uma vez que estas diferenças entre os grupos ocorreram no momento pré-operatório.

Uma proteína não identificada nominalmente, de 23kDa, foi observada nos traçados eletroforéticos em todos animais, independente do grupo (Figura 3 e 4). Apesar da ausência de informações sobre a sequência gênica desta proteína, Murata et al. (2004) a descreveram como um monômero da cadeia alfa de haptoglobina em bovinos. No entanto, mais pesquisas são necessárias para avaliar a função desta proteína em cães, uma vez que não há dados disponíveis na literatura sobre o exato papel desta fração proteica. Esta fração diminuiu 16% ( $p < 0,05$ ) no T3 das cadelas submetidas à OSH convencional, ou seja, 48 horas após a cirurgia, quando comparadas com o T1 (Figura 3). Em relação às concentrações desta proteína entre os grupos, estas estiveram significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) em todos os momentos do G1 (OSH minimamente invasiva) quando comparadas aos momentos do G2 (OSH convencional). Desta forma, como citado anteriormente, esta proteína também pode ter sofrido influência ambiental devido às diferentes origens dos animais.

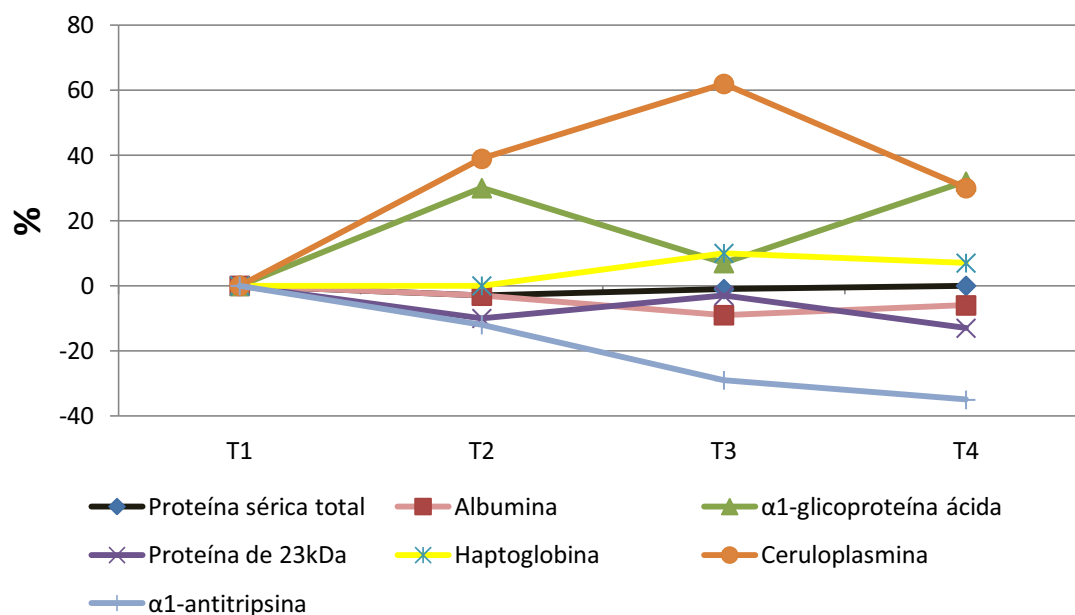


FIGURA 4: Porcentagem de alteração das concentrações séricas da proteína total e suas frações do grupo de cadelas submetidas à OSH minimamente invasiva. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.

As cadelas submetidas à técnica minimamente invasiva apresentaram 62% de aumento ( $p < 0,05$ ) nas concentrações séricas de Cp 48 horas após o procedimento cirúrgico (T3) quando comparadas com o T1 (pré-operatório) (Figura 5). A Cp atua como agente antiinflamatório, pois minimiza a formação de radicais aniônicos superóxidos liberados pelos leucócitos durante a inflamação (BROADLEY e HOOVER, 1989). Como a Cp é considerada uma PFA moderada em cães (CERÓN et al., 2005), o processo inflamatório causado pelo procedimento cirúrgico minimamente invasivo causou o aumento das suas concentrações 48 horas após a indução da inflamação pela cirurgia.

Conner et al. (1988) verificaram que houve pequeno aumento nas concentrações da Cp 24 horas após cirurgia para implante de enxerto de aorta abdominal em cães, mas 96 horas após o procedimento os autores observaram aumento de 140% nas concentrações desta proteína, demonstrando sua ação como proteína de fase aguda moderada. Por outro lado, Serin e Ulutas (2010) observaram aumento de 86% nas concentrações da Cp 72 horas após OSH em cadelas. No mesmo estudo, foram determinadas as concentrações da CRP que apresentaram aumento significativo das suas concentrações 24 horas após a cirurgia. Entretanto, Alves et al. (2010) observaram que a Cp foi a proteína

que apresentou menor porcentagem de aumento nas suas concentrações após o procedimento de ovariectomia convencional e por laparoscopia em gatas.

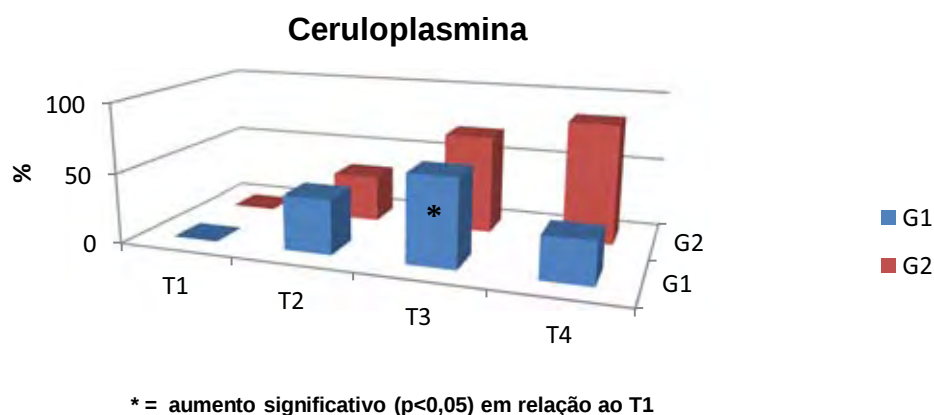


FIGURA 5: Porcentagem de aumento das concentrações séricas da ceruloplasmina nos momentos dos grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.

No presente estudo, a dinâmica das alterações das concentrações da Cp foram divergentes dos estudos supracitados, pois aumentaram significativamente 48 horas após a técnica cirúrgica de OSH minimamente invasiva em cadelas, retornando às concentrações observadas no momento pré-operatório sete dias após o procedimento. A Cp, como uma PFA moderada em cães, retorna às suas concentrações basais mais lentamente do que as PFAs principais por possuir uma meia vida mais longa (KJELGAARD-HANSEN e JACOBSEN, 2011). Portanto, a Cp foi um marcador mais eficiente da inflamação, 48 horas após o procedimento cirúrgico, quando comparado com a resposta leucocitária, neste mesmo momento, em cadelas submetidas à OSH minimamente invasiva, uma vez que não foram observadas alterações no leucograma (Tabela 1 e 3).

O grupo submetido à OSH minimamente invasiva apresentou concentrações de Cp 94% superiores ( $p<0,05$ ) em relação ao G2 (OSH convencional) 24 horas após o procedimento cirúrgico quando comparadas às concentrações pré-operatórias (Tabela 3), sugerindo que a utilização da abraçadeira de náilon provocou uma reação inflamatória mais intensa do que o material utilizado no G2 (fio de náilon) no momento avaliado.

As concentrações séricas da  $\alpha_1$ -antitripsina nos momentos T3 e T4, ou seja, à partir de 48 horas e até sete dias após a OSH minimamente invasiva, apresentaram diminuição ( $p<0,05$ ) de 29% e 35% respectivamente, em relação às concentrações do T1 (Figura 6). Da mesma forma, no G2, as concentrações desta proteína também apresentaram diminuição de 9% no T3 em relação ao T1 (Figura 6). Em relação às concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina entre os grupos, o G1 apresentou concentrações 46% menores nos momentos T2 e T3 e 54% menor no T4 ( $p<0,05$ ) em relação ao G2, ou seja, 24 horas até sete dias após os procedimentos cirúrgicos quando comparadas às concentrações observadas no pré-operatório. A literatura é escassa em relação a função desta proteína em cães, mas sabe-se que ela regula a atividade de proteinases, de forma que durante o processo inflamatório, é liberada para minimizar os danos aos tecidos (HIBBETS et al., 1999; MURATA et al., 2004; ECKERSALL, 2008). No entanto, um estudo demonstrou que as concentrações séricas da  $\alpha_1$ -antitripsina não diferiram entre cães saudáveis e hospitalizados, mas as cadelas saudáveis e castradas possuíam concentrações 16% menores do que as cadelas saudáveis inteiras que apresentaram concentrações 23% maiores do que os cães machos saudáveis inteiros (HUGHES et al., 1995).

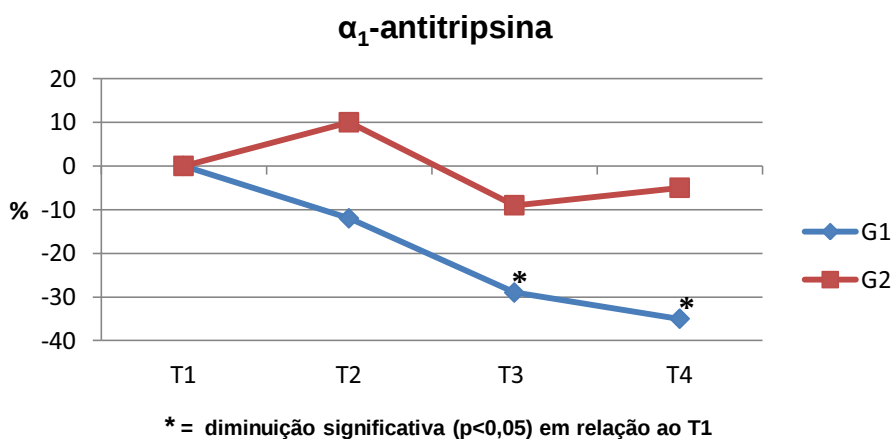


FIGURA 6: Porcentagem de aumento e diminuição das concentrações séricas da  $\alpha_1$ -antitripsina nos momentos dos grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH. (T1) 24 horas antes do procedimento; (T2) 24h após o procedimento (dia 1); (T3) 48h após o procedimento (dia 2); (T4) sete dias após o procedimento.

Conner et al. (1988) verificaram que cães submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de enxerto de aorta abdominal apresentaram aumento da  $\alpha_1$ -antitripsina de apenas 13% após a cirurgia. Os autores sugeriram que a

ausência de resposta desta proteína após cirurgia em cães e o fato da  $\alpha_1$ -antiquimotripsina, uma outra PFA em humanos do grupo de antiproteases, não estar presente no plasma canino, poderia indicar que o sistema inibidor de protease que age durante a resposta de fase aguda no cão difere deste mesmo sistema em humanos. Pois, em humanos, as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina dobraram após procedimento cirúrgico de colecistectomia (ARONSEN et al., 1972).

De qualquer forma, nas cadelas do G1, o processo inflamatório pode ter sido a causa da diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) das concentrações desta proteína nos momentos T3 e T4 assim como nas cadelas do G2 no T3, pois os cães, aparentemente, não possuem sistema inibidor de protease semelhante ao de humanos. Assim, não foi possível definir uma resposta (aumento ou diminuição) para a espécie diante desse tipo de resposta inflamatória, ou seja, ao trauma cirúrgico promovido pela OSH. Porém, como observado por Hughes et al. (1995), as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina podem também ter diminuído significativamente em consequência da diminuição hormonal decorrente da remoção dos órgãos reprodutivos em cães. Esta alteração foi observada em relação as concentrações de Cp (ULUTAS et al., 2009), assim como por Schmidt et al. (2011) indicando a possível relação entre esta proteína e o 17-beta estradiol.

Em mulheres, após a administração de estrógeno, ocorreu aumento da  $\alpha_1$ -antitripsina (LAURELL et al., 1968). Segundo Kueppers e Mills (1983), ratos machos possuem concentrações aproximadamente três vezes maiores do que fêmeas. Esta proteína não é considerada uma PFA nesta espécie, mas responde fortemente a testosterona, pois após a castração de machos ocorreu diminuição significativa das suas concentrações. Após a administração de testosterona nestes animais, as concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina voltaram às basais, assim como a administração em fêmeas levou a concentrações similares às dos machos. Em coelhos machos as concentrações desta proteína são em média 16% superiores em relação a sua média em fêmeas (KUEPPERS et al., 1984). Em contrapartida, Kueppers et al. (1993) observaram que as concentrações em cadelas saudáveis eram maiores do que em machos saudáveis. Desta forma, os autores sugeriram a possibilidade da regulação da  $\alpha_1$ -antitripsina por estrógenos.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas para as concentrações de Hp entre os momentos de cada grupo quando comparados ao pré-operatório, o grupo de cadelas submetidas à OSH minimamente invasiva apresentou concentrações desta proteína 39%, 61% e 77% maiores nos momentos T2, T3 e T4 respectivamente ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo das cadelas submetidas à OSH convencional, ou seja, 24 horas, 48 horas e sete dias depois (Tabela 3). A Hp é uma PFA moderada em cães e possui efeito bacteriostático, além de apresentar resposta antiinflamatória ao regular as reações da imunidade inata sobre os leucócitos, justificando o aumento das suas concentrações séricas diante de um processo inflamatório (CERÓN et al., 2005).

No presente estudo, as concentrações desta proteína estiveram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) no grupo submetido à OSH minimamente invasiva em relação ao grupo submetido à OSH convencional demonstrando sua ação como PFA moderada em cães (Tabela 3). Dabrowski et al. (2009) observaram que as concentrações da Hp em cadelas que tiveram complicações após OSH para tratamento de piometra se mantiveram semelhantes desde o primeiro dia até 17 dias após o procedimento quando comparadas às concentrações observadas no pré-operatório. Em contrapartida, nas cadelas que não tiveram complicações pós-operatórias, as concentrações da Hp diminuíram consideravelmente à partir do 10º dia após a OSH. Serin e Ulutas (2010) observaram aumento desta proteína 48 e 72 horas após OSH em cadelas saudáveis e Dabrowski et al. (2007) observaram aumento das concentrações da Hp 72 e 120 horas também após OSH em cadelas saudáveis. Conner et al. (1988) observaram pico nas concentrações da Hp 120 horas após a cirurgia de implante de enxerto da aorta abdominal em cães.

Assim, os aumentos das concentrações da Hp e da Cp observados no grupo de cadelas em que foram utilizadas as abraçadeiras, sugerem que a reação inflamatória, em comparação com a utilização da técnica convencional com fio de náilon, ocorreu de forma mais intensa, pois esse aumento significativo ocorreu nas primeiras horas e até uma semana após a cirurgia. De acordo com Lima et al. (2010) não ocorreram alterações macroscópicas ou quaisquer reações teciduais ao se comparar a utilização da abraçadeira e do

fio de náilon para ligadura dos pedículos ovarianos em cadelas. Porém, os autores supracitados efetuaram a avaliação histológica dos pedículos somente 60 dias após a realização da cirurgia e não determinaram as concentrações das proteínas avaliadas no presente estudo para investigar qual seria a resposta sistêmica com a utilização dos dois tipos de material durante o pós-operatório imediato. Castro et al. (2004) apontaram a eficiência da utilização da abraçadeira de náilon na ligadura dos pedículos ovarianos e uterino em gatas, assim como a não observação de quaisquer manifestações clínicas que denotassem reação tecidual excessiva no pós-operatório imediato ou tardio. No entanto afirmaram a importância da realização de testes adicionais para se avaliar a intensidade da reação tecidual ao implante.

Segundo Solter et al. (1991) as concentrações da Hp e da Cp são seis vezes mais sensíveis do que a contagem de leucócitos na detecção de processos inflamatórios em cães. A leucocitose é uma das alterações que ocorre durante a resposta de fase aguda, porém a resposta leucocitária é frequentemente sinoidal, com uma diminuição inicial, causada pela marginalização e adesão às células endoteliais, e um subsequente aumento na contagem total de leucócitos induzido pelas citocinas liberadas nesta fase. Posteriormente, essas células amplificam a resposta inflamatória pela liberação de mais citocinas e atração de células inflamatórias ao local da inflamação (ECKERSALL, 2008; WEISS et al., 2010).

Na presente pesquisa as concentrações da Hp e da Cp, como citado anteriormente, foram significativamente diferentes entre os dois grupos, demonstrando reações inflamatórias diferentes entre as duas técnicas. O mesmo não ocorreu com a contagem total de leucócitos, que embora tenha ocorrido leucocitose por neutrofilia no T2 de ambos os grupos, ou seja, 24 horas após a cirurgia, esses valores não foram significativamente diferentes entre os grupos, o que nos revela a importância da determinação das proteínas de fase aguda no monitoramento do pós-operatório em cadelas. Isto está de acordo com Yamamoto et al. (1993), que sugeriram que a CRP foi mais útil do que a contagem total de leucócitos para avaliar a gravidade de diferentes processos inflamatórios nos cães, e que desta forma, estas células não servem como indicadores confiáveis da inflamação nesta espécie. Em contrapartida, Nakamura et al. (2008) citaram que, embora exista divergência entre a

contagem total de leucócitos e a concentração da CRP, ambos devem ser avaliados rotineiramente como marcadores inflamatórios, pois a CRP pode ser útil para detectar inflamações de forma precoce, visto que dentro de um período de 24 horas após o estímulo inflamatório suas concentrações podem aumentar de 100 até 1000 vezes, sendo assim um marcador amplamente sensível.

Apesar das diferenças significativas observadas nas concentrações do fibrinogênio, da proteína plasmática total e nos outros parâmetros do leucograma (neutrófilos bastonetes e linfócitos), esses não ultrapassaram os limites de referência para a espécie canina, com exceção da eosinofilia observada no T3 do G1, sugerindo que houve uma ação antiinflamatória em resposta a inflamação, porém não tão evidente quando comparada com as concentrações de Hp e Cp.

## 6 CONCLUSÕES

O aumento ( $p<0,05$ ) observado nas concentrações de ceruloplasmina 48 horas após OSH minimamente invasiva permitiu observar a sua ação como proteína de fase aguda moderada em cães após a indução do processo inflamatório causado pelo trauma cirúrgico em cadelas.

Com base nas alterações observadas nas concentrações da  $\alpha_1$ -antitripsina após as duas técnicas de OSH, conclui-se que existe possibilidade desta proteína de fase aguda ser dependente de hormônios femininos no caso da espécie canina, podendo desta forma ser regulada por hormônios.

Uma proteína de 23 kDa, não identificada nominalmente, foi observada no traçado eletroforético de todos os animais, independentemente do grupo avaliado, denotando-se assim a importância de estudos mais aprofundados sobre esta proteína em cães.

Conclui-se que, embora tenha ocorrido leucocitose por neutrofilia 24 horas após as duas técnicas de OSH, não houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre os grupos, e que desta forma, esses parâmetros não foram eficientes para demonstrar a diferença e/ou a presença da resposta inflamatória após OSH convencional e minimamente invasiva em cadelas.

As concentrações das proteínas de fase aguda (Cp, Hp e  $\alpha_1$ -antitripsina) forneceram dados relevantes sobre o pós-operatório de cadelas submetidas à duas técnicas cirúrgicas distintas auxiliando, portanto, no monitoramento da recuperação cirúrgica.

A partir das alterações nas concentrações das proteínas de fase aguda (Cp e Hp) foi possível observar que a OSH pela técnica minimamente invasiva com utilização da abraçadeira de náilon, causou uma resposta inflamatória mais intensa do que a OSH pela técnica convencional em cadelas no período pós-operatório imediato.

## 7 REFERÊNCIAS

ALVES, A.E.; RIBEIRO, A.P.C.; Di FILIPPO, P.A.; APPARICIO, M.F.; FAGLIARI, J.J.; VICENTE, E.R.R. Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.1, p.86-91, 2010.

ANDREWS, D. A.; REAGAN, W.J.; DeNICOLA, D.B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. *Continuing education for the practicing veterinarian*, v.16, n.10, p.1349-1357, 1994.

ARONSEN, K.-F.; EKELUND, G.; KINDMARK, CO.; LAURELL, C.-B. Sequential changes of plasma proteins after surgical trauma. *Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation*, v. 29, p.127-136, 1972.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, v.15, p.74-80, 1994.

BROADLEY, C.; HOOVER, R.L. Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. *American Journal of Pathology*, v.135, p.647-655, 1989.

BUTTENSCHOEN, K.; BUTTENSCHOEN, D.C.; BERGER, D.; VASILESCU, C.; SCHAFHEUTLE, S.; GOELTENBOTH, B.; SEIDELMANN, M.; BEGER, H.G. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. *The American Journal of Surgery*, v.181, p.36-43, 2001.

BURTON, S.A.; HONOR, D.J.; MACKENZIE, A.L.; ECKERSALL, P.D.; MARKHAM, R.J.; HORNEY, B.S. C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *American Journal Veterinary Research*, v.55, p.613-8, 1994.

CALDIN, M.; TASCA, S.; CARLI, E.; BIANCHINI, S.; FURLANELLO, T.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology*, v.38, p. 63–68, 2009.

CASPI, D.; BALTZ, M.L.; SNEL, F.; GRUYS, E.; NIV, D.; BATT, R.M.; MUNN, E.A.; BUTTRESS, N.; PEPYS, M.B. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*, v.53, p.307-313, 1984.

CASPI, D.; SNEL, F.W.; BATT, R.M.; BENNETT, D.; RUTTEMAN, G.R.; HARTMAN, E.G.; BALTZ, M.L.; GRUYS, E.; PEPYS, M.B. C-reactive protein in dogs. *American Journal Veterinary Research*, v.48, p.919-21, 1987.

CASTRO, R. D.; PACHALY, J. R; FERREIRA, F. M. Técnica alternativa para ligadura vascular em massa na ovariectomia em cadela. Relato preliminar. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, Umuarama, v.7, supl.1, p.44, 2004.

CECILIANI, F.; CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, 2012.

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

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, v.34, n.2, p.85-99, 2005.

CHERYK, L.A.; HOOPER-MCGREY, K.E.; GENTRY, P.A. Alterations in bovine platelet function and acute phase proteins induced by *Pasteurella haemolytica* A1. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.62, p.1-8, 1998.

CHRISTENSEN, M.; JACOBSEN, S.; ICHIYANAGI, T.; KJELGAARD-HANSEN, M. Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. *The Veterinary Journal*, v.194, p.332-337, 2012.

CONCANNON, P.W.; GIMPEL, T.; NEWTON, L.; CASTRACANE, V.D. Postimplantation increase in plasma fibrinogen concentration with increase in relaxin concentration in pregnant dogs. *American Journal Veterinary Research*, v.57, p.1382-1385, 1996.

CONNER, J.G.; ECKERSALL, P.D.; FERGUSON, J.; DOUGLAS, T.A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science*, v.45, p.107-110, 1988.

COUTO, C.G.; CERÓN, J.J.; PARRA, M.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; LAZBIK, M.C. Acute phase protein concentrations in retired racing Greyhounds. *Veterinary Clinical Pathology*, v.38, p.219-223, 2009.

CRYSTAL, R.G.  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency, emphysema, and liver disease. Genetic basis and strategies for therapy. *The Journal of Clinical Investigation*, v.85, p.1343-1352, 1990.

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

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in health bitches and those with pyometra. *Theriogenology*, v.67, p. 321-327, 2007.

DABROWSKI, R.; KOSTRO, K.; LISIECKA, U.; SZCZUBIAL, M.; KRAKOWSKI, L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology*, v.72, p.471-476, 2009.

DOBRYSZYCKA, W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v.35, p.647–654, 1997.

EBERSON, J.; CAPPELLI, D. Acute phase reactants in infectious and inflammatory diseases. *Periodontology*, v.23, p.19–49, 2000.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, v.12, p.169-178, 1988.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G.; PARTON, H. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Record*, v.124, p.490-491, 1989.

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G.; HARVIE, J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communication*, v.15, p.17-24, 1991.

ECKERSALL, P.D.; DUTHIE, S.; TOUSSAINT, M.J.M.; GRUYS, E.; HEEGAARD, P.; ALAVA, M.; LIPPERHEIDE, C.; MADEC, F. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Advances Veterinary Medicine*, v.41, p.643-655, 1999.

ECKERSALL, P.D. The time is right for acute phase protein assays – Guest editorial. *The Veterinary Journal*, v.168, p.3-5, 2004.

ECKERSALL, P.D.; YOUNG, F.J.; NOLAN, A.M.; KNIGHT, C.H.; McCOMB, C.; WATERSTON, M.M.; HOGARTH, C.J.; SCOTT, E.M.; FITZPATRICK, J.L. Acute phase proteins in bovine milk in an experimental model of *Staphylococcus aureus* subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1488-1501, 2006.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6.ed. Burlington: Academic Press, 2008. chap.5, p.117-155.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, v.185, p.23-27, 2010.

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

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

GAHMBERG, C.G.; ANDERSON, L.C. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (oromucoid). *Journal of Experimental Medicine*, v.148, p.507-521, 1978.

GANROT, K. Plasma protein response in experimental inflammation in the dog. *Research Experimental Medicine*, v.161, n.4, p.251-261, 1973.

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

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

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal Zhejiang University Science*, v.11, p.1045-1056, 2005.

HAGMAN, R. Serum  $\alpha$ -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. *Veterinary Clinical Pathology*, v.40, p.52-59, 2011.

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.

HAYASHI, S.; JINBO, T.; IGUCHI, T.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; NOMURA, M.; ISHIDA, Y.; YAMAMOTO, S. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary Research Communication*, v.25, p.117-126, 2001.

HELD, J.P.; ADAIR, S.; MCGAVIN, M.D.; ADAMS, W.H.; TOAL, R.; HENTON, J. Bacterial epididymitis in two stallions. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.197, p.602-604, 1990.

HELMAN, N.E.; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annual Review of Nutrition*, v. 22, p.439-458, 2002.

HIBBETTS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of proteinase inhibitors. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.13, p.302-308, 1999.

HOCHEPIED, T.; BERGER, F.G.; BAUMANN, H.; LIBERT, C. Alpha1-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Reviews*, v.14, p.25-34, 2003.

HORADAGODA, N.U.; KNOX, K.M.G.; GIBBS, H.A.; REID, S.W.J.; HORADAGODA, A.; EDWARDS, S.E.R.; ECKERSALL, P.D. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Veterinary Record*, v.144, p.437-441, 1999.

HUGHES, D; ELLIOTT, D.A.; WASHABAU, R.J.; KUEPPERS, F. Effects of age, sex, reproductive, and hospitalization on serum alpha 1-antitrypsin concentrations in dogs. *American Journal Veterinary Research*, v.56, p.568-572, 1995.

ITOH, H.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; MOTOI, Y.; FUNAYAMA, Y. Characterization of serum alpha 1-acid glycoprotein in fetal and newborn calves during development. *American Journal Veterinary Research*, v.54, p.591-595, 1993a.

ITOH, H.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; MOTOI, Y.; KIDOGUCHI, K.; FUNAYAMA, Y. The influence of age and health status on the serum alpha 1-acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen-free pigs. *Canadian Journal Veterinary Research*, v.57, p.74-78, 1993b.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P.H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, v.19, p.38-46, 2007.

JACOBSEN, S.; NIELSEN, J.V.; KJELGAARD-HANSEN, M.; TOELBOELL, T.; FJELDBORG, J.; HALLING-THOMSEN, M.; MARTINUSSEN, T.; THOEFNER, M.B. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Veterinary Surgery*, v.38, p.762-769, 2009.

JAIN, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. 1086p.

JAIN, N.C. *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 414p.

KAJIKAWA, T.; FURUTA, A.; ONISH, T.; TAJIMA, T.; SUGII, S. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.68, p.91-98, 1999.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M. Clinical biochemistry of domestic animals. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.

KIRAL, F.K.; SEYREK, K.; PASA, S.; ERTABAKLAR, H.; ÜNSAL, C. Some haematological, biochemical and electrophoretic findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Revue Médecine Vétérinaire*, v. 155, p. 226-229, 2004.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JACOBSEN, S. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. *Clinics in Laboratory Medicine*, v.31, p.51-70, 2011.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JENSEN, A.L.; KRISTENSEN, A.T. Evaluation of commercially available human c-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine Serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology*, v.32, p.81-87, 2003a.

KJELGAARD-HANSEN, M.; KRISTENSEN, A.T. ; JENSEN, A.L. Evaluation of a Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of C-Reactive Protein in Canine Serum. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, v.50, p.164-168, 2003b.

KURIBAYASHI, T.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; HONJYO, T.; YAMAMOTO, Y.; KUBA, K.; YAMAMOTO, S. Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. *Experimentals Animals*, v.52, p.377–381, 2003.

KUEPPERS, F.; McCONNELL, I.W.; KRAMEK, B.A. Polymorphism of alpha-1 antitrypsin in dogs. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v.106B, p.531-533, 1993.

KUEPPERS, F.; MILLS, J.K. Trypsin inhibition by mouse serum: sexual dimorphism controlled by testosterone. *Science*, v.219, p.182-184, 1983.

KUEPPERS, F.; LEE, C.C.; FOX, R.R.; MILLS, J.K. Genetic heterogeneity of rabbit alpha-1 antitrypsin. *Genetics*, v.106, p.695-703, 1984.

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

LAURELL, C.B.; KULLANDER, S.; THORELL, J. Effect of administration of a combined estrogen-progestin contraceptive on the level of individual plasma proteins. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v.21, p.337-343, 1968.

LIMA, A.F.M.; LUNA, S. P. L.; RODRIGUES, M. M. P.; QUITZAN, J. G. Avaliação histológica e videolaparoscópica de ligaduras dos pedículos ovarianos realizados com mononáilon agulhado ou abraçadeiras auto-estáticas de náilon em cadelas submetidas a ovariossalpingohisterectomia pela técnica do gancho. *Ars Veterinária*, v.26, n.2, p.66-70, 2010.

LIN, Y.; MICHAEL W. RAJALA, M.W.; BERGER, J.P.; MOLLER, D.E.; BARZILAI, N.; SCHERER, P.E. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.42077-42083, 2001.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; GINEL, O.J.; CERÓN, J.J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Veterinary Record*, v.154, p.814-817, 2004.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Validación analítica de técnicas comerciales para la determinación de haptoglobina, proteína C reactiva y amiloide sérico en caninos Analytical. *Archivos Medicina Veterinaria*, v.37, p.61-66, 2005.

McGROTTY, Y.L.; ARTEAGA, A.; KNOTTENBELT, C.M.; RAMSEY, I.K.; ECKERSALL, P.D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. *Veterinary Clinical Pathology*, v.34, p.255-258, 2005.

MOLD, C.; RODRIGUEZ, W.; RODIC-POLIC, B.; DU CLOS, T.W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc-gamma R. *Journal of Immunology*, v.169, p.7019-7025, 2002.

MORTENSEN, R.F.; ZHONG, W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *Journal of Leukocyte Biology*, v.67, p.495-500, 2000.

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

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOGUCHI, A.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *Journal Veterinary Medical Science*, v.70, p.127-131, 2008.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, v.31, p.125-129, 2007.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, v. 35, p. 163 -187, 2004.

PFEFFER, A.; ROGERS, K.M.; O'KEEFFE, L.; OSBORN, P.J. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. *Research in Veterinary Science*, v.55, p.360-366, 1993.

POLAND, D.C.W.; KRATZ, E.; VERMEIDEN, J.P.W.; DE GROOT, S.M.; BRUYNEEL, B.; DE VRIES, T.; VAN DIJK, W. High levels of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin. *Prostate*, v.52, p.34–42, 2002.

SERIN, G.; ULUTAS, P.A. Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrus bitches after ovariohysterectomy. *Veterinary Record*, v.166, p.20-22, 2010.

SILVA, L.A.F.; ARAÚJO, G.R.S.; MIRANDA, A.H.; RABELO, R.E.; GARCIA, A.M.; SILVA, O.C.; ARAÚJO, I.F.L.; MACEDO, S.P.; SOUSA, J.N.; FIORAVANTI, M.C.S.; OLIVEIRA, K.S.; AMARAL, A.V.C.; SILVA, E.B. Ovariohisterectomia em cadelas: uso da braçadeira de náilon na hemostasia preventiva. *Ciência Animal Brasileira*, v.5, p.100-102, 2004.

SCHMIDT, E.M.S.; LIMA, A.F.M.; THOMAZINI, C.M.; MORAES, L.F.; CAMPOY, G.; GARCIA, C.Z.; LUNA, S.P.L.; FAGLIARI, J.J. Serum protein concentrations in female dogs submitted to ovariohysterectomy determined by means of SDS-PAGE electrophoresis. *Veterinary Clinical Pathology - ASVCP Annual Meetings Abstracts*, p.13, 2011.

SHIM, B.S.; YOON, C.S.; OH, S.K.; LEE, T.H.; KANG, Y.S. Studies on swine and canine serum haptoglobins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.243, p.126-136, 1971.

SOLTER, P.F. HOFFMANN, W.E.; HUNGERFORD, L.L.; SIEGEL, J.P.; DENIS, S.H.St.; DORNER, J.L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.52, p.1738–1742, 1991.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M. Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

STONE, E. A. Ovário e útero. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 3.ed. São Paulo: Manole, v.2, p.1487-1502, 2007.

SUTER, M.; MARTINET, O.; SPERTINI, F. Reduced acute phase response after laparoscopic total extraperitoneal bilateral hernia repair compared to open repair with the Stoppa procedure. *Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques*, v.16, p.1214-1219, 2002.

SUTTON, R.H.; JOHNSTONE, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *The Journal of Small Animal Practice*, v.18, p.277-281, 1977.

TAGATA, K.; YOKOYAMA, S.; GINBO, T.; HONDA, M.; OKIMURA, T.; ODAKURA, M.; NOMURA, M.; YAMAMOTO, S. Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary Research Communication*, v.20, p.21-30, 1996.

ULUTAS, P.A.; MUSAL, B.; KIRAL, F.; BILDIK, A. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Research in Veterinary Science*, v.86, p.373-376, 2009.

URIELI-SHOVAL, S.; LINKE, R.P.; MATZNER, Y. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. *Current Opinion in Hematology*, v.7, p.64-69, 2000.

WEIDMEYER, C.E.; SOLTER, P.F. Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Veterinary Clinical Pathology*, v.25, p.141-146, 1996.

WEISS, D.J.; RAMAIAH, S.K.; WALCHECK, B. Neutrophil distribution and function. In: WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2010. chap.41, p.268-274.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; MIYAJI, S.; SANTSUKA, H.; FUGISE, H.; MUKAWA, K.; FURUKAWA, E.; NAGAE, T.; NAIKI, M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communication*, v.17, p.85-93, 1993.

YAMAMOTO, S.; MIYAJIA, S.; ASHIDAB, Y.; OTABEC, K.; MOMOTANID, E.; RIKIHISAET, Y. Preparation of anti-canine serum amyloid A (SAA) serum and purification of SAA from canine high-density lipoprotein. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.41, p.41-53, 1994.

YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; MIYAMOTO, T.; HAGIO, M.; IZUMISAWA, Y.; KOTANI, T. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *Journal Veterinary Medical Science*, v.56, p.487-492, 1994.

YUKI, M.; ITOH, H.; TAMURA, K.; NISHII, N.; TAKASEET, K. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. *Veterinary Research Communication*, v.32, p.533-542, 2008.

YUKI, M.; ITOH, H.; TAKASE, K. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. *Veterinary Clinical Pathology*, v.39, p.65-71, 2010.

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

## **Proteínas de fase aguda em cães: possíveis aplicações em cirurgia**

### **Acute phase proteins in dogs: possible applications in surgery**

**Camila Peres Rubio<sup>I</sup> Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt<sup>I\*</sup>**

#### **-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-**

#### **RESUMO**

As proteínas de fase aguda (PFA) são um grupo de proteínas do sangue que apresentam alteração nas suas concentrações em animais acometidos por infecções, inflamações, submetidos a trauma cirúrgico ou mesmo o estresse. A magnitude do aumento das proteínas de fase aguda está relacionada à intensidade do trauma cirúrgico. Como a concentração sanguínea das proteínas de fase aguda é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual e/ou de inflamação, espera-se que animais com de complicações pós-operatórias apresentem concentrações protéicas mais elevadas. Assim, as PFAs podem ser utilizadas como ferramentas para monitorar a intensidade da resposta inflamatória e como marcadores precoces de complicações pós-operatórias.

**Palavras-chave:** proteína C-reativa, amilóide A sérico, pós-operatório, soro.

#### **ABSTRACT**

The acute phase proteins (APPs) are blood proteins that change their serum concentrations in animals with infections, inflammations, trauma, surgery or stress. The magnitude of increase of the APP is related to the intensity of surgical trauma. The serum concentration of the APPs is directly proportional to the degree of tissue injury and/or inflammation. Therefore animals with postsurgical complications will have increased concentrations of APPs. Thus, the APP concentrations may be an useful tool for evaluate the

<sup>I</sup>Departamento de Clínica Veterinária – Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Botucatu. Distrito de Rubião Junior, s/n 18618-970 - Botucatu, SP. E-mail: [bethschmidt@fmvz.unesp.br](mailto:bethschmidt@fmvz.unesp.br). \* Autor para correspondência.

intensity of the inflammatory response to surgical trauma and as diagnostic markers of early postoperative complications.

**Key-words:** C-reactive protein, serum amyloid A, postoperative, serum.

## INTRODUÇÃO

Uma PFA é definida como uma proteína que sofre alteração na sua concentração sérica em pelo menos 25% durante a resposta às citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL)-6, IL-1 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), secretadas no momento da inflamação. As PFAs são consideradas componentes da resposta imune inata não-específica, envolvidas no restabelecimento da homeostasia e contenção do crescimento microbiano antes do desenvolvimento de uma resposta imune adquirida frente a um desafio (MURATA et al., 2004; GRUYS et al., 2005).

Na reação inflamatória ocorrem alterações denominadas respostas de fase aguda. Essas respostas são induzidas pelas citocinas pró-inflamatórias que atuam como mensageiros entre o local da lesão e a síntese e liberação das proteínas de fase aguda (PFAs) principalmente pelos hepatócitos (KJELGAARD-HANSEN & JACOBSEN, 2011). A resposta de fase aguda é, portanto, uma reação sistêmica do organismo a um distúrbio local ou sistêmico causado por infecção, injúria tecidual, trauma ou cirurgia, crescimento neoplásico ou distúrbios imunológicos. No local em que há invasão de microorganismos e dano tecidual, são iniciadas respostas pelo próprio tecido associadas à produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios. Esses ativam receptores em diferentes células-alvos levando a uma reação sistêmica, resultando em ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, redução da secreção do hormônio de crescimento e alterações orgânicas clinicamente caracterizadas por febre, anorexia, equilíbrio do nitrogênio negativo e catabolismo de células musculares, além

de outras alterações como leucocitose, aumento do cortisol sanguíneo e alterações na concentração de proteínas de fase aguda, por modificações no metabolismo hepático (ECKERSALL, 2008). Dentro de poucas horas após a inflamação, o padrão das proteínas sintetizadas pelo fígado é alterado, resultando no aumento da concentração de algumas proteínas sanguíneas, as PFA positivas, e diminuição na síntese de outras, as PFA negativas (GRUYS et al., 2005).

As PFAs positivas apresentam respostas principais (ou maiores), moderadas e menores. As principais possuem baixa concentração ( $<1 \mu\text{g/L}$ ) em animais saudáveis e aumentam em 100 a 1000 vezes na concentração sob estimulação, ocorrendo pico em 24 a 48 horas, quando então diminuem rapidamente durante a fase de recuperação do animal. As respostas de fase aguda moderadas são aquelas que aumentam em cinco a 10 vezes sob ativação, com pico após dois a três dias, e diminuem suas concentrações mais lentamente que as PFA principais. As PFA com respostas menores são aquelas que aumentam gradualmente a sua concentração entre 50 a 100% (ECKERSALL & BELL, 2010). As PFAs negativas são aquelas em que suas concentrações diminuem pelo menos 25% do seu valor basal na resposta a inflamação. Nos cães, as principais PFA negativas são a albumina e a transferrina (PALTRINIERI, 2007; ECKERSALL e BELL, 2010).

Em cães, há diferenças na magnitude e também no tempo da resposta ao distúrbio inflamatório. As principais PFAs positivas, como a Proteína C-Reativa e o Amilóide A Sérico (SAA) apresentam um aumento rápido e precoce nas suas concentrações, mas um declínio muito rápido em condições inflamatórias agudas. As PFAs moderadas (haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida e ceruloplasmina) necessitam de mais tempo para aumentar e retornar ao valor normal, com um declínio mais gradual (CERÓN et al., 2005; ECKERSALL & BELL, 2010).

As concentrações das PFAs na circulação estão relacionadas à gravidade do distúrbio e a extensão do dano tecidual. Apesar de serem denominadas de PFAs, há secreção e expressão contínua dessas proteínas em processos crônicos. No entanto, a concentração sanguínea dessas proteínas pode ser alterada de acordo com a evolução dessas condições (ECKERSALL, 2008).

O procedimento cirúrgico promove um trauma tecidual, que por sua vez produz uma reação inflamatória localizada e generalizada (resposta de fase aguda), além de uma reação imunossupressora e metabólica. Determinar a dinâmica destas reações pode auxiliar a quantificar o grau de trauma tecidual induzido pela cirurgia, compreender melhor diferenças nos processos inflamatórios entre procedimentos distintos e monitorar de forma mais adequada o período pós-operatório (SUTER et al., 2002).

O objetivo desta revisão é apresentar as principais PFAs utilizadas em cães, com ênfase nas suas alterações relacionadas ao trauma cirúrgico.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

O fibrinogênio (FB) é uma betaglobulina, considerado uma proteína de fase aguda, sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática eleva-se sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e IL-6) e do TNF- $\alpha$  liberados pelo processo inflamatório (ANDREWS et al., 1994). Segundo JAIN (1986), durante o processo de inflamação aguda, a concentração plasmática desta proteína aumenta por vários dias, atingindo um pico entre o quinto e sétimo dia e o grau de hiperfibrinogenemia pode refletir a gravidade da inflamação, sendo considerada uma proteína de fase aguda moderada. Para cães, valores superiores aos de referência (100 - 300mg/dl) podem indicar processo inflamatório desde que a hemoconcentração não esteja presente (SUTTON & JOHNSTONE, 1977).

A determinação do fibrinogênio plasmático é comumente usada, mas pode ser influenciada por outros fatores, além do processo inflamatório. A diminuição da concentração

do fibrinogênio pode ser causada por consumo em coagulopatias ou pelo aumento da permeabilidade vascular, que pode mascarar uma hiperfibrinogenemia induzida por inflamação e tornar a interpretação dos resultados difícil (KJELGAARD-HANSEN & JACOBSEN, 2011).

A proteína C-reativa (CRP) possui peso molecular de 100 kD (cinco subunidades de 20 kD cada) (YUKI et al., 2010). Esta proteína tem papel importante na proteção contra infecção, eliminação de dano tecidual e regulação da resposta inflamatória (MOLD et al., 2002). Ela inibe a quimiotaxia e a “explosão respiratória” de neutrófilos (MORTENSEN & ZHONG, 2000), liga-se diretamente a vários microorganismos, degenerando células e restos celulares, ativando o sistema complemento pela via clássica C1q e atua também como opsonina (GRUYS et al, 2005).

Assim como em humanos, a CRP é conhecida como um marcador útil da inflamação aguda em cães. A CRP em cães apresenta rápida e precoce elevação na sua concentração e um declínio muito rápido, sendo assim um teste útil para indicar a situação do animal no momento da colheita da amostra. O soro de cães saudáveis contém menos de 5 mg/L CRP. No entanto, após o estímulo inflamatório promovido por uma cirurgia, observa-se um aumento na sua concentração em quatro horas e o pico de sua concentração ocorre em 24 horas (CASPI et al, 1984; CERÓN et al., 2005). Após trauma cirúrgico em cães, observa-se aumento de 95 vezes na concentração da CRP, sendo esta considerada uma PFA principal em cães (CERÓN et al., 2005).

Geralmente, a concentração da CRP em cães está correlacionada com a extensão e atividade da inflamação ou intensidade do trauma cirúrgico. Observa-se aumento nas concentrações de CRP antes de quaisquer alterações hematológicas, sendo em muitos casos este aumento o único indicador de um processo inflamatório (CASPI et al., 1987).

YAMAMOTO et al. (1993) realizaram um estudo em 29 cães submetidos a diferentes tipos de cirurgia. A concentração da CRP aumentou de forma significativa na maioria dos cães 24 a 48 horas após os procedimentos, sendo as menores concentrações observadas no grupo de animais submetidos a ovariectomia convencional e suas concentrações diminuíram significativamente quando as suturas cirúrgicas foram removidas. DABROWSKI et al. (2009) demonstraram que houve um aumento significativo com relação ao período pré-operatório, nas concentrações de CRP, 24 horas após ovariectomia, em cadelas para tratamento de piometra, com e sem complicações no período pós-operatório. No entanto, as concentrações de CRP do grupo de animais sem complicações diminuíram em até 48 horas após o procedimento, e no grupo com complicações pós-operatórias, as concentrações de CRP começaram a diminuir sete dias após o procedimento cirúrgico. DABROWSKI et al. (2007) demonstraram que cadelas saudáveis submetidas a ovariectomia apresentaram um aumento máximo e significativo na concentração de CRP 24 horas após o procedimento cirúrgico, com rápido declínio nos outros dias.

SERIN & ULUTAS (2010) verificaram que as concentrações da CRP aumentaram significativamente, em relação aos valores pré-operatórios, 24, 48 horas e sete dias após ovariectomia em cadelas saudáveis. Em outro estudo, a concentração da CRP foi significativamente maior do que os valores pré-cirúrgicos em cadelas 12 horas após serem submetidas a cirurgia de ovariectomia. Em cães submetidos a trauma cirúrgico decorrente de implante de enxerto de aorta abdominal, a concentração da CRP aumentou rapidamente após o procedimento, sendo que seu pico ocorreu em até 24 horas (CONNER et al., 1988).

Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP), também denominada de orosomucóide, é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 43 kD, sintetizada e secretada principalmente por hepatócitos (FOURNIER et al., 2000; ECKERSALL, 2008; YUKI et al.,

2008). Foi demonstrado que linfócitos também produzem alfa-1 glicoproteína ácida, o que pode explicar o seu nível sérico elevado em cães e gatos com linfoma (GAHMBERG e ANDERSON, 1978). A produção extrahepática de AGP foi observada em humanos nos rins, intestino e coração, e por diferentes tipos de leucócitos (FOURNIER et al., 2000).

A função biológica da AGP ainda permanece desconhecida, mas é uma PFA com função na imunomodulação e inflamação (FOURNIER et al., 2000; HOCHÉPIED et al., 2003.). É conhecida por suprimir a função imune, como a fagocitose de neutrófilos e blastogênese de linfócitos por modular os efeitos da IL-1, IL-6 e do TNF- $\alpha$  (BAUMANN & GAULDIE, 1994). Sua concentração sérica altera-se significativamente após um processo inflamatório (KURIBAYASHI et al., 2003). Em estudos realizados por GANROT (1973), nos quais avaliou a AGP em cães saudáveis, observou-se, ao se induzir o processo inflamatório, rápido e significativo aumento desta proteína, com duração média de aproximadamente 5,5 dias. HAGMAN (2011) observou que a concentração média de AGP em cadelas com piometra era quatro vezes maior do que em cadelas saudáveis. HAYASHI et al. (2001) observaram que o procedimento de ovariectomia aumentou a concentração sérica da CRP assim como da AGP.

A concentração de AGP em cães saudáveis pode variar conforme a idade, o ambiente, a raça e com a gestação (YUKI et al., 2010). Em cães filhotes, a concentração da AGP é baixa e aumenta gradualmente com a idade (FOURNIER et al., 2000). KURIBAYASHI et al. (2003) demonstraram que em cadelas gestantes a concentração da AGP era o dobro em relação a concentração média de cadelas não gestantes e saudáveis. Isto ocorre devido uma reação inflamatória induzida por invasão endometrial embrionária (CERÓN et al., 2005).

YUKI et al. (2010) relataram que a concentração sérica da AGP esteve mais elevada em cães com infecções, especialmente agudas, além de ser um marcador útil para avaliar o

curso de distúrbios inflamatórios, uma vez que o processo de reparação continua ocorrendo se a concentração da AGP permanecer aumentada.

A ceruloplasmina (Cp) é uma  $\alpha$ 2-glicoproteína considerada uma PFA moderada em cães (CERÓN & MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004). Possui peso molecular de 151 kD e é sintetizada principalmente por hepatócitos (HELLMAN & GITLIN, 2002). Esta proteína é a principal proteína de ligação do metal cobre no sangue. Atua como um agente antiinflamatório devido a sua capacidade de minimizar a formação de radical aniônico superóxido, gerado por leucócitos polimorfonucleares durante a inflamação, e que poderia causar danos teciduais (BROADLEY & HOOVER, 1989). SOLTER et al. (1991) comprovaram que tanto a Cp como a haptoglobina, são seis vezes mais sensíveis do que a concentração de fibrinogênio e a contagem de leucócitos na detecção de processos inflamatórios em cães. Em cães, ocorre um aumento intenso na concentração de Cp após um trauma cirúrgico, decorrente de implante de enxerto de aorta abdominal, ocorrendo pico duas a três vezes acima do valor de referência 96 horas após o procedimento (CONNER et al., 1988). No estudo realizado por SERIN & ULUTAS (2010) a concentração da Cp aumentou significativamente, em relação aos valores pré-cirúrgicos, após ovariectomia em cadelas, com pico em até 72 horas após o procedimento.

A haptoglobina (Hp) possui peso molecular de 81 kD (SHIM et al., 1971). A maioria das suas atividades está relacionada à formação do complexo Hp-hemoglobina. Atua também regulando as reações da imunidade inata sobre os leucócitos (resposta antiinflamatória) e possui efeito bacteriostático direto, ou seja, a Hp torna o ferro indisponível para a bactéria que o necessita para seu crescimento (CÉRON et al., 2005). Pulmão, tecido adiposo, baço e rins também podem produzir a Hp (DOBRYSYCKA, 1997; EBERSOLE & CAPPELLI, 2000).

A Hp canina é particularmente sensível aos glicocorticóides. Assim, concentrações elevadas desta proteína podem ser encontradas após o tratamento com glicocorticóides

(HARVEY & WEST, 1987; MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2004). Foi demonstrado aumento nas concentrações de Hp e fibrinogênio em cães com hiperadrenocorticismo, com ou sem inflamação (McGROTTY et al., 2005; CALDIN et al., 2009). COUTO et al. (2009) demonstraram que cães da raça Greyhound sadios apresentaram concentrações séricas menores de Hp do que cães de outras raças sugerindo assim, que deve-se estar atento ao interpretar resultados de PFA nas diferentes raças de cães.

A resposta da Hp em cães ao trauma cirúrgico segue o mesmo curso de humanos, com pico nas suas concentrações 120 horas após a cirurgia, seguido por declínio gradual (CONNER et al., 1988). Em cadelas que foram submetidas a ovariectomia para tratamento de piometra, as concentrações de Hp apresentaram-se significativamente aumentadas naquelas com complicações no período pós-operatório. No grupo de cadelas sem complicações no período pós-operatório, as concentrações de Hp se mantiveram semelhantes aos valores da avaliação pré-cirúrgica (DABROWSKI et al., 2009). SERIN & ULUTAS (2010) observaram aumento significativo nas concentrações da Hp 48 e 72 horas após o procedimento de ovariectomia em cadelas, em relação aos valores pré-operatórios. DABROWSKI et al. (2007) observaram um aumento significativo na concentração da Hp somente após 72 e 120 horas após o a ovariectomia em cadelas saudáveis, em relação aos valores pré-cirúrgicos.

O amiloide A sérico (SAA) é uma proteína com um peso molecular de 15 kD (CERÓN et al., 2005). Além de sua produção hepática, há também produção em tecidos como intestino, rim, medula óssea, adipócitos (quando há hiperglicemia) e glândula mamária (em casos de mastite), em diferentes espécies animais, servindo como potencial marcador local de atividade inflamatória (LIN et al., 2001; CERÓN et al., 2005; CECILIANI et al., 2012). Seu papel fisiológico na defesa durante a inflamação não é bem conhecido, mas inclui a detoxificação de endotoxinas, inibição de linfócitos, inibição da proliferação de células

endoteliais, inibição de agregação plaquetária e inibição da adesão do linfócito T à proteína da matriz celular (URIELI-SHOVAL et al., 2000). O SAA está envolvido no recrutamento quimiotático de células inflamatórias ao local da infecção (XU et al., 1995).

Em cães, o SAA é considerado uma das principais PFAs por sua concentração elevada durante a resposta de fase aguda e por seu rápido declínio com a resolução do distúrbio inflamatório (CERÓN et al., 2005). Segundo DABROWSKI et al. (2007), as concentrações de CRP e SAA refletem a ativação do sistema imune e podem ser usadas para avaliar o estado de saúde de cadelas ou monitorar complicações pós-operatórias, pois cadelas com piometra apresentaram concentrações muito elevadas de CRP e SAA, como resultado de uma produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias por neutrófilos e macrófagos. Após a ovariectomia, essas concentrações diminuíram gradativamente, demonstrando a resolução do processo e a diminuição da resposta inflamatória à agressão cirúrgica.

A transferrina, considerada uma PFA negativa em mamíferos, é uma glicoproteína sanguínea responsável pelo transporte de ferro na circulação. Em cães e gatos, a determinação das suas concentrações tem sido usada amplamente para a avaliação do metabolismo do ferro e homeostase (CERÓN et al., 2005). Concentrações diminuídas de transferrina podem ser consequência da produção inadequada de transferrina por danos nos hepatócitos, doença renal, leucemias, inflamação aguda e crônica (ECKERSALL, 2008). Em um estudo realizado em humanos, a concentração da transferrina diminuiu no período pós-operatório de cirurgias abdominais (BUTTENSCHOEN et al., 2001).

Existem vários métodos validados para a determinação das concentrações das PFAs em cães, como a imunoturbidimetria, ELISA, imunodifusão, teste de aglutinação em látex, nefelometria, espectrofotometria, por meio de kits comerciais ou por eletroforese (HARVEY & WEST, 1987; ECKERSALL et al., 1991; KJELGAARD-HANSEN et al., 2003; CERÓN & MARTÍNEZ-SUBIELA, 2004; CHRISTENSEN et al., 2012).

A eletroforese compreende uma ferramenta importante para o fracionamento de proteínas do sangue. Com esta técnica, as proteínas são agrupadas numa série de bandas definidas pela sua massa molecular relativa (ECKERSALL, 2008).

ALVES et al. (2010) identificaram, ao utilizar a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), 29 proteínas no proteinograma sérico de gatas submetidas à ovariectomia convencional e por videolaparoscopia e observaram resposta inflamatória mais intensa nas fêmeas submetidas a ovariectomia convencional, evidenciada pela elevação nas concentrações de ceruloplasmina, hemopexina, haptoglobina e alfa 1-glicoproteína ácida no traçado eletroforético.

SCHMIDT et al (2011) também utilizaram a eletroforese por SDS-PAGE e identificaram, em cadelas submetidas a ovariectomia, diminuição nas concentrações de ceruloplasmina após o procedimento cirúrgico, indicando uma possível relação entre a síntese desta proteína e a ausência do 17-beta estradiol.

Apesar de diversos estudos estarem sendo realizados, ainda há necessidade de pesquisas adicionais para determinar o perfil e a cinética das PFA nos diferentes tipos de cirurgias.

## **CONCLUSÃO**

Como a concentração sanguínea das PFAs é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual e/ou de inflamação (CERÓN et al., 2005), espera-se que animais com complicações pós-operatórias apresentem concentrações protéicas mais elevadas (GRUYS et al., 1994). Assim, as PFAs podem ser utilizadas como ferramentas para avaliar a intensidade e monitorar a resposta inflamatória no período pós-operatório (DABROWSKI et al., 2007; SERIN & ULUTAS, 2010).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, A.E. et al. Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.1, p.86-91, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352010000100012>. Acesso em: 29 mar. 2013.
- ANDREWS, D. A. et al. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. **Continuing education for the practicing veterinarian**, v.16, n.10, p.1349-1357, 1994.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, p.74-80, 1994. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699\(94\)90137-6](http://dx.doi.org/10.1016/0167-5699(94)90137-6). Acesso em: 2 abr. 2013.
- BROADLEY, C.; HOOVER, R.L. Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. **American Journal of Pathology**, v.135, p.647-655, 1989. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1880036/>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID: PMC1880036
- BUTTENSCHOEN, K. et al. Endotoxemia and acute-phase proteins in major abdominal surgery. **American Journal of Surgery**, v.181, p.36-43, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11248174>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID:11248174
- CALDIN, M. et al. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p. 63–68, 2009. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2008.00087.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1111/j.1939-165X.2008.00087.x.

CASPI, D. et al. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. **Immunology**, v.53, p.307-313, 1984. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1454838/>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMC1454838

CASPI, D. et al. C-reactive protein in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.48, p.919-21, 1987. Disponível em: <http://europepmc.org/abstract/MED/3605808>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID:3605808

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, 2012. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.004

CERÓN, J.J., MARTÍNEZ-SUBIELA, S. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. **Veterinary Research**, v.35, p.679- 671, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1051/vetres:2004046>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1051/vetres:2004046

CERÓN, J.J. et al. 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: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x

CHRISTENSEN, M. et al. Evaluation of an automated assay based on monoclonal anti-human serum amyloid A (SAA) antibodies for measurement of canine, feline, and equine SAA. **The Veterinary Journal**, v.194, p.332-337, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.05.007>. Acesso em: 2 abr. 2013.

CONNER, J.G. et al. Acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, v.45, p.107-110, 1988. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2464844>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID:2464844

COUTO, C.G. et al. Acute phase protein concentrations in retired racing Greyhounds. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p.219-223, 2009. Disponível em: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2009.00144.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false)

[165X.2009.00144.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2009.00144.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false)  
>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1111/j.1939-165X.2009.00144.x.

DABROWSKI, R. et al. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in health bitches and those with pyometra. **Theriogenology**, v.67, p. 321-327, 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.019>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

DABROWSKI, R. et al. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. **Theriogenology**, v.72, p.471-476, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.017>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

DOBRYSZYCKA, W. Biological functions of haptoglobin-new pieces to an old puzzle. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.35, p.647-654, 1997. Disponível em: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.1997.35.issue-9/cclm.1997.35.9.647/cclm.1997.35.9.647.xml>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi:10.1515/cclm.1997.35.9.647.

EBERSOLE, J.; CAPPELLI, D. Acute phase reactants in infectious and inflammatory diseases. **Periodontology**, v.23, p.19-49, 2000. doi: 10.1034/j.1600-0757.2000.2230103.x

ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G. Bovine and canine acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v.12, p.169-178, 1988. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF00362798>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1007/BF00362798.

ECKERSALL, P.D. et al. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. **Veterinary Research Communications**, v.15, p.17-24, 1991. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00497786>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi:10.1007/BF00497786.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6th ed. Burlington: Academic Press, 2008. p.117-155.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, p.23-27, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621712>>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID:20621712.

FOURNIER, T. et al. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1482, p.157-171, 2000. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/11058758>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1016/S0167-4838(00)00153-9

GAHMBERG, C.G.; ANDERSON, L.C. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid). **Journal of Experimental Medicine**.; v.148, p.507-521, 1978. Disponível em: <<http://jem.rupress.org/content/148/2/507.abstract>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1084/jem.148.2.507.

GANROT, K. Plasma protein response in experimental inflammation in the dog. **Research Experimental Medicine**, v.161, n.4, p.251-261, 1973. Disponível em; <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF01851449>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1007/BF01851449.

GRUYS, E. et al. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal Zhejiang University Science**, v.11, p.1045-1056, 2005. Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1390650/>>. Acesso em: 2 abr. 2013.  
doi: [10.1631/jzus.2005.B1045](https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B1045).

HAGMAN, R. Serum  $\alpha$ -1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. **Veterinary Clinical Pathology**, v.40, p.52-59, 2011. Disponível em: <  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2011.00294.x/full>>. Acesso em: 2  
abr. 2013.

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: <<http://vet.sagepub.com/content/24/1/90.short>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi:  
10.1177/030098588702400115.

HAYASHI, S. et al. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary Research Communication**, v.25, p.117-126, 2001. Disponível em:  
<<http://link.springer.com/article/10.1023/A%3A1006404902214>>. Acesso em: 2 abr. 2013.  
doi: 10.1023/A:1006404902214.

HELMAN, N.E.; GITLIN, J.D. Ceruloplasmin metabolism and function. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p.439-458, 2002. Disponível em:  
<http://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457>. Acesso em:  
7 mai. 2013. doi:10.1146/annurev.nutr.22.012502.114457.

HOCHEPIED, T. et al. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v.14, p.25-34, 2003.  
Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101\(02\)00054-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101(02)00054-0)>. Acesso em: 2 abr.  
2013.

JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986.1086p.

KAJIKAWA, T. et al. Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.68, p.91-98, 1999. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/MED/10231954>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi: 10.1016/S0165-2427(99)00012-4.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JACOBSEN, S. Assay validation and diagnostic applications of major acute-phase protein testing in companion animals. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.31, p.51-70, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295722>>. Acesso em: 2 abr. 2013. PMID:21295722.

KJELGAARD-HANSEN, M. et al. Evaluation of a Commercially Available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Determination of C-Reactive Protein in Canine Serum. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v.50, p.164-168, 2003b. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1439-0442.2003.00509.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

KURIBAYASHI, T. et al. Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. **Experimentals Animals**, v.52, p.377-381, 2003. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1538/expanim.52.377>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

LIN, Y. et al. Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.42077-42083, 2001. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/276/45/42077.short>>. Acesso em: 2 abr. 2013. doi:10.1074/jbc.M107101200.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S. et al. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **Veterinary Record**, v.154, p.814-817, 2004. Disponível em:

<<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/154/26/814.abstract>>. Acesso em: 2 abr. 2013.  
doi:10.1136/vr.154.26.814.

1 MCGROTTY, Y.L. et al. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p.255-258, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00050.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso em: 3 abr. 2013.

MOLD, C. et al. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with Fc-gamma R. **Journal of Immunology**, v.169, p.7019-7025, 2002. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/169/12/7019.short>>. Acesso em: 3 abr. 2013. PMID:12471137.

MORTENSEN, R.F.; ZHONG, W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. **Journal of Leukocyte Biology**, v.67, p.495-500, 2000. Disponível em: <<http://www.jleukbio.org/content/67/4/495.short>>. Acesso em: 3 abr. 2013. PMID:10770281.

MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary Journal**, v.168, p.28-40, 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>>. Acesso em: 3 abr. 2013.

PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: the acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v.31, p.125-129, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11259-007-0107-3?LI=true>>. Acesso em: 3 abr. 2013. doi: 10.1007/s11259-007-0107-3.

PFEFFER, A. et al. Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep. **Research in Veterinary Science**, v.55,

p.360-366, 1993. Disponível em: <  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/003452889390108R>>. Acesso em: 3 abr.  
 2013. [http://dx.doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90108-R](http://dx.doi.org/10.1016/0034-5288(93)90108-R).

SERIN, G.; ULUTAS, P.A. Measurement of serum acute phase proteins to monitor postoperative recovery in anoestrus bitches after ovariohysterectomy. **Veterinary Record**, v.166, p.20-22, 2010. Disponível em:<  
<http://veterinaryrecord.bmj.com/content/166/1/20.abstract>>. Acesso em: 3 abr. 2013.  
 doi:10.1136/vr.b5585.

SCHMIDT, E.M.S. et al. Serum protein concentrations in female dogs submitted to ovariohysterectomy determined by means of SDS-PAGE electrophoresis. **Veterinary Clinical Pathology - ASVCP Annual Meetings Abstracts**, p.13, 2011.

SHIM, B.S. et al. Studies on swine and canine serum haptoglobins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.243, p.126-136, 1971. Disponível em:<[http://dx.doi.org/10.1016/0005-2795\(71\)90046-8](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2795(71)90046-8)>. Acesso em: 3 abr. 2013.

SUTER, M. et al. Reduced acute phase response after laparoscopic total extraperitoneal bilateral hernia repair compared to open repair with the Stoppa procedure. **Surgical Endoscopy And Other Interventional Techniques**, v.16, p.1214-1219, 2002. Disponível em:<<http://link.springer.com/article/10.1007/s00464-001-9164-9>>. Acesso em: 3 abr. 2013.  
 doi:10.1007/s00464-001-9164-9.

SUTTON, R.H.; JOHNSTONE, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. **The Journal of Small Animal Practice**, v.18, p.277-281, 1977. Disponível em: <  
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1748-5827.1977.tb05884.x/abstract>>. Acesso  
 em: 3 abr. 2013.

SOLTER, P.F. et al. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.1738–1742, 1991. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1767999>. Acesso em: 3 abr. 2013. PMID:1767999.

THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams, Wilkins, 2000. p.891-898.

URIELI-SHOVAL, S. et al. Expression and function of serum amyloid A, a major acute-phase protein, in normal and disease states. **Current Opinion in Hematology**, v.7, p.64-69, 2000. Disponível em: [http://journals.lww.com/co-hematology/Abstract/2000/01000/Expression\\_and\\_function\\_of\\_serum\\_amyloid\\_A,\\_a.12.aspx](http://journals.lww.com/co-hematology/Abstract/2000/01000/Expression_and_function_of_serum_amyloid_A,_a.12.aspx). Acesso em: 3 abr. 2013.

YAMAMOTO, S. et al. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communication**, v.17, p.85-93, 1993. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF01839236>. Acesso em: 3 abr. 2013.

YUKI, M. et al. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Veterinary Research Communication**, v.32, p.533-542, 2008. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11259-008-9055-9>. Acesso em: 3 abr. 2013. doi: 10.1007/s11259-008-9055-9.

YUKI, M. et al. K. Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. **Veterinary Clinical Pathology**, v.39, p.65-71, 2010. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1939-165X.2009.00181.x/abstract?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false>. Acesso em: 3 abr. 2013. doi:10.1111/j.1939-165X.2009.00181.x.



## Normas para publicação

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

**4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

**5. A nota deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa**

**envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

**9.1.** Citação de livro:  
JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:  
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:  
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests **Tribolium confusum** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Tenebrio molitor** (Coleoptera: Tenebrionidae), **Sitophilus granarius** (Coleoptera: Curculionidae) and **Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37,

p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

#### 9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

#### 9.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**13.** Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

**14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

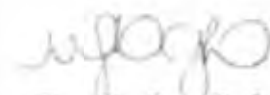
**16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.



## A T E S T A D O

Atesto para os devidos fins, que o Projeto de Pesquisa "**Proteínas de fase aguda em cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia pela técnica convencional e minimamente invasiva**", Protocolo nº 194/2011-CEUA, de **Camila Peres Rubio**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Mestrado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 02 de setembro de 2011.

  
p/

**Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira**

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

# Anexo A – Hemograma e concentrações de fibrinogênio e da proteína plasmática total nos dois grupos (G1 e G2) de cadelas submetidas à OSH

| Momentos avaliados               |                                   |                                   |                                 |         | Valores de referência para cães (Jain, 1993) |
|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---------|----------------------------------------------|
| Pré-cirúrgico (T1)               | 24 horas após o procedimento (T2) | 48 horas após o procedimento (T3) | 7 dias após o procedimento (T4) |         |                                              |
| Eritrograma                      |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| Hemácias (x10 <sup>9</sup> /μL)  |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 6,13                              | 6,33                              | 6,32                            | 6,39    | 5,5-8,5                                      |
| G2                               | 6,14                              | 5,62                              | 5,93                            | 6,82    |                                              |
| Hemoglobina (g/dL)               |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 14,51                             | 14,40                             | 14,58                           | 14,94   | 12-18                                        |
| G2                               | 14,00                             | 14,00                             | 13,60                           | 14,30   |                                              |
| Hematócrito (%)                  |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 43                                | 42                                | 44                              | 43      | 37-55                                        |
| G2                               | 41                                | 40                                | 40                              | 42      |                                              |
| VCM (fL)                         |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 66,86                             | 65,06                             | 68,26                           | 66,73   | 60-77                                        |
| G2                               | 68,82                             | 72,35                             | 68,80                           | 62,31   |                                              |
| CHCM (%)                         |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 32,00                             | 30,00                             | 31,00                           | 29,00   | 32-36                                        |
| G2                               | 33,20                             | 33,26                             | 33,23                           | 33,20   |                                              |
| Plaquetas (μL)                   |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 294.000                           | 292.000                           | 297.000                         | 360.000 | 160.000-430.000                              |
| G2                               | 200.000                           | 186.000                           | 180.000                         | 207.000 |                                              |
| Leucograma                       |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| Leucócitos totais (μL)           |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 15.500                            | 17.600                            | 14.300                          | 11.400  | 6.000-17.000                                 |
| G2                               | 13.970                            | 22.481                            | 16.862                          | 14.756  |                                              |
| Neutrófilos bastonetes (μL)      |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 0                                 | 113                               | 0                               | 0       | 0-300                                        |
| G2                               | 0                                 | 0                                 | 0                               | 0       |                                              |
| Neutrófilos segmentados (μL)     |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 12.012                            | 14.490                            | 9.798                           | 8.260   | 3.000-11.500                                 |
| G2                               | 9.160                             | 17.853                            | 11.376                          | 9.530   |                                              |
| Linfócitos (μL)                  |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 1.384                             | 1.846                             | 2.088                           | 2430    | 1.000-4.800                                  |
| G2                               | 4.329                             | 3.280                             | 3.965                           | 4038    |                                              |
| Monócitos (μL)                   |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 578                               | 849                               | 718                             | 470     | 150-1.350                                    |
| G2                               | 468                               | 459                               | 659                             | 465     |                                              |
| Eosinófilos (μL)                 |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 1.141                             | 784                               | 1845                            | 1.133   | 100-1.250                                    |
| G2                               | 370                               | 371                               | 662                             | 533     |                                              |
| Basófilos (μL)                   |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 0                                 | 0                                 | 0                               | 0       | Raro                                         |
| G2                               | 0                                 | 0                                 | 0                               | 0       |                                              |
| Proteína plasmática total (g/dL) |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 7,06                              | 7,21                              | 7,08                            | 6,77    | 6-8                                          |
| G2                               | 7,40                              | 7,69                              | 7,68                            | 8,14    |                                              |
| Fibrinogênio (mg/dL)             |                                   |                                   |                                 |         |                                              |
| G1                               | 200                               | 200                               | 200                             | 200     | 100-400                                      |
| G2                               | 200                               | 200                               | 200                             | 200     |                                              |

G1: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia minimamente invasiva. G2: cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia convencional.

---

**Anexo B - Valores de referências para cães**

---

|                                       |           |
|---------------------------------------|-----------|
| Alanina Aminotransferase (ALT) (UI/L) | 21-73     |
| Creatinina (mg/dL)                    | 0,50-1,50 |

---

KANEKO et al., 2008