

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

SAULO TINOCO DE LANNES

**AVALIAÇÃO CLÍNICA E DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E
DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE BOVINOS HÍGIDOS**

Campos dos Goytacazes

Fevereiro de 2016

SAULO TINOCO DE LANNES

AVALIAÇÃO CLÍNICA E DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E DO
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE BOVINOS HÍGIDOS

Dissertação de Mestrado submetida à Banca
examinadora como requisito para aprovação
da mesma no programa de pós-graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF.

ORIENTADORA: Prof^a. Paula Alessandra Di Filippo

Campos dos Goytacazes

Fevereiro de 2016

SAULO TINOCO DE LANNES

AVALIAÇÃO CLÍNICA E DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES SÉRICOS E DO
LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE BOVINOS HÍGIDOS

Dissertação de Mestrado submetido à Banca
examinadora como requisito para aprovação
no programa de pós-graduação em Ciência
Animal da Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro-UENF.

Aprovada em 22 de Fevereiro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. José Dantas Ribeiro Filho (Doutor, Ciência Animal) - UFV

Prof^a. Ana Bárbara Freitas Rodrigues (Doutora, Produção Animal) - UENF

Prof^o. Flávio Augusto Soares Graça (Doutor, Ciências Veterinárias) - UENF

Prof.^a Paula Alessandra Di Filippo (Doutora, Cirurgia Veterinária) - UENF

(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente a Deus que foi o grande responsável por eu ter chegado até aqui e estar finalmente atingindo o grande objetivo de completar o Mestrado.

Agradeço, com grande respeito a todos os professores, em especial a minha orientadora, Professora Paula Alessandra Di Filippo, por terem feito parte da minha formação e proporcionarem o conhecimento necessário para seguir adiante e me aperfeiçoar ainda mais em minha profissão.

Agradeço aos meus familiares e com especial carinho a meu pai, Marco Antônio Pereira de Lannes, minha mãe, Márcia Tinoco de Lannes e minha irmã, Luciana Tinoco de Lannes Karasarksian, dos quais recebi apoio das mais diversas maneiras que alguém poderia receber.

Agradeço com todo meu amor a Ana Carolina Queiroz Lima, minha esposa e companheira dos momentos bons e difíceis, sendo fundamental para manter meu equilíbrio, estímulo e foco.

Agradeço aos meus amigos Éverton Nunes, Daniel Amaral, Bethânia Falcão, Daniel Loivos de Latorre Pereira, Marcos Aurélio Dias Meireles e Rodrigo Menezes Salles Peçanha que foram muito importantes com estímulo e auxílio na execução deste trabalho de pesquisa.

Agradeço ao amigo e professor Anderson Teixeira Bastos e Antônio Peixoto Albernaz que me auxiliaram com desenvolvimento deste trabalho de dissertação, abrindo as portas de seu laboratório e ensinando os procedimentos técnicos.

Agradeço a todos os outros amigos e colegas com os quais convivi e estudei e que fizeram parte diretamente e indiretamente do meu aprendizado.

Agradeço imensamente a Professora Andressa Nogueira por todo o auxílio que prestou ao longo da execução deste trabalho.

Agradeço todos os técnicos desta universidade que só fizeram ajudar ao longo, facilitando práticas de laboratório, pesquisas, aulas práticas e além de manterem a organização de nossa universidade.

Agradeço por fim, aos Professores da banca examinadora, que cederam parte de seu tempo para avaliarem-me no momento em que encerro minhas atividades como aluno de mestrado.

RESUMO

As proteínas de fase aguda (PFAs) inibem a continuidade do dano tecidual e ativam o processo de reparação tecidual, além de serem os indicadores mais fiéis da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos. Foram utilizados 50 bovinos mestiços, com 18 meses de idade em média, os quais foram divididos em dois grupos de 25 animais, de acordo com o sexo. Os materiais biológicos coletados para o presente estudo foram o soro e o líquor. Para avaliar a sanidade dos animais do estudo, foram realizados exames clínicos como avaliação da temperatura retal (TR), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR), além das análises das bioquímicas séricas e líquóricas de Aspartato Aminotransferase (AST), Lactato Desidrogenase (LDH), Creatina Quinase (CK) e Gama Glutamiltransferase (GGT). Para a separação e identificação das PFA dos analitos em questão, foi empregada a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). As proteínas obtidas no soro e no líquor dos animais avaliados foram a imunoglobulina A (IgA) com peso molecular aproximadamente de 169 kDa, ceruloplasmina 104 kDa, transferrina 77 kDa, albumina 64 kDa, α 1-antitripsina 58 kDa, imunoglobulina G (IgG) com 85 kDa, haptoglobina 43 kDa e α 1-glicoproteína ácida (GPA) 39 kDa, de maneira que a α 1-antitripsina não apresentou concentrações séricas. Os exames físicos e bioquímicos séricos e líquóricos apresentaram-se condizentes aos de bovinos saudáveis, destacando-se que a análise de CK líquórica não gerou leituras de sua atividade. O efeito do sexo foi observado nas PFA do soro para as variáveis GPA e IgG, onde os machos apresentaram concentrações significativamente mais elevadas em ambos os casos. A avaliação e padronização das PFA líquóricas para bovinos hígdos é relevante, de maneira que estes dados ainda não são relatados na literatura e, devido à importância clínica destas, futuramente possam vir a ser associadas no diagnóstico de afecções neurológicas da espécie em questão.

Palavras-chave: Eletroforese, Proteína de fase aguda, Líquor, Diagnóstico.

ABSTRACT

Acute phase proteins (AFP) inhibit the continuity of tissue damage and activate the process of tissue repair as well as being the most faithful indicators of systemic responses in the inflammatory and infectious processes. Crossbred 50 steers were used, 18 months old on average, who were divided into two groups of 25 animals, according to sex. Biological materials collected for this study were the serum and cerebrospinal fluid (CSF). To assess the health of study animals, clinical trials were performed as evaluation of rectal temperature (RT), heart rate (HR), respiratory rate (RR), in addition to analyzes serum biochemical and CSF Aspartate Aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) and gamma glutamyl transferase (GGT). For the separation and identification of the analytes in question PFA, it was used electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). The proteins found in serum and cerebrospinal fluid of evaluated animals were immunoglobulin A (IgA) having a molecular weight of approximately 169 kDa, ceruloplasmin 104 kDa, transferrin 77 kDa, albumin, 64 kDa, α 1-antitrypsin 58 kDa immunoglobulin G (IgG) with 85 kDa, 43 kDa haptoglobin and α 1-acidic glycoprotein (GPA) 39kDa, so that the α 1-antitrypsin showed no serum concentrations. The physical examination and serum and CSF biochemical presented is consistent to the healthy cattle, especially the CK CSF analysis yielded no readings of their activity. The gender effect was observed in the serum AFP for GPA and IgG variables, where the males showed significantly higher concentrations in both cases. Evaluation and standardization of CSF PFA for healthy cattle is important, so that these data are not reported in the literature and, due to the clinical importance of these in the future may be associated in the diagnosis of neurological disorders of the species concerned.

Keywords: Electrophoresis, Acute phase protein, Cerebrospinal fluid, Diagnosis.

ABREVIATURAS

AST-Aspartato aminotransferase

BHA- Barreira Hematoencefálica

CK- Creatinaquinase

Cp- Ceruloplasmina

GGT-Gama glutamiltransferase

GPA- α 1-glicoproteína ácida

Hp-Haptoglobina

IL-1- Interleucina1

IL-6- Interleucina6

LCR- Líquido cefalorraquiano

LDH- Lactato desidrogenase

PAMP- Padrões Moleculares Associados a Patógenos

PCR- Proteína C Reativa

PFA- Proteínas de fase aguda

RRP- Receptores de Reconhecimento de Padrões

SAA- Amiloide A sérica

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa

α 1-GPA- α 1-glicoproteína ácida

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios, erro padrão da média, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis temperatura corporal (TR), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII)25

Tabela 2: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK) do soro (UIL⁻¹) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII)25

Tabela 3: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamiltransferase (GGT) do líquido (UIL-1) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII)26

Tabela 4: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis proteínas totais e proteínas de fase aguda do soro (mgdL⁻¹) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII)32

Tabela 5: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis proteínas totais e proteínas de fase aguda do líquido (mgdL⁻¹) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII)334

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO	3
3- JUSTIFICATIVA	4
4- REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.....	5
4.1.1. Proteínas de Fase Aguda Negativas:	7
4.1.2 Proteínas de fase aguda positivas	9
4.2. APLICABILIDADE FISIOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.....	13
4.3 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	14
4.4 BIOQUÍMICA CLÍNICA.....	15
4.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)	15
4.4.2 Creatina Quinase (CK)	16
4.4.3 Gama Glutamiltransferase (GGT)	17
4.4.4 Lactato Desidrogenase (LDH)	18
5- MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	19
5.2 EXAME CLÍNICO	19
5.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)	19
5.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE	20
5.5 ANÁLISES LABORATORIAIS	20
5.5.1 Liofilização	20
5.5.2 Eletroforese em gel poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio	21
5.5.3 Bioquímica sérica e líquórica	22
6- ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
7-RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
7.1 RESULTADOS DOS EXAMES FÍSICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS E LIQUÓRICOS	24
7.2 DISCUSSÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E EXAMES BIOQUÍMICOS SÉRICOS E LIQUÓRICOS	26
7.3 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO PROTEICA SÉRICA E LIQUÓRICA	31
7.4 DISCUSSÃO DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DO SORO E DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO	35
8-CONCLUSÕES	43

9-CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
ANEXOS I	64
ANEXOS II	69
ANEXO III.....	72

1-INTRODUÇÃO

A bovinocultura possui papel de destaque no cenário do agronegócio Nacional e Internacional. Frente a este contexto, o Brasil é detentor do segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de animais. Em 2004, assumiu a liderança nas exportações, aliado a presença da atividade em todos os estados brasileiros, denotando a importância econômica e social da bovinocultura no país (MAPA, 2015).

Entretanto, o grupo das doenças neurológicas que acometem o rebanho bovino, constitui-se como importantes entraves para o contínuo desenvolvimento e expansão do agronegócio da bovinocultura brasileira devido ao intenso quadro de morbidade e aos altos níveis de mortalidade causados por esta classe de doenças (LEMOS, 2005). Em estudo retrospectivo das afecções presentes no rebanho bovino brasileiro, Souza (2013) descreve as doenças do sistema nervoso bovino com prevalência de 53,58% sobre as dos demais sistemas, com especial destaque para a raiva, o botulismo e a polioencefalomalacia (PEM).

O diagnóstico de doenças neurológicas muitas vezes requer equipamentos específicos, demandam tempo, são onerosos e difíceis de serem realizados. Desta forma, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos diagnósticos confiáveis, seguros, baratos e que abranjam de forma representativa os rebanhos bovinos (SOUZA, 2013). O líquido cefalorraquidiano (LCR), produzido nos ventrículos cerebrais, é responsável pela proteção, nutrição e defesa do sistema nervoso central (SNC) e parte do sistema nervoso periférico (GAMA et al., 2005). O exame deste líquido traz informações preciosas sobre a higidez do SNC dos animais. Neste sentido, técnicas de citologia, pesquisa de anticorpos e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) são empregadas com sucesso na análise do LCR (CUNHA et al., 2009).

Nas duas últimas décadas, o interesse centrou-se sobre o potencial das proteínas de fase aguda (PFAs), como indicadores da presença, grau e, naturalmente, do tempo de inflamação, uma vez que estas proteínas são liberadas em grandes quantidades para a corrente sanguínea em resposta à infecção e lesão de tecidos. Componentes não específicos do sistema imune, as PFAs inibem a

continuidade do dano tecidual, isolando e destruindo o agente agressor e ativando o processo de reparação necessária para o retorno à normalidade. As concentrações circulantes das PFAs relacionam-se à intensidade da afecção e à extensão das lesões teciduais apresentadas pelo animal; portanto, sua quantificação pode prover informações diagnósticas e prognósticas importantes, se mensurada em tempo ideal (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

Na dependência da espécie animal, as PFA são consideradas indicadores mais fiéis da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios e infecciosos, quando comparadas a outras variáveis, tais como hipertermia e a presença de leucocitose associada à neutrofilia (JAIN, 2011). Assim sendo, acredita-se que importantes esclarecimentos sobre a fisiopatogenia de doenças neurológicas poderão advir após o estabelecimento do traçado eletroforético das proteínas de fase aguda contidas no LCR de bovinos hígidos e que este, viabilizará a interpretação das amostras alteradas. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi o de determinar o proteinograma do LCR de bovinos hígidos, utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

2- OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil eletroforético das proteínas de fase aguda do líquido cefalorraquidiano (LCR) e do soro de bovinos hígidos com idade média de 18 meses.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Correlacionar os achados do proteinograma do LCR com o do soro;
2. Correlacionar os achados do proteinograma do LCR e do soro com biomarcadores de lesões teciduais e de função orgânica;
3. Avaliar e discutir prováveis diferenças entre o proteinograma do LCR e do soro em função do sexo dos animais.

3- JUSTIFICATIVA

A análise do LCR fornece subsídios esclarecedores sobre a higidez do SNC dos animais. Muitas afecções podem produzir alterações na composição do LCR e evidenciar subprodutos do processo patológico ou mesmo, alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. As proteínas de fase aguda (PAF), componentes não específicos do sistema imune, são cada vez mais utilizadas como biomarcadores de prognóstico e no monitoramento das respostas a tratamentos, juntamente com determinantes gerais da saúde dos bovinos. Sabe-se que estas contribuem para o restabelecimento da homeostase, limitando o crescimento bacteriano de forma independente dos anticorpos, que aparecem logo após a instalação de processos inflamatórios, infecciosos, trauma cirúrgico, estresse e neoplasias.

Diante do exposto, acredita-se que a partir da determinação do perfil das proteínas de fase aguda contidas no LCR de bovinos hígidos seja possível o estabelecimento de padrões proteicos que possam ser confrontados com amostras provenientes de animais portadores de afecções relacionadas ao Sistema Nervoso.

4- REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

As proteínas são substâncias orgânicas formadas por aminoácidos unidos entre si, formando uma cadeia polipeptídica. São as macromoléculas mais abundantes do organismo, constituindo cerca de 50% do peso vivo. Esta biomolécula apresenta grande versatilidade funcional, das quais se destacam as atividades enzimáticas, de transporte, estruturais e imunológicas (GONZÁLEZ e SILVA, 2006). Algumas proteínas possuem características específicas podendo ser utilizadas como biomarcadores sensíveis do processo inflamatório, sinalizadoras de doenças, determinação de diagnósticos e prognósticos, controle da eficiência de tratamentos e na triagem para controle da saúde de rebanhos. Estas proteínas são conhecidas como Proteínas de Fase Aguda (PFAs). Essas proteínas podem alterar suas concentrações séricas em mais de 100% em resposta a reações pró-inflamatórias estimuladas por citocinas durante processos patológicos (ECKERSALL e BELL, 2010).

A inflamação é uma resposta coordenada do organismo frente a traumas ou lesões teciduais produzidas por agentes físicos (traumatismos e/ou cirurgias), químicos (tóxicos irritantes) ou biológicos (agentes infecciosos). A reação inflamatória é um componente da resposta imune inata. A imunidade inata representa uma resposta rápida e estereotipada a um número grande, mas limitado, de estímulos. É representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, células especializadas e moléculas solúveis, presentes em todos os indivíduos, independente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores, não alterando-se qualitativa ou quantitativamente após o contato. As principais células efetoras da imunidade inata são: macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células Natural Killer (NK). Os principais mecanismos na imunidade inata compreendem a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios, ativação de proteínas do sistema complemento e síntese de proteínas de fase aguda (PFA) a partir de citocinas e quimiocinas inflamatórias (CRUVINEL et al., 2010).

As citocinas são produzidas a partir da interação entre Receptores de Reconhecimento de Padrões (RRP), dentre os quais a família dos receptores Toll-like (TLRs), presentes nas células de defesa, com estruturas moleculares dos microrganismos, os Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) (CRUVINEL et al., 2010). Estas citocinas caracterizam-se como proteínas de baixo peso molecular, frequentemente glicosiladas, produzidas em resposta a patógenos, aos seus produtos e outros sinais associados (MATEOS, 2000). As citocinas pró-inflamatórias são liberadas, principalmente, por monócitos ou macrófagos, de forma a estimularem a síntese de PFAs pelo fígado. As principais citocinas responsáveis por ativar a síntese de PFAs no tecido hepático são a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e TNF- α (MURATA, 2004). Outro fator envolvido na produção e liberação das PFAs é o cortisol. Os corticosteróides são sintetizados e liberados quando necessários, não sendo estocados nas células adrenais. O principal estímulo para a sua secreção é o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ou corticotropina, produzido na adeno-hipófise (RODRIGUES, 2006). Quando o hormônio liberador da corticotropina sinaliza para adrenal a liberação do cortisol este, promove um efeito generalizado sobre o catabolismo tecidual, mobilizando aminoácidos da musculatura esquelética para a síntese hepática de proteínas de fase aguda (RODRIGUES, 2006).

Células inflamatórias como os mastócitos, leucócitos e macrófagos liberam substâncias denominadas citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α), que ativam células endoteliais e induzem a expressão de moléculas de adesão em sua superfície (RODRÍGUEZ, 2013).

A cinética da resposta das PFAs varia em função da espécie animal e do tipo de agente indutor. Em geral, sua produção inicia-se entre 6 e 8 horas após a agressão e atingem a concentração máxima em torno de 24 a 48 horas após o início da resposta, diminuindo assim que se produz uma melhora no estado de saúde do animal (ECKERSALL, 2008). As principais funções das PFAs dependem da interação destas com os ligantes de várias origens, formando complexos que são removidos pelos retículos endoplasmáticos ou hepatócitos. Com isso, poderá ocorrer inibição de proteases, neutralização de moléculas tóxicas, eliminação de membranas celulares e cromatina (ALMEIDA, 2006). Pesquisas recentes mostram que a quantificação de PFAs no plasma ou no soro sanguíneo pode ser útil no

diagnóstico, prognóstico e monitoramento de doenças e também, na avaliação do bem-estar de indivíduos ou de rebanhos (SIMPLÍCIO et al., 2013). Ensaios para a quantificação de PFAs apontam sua aferição rotineira no futuro, a fim de avaliar a saúde animal, aperfeiçoar o desempenho produtivo individual, monitorar a eficácia de terapias antibióticas, detectar doenças e ainda, propiciar benefícios consideráveis à segurança alimentar, por meio da avaliação dos animais antes do abate (SKINNER, 2001).

Atualmente o método mais utilizado para a detecção das PFAs é a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Sua execução é relativamente simples e de baixo custo. Este método possibilita a determinação de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, sendo necessárias apenas pequenas quantidades de amostra. Tem sido utilizada com eficiência para a obtenção do proteinograma em diversas espécies, inclusive bovinos (CALAZANS et al., 2009).

As PFAs podem ser classificadas em positivas e negativas. As positivas aumentam sua concentração durante a resposta de fase aguda, porém, as PFAs negativas apresentam diminuição na concentração (ECKERSALL, 2008).

4.1.1. Proteínas de Fase Aguda Negativas:

Entre as PFA negativas, destacam-se a albumina e a transferrina.

a) Albumina

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, constituindo importante reserva proteica. Atua como transportadora de ácidos graxos livres, aminoácidos, metais, cálcio, hormônios e bilirrubina, além de participar da regulação do pH sanguíneo (CARNEIRO, 2013).

Aumentos nas concentrações séricas de albumina ocorrem exclusivamente em situações de desidratação, de forma que seu aumento verdadeiro não ocorre em nenhuma espécie de animal doméstico (ECKERSALL, 2008). No entanto, processos patológicos como danos hepáticos crônicos, deficiência alimentar, doença renal, síndrome da má absorção intestinal, hemorragia e enteroparasitoses, podem produzir quadro de hipoalbuminemia como consequência do catabolismo aumentado

da albumina, sendo este, associado à deficiência energética que estimular a mobilização de reservas de aminoácidos para entrarem na via da gliconeogênese (CARNEIRO, 2013).

Bovinos com histórico de reticulopericardite traumático geralmente apresentam valores aumentados de albumina plasmática, já animais submetidos a procedimentos cirúrgicos apresentam diminuição da concentração de albumina denotando que o comportamento desta pode variar em virtude da afecção (SOARES, 2008). Em animais intoxicados naturalmente pela *Cestrum laevigatum* e que desenvolveram hepatopatia, foi detectada diminuição considerável nos níveis séricos de albumina. Esta diminuição deveu-se à perda de função do tecido hepático durante a intoxicação (COUTINHO et al., 2013).

b) Transferrina

A transferrina também é uma PFA negativa que possui a habilidade de sequestrar o ferro livre circulante e no controle da absorção do ferro intestinal, bem como na sua distribuição no organismo (TIZARD, 2008). O ferro é um dos nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, desta forma, a transferrina age como um elemento bacteriostático. Saut et al. (2009) demonstraram que a diminuição na concentração de transferrina observada em bovinos após o parto ocorreu em função da exposição do útero destes animais a micro-organismos. Estudos em bezerros recém-nascidos demonstraram que os níveis séricos de transferrina aumentaram até os 15 dias de vida, permanecendo estáveis após este período. Este comportamento não foi relacionado à resposta ao nascimento ou à ingestão de colostro, mas sim a um desenvolvimento fisiológico natural, inerente ao período de vida do animal (FAGLIARI et al., 2007; ROCHA et al., 2013).

A diminuição dos níveis da transferrina tem sido associada ainda a reações agudas causadas por ferimentos cirúrgicos (SAQUETTI, 2010), fruto de processos infecciosos (SAMPAIO, 2013) ou mesmo de processos inflamatórios (SIMPLÍCIO et al., 2013). No entanto, ensaio conduzido por Nogueira et al. (2013) demonstrou que equinos submetidos à laparotomia exploratória apresentaram aumento nos níveis de transferrina do líquido peritoneal. Os achados foram associados à resposta inflamatória desencadeada pela ferida cirúrgica e pela própria lesão entérica. Esta proteína, além de ser encontrada no plasma em maior quantidade, pode ser

observada ainda em baixíssimas concentrações no LCR, humor aquoso e perilíngua (CASTELL, 2007).

4.1.2 Proteínas de fase aguda positivas

Entre as PFAs positivas destacam-se a ceruloplasmina, a haptoglobina, o fibrinogênio, a proteína C-reativa (PCR), amiloide A, α 1-antitripsina e a glicoproteína ácida (SAUT et al., 2009). As PFAs positivas podem ser divididas ainda de acordo com o seu nível de aumento frente à resposta de fase aguda. As concentrações proteicas podem aumentar em 50% em relação aos seus valores basais, ter incremento de 2 a 3 vezes o valor de referência ou apresentar rápidos aumentos de até 1000 vezes sua concentração basal (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

As PFAs apresentam particularidades de acordo com a espécie em estudo. Na espécie bovina as proteínas que sofrem maior aumento frente a processos inflamatórios/infecciosos são a haptoglobina (Hp) e amiloide A sérica (SAA). Estas proteínas podem apresentar aumentos de 100 a 1000 vezes em relação à sua concentração basal. A α 1-glicoproteína ácida (GPA), fibrinogênio, PCR e a α 1-antitripsina apresentam aumento moderado (2 a 3 vezes) em relação às concentrações basais (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001; ECKERSALL, 2008; CRAY, 2009).

a) Fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína composta por duas subunidades, cada uma das quais, consiste de três cadeias polipeptídicas interligadas por pontes de dissulfeto (ECKERSALL, 2008). Normalmente circula em níveis plasmáticos uniformes, mas durante a fase aguda da inflamação é liberado em maior quantidade pelos hepatócitos, elevando seus níveis (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001).

Aumento significativo nos níveis de fibrinogênio (8,86%) foi demonstrado por Simplício et al. (2013) em bovinos com fotossensibilização. Em condições de manejo extensivo, Silva et al. (2008) demonstraram que o fibrinogênio em bovinos apresenta reatividade precoce em relação a alterações leucocitárias, apontando a eficiência do seu uso no diagnóstico de afecções agudas. Entretanto, o fibrinogênio não apresenta grande confiabilidade na determinação de processos inflamatórios quando utilizado isoladamente, pois sua concentração pode permanecer invariável ou

diminuir em enfermidades inflamatórias, pois o consumo desta proteína pode exceder sua produção (WELLES et al., 1993).

b) Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) foi a primeira PFA descrita devido ao seu aparecimento precoce diante de processos inflamatórios, antes mesmo da observação da hipertermia (CRAY, 2009). A PCR é um marcador de resposta de fase aguda que apresenta rápido aumento dos seus níveis séricos após dano tecidual, infecção ou outros processos inflamatórios. Após trauma agudo ou infecção, a PCR é rapidamente sintetizada pelos hepatócitos (ANZILIERO et al., 2013). Dentre suas funções biológicas destaca-se a ativação da fagocitose por macrófagos e monócitos de partículas antigênicas e de micro-organismos, produção de citocinas e ativação seletiva das células T citotóxicas (PETERSEN, 2004).

Na espécie humana, a PCR tem sido utilizada para diferenciar quadros de meningites bacterianas e virais. Os níveis de PCR apresentam elevações significativas em infecções bacterianas, diferentemente das infecções virais, onde seus níveis não se modificam (ALMEIDA, 2006). Os níveis de PCR também permaneceram inalterados em bovinos da raça Flamenga diagnosticados com Leucose Enzoótica Bovina (ROCHA et al., 2014).

c) Haptoglobina (Hp)

A haptoglobina é uma glicoproteína do plasma que possui uma estrutura tetramérica. Consiste de duas subunidades α combinadas com outras duas subunidades β formando um complexo estável ao se ligar a hemoglobina, de forma a prevenir danos oxidativos (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001; RODRÍGUEZ, 2013).

Em bovinos a determinação da concentração de Hp é útil no monitoramento da presença e gravidade de processos inflamatórios agudos (GANHEIM et al., 2007; ECKERSALL, 2008). A Hp é um dos biomarcadores mais sensíveis na espécie bovina como demonstrado por Simplício et al. (2013), ao comparar o proteinograma de animais sadios com o de animais acometidos com afecções inflamatórias agudas, havendo considerável aumento de Hp nos casos patológicos. Vacas e búfalas submetidas à laparotomia apresentaram níveis elevados de Hp 24 horas após os procedimentos cirúrgicos, mantendo níveis elevados por até 120 horas no pós-

operatório (SAQUETTI, 2010). A haptoglobina está presente ainda, na maioria dos fluidos corporais, tais como soro, urina, saliva, LCR, líquido amniótico e ascite (DOBRYSYCKA, 1997).

d) α 1-antitripsina

A α 1-antitripsina é considerada o principal componente entre os inibidores de proteases, sendo que possui a função de neutralizar as atividades das enzimas proteolíticas, durante processo inflamatório agudo (DI FILIPPO et al., 2011). A α 1-antitripsina é um fraco inibidor da fibrinólise, porém potente inibidor do fator de coagulação XI. Em adição ao seu papel fibrinolítico, a α 1-antitripsina é um dos principais inibidores da proteína C reativa (McGAVIN e ZACHARY, 2007).

Em bezerros recém-nascidos, níveis de α 1-antitripsina não foram detectados por Rocha et al. (2013). Estes resultados podem ser comparados aos obtidos por Fagliari et al. (2006), onde em proteinogramas realizados em três grupos de bezerros apenas em um deles foi detectada a presença da α 1-antitripsina. A α 1-antitripsina também não foi detectada no soro de bovinos adultos saudáveis (JULIANO et al., 2009), no entanto Sampaio (2013) demonstrou a ocorrência de aumento nos níveis desta proteína em bovinos experimentalmente infectados com *Trypanosoma vivax*, demonstrando sua importância como indicador de processos infecciosos.

e) α 1-Glicoproteína Ácida (GPA)

A α 1-glicoproteína ácida é uma PFA altamente glicosilada e possui elevado conteúdo de ácido siálico e componente da fração seromucoide do plasma, a qual possui mais resistência à precipitação com ácidos. Possui a capacidade de ligar-se a compostos farmacológicos produzindo mudanças farmacocinéticas, além da habilidade de neutralizar lectinas tóxicas e endotoxinas (ECKERSALL, 2008).

Bovinos com fotossensibilização ou mastite, apresentaram a α 1-glicoproteína ácida atuando como um biomarcador inflamatório sensível, porém em pacientes com onfaloflebite não foi verificada diferença significativa nas concentrações séricas de GPA em relação aos animais saudáveis (SIMPLÍCIO et al., 2013). Segundo achados de Hirvonen (2000), este fator se deve a GPA apresentar

níveis moderados ou relativamente baixos em resposta à injúria tecidual nesta espécie.

A α 1-glicoproteína ácida participa ainda na manutenção da homeostase local, reduzindo os danos teciduais provocados pelos processos inflamatórios. Lecchi et al. (2009), acreditam que a GPA esteja envolvida no processo de resistência às bactérias. Ainda, em estudos do perfil da GPA em bovinos da raça curraleiros, Juliano et al. (2009), demonstraram correlação positiva entre os valores da Hp e da GPA indicando que fatores para a elevação destas estejam associados.

f) Amilóide A sérica (SAA)

A (SAA) é uma apolipoproteína que se associa a lipoproteínas de alta densidade durante a resposta de fase aguda. Apresenta grande sensibilidade na espécie bovina diante de processos inflamatórios. Vários isótopos da SAA foram descritos, dentre estes a SAA₁ e SAA₂ que respondem a estímulos inflamatórios com aumento de sua produção pelo fígado e a SAA₃ que é expresso em tecidos não hepáticos, como pulmões e glândulas mamárias (CECILIANI, 2012).

A proteína Mastite Amilóide A Sérica (M-SAA) é um isótopo produzido no tecido mamário, associado com a adaptação extrauterina dos recém-nascidos e remodelação do tecido mamário. Esta proteína pode ser um indicador de processos inflamatórios e infecciosos do tecido mamário de bovinos (TÓTHOVÁ et al., 2012).

g) Ceruloplasmina (CR)

A CR é uma glicoproteína que transporta a maior parte do cobre do soro. Cada molécula transporta 6 a 8 átomos de cobre de acordo com a espécie animal. É uma proteína de fase aguda, cujo aumento no plasma de ruminantes indica processo inflamatório leve (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001). Apesar da afirmação de Murata (2004) de que a CR seja um marcador inflamatório menos comum para bovinos do que outras PFAs, aumentos desta variável foram demonstrados em animais com mastite, fotodermatite e onfaloflebite (SIMPLÍCIO et al., 2013). Em pacientes bovinos com fotossensibilização hepatógena foi verificado aumento ainda maior dos níveis CR em relação a animais saudáveis. Este aumento alcançou 309,1% em relação aos valores basais (FAGLIARI et al., 2007).

4.2. APLICABILIDADE FISIOLÓGICA DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA

As PFAs apresentam diversos tipos de funções, como a identificação de processos inflamatórios e infecciosos. Seu uso já foi comprovado em afecções como mastites, enterites, pneumonias, peritonites, endocardites e endometrites (CECILIANI et al., 2012). Outra importante aplicação é a possibilidade de avaliação do bem-estar animal através de elaboração de proteinogramas de estresse (ECKERSALL e BELL, 2010).

Estudos conduzidos por Fagliari et al. (2006) revelaram que as PFAs podem ser utilizadas na avaliação da imunidade passiva e no diagnóstico e prognóstico de doenças em bezerros neonatos, porém é preciso considerar as diferenças fisiológicas, possivelmente decorrentes de influência genética reduzindo-se assim, o risco da interpretação incorreta dos resultados.

A CR e a Hp são apontadas por Simplício et al. (2013) como os biomarcadores mais confiáveis em bovinos com mastite, fotossensibilização e onfaloflebite. A GPA foi um bom marcador apenas em animais com mastite e fotossensibilização. Por sua vez, o fibrinogênio mostrou-se confiável apenas em bovinos com mastite, com elevação de 146,5% em relação ao grupo sadio.

Apesar das PFAs apresentarem alterações frente a diversas afecções de caráter infeccioso e inflamatório em bovinos, Carvalho (2010) não detectou alterações significativas na concentração das PFAs em ovinos com pododermatite causada por *Fusobacterium necrophorum* e *Dichelobacter nodosus*. Segundo Silva et al. (2008), bovinos terminados a pasto apresentam maior concentração sérica de fibrinogênio em relação a bovinos em confinamento. O aumento do fibrinogênio foi atribuído ao constante desafio imunológico ao qual os animais são expostos nestas condições de manejo.

Existe também grande preocupação em minimizar os danos sofridos em procedimentos cirúrgicos cruentos como a orquiectomia e a descorna. Pang et al. (2006) avaliaram o efeito do carprofeno sobre o comportamento do cortisol e das PFAs em bovinos castrados utilizando-se ligadura ou burdizzo, visando desta maneira, a diminuição dos fatores inflamatórios durante o pós-cirúrgico. Os níveis de cortisol e de Hp e fibrinogênio apresentaram-se diminuídos nos grupos de animais

que receberam o carprofeno. Os resultados foram associados à diminuição dos fatores inflamatórios no pós-operatório. Aferições dos valores de PFAs também foram realizadas por Ting et al. (2003) em bovinos castrados através do burdizzo. O estudo visava distinguir as diferenças entre grupos experimentais, nos quais eram utilizados diferentes protocolos de analgesia e anestesia. Os resultados demonstraram que os grupos experimentais em que se fez uso do cetoprofeno, independente da realização do bloqueio local ou anestesia epidural, apresentaram redução significativa nos níveis de Hp e fibrinogênio. Tais achados denotam a importância do uso farmacológico de anti-inflamatórios não esteroidais em procedimentos cirúrgicos nesta espécie. As PFAs podem ainda ser utilizadas no estabelecimento do nível de lesão após correções cirúrgicas. Concentrações elevadas de CR foram observadas no plasma e no líquido peritoneal de bezerros, antes e após herniorrafia umbilical congênita (SOARES, 2008).

O perfil eletroforético das proteínas do LCR de cães saudáveis e com cinomose em fase nervosa e não nervosa revelou aumento nos níveis de PFAs nos animais enfermos (GAMA et al., 2007). Em humanos, duas proteínas designadas de 130 e 131 foram detectadas, em baixas concentrações no LCR de pacientes com a doença de Creutzfeldt-Jakob (GARY et al., 1996).

4.3 LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

O LCR é produzido nos ventrículos cerebrais e irriga o sistema nervoso central (SNC) e parte do sistema nervoso periférico. Possui as funções de proteção, nutrição e, ainda, habilidade em promover a defesa do sistema nervoso, transportando e colocando frente a frente agentes injuriantes e células de defesa (GAMA et al., 2005). A conservação das propriedades e funções do LCR só é possível graças a barreira hematoencefálica que mantém um ambiente estável para a atividade neuronal, impedindo a passagem de substâncias tóxicas e protegendo os neurônios contra neurotransmissores circulantes (LATERRA e GOLDSTEIN, 1991), entretanto, permite trocas ativas que ocorrem continuamente e que conferem o dinamismo dos constituintes do LCR (GAMA et al., 2005). Deste modo os constituintes líquóricos podem refletir situações de normalidade e condições patológicas. Assim sendo, a análise do LCR constitui-se em um meio viável e eficaz

na avaliação do sistema nervoso, no que diz respeito ao diagnóstico e prognóstico de inúmeras enfermidades (GAMA et al., 2005).

Aumentos nas atividades enzimáticas presentes no LCR de bovinos podem indicar a existência de lesões no tecido encefálico ou alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os níveis líquóricos de creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH) e aspartato aminotransferase (AST) encontram-se aumentados no LCR após lesão de tecido nervoso ou após o aumento de permeabilidade da barreira entre o sangue e o sistema nervoso (MOSCARDINI, 2007).

4.4 BIOQUÍMICA CLÍNICA

A composição bioquímica sanguínea reflete condições metabólicas dos tecidos, de maneira que sua alteração pode ser reflexo de lesões teciduais, transtornos no funcionamento dos órgãos, adaptação do animal frente a mudanças nutricionais, fisiológicas e desequilíbrios metabólicos específicos. Dessa forma, a representatividade clínica de enzimas como a Aspartato Aminotransferase (AST), Gama Glutamiltransferase (GGT), Creatina Quinase (CK) e Lactato Desidrogenase (LDH) se faz necessária na avaliação da sanidade dos animais (NOLETO, 2012).

4.4.1 Aspartato Aminotransferase (AST)

A AST é responsável por catalisar a transaminação do L-aspartato e do 2-oxoglutarato em acetato e glutamato utilizando o piridoxal-5'-fosfato como cofator (KANEKO, 2008). A AST apresenta grande atividade no tecido hepático, muscular, cardíaco e nos eritrócitos. O aumento dos níveis de AST se relaciona à existência de doenças hepáticas graves e difusas, principalmente quando associado com icterícia (CARDOSO et al., 2011), já que a AST hepática está localizada nos hepatócitos com 81% a 85% do total da atividade na mitocôndria e 15% a 19% no citoplasma, dessa forma, existem duas isoenzimas de AST, uma citosólica e outra mitocondrial que possuem pesos moleculares diferentes e existem em múltiplas formas (BARINI, 2007).

Em bezerros recém-nascidos, a atividade de AST se elevava a partir dos três meses de idade chegando a valores máximos em vacas com 48 a 72 meses (GREGORY et al., 1999). Esta enzima se localiza no citoplasma das células hepáticas e mitocôndrias. Dessa forma, é possível estimar a extensão da lesão, assim como as condições de reversão desta, baseando-se no aumento e no tempo no qual a AST manteve-se elevada. O aumento da atividade sérica da AST é observado tanto em lesões hepáticas reversíveis e irreversíveis (KANEKO, 2008).

A AST associada à creatina quinase (CK), pode ser utilizada no diagnóstico de lesões musculares. A CK apresenta pico máximo de elevação no período 4 a 6 horas após a injúria muscular e seus valores retornam aos basais de 24 a 96 horas. Já as concentrações séricas de AST apresentam pico após 24 horas e podem se manter elevadas por 5 dias ou até algumas semanas após trauma muscular (THOMASSIAN et al., 2007). Esta avaliação corrobora com a indicação de lesões musculares mais antigas e na interpretação do conjunto de respostas, facilitando ou mesmo estendendo o período de tempo dessa avaliação (CLÁUDIO, 2012).

4.4.2 Creatina Quinase (CK)

A CK está presente em maior atividade na musculatura esquelética. Sua concentração varia de acordo com o grupo muscular estudado, de forma que, músculos de “ação rápida” possuem maior atividade de CK do que músculos de “ação lenta” (BARINI, 2007). Tanto no miocárdio, quanto no músculo esquelético a CK permite que, em situações de baixa demanda energética, a energia seja armazenada na forma de creatina fosfato. Entretanto, em momentos que são necessários maiores aportes energéticos para a contração muscular a CK catalisa a transferência do fosfato de alta energia da creatina fosfato ao ADP para formar ATP (KANEKO, 2008).

A CK apresenta duas subunidades distintas referidas como CKM (músculo) e CKB (cérebro). Estas se combinam aleatoriamente para formar três isoenzimas de CK: CK-MM, CK-BB e CK-MB. O músculo esquelético da maioria das espécies tem quase 100% CK-MM. O Coração tem principalmente CK-MM e uma quantidade variável de CK-MB. Por sua vez, o cérebro possui principalmente, CK-BB e pequena quantidade de CK-MB e CK-MM (KANEKO, 2008). A atividade da CK no tecido cerebral é aproximadamente 10% da encontrada no músculo esquelético. Sendo

assim, a CK plasmática normalmente não penetra no LCR, de forma que qualquer atividade do CK nesse fluido será derivada do Sistema Nervoso Central. Em algumas doenças neurológicas da espécie bovina como raiva, leucose medular e abscesso parahipofisário, não foram observadas diferenças nos valores de CK no LCR, denotando que estas afecções não produzem alterações à permeabilidade da barreira hematocefálica que permitam a passagem desta enzima (MOSCARDINI, 2007).

4.4.3 Gama Glutamiltransferase (GGT)

A GGT é uma enzima ligada à membrana, na superfície externa das células através de um peptídeo hidrófobo transmembranal. A localização celular de GGT é de grande relevância, uma vez que a especificidade desta por determinados órgãos pode ser usada como um teste de valor diagnóstico (KANEKO, 2008). Na espécie bovina a GGT está presente em todas as células, com exceção das musculares. Atividades elevadas de GGT são encontradas nos rins e principalmente no fígado, já que este contribui provavelmente para a maioria, se não toda a atividade da GGT sérica. Lesões hepatobiliares com colestase elevam seus níveis de GGT rapidamente, devido à sua alta concentração nas células epiteliais biliares (SANTOS et al., 2007).

A mensuração de GGT possui grande importância na identificação de alterações hepáticas quando os níveis de AST estão aumentados. Isoladamente, aumentos nos níveis de AST podem ser inespecíficos para o esclarecimento da condição hepática, já que alterações musculares elevam seus valores. Entretanto, quando o aumento da AST está associado ao de GGT, o valor diagnóstico é aumentado (CARDOSO et al., 2011).

Em bovinos as principais enzimas utilizadas para a avaliação do perfil hepático são a GGT e AST. Estudo realizado por Cardoso et al. (2011), demonstrou haver diferença na atividade destas enzimas entre bovinos das raças Nelore, Curraleiros e Pantaneiros. Outra alteração presente na atividade de GGT, que não se relaciona a causas patológicas, refere-se às idades dos conceptos. Bezerros recém-nascidos apresentam picos na atividade de GGT com 12 horas após o nascimento e os valores decrescem entre 16 a 30 dias de vida, estabilizando-se (FEITOSA et al., 2009).

4.4.4 Lactato Desidrogenase (LDH)

A LDH catalisa a interconversão reversível do lactato e piruvato, além de ser umas das maiores moléculas de proteína do corpo. As moléculas de LDH são tetraméricas, formadas por quatro subunidades; estas podem ser de duas formas, M (muscle) ou H (heart). As combinações possíveis dessas subunidades resultam em cinco isoenzimas de LDH, que podem ser separadas por eletroforese (CLÁUDIO, 2012).

A LDH é uma enzima presente em ampla variedade de estruturas como tecido muscular, endotelial e nervoso. Frequentemente é usada como marcador de danos teciduais, além de apresentar-se abundante nas células vermelhas, o que permite sua utilização como biomarcador para hemólise (THOMASSIAN et al., 2007).

Dentre os testes laboratoriais utilizados para a avaliação da integridade muscular as enzimas CK, LDH e AST são as mais utilizadas. Estas enzimas apresentam concentrações altas no citoplasma das células musculares (BARINI, 2007). Entretanto, devido à meia-vida de LDH, sua atividade permanece aumentada por algum tempo após a lesão inicial, podendo assim, ser útil em diagnósticos retrospectivos. Atividades séricas e líquóricas aumentadas de CK, AST e LDH, são detectadas em associação com diversas doenças neurológicas ou aumento da permeabilidade da membrana, como, por exemplo, durante a intoxicação por *Solanum paniculatum* (MOSCARDINI, 2007; REGO et al., 2012).

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para realização deste ensaio 50 bovinos mestiços, machos e fêmeas, com média de idade de 18 meses foram utilizados. Os animais apresentavam em média 350 Kg de peso corporal, de forma que todos eram criados extensivamente em pasto formado por *Brachiara decumbens* e vacinados contra clostridiose, febre aftosa e raiva visando o abate humanitário para consumo humano. Os animais foram avaliados clinicamente e ao ser constatada a inexistência de doenças inflamatórias e/ou infecciosas, foram submetidos à colheita de líquido cefalorraquidiano. Os animais foram alocados em dois diferentes grupos experimentais, GI (n=25)= bovinos machos e GII (n=25)= bovinos fêmeas.

No que diz respeito às questões de bioética e bem-estar animal, o presente trabalho de pesquisa foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UENF, tendo sido devidamente aprovado sob o número de protocolo 291.

5.2 EXAME CLÍNICO

Os animais foram submetidos a exames clínicos e os parâmetros, frequência cardíaca e respiratória, temperatura retal e coloração das mucosas oculares foram aferidos. A observação da existência de alterações e/ou ferimentos e lesões corporais automaticamente excluiu os animais das análises. Os animais também foram submetidos ao exame neurológico (Anexo I).

5.3 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO (LCR)

As colheitas de LCR foram realizadas através da punção do espaço atlanto-occipital utilizando-se o mandril do cateter 14G¹. Para colheita, os animais foram sedados com cloridrato de xilazina a 2%² na dose de 0,05 a 0,08 mg/kg, via intramuscular. Na sequência, o animal foi colocado em um brete de contenção e com o auxílio de um imobilizador nasal tipo formiga e teve a cabeça flexionada em

¹ Jelco®

² Rompun®

direção ao pescoço, formando um ângulo de 90° (STÖBER, 1993). A região puncionada foi submetida à tricotomia e antisepsia rotineiras e na sequência, procedeu-se com o bloqueio anestésico local com cloridrato de lidocaína a 2%³, aproximadamente 5mL por animal. O local exato de punção, foi determinado pela região delimitada por um triângulo, formado pela protuberância do osso occipital e as bordas da asa do atlas, conforme técnica descrita por Scott (2004).

Após a colheita, as amostras de líquido cefalorraquidiano foram acondicionadas em tubos estéreis tipo eppendorf, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento das análises.

5.4 COLHEITA DAS AMOSTRAS DE SANGUE

Amostras de sangue foram colhidas mediante punção jugular utilizando-se agulhas hipodérmicas 40x1,2 mm e seringas plásticas descartáveis. As amostras foram colhidas em frascos estéreis sem anticoagulante. Ato contínuo foi realizada a centrifugação a 200G por 5 minutos e após sinérese, identificadas e armazenadas a -20°C até o momento das análises laboratoriais.

5.5 ANÁLISES LABORATORIAIS

5.5.1 Liofilização

As concentrações das proteínas totais séricas e líquóricas foram obtidas pelo método do Biureto, e Sensiprot, respectivamente, com o auxílio de um conjunto de reagentes⁴ e leituras espectrofotométricas⁵.

Para o fracionamento eletroforético das frações proteicas do soro e do líquido cefalorraquidiano, procedeu-se com a eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Entretanto, no caso do LCR, foi necessário que primeiramente realiza-se a liofilização do mesmo, devido à baixa concentração de proteínas no LCR. Para tanto, foram pipetadas alíquotas de 1ml de

³ LidoFarm®

⁴ Labtest Sistema de Diagnósticos Ltda. - Lagoa Santa, Brasil.

⁵ Biosysten®- BTS-350.

cada amostra para acondicionamento em tubos Falcons de 15mL. Em seguida as amostras passaram por um processo de congelamento em nitrogênio líquido. Este congelamento foi realizado de maneira que o material amostral formasse uma fina camada na parede do tubo, facilitando o processo de liofilização. O tubo foi então lacrado com papel filme e neste, foram realizados vários orifícios com o auxílio de uma agulha estéril 25X8 mm, permitindo assim, que ocorresse o processo de liofilização, porém, impedindo uma possível perda da amostra durante o processo.

A liofilização foi realizada em um aparelho Liofilizador⁶, que deve estar previamente resfriado a -40°C. Após atingir a temperatura determinada, a bomba de vácuo é ligada, para que a pressão do sistema caia pelo menos até 500µHg. Nestas condições, as amostras foram inseridas nos frascos de liofilização e estes foram fechados com uma tampa de borracha contendo um adaptador que se conecta ao liofilizador. Após a conexão do frasco à torneira do sistema, a válvula de vácuo desta é aberta e aguardou-se cerca de 8 horas, até que o processo estivesse concluído. As liofilizações foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Reconhecer no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

5.5.2 Eletroforese em gel poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

Para realização da eletroforese, a placa que contém o gel foi acoplada ao suporte de sustentação apropriado, em contato com uma cuba contendo solução tampão apresentando pH 8,9. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e, após polimerização, com o gel de empilhamento a 4%. Passadas algumas horas para polimerização do material, o próximo passo consistiu no preparo das amostras para o fracionamento das proteínas adicionando-se 10µL de soro sanguíneo ou LCR concentrado, diluindo-os em 30µL de tampão-fosfato (PBS), e 20µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5µL de cada amostra foi depositada em uma determinada cavidade do gel, tendo a primeira e a última amostra de cada gel em duplicata, além da amostra padrão como referência, que sempre é colocada em uma cavidade preestabelecida (NOGUEIRA, 2014).

⁶ LioTop L-101

O conjunto foi submetido à corrente elétrica inicial de 20 mA por gel, fornecido por uma fonte de energia apropriada. Após a passagem das amostras do gel de empilhamento para o gel de separação, a corrente elétrica foi aumentada em 25% do valor inicial, perfazendo um total de 40 mA. Terminada a separação, a fonte elétrica foi imediatamente desligada e o gel, retirado da placa para ser corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie 0,2% sob agitação horizontal constante para uma coloração uniforme. Em seguida o gel foi submerso em solução descorante a base de metanol para retirar o excesso de corante, até que todo o gel se apresentasse nítido (NOGUEIRA, 2014). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada⁷. Para o cálculo do peso molecular, foram utilizados marcadores (Sigma Marker 6.500 – 200.000) de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20kDa, além das proteínas purificadas albumina, α 1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e imunoglobulina G (IgG) (Anexo II). Os procedimentos descritos foram realizados no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”(UNESP), Campus Jaboticabal-SP.

5.5.3 Bioquímica sérica e líquórica

A determinação da concentração sérica e líquórica das variáveis AST, GGT, CK e LDH foi realizada com o auxílio de um conjunto de reagentes⁸ e realizada em aparelho de leitura espectrofotométrica⁹. Para tanto, as amostras foram descongeladas rapidamente a 37° C para que não houvesse a formação de cristais de gelo e em seguida, estas foram pipetadas em tubos de ensaio juntamente com o reagente de cada teste realizado, de acordo com as especificações do fabricante⁸. Por fim, foi realizada a leitura em aparelho de espectrofotometria adequado⁹. Todos os testes foram realizados no Setor de Patologia Clínica do Laboratório de Clínica e Cirurgia Animal do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

⁷ FotodyneInc, Houston, TX, USA

⁸ Labtest Sistema de Diagnósticos Ltda. - Lagoa Santa, Brasil

⁹ Biosystem- BTS 350

6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas em duas fases, sendo a primeira referente ao proteinograma das amostras e a segunda, o perfil enzimático hepático e tecidual. Para a padronização dos níveis de atividade enzimática sérica e liquórica, assim como das concentrações padrão das proteínas de fase aguda séricas e liquóricas, ambas avaliadas em função do sexo, foi utilizado o “Teste F”. Foi testada também se há heterogeneidade de variâncias com uso da teoria de modelos lineares, análises essas, feitas com o procedimento MIXED do software SAS. Procedimento semelhante foi utilizado na análise estatística da temperatura retal, pois assim como os demais dados, este também apresenta distribuição normal. Entretanto, as análises da frequência respiratória e frequência cardíaca, realizadas a fim de estabelecer os valores de normalidade para o rebanho analisado em função do sexo, foi utilizada a teoria de modelos lineares generalizados com pressuposição das duas características possuírem distribuição de *Poisson*, utilizando procedimento GLIMMIX do software SAS. Por fim, foi realizada Correlação de Pearson para o estabelecimento de possíveis associações entre os níveis de atividade enzimática e concentrações proteicas entre as amostras sérica e liquórica, utilizando para tanto, o procedimento CORR do software SAS.

7-RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 RESULTADOS DOS EXAMES FÍSICOS E BIOQUÍMICOS SÉRICOS E LIQUÓRICOS

Os dados referentes à avaliação clínica, bem como a estatística calculada, estão expostos na Tabela 1. Para as variáveis frequência respiratória, frequência cardíaca e temperatura corpórea não houve variação por efeito do sexo e as médias apresentaram-se dentro dos limites de confiança estabelecidos para bovinos.

Na bioquímica sérica, foram avaliadas as atividades de AST, CK, LDH e GGT, de forma que os analitos e as médias obtidas (Tabelas 2 e 3) apresentaram-se dentro dos limites de confiança estabelecidos para os bovinos do presente ensaio. Com relação à atividade sérica de CK, esta apresentou efeito quanto ao sexo, onde as fêmeas demonstraram médias superiores aos machos (Tabela 2).

Da mesma forma que no soro, nas amostras liquóricas bovinas foram avaliadas as atividades de AST, CK, LDH e GGT, sendo que apenas a CK liquórica não apresentou leitura para os animais aqui avaliados (Tabela 3). As demais variáveis aferidas apresentaram-se dentro dos limites de confiança estabelecidos para os bovinos do presente ensaio. Não houve correlação entre os valores séricos e liquóricos de AST, CK, LDH e GGT quando analisados pelo método de Correlação de Pearson.

Tabela 1: Valores médios, erro padrão da média, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis temperatura corporal (TR), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (FR) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII).

Parâmetro	Sexo	Média	Erro padrão	Intervalo de confiança (99%)		P Valor*
				LI	LS	
TR- ^o C	GI	38,68	±0,021	38,62	38,73	0,2826
	GII	38,64	±0,019	38,59	38,70	
FC- BPM	GI	65,2	±0,03	64,2	66,3	0,7998
	GII	65,8	±0,02	64,8	66,9	
FR- RPM	GI	36,7	±0,03	35,6	37,8	0,4911
	GII	37,9	±0,03	36,8	38,9	

*P Valor: Significância de efeito do sexo para valores de $P \leq 0,01$.

Tabela 2: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH), gama glutamiltransferase (GGT) e creatina quinase (CK) do soro (U/L) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII).

Enzimas	Sexo	Média- UI/L	Erro padrão	Intervalo de confiança (99%)		$P \leq 0,01$
				LI	LS	
AST	GI	146,67	±6,266	129,85	163,49	0,2557
	GII	156,76	±6,139	140,28	173,24	
LDH	GI	1865	±94,5	1611	2119	0,7888
	GII	1900	±92,6	1652	2149	
GGT	GI	22	±1,3	18	25	0,0512
	GII	18	±1,2	15	21	
CK	GI	316,2	±32,98	223,6	408,8	0,0016
	GII	556,9	±62,51	382,1	731,8	

*P Valor: Significância de efeito do sexo para valores de $P \leq 0,01$.

Tabela 3: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e gama glutamiltransferase (GGT) do líquido (UIL-1) de 50 bovinos mestiços saudáveis, machos (GI) e fêmeas (GII).

Enzimas	Sexo	Média- UI/L	Erro padrão	Intervalo de confiança (99%)		P Valor*
				LI	LS	
AST	GI	22,750	±2,9834	14,734	30,766	0,0153
	GII	33,375	±2,9834	25,359	41,391	
LDH	GI	9,189	±0,5093	7,759	10,619	0,3848
	GII	10,158	±0,9767	7,417	12,900	
GGT	GI	2,814	±0,1416	2,415	3,213	0,0125
	GII	3,823	±0,3513	2,833	4,813	

*P Valor: Significância de efeito do sexo para valores de $P \leq 0,01$.

7.2 DISCUSSÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E EXAMES BIOQUÍMICOS SÉRICOS E LIQUÓRICOS

As médias dos parâmetros clínicos avaliados para os bovinos do presente ensaio (Tabela 1) foram compatíveis aos valores de referência apresentados por Smith (2002) quanto aos quesitos TR (38-39°C), FC (40-80 bat./min) e FR (12-36 resp/min). As respostas, quanto às avaliações neurológicas realizadas nos animais do experimento (Anexo I), foram negativas para afecções neurológicas segundo a literatura avaliada (FEITOSA, 2014).

Quanto à avaliação da bioquímica sérica sabe-se que a CK é a enzima mais sensível para indicar a existência de lesão muscular. Pode ocorrer incremento em seus níveis pelas mais diversas situações tais como decúbito prolongado, convulsões, traumas, excesso de exercício, necrose, cirurgias, choque, esforço do parto, miopatias nutricionais que envolvam deficiência de vitamina E e também selênio (KRAMER e HOFFMAN, 1997). As diferenças observadas nos valores séricos de CK entre os animais do GI e GII foram associadas a uma variação de comum ocorrência em animais saudáveis, muitas vezes correlacionadas com variações quanto à faixa etária, que envolve diretamente a fase do desenvolvimento

fisiológico na espécie bovina (BARINI, 2007 e BORGES et al., 2011). Ainda, segundo as observações de Grandin (2000), Weeks et al. (2002), Strappini et al. (2010) e Cláudio (2012), as fêmeas são mais susceptíveis à ocorrência de lesões musculares, conseqüentemente, a elevação de parâmetros séricos como a CK, é frequente. Valores séricos semelhantes aos de CK aqui obtidos, foram apresentados por Borges et al. (2011) em bovinos com a mesma faixa etária estudada ($396,3 \pm 231,9$ UI/L).

Resultados médios de CK sérico superiores aos padronizados por Kaneko (2008), foram obtidos nos bovinos deste estudo (Tabela 2). Tais aumentos podem ser reflexo do manejo a pasto empregado nos animais utilizados no presente ensaio e do pouco contato humano, o que contribuiria para a exacerbação da resposta ao estresse, fatores estes elucidados na literatura por Lensink et al. (2001) e Gallo e Tadich (2008).

A creatina quinase não atravessa a barreira hematoencefálica íntegra e normalmente toda a atividade de CK encontrada no sistema nervoso é relativa a uma isoenzima (CK-BB), produto da degeneração da mielina quando em presença de lesões ao tecido nervoso (WILSON, 1977 e HAYES, 1987). Outra razão para que ocorra a elevação da CK no LCR é resultante do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica em virtude de alguma afecção neurológica, com conseqüente penetração das enzimas séricas no tecido nervoso. Os principais tipos de doenças neurológicas envolvidas no aumento da CK incluem, as degenerativas como a polioencefalomalacia ao acometer a substância branca (STORTS, 1998), aquelas ocasionadas por traumas, além da contaminação sanguínea e/ou gordura extradural durante a coleta (JACKSON et al., 1996). Tais estudos, presentes na literatura remetem aos resultados do presente trabalho, onde em virtude da coleta de LCR em pacientes comprovadamente hígidos, a concentração de CK total sérica não atravessa a barreira hematoencefálica íntegra e pelo fato do CK-BB ser a única isoenzima de CK presente no sistema nervoso, de forma que esta, apresenta baixíssimas concentrações nas já comentadas condições clínicas, não obteve-se leitura da atividade de CK total no LCR dos animais dos grupos I e II. Achados semelhantes foram descritos por Moscardini (2007). A ausência de correlação entre a atividade da CK, do LCR e a CK sérica observada neste estudo assemelha-se aos resultados obtidos por Buchner et al. (1996).

Os resultados médios de AST obtidos neste estudo (Tabela 2), apresentaram-se relativamente maiores quando comparados aos valores de referência descritos por Kaneko (2008) (78-132UI/L), porém, com intervalo de confiança condizente com os valores apresentados pelo referido autor. Ademais, quando os valores de AST sérico do presente estudo são comparados aos dados obtidos por Cláudio (2012) (78,57-345,7UI/L), que avaliou os valores de AST em animais criados a pasto e em confinamento, estes se tornam compatíveis, já que a atividade de AST se eleva em animais criados a pasto devido ao aumento de intempéries, esforço físico e estresse. Não houve diferença entre sexo, a exemplo dos achados de Barini (2007), entretanto, Cláudio (2012) obteve diferença estatística entre sexos, denotando a alta variabilidade inerente à leitura da atividade enzimática (KANEKO, 2008).

O Sistema Nervoso Central (SNC) apresenta quantidade significativa de AST ligada a suas células, de forma que, em algumas espécies como a humana, chegam a ter mais AST no tecido nervoso do que no hepático e quase tanto quanto no tecido cardíaco (KULKARNI et al., 2006). Por isso, qualquer lesão ou doença do SNC irá aumentar a atividade da AST no LCR. O aumento dos níveis de AST no LCR pode estar associado ao aumento de enzimas a partir das células destruídas do SNC, hipóxia e aumentos da permeabilidade da barreira hematoencefálica (KULKARNI et al., 2006). O aumento da atividade de AST pode constituir um importante indicador de necrose ativa no sistema nervoso central, já esta não ultrapassa a barreira hematoencefálica íntegra, fazendo-se importante sua aferição em casos suspeitos de afecções neurológicas (GAMA, 2005). As aferições de atividade líquórica de AST obtidas (Tabela 3) foram compatíveis aos valores de referência descritos por Rodrigues (2007) (9,42-34,92UI/L). Os resultados também foram semelhantes aos apresentados para outras espécies de ruminantes como ovinos (10,8-26,19UI/L) (SANTOS et al., 2012). Apesar da atividade líquórica de AST obtidos em GI ser relativamente maior aos apresentados em GII, esta variação não foi significativa a exemplo do relatado por Kaneko (2008).

A atividade da enzima LDH, apesar de também poder ser utilizada como indicativa de lesão muscular, é menos específica do que a CK e AST, já que é formada por cinco isoenzimas diferentes distribuídas por diversos tecidos do organismo. Conseqüentemente, o ideal é que a interpretação dos seus resultados seja individualizada para cada paciente e analisada em conjunto com a CK e AST (CLÁUDIO, 2012). Injúrias em vários órgãos promovem a liberação de LDH para o espaço extracelular (LASSEN, 2004). A atividade de LDH sérica bovina obtida neste ensaio apresentou-se superior à demonstrada por Kaneko (2008) (697-1445UI/L), entretanto, estes valores ligeiramente aumentados não podem ser atribuídos a possíveis lesões teciduais, já que os valores de CK e AST apresentam-se dentro da faixa de normalidade para a espécie (Tabela 3). Os valores encontrados podem ter decorrido do estresse durante a coleta, como explicaram AHMED et al. (2009). Na literatura consultada, não houve diferença significativa entre GI e GII determinada pelo efeito do sexo (KANEKO, 2008).

Em amostras líquóricas, a atividade aumentada da LDH possui origem nervosa e nos casos de doenças infecciosas é quase sempre liberada, apresentando mensurações elevadas de suas atividades catalíticas em casos humanos de meningites bacterianas (NUSSINOVITCH, 1996) e, também em cães acometidos pela cinomose (GAMA, 2005). A atividade líquórica de LDH apresentada neste estudo (Tabela 3) apresentou-se dentro dos valores de referência descritos por Welles et al. (1992) e Kaneko (2008) (2-25UI/L).

A enzima GGT ocorre em todas as células com exceção das musculares. Sua atividade é alta nos rins e no fígado, mas somente a GGT de origem hepática é encontrada no plasma (SANTOS et al., 2007). O aumento da atividade desta enzima ocorre em afecções hepatobiliares com colestase. O aumento da atividade de GGT sérica em função da idade em situações fisiológicas, foi observado para espécie bovina por Borges et al. (2011), ao subdividir o rebanho em grupos experimentais de acordo com a faixa etária. Neste ensaio, os valores de GGT obtidos do sangue dos animais dos grupos I e II foram superiores aos descritos por Borges et al. (2011), os quais obtiveram intervalos de valores de $16,6 \pm 3,8$ UI/L. Tais diferenças podem, provavelmente residir na grande variação de idade no subgrupo estudado por Borges et al. (2011) (12-35 meses). Entretanto, as médias de GGT apresentadas foram compatíveis aos valores de referência descritos por Kaneko (2008) (8-22UI/L).

A avaliação da atividade de gama glutamil transferase (GGT) do LCR pode auxiliar no diagnóstico de alterações nas células nervosas e danos das suas membranas e, conseqüentemente representar um aumento na permeabilidade da barreira hematoencefálica com a passagem da GGT para o licor (AKIMOV et al., 1986). A determinação da atividade de GGT no LCR pode ser recomendada ainda, como um método complementar de diagnóstico diferencial de meningite cerebral (AKIMOV et al., 1986). São escassas na literatura informações a respeito da atividade líquórica da GGT na espécie bovina, porém, Kaneko (2008) descreve valores de referência para a espécie equina, denotando a importância desta variável para a avaliação de patologias do sistema nervoso da espécie bovina.

7.3 RESULTADOS DA AVALIAÇÃO PROTEICA SÉRICA E LIQUÓRICA

Após o fracionamento das proteínas do soro sanguíneo, verificou-se, por meio dos traçados eletroforéticos, a presença de 24 a 34 frações proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 7 a 244 kDa. Dentre as proteínas encontradas 7 foram consideradas como proteínas de fase aguda e de importância para o estudo em questão, sendo identificadas nominalmente: imunoglobulina A (IgA) com peso molecular aproximadamente de 171 kDa, ceruloplasmina (Cp) 105 kDa, transferrina 77 kDa, albumina 62 kDa, imunoglobulina G (IgG) com 85 kDa, haptoglobina (Hp) 41 kDa e α 1-glicoproteína ácida (GPA) 39 kDa (Tabela 4).

A albumina, transferrina, Hp, Cp e IgA obtidas pela densitometria das amostras séricas bovinas, incluindo as proteínas totais obtidas pelo método de biureto, não apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os grupos GI e GII, ou seja, entre machos e fêmeas (Tabela 4). Quanto a GPA e a IgG, estas apresentaram diferença estatística significativa entre GI e GII, denotando o efeito do sexo sobre essas variáveis. Os valores médios de proteína total e de todas as PFA séricas obtidas, apresentaram-se dentro dos respectivos valores estabelecidos pelo intervalo de confiança para o rebanho avaliado em 99% de significância (Tabela 4).

Tabela 4: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis proteínas totais e proteínas de fase aguda do soro (mgdL^{-1}) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII).

Proteínas	Sexo	Média- mg/dL	Erro padrão	Intervalo de confiança (99%)		P Valor*
				LI	LS	
Proteína Total	GI	8982,50	$\pm 419,14$	7805,83	10159,0	0,2823
	GII	8488,75	$\pm 166,38$	8021,66	8955,84	
Albumina	GI	5142,17	$\pm 157,470$	4700,09	5584,26	0,6826
	GII	5021,69	$\pm 98,824$	4737,24	5306,15	
Transferrina	GI	335,60	$\pm 22,016$	276,44	394,76	0,0340
	GII	267,54	$\pm 22,016$	208,39	326,7	
Haptoglobina	GI	9,4421	$\pm 1,44000$	5,3994	13,4847	0,3037
	GII	7,6567	$\pm 0,92830$	5,0505	10,2628	
Ceruloplasmina	GI	11,0008	$\pm 0,81450$	8,7143	13,2873	0,0850
	GII	13,9692	$\pm 1,46450$	9,8579	18,0805	
$\alpha 1$ -glicoproteína ácida	GI	13,422	$\pm 0,7331$	11,452	15,392	0,0001
	GII	7,980	$\pm 0,7331$	6,010	9,950	
Imunoglobulina A	GI	174,9	$\pm 17,81$	127,02	222,77	0,1572
	GII	138,6	$\pm 17,81$	90,794	186,54	
Imunoglobulina G	GI	2799,36	$\pm 95,162$	2543,66	3055,07	0,0001
	GII	2070,74	$\pm 95,162$	1815,03	2326,44	

*P Valor: Significância de efeito do sexo para valores de $P \leq 0,01$.

Quanto ao fracionamento das proteínas do LCR, verificou-se, por meio dos traçados eletroforéticos, a presença de 20 a 37 frações proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 7 a 266 kDa. Dentre as proteínas encontradas 8 foram consideradas como proteínas de fase aguda e de importância para o estudo em questão, sendo identificadas nominalmente: imunoglobulina A (IgA) com peso molecular aproximadamente de 169 kDa, ceruloplasmina 104 kDa, transferrina 77

kDa, albumina 64 kDa, α 1-antitripsina 58 kDa, imunoglobulina G com 85 kDa, haptoglobina 43 kDa e α 1-glicoproteína ácida (GPA) 39 kDa (Tabela 5).

Tanto a proteína total do líquido obtida pelo método de sensiprot, quanto as PFA obtidas pela densitometria das amostras líquóricas bovinas, não apresentaram diferença significativa ($P \leq 0,01$) entre os grupos GI e GII (Tabela 5). Entretanto, nas amostras de líquido, foram observados valores α 1-antitripsina, o qual não foi identificado nas amostras séricas, nos referidos animais. Os valores médios de proteína total e de todas as PFA líquóricas obtidas, apresentaram-se dentro dos respectivos valores estabelecidos pelo intervalo de confiança para o rebanho avaliado em 99% de significância (Tabela 5).

Tabela 5: Valores das médias, erro padrão, intervalo de confiança com limite inferior (LI) e limite superior (LS) obtidos para as variáveis proteínas totais e proteínas de fase aguda do líquor (mgdL^{-1}) de 50 bovinos mestiços sadios, machos (GI) e fêmeas (GII).

Proteínas	Sexo	Média- mg/dL	Erro padrão	Intervalo de confiança (99%)		P Valor*
				LI	LS	
Proteína Total	GI	12,2	$\pm 1,04$	9,04	15,00	0,0909
	GII	14,7	$\pm 1,02$	12,00	17,5	
Albumina	GI	5,2993	$\pm 0,4533$	4,0268	6,5718	0,0468
	GII	7,0815	$\pm 0,7406$	5,0102	9,1528	
Transferrina	GI	0,541	$\pm 0,0732$	0,344	0,737	0,9148
	GII	0,530	$\pm 0,0717$	0,337	0,722	
Haptoglobina	GI	0,239	$\pm 0,0853$	0,033	0,444	0,8540
	GII	0,216	$\pm 0,0836$	0,015	0,418	
Ceruloplasmina	GI	0,033	$\pm 0,0054$	0,018	0,047	0,7997
	GII	0,031	$\pm 0,0054$	0,016	0,045	
$\alpha 1$ -glicoproteína ácida	GI	0,215	$\pm 0,0423$	0,102	0,329	0,4737
	GII	0,173	$\pm 0,0397$	0,067	0,280	
$\alpha 1$ -antitripsina	GI	0,270	$\pm 0,0521$	0,119	0,420	0,7561
	GII	0,295	$\pm 0,0611$	0,118	0,472	
Imunoglobulina A	GI	0,078	$\pm 0,0215$	0,021	0,136	0,1974
	GII	0,118	$\pm 0,0211$	0,061	0,174	
Imunoglobulina G	GI	3,056	$\pm 0,3151$	2,210	3,902	0,1145
	GII	3,766	$\pm 0,3088$	2,937	4,595	

*P Valor: Significância de efeito do sexo para valores de $P \leq 0,01$.

7.4 DISCUSSÃO DAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA DO SORO E DO LÍQUIDO CEFALORAQUIDIANO

O proteinograma do líquido cefalorraquidiano (LCR) dos animais, machos e fêmeas, utilizados no presente estudo assemelhou-se ao subfracionamento sérico, corroborando com as afirmações de Kaneko (2008). Segundo Kaneko (2008), líquidos corporais distintos possuem perfis eletroforéticos similares, de forma que o LCR apresenta-se como um ultrafiltrado do soro sistêmico. No caso do LCR, as proteínas plasmáticas devem cruzar a barreira hematoencefálica, o que ocorre de forma limitada e seletiva.

As concentrações das proteínas totais séricas (Tabela 4) e líquóricas (Tabela 5) apresentadas pelos animais em GI e GII, assemelharam-se aos valores de referência para a espécie bovina descritos na literatura, de maneira que diferenças significativas não foram entre os grupos propostos. Valores de referência de PT sérica variando entre 4,80-9.60 g/dl, foram obtidos por Juliano et al. (2009) ao avaliar bovinos da raça pantaneira com 13 a 24 meses de idade. Em estudo semelhante, Barini (2007) também obteve valores médios de PT séricas ($8,15 \pm 0.89$ g/dL), dados estes semelhantes aos níveis de referências obtidos na presente pesquisa (Tabela 4). Em contrapartida, quando comparado a bovinos de raças de origem europeia (Holandesa), que apresentavam uma menor rusticidade, Souza (1997) obtém valores médios de PT séricas ($7,57 \pm 0,09$ g/dL) menores do que os aqui demonstrados (Tabela 4), de modo que o aumento da concentração de PT séricas estão ligadas ao aumento do metabolismo de estresse e genética.

Perfis anormais de proteínas presentes no soro podem ser identificados como processos de doença e deste modo fornecem a justificativa para estudos definitivos e mais aprofundados sobre o estado clínico do paciente (KANEKO, 2008). A proteína total presente no LCR possui representatividade clínica, semelhante às séricas, de forma que aumentos em seus níveis podem sugerir doenças inflamatórias e infecciosas no sistema nervoso central ou mesmo comprometimento da barreira hematoencefálica (MOSCARDINI, 2007). Estudos demonstram que valores normais da proteína total líquórica em bovinos podem variar até 66,3mg/dL, sendo condizentes com os valores apresentados neste trabalho (Tabela 5) (WELLES et al., 2005). No entanto, outros estudos demonstram valores de PT

liquórica relativamente superiores aos obtidos neste ensaio tais como Moscardini (2007) ($35,5 \pm 25,0$ mg/dL) e Kaneko (2008) ($39,16 \pm 3,39$ mg/dL). Estas variações podem ocorrer em virtude de fatores como idade, raça, estágio de maturidade da barreira hematoencefálica, local de amostragem, tempo de análise após a amostragem, condições de armazenagem (AHMED et al., 2009).

A albumina é a proteína mais abundante no plasma, representando neste ensaio, 58,17% das PT séricas dos bovinos estudados, resultado próximo ao descrito por Kaneko (2008) (40%). A albumina é produzida no fígado, sendo a fração mais homogênea, solúvel e estável, sendo que é encontrada em maior quantidade no plasma. Possui a função de manter a pressão colóide osmótica plasmática, além de ser responsável pelo transporte de várias substâncias endógenas e exógenas (SIMPLICIO, 2011). No LCR, esta também se apresenta como a principal proteína em termos quantitativos como observado neste ensaio (46,03%). Toda a albumina presente no LCR provém da fração sérica desta, que atravessa a barreira hematoencefálica de forma seletiva e limitada (KANEKO, 2008).

Os valores séricos de albumina obtidos neste estudo para a espécie bovina tanto em GI quanto em GII (Tabela 4), são compatíveis aos achados de Juliano et al. (2009), com limites de confiança variando entre 2,67-5,71 g/dl. Valores médios de albumina inferiores aos apresentados na Tabela 4 foram demonstrados por Osman e Al-Busadah (2003) ($4,5 \pm 0,1$ g/dL), Fagliari (2007) ($3,31 \pm 0,26$ g/dL) e Barini (2007) ($2,58 \pm 0,41$ g/dL), entretanto estes achados distintos não apresentam significância clínica, já que aumentos na concentração de albumina ocorrem por causas fisiológicas e não patológicas. Os valores distintos observados estão relacionados, provavelmente a características inerentes a cada rebanho alvo de estudo (ECKERSALL, 2008).

Já a albumina liquórica dos bovinos deste ensaio (Tabela 5), apresentou resultados condizentes aos valores de referência estabelecidos por Jean, et al. (1997) (4,8-20,9 mg/dL), que estudaram parâmetros liquóricos do LCR de bezerros, entretanto, com médias inferiores aos valores de referência estabelecidos por Kaneko (2008) (8,21-28,71mg/dL). Tais diferenças podem ter ocorrido em função da idade dos animais utilizados no experimento, já que fatores metabólicos, nutricionais e genéticos podem estar envolvidos na variação dos níveis desta proteína (JULIANO

et al., 2009). Diferenças estatísticas significantes não foram observadas entre as médias em GI e GII.

Dentre as globulinas, destacaram-se aquelas de importância para resposta de fase aguda dos grupos das alfa1-globulinas (α 1-antitripsina e α 1-glicoproteína ácida), alfa2-globulinas (haptoglobina e ceruloplasmina), Beta-globulina (transferrina) e Gama-globulinas (IgA e IgG). Estas globulinas podem estar presentes tanto no soro quanto no LCR, mas, no presente ensaio não foram detectadas concentrações de α 1-antitripsina no soro de bovinos hípidos, a exemplo do observado por Fagliari et al. (2006), Juliano et al. (2009) e Sampaio (2013). Segundo estes autores, níveis séricos muito reduzidos desta proteína podem ser um fator para sua não detecção. No entanto, estudos conduzidos em humanos, denotam fatores genéticos que influenciam na produção α 1-antitripsina por parte do tecido hepático (CAMELIER et al., 2008). Já o aparecimento da α 1-antitripsina no LCR pode estar relacionado com uma produção local desta proteína por parte de células gliais ou outros tecidos do SNC, já que 20% das proteínas presentes no LCR são produzidas localmente e os 80% restantes, advêm pela barreira hematoencefálica (DIMAS e PUCCIONI-SOHLER, 2008). Sabe-se ainda, que a resposta de fase aguda estimula tanto a produção hepática de PAFs como também, a extrahepática através das células epiteliais, células endoteliais e do tecido conectivo adjacente (JAIN et al., 2011).

Concentrações séricas e líquóricas de transferrina foram obtidas no presente ensaio, como demonstrado nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Os valores de referência de transferrina sérica obtidos neste ensaio em GI e GII para a espécie bovina foram compatíveis aos valores médios achados por Fagliari et al. (2004) ($388,67 \pm 36,34$ mg/dL), Fagliari et al. (2007) ($264,9 \pm 19,5$ mg/dL), Juliano et al. (2009) ($241,50 \pm 172,69$ mg/dL) e Simplício (2011) ($270 \pm 24,6$ mg/dL). Apesar das diferenças entre as médias apresentadas entre GI e GII, onde as médias em GII foram menores que as apresentadas em GI, não houve diferença estatística significante. Pequenas variações entre os valores obtidos por diferentes estudos podem relacionar-se com as diferenças inerentes à faixa etária e raças estudadas (Juliano et al., 2009).

Com relação aos níveis de transferrina no líquido de bovinos, informações mais detalhadas sobre seus valores ainda são escassas, porém na medicina humana, estudos da ação desta proteína foram conduzidos em casos clínicos

específicos denotando a importância do aprofundamento de estudos a respeito desta variável para saúde do SNC na medicina veterinária (EARLEY et al., 2000; MIZUNO et al., 2005). Ensaio conduzido por Earley et al. (2000) e Mizuno et al. (2005) obtiveram aumentos na concentração de transferrina líquórica de pessoas portadoras da Síndrome da Perna Inquieta, no entanto, não houve alteração dos níveis séricos desta proteína. Os achados foram associados ao aumento do metabolismo do ferro no tecido nervoso no curso da doença, sendo esta proteína uma das principais transportadoras deste mineral no SNC. Perfil similar de aumento da transferrina no LCR foi observado durante a Esclerose Múltipla, também em humanos, devido ao aumento da deposição de ferro no cérebro dos pacientes (KHALIL et al., 2014). Apesar de na medicina veterinária ainda não serem determinados os valores de referência para a transferrina líquórica da espécie bovina, na medicina humana esses valores já são conhecidos e importantes como marcadores de doenças neurodegenerativas (EARLEY et al., 2000).

Os valores médios de Hp obtidos no soro dos animais do presente estudo (Tabela 4) estão de acordo com os apresentados por Juliano et al. (2009), para bovinos de mesma faixa etária (3,36-58,65mg/dL). De modo semelhante, os valores séricos médios de Hp obtidos por Saquetti (2010) ($10,3 \pm 5,4$ mg/dL) apresentam-se dentro dos valores de referência estabelecidos no presente ensaio para Hp sérica na espécie bovina. Apesar de algumas variações apresentadas nas médias séricas de Hp para a espécie bovina, como em Fagliari et al. (2006) ($53,12 \pm 9,31$ mg/dL), Fagliari et al. (2007) ($32,3 \pm 4,0$ mg/dL), Simplicio (2011) ($32,0 \pm 3,74$ mg/dL), todos os autores citados concordaram com os valores de referência citados por Juliano et al. (2009). Segundo Fagliari et al. (2006) e Juliano et al. (2009), as variações observadas estão intimamente ligadas a faixas etárias e a outros fatores intrínsecos dos rebanhos bovinos avaliados, como genética e tipo de manejo.

Devido a escassez de dados na literatura a respeito das concentrações de Hp no LCR de bovinos, maiores comparações não são possíveis. Porém, em estudos conduzidos com humanos portadores de Mal de Parkinson, a Hp líquórica, apesar de se mostrar elevada em relação a pacientes saudáveis, não apresentou aumento significativo (COSTA, 2011). Em contraposição aos achados de Costa (2011), Noris-García et al. (1999) apontam a Hp como um marcador eficaz, porém, frente a processos infecciosos do sistema nervoso como a meningite bacteriana. Frente a

meningites virais, a Hp não apresenta elevação significativa, a exemplo do comportamento observado para outras PFA, tais como a PCR (NORIS-GARCÍA et al., 1999) . Entretanto, como a Hp é umas das PFA mais representativas para a espécie bovina, maiores estudos de sua concentração líquórica merecem ser realizados (MURATA, 2004).

A ceruloplasmina é uma PFA positiva transportadora, com importante papel no metabolismo e transporte de cobre, essencial a eritropoese, além de possuir função imunológica e removedora de radicais livres do oxigênio produzidos na inflamação (HIRVONEN, 2000). Seu aumento está relacionado a processos inflamatórios com danos teciduais (fotosensibilizações), infecciosos, virais e parasitários, enquanto sua diminuição geralmente é associada a fatores metabólicos como desnutrição, ou doenças hepáticas e renais que afetam sua produção e excreção respectivamente (FAGLIARI et al., 2007 e NOGUEIRA, 2014). As concentrações médias ceruloplasmina sérica apresentadas por Fagliari et al. (2007) (12.0 ± 4.1 mg/dL) foram compatíveis com os valores de referência obtidos tanto para GI quanto para GII (Tabela 4), de forma que não houve diferenças significativas entre os grupos estudados. De forma semelhante, os valores médios de ceruloplasmina sérica deste ensaio em GI e GII (Tabela 4), foram compatíveis aos valores de referência obtidos por Soares (2008) (1,20-13,70 mg/dL) para bovinos em faixa etária semelhante aos dos animais aqui avaliados. A idade dos animais avaliados pode influenciar fortemente nas concentrações séricas de Cp, à medida que, esta pode apresentar-se elevada em bezerros com 02 dias de vida reduzindo-se nos dias seguintes, podendo inclusive, apresentarem-se nulos e elevarem-se nos meses seguintes, com o aumento da faixa etária (FAGLIARI et al., 2006; JULIANO et al., 2009). Justificativas para as oscilações encontradas nos valores de Cp sérica seriam a existência de variantes eletroforéticas dessa proteína, além de os mecanismos que interferem na sua concentração sérica e nas suas funções in vivo na homeostase do ferro e cobre serem pouco elucidadas até o momento (HELLMAN e GITLIN, 2002).

Até o momento são escassos na literatura informações a respeito da concentração de ceruloplasmina no LCR bovino. Contudo, estudos conduzidos em humanos portadores de doenças neurodegenerativas como a Doença de Parkinson, sugerem que a ceruloplasmina é uma boa marcadora para identificação precoce

desta doença (COSTA, 2011). Sendo assim, um estudo aprofundado sobre a Cp presente no LCR de bovinos poderia ser de vital importância para o diagnóstico precoce de doenças neurodegenerativas, tais como a encefalopatia espongiiforme bovina (HOCHSTRASSER et al., 1997). A Cp é citada ainda como um bom marcador para doenças infectocontagiosas do sistema nervoso, como meningites bacterianas, entretanto, como um marcador sem significância para meningites virais, fator este que segundo os autores pode ser utilizado para a diferenciação entre os dois tipos de meningite (PARADOWSKI et al., 1995).

Dentre as imunoglobulinas, detectou-se, no traçado eletroforético sérico, a presença IgG e IgA, sendo que, em infecções sistêmicas, a resposta imune humoral caracteriza-se por altos títulos de IgG (DI FILIPPO et al., 2014). No caso da IgA, sabe-se que sua função na resposta imunológica dos animais de produção não foi totalmente elucidada, mas seu papel parece estar relacionado a um estímulo inflamatório como uma segunda linha de defesa na eliminação de patógenos que tenham rompido a barreira das superfícies mucosas (SNOECK et al., 2006). Esta pode atuar como anticorpo secretório dentro do trato intestinal e dos pulmões, sendo capaz de neutralizar vírus e prevenir aderências de patógenos bacterianos aos tecidos alvo (DI FILIPPO et al., 2014). Os valores de IgG e IgA sérico obtidos neste estudo (Tabela 4) foram compatíveis com os parâmetros apresentados por Juliano et al. (2009) (IgG= 1,33-3,87 /IgA= 0,14-0,72 mg/dL) para bovinos de mesma faixa etária. Os valores também foram semelhantes aos encontrados por Fagliari et al. (2006) (IgG= 1.869,07±303,61/ IgA= 273,60±33,48mg/dL) e Benatti (2013) (2364,28±841,81/ 117,79±45,77mg/dL).

Para a variável IgG, houve diferença significativa entre os valores apresentados pelos animais do GI e do GII ($P \leq 0,01$) (Tabela 4). Valores superiores foram observados no soro de bovinos machos (GI). Achados semelhantes foram descritos por Neto et al. (1997), porém no referido ensaio as fêmeas apresentaram valores de IgG superiores aos dos machos. O próprio autor aponta que esse efeito da IgG relacionado ao sexo pode se dar em função do peso do animal ao nascer, época do nascimento, idade de parição da vaca, manejo no aleitamento, característica do úbere materno e estresse.

Concentrações IgG e de IgA também foram encontradas no LCR dos animais avaliados neste ensaio em GI e GII. Sabe-se que a IgG é uma das principais imunoglobulinas presentes no LCR, originando-se normalmente a partir do soro (KANEKO, 2008). Aumentos nos níveis de gamaglobulina no LCR são relatados em doenças inflamatórias do sistema nervoso central, originadas do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica ou a partir da produção intratecal, a partir de uma reação oligoclonal (HERINGER, 2006). Os valores de IgG do LCR apresentados no presente ensaio (Tabela 5) foram inferiores a aqueles estabelecidos por Kaneko (2008) (4,88-16,7mg/dL) tanto em GI quanto em GII, de maneira que, aumentos nas concentrações de IgG podem ocorrer com o aumento da faixa etária (JULIANO et al., 2009).

Já a concentração de IgA no LCR, normalmente apresenta-se baixa e sua elevação está vinculada aos aumentos séricos de IgA, de forma que, sua produção intratecal é muito rara, onde relatos de sua produção ocorrem durante curso de meningites purulentas na espécie humana (HERINGER, 2006). Infelizmente, informações na literatura a respeito dos valores de referência de IgA no LCR de bovinos ainda são escassas, entretanto, esses dados já são referidos na medicina veterinária para a espécie canina, denotando a necessidade da avaliação dos valores desta variável para a espécie alvo do presente ensaio (KANEKO, 2008).

A α 1-glicoproteína ácida (α 1-GPA) é uma PFA clinicamente importante em bovinos e tem sido utilizada na monitorização de processos inflamatórios tais como pericardites, artrites, mastites, pneumonias e babesiose (MARTÍNEZ-SUBIELA et al., 2001; MURATA, 2004). Geralmente sua concentração aumenta mais lentamente, porém permanece elevada por mais tempo. Dessa maneira, sua determinação pode ser útil no estabelecimento da evolução aguda ou crônica frente a diferentes enfermidades (ECKERSALL, 2008). Os valores de referência de α 1-GPA séricos obtidos para GI no presente estudo (Tabela 4), corroboram com os valores médios obtidos por Simplicio et al. (2013) ($13,9 \pm 2,4$ mg/dL), Benatti (2013) ($16,99 \pm 2,95$ mg/dL), de forma que aqueles obtidos para GII corroboram com os achados de Rocha et al. (2013) ($7,88 \pm 2,04$ mg/dL). Neste ensaio, as fêmeas (GII) apresentaram valores séricos de α 1-GPA inferiores aos machos (GI). Resultados semelhantes aos obtidos para a respectiva variável em função do sexo não foram relatados na literatura consultada, porém, alguns autores incriminam o estresse

como um fator importante para o aumento nos níveis de α 1-GPA sérica (MURATA, 2004; BENATTI, 2013). Outros fatores citados como passíveis de produzir variações nos níveis de α 1-GPA em bovinos seriam a ingestão ou não de colostro (ORRO et al., 2008) e bezerros provenientes de vacas pluríparas, que apresentam maior concentração de α 1-GPA quando comparados a filhotes provenientes de vacas primíparas (ROCHA et al., 2013).

Até o momento não foram relatados na literatura valores de α 1-GPA líquórica na espécie bovina que pudessem ser comparados com os resultados obtidos neste ensaio. Mas, a α 1-GPA é citada como um marcador sensível para meningites bacterianas em suínos (ITOH et al., 1992) e coelhos, de forma que seus níveis no LCR se elevam com o intuito de inibir o TNF- α , citocina envolvida diretamente com este tipo de infecção (MOORE et al., 2000). Aumentos dos níveis α 1-GPA líquórica foram descritos ainda em humanos portadores de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (ROHER et al., 2009).

8-CONCLUSÕES

- Os exames clínicos foram representativos para a constatação da higidez clínica dos bovinos utilizados no estudo. O mesmo pode-se dizer a respeito dos exames bioquímicos realizados com o intuito de garantir a ausência de lesões teciduais e doenças hepáticas as quais, poderiam interferir nos valores de PFA determinados;
- O sexo não influenciou nos resultados das proteínas de fase aguda presentes no LCR, entretanto, produziu diferença significativa na IgG e GPA séricas;
- O proteinograma obtido em gel de poliacrilamida possibilitou a detecção de até 37 proteínas no traçado eletroforético do licor de bovinos hígidos, podendo trazer contribuição significativa ao diagnóstico, tratamento e prognóstico de animais com doenças neurológicas.

9-CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos mais detalhados a respeito da concentração das PFA no LCR bovino devem ser conduzidos, levando em consideração outros fatores tais como idade, raça, sistema de criação e características do parto dos animais. Situações patológicas também poderão ser avaliadas, pois diversos estudos apontam as PFA como indicadoras de danos teciduais ao sistema nervoso, com destaque para haptoglobina, ceruloplasmina, α 1-gliproteína ácida, α 1-antitripsina, transferrina, Imunoglobulina A e Imunoglobulina G.

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, J. N. Prediction of blood - brain barrier permeation in drug discovery from in vitro, in vivo and in silico models. **Journal of Anatomy**, v. 6, n. 1, p. 629-638, 2002.

AHMED, S.H.; ATTI OMER, S. A.; GAMEEL, A.A. Some normal constituents in serum and cerebrospinal fluid in sudanese camels (*Camelus dromedaries*). **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 55, n. 123, 2009.

AKIMOV, G.A., KOMANDENKO, N.I., ZINCHENKO, V.A. Activity of gamma-glutamyltransferase in the cerebrospinal fluid in various forms of cerebral arachnoiditis. **Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova**, v. 86, n. 5, p. 682-684, 1986.

ALMEIDA, A.H. **Dinâmica de proteínas de fase aguda e mensurações ultrasonográficas no concepto durante o período gestacional em cadelas da raça Boxer**. 2006. 110 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

ANZILIERO, D. et al. Serum c-reactive protein (CRP) measurement in dogs with altered hematological parameters. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 2, p. 265-272, 2013.

BARINI, A.C. **Bioquímica sérica de bovinos (*Bos taurus*) sadios da raça curraleiro de diferentes idades**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado Ciência Animal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia- MT. 2007.

BENATTI, L.A.T. **Marcadores fisiológicos do estresse e perfil metabólico de bovinos das raças curraleiro pé-duro, pantaneiro e nelore em confinamento experimental.** 2013. 126 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Goiás, Goiânia- MT. 2013.

BORGES, A.C. et al. Enzimas Séricas e Parâmetros Bioquímicos de Bovinos (*Bos taurus*) Sadios da Raça Pantaneira. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, v. 106, 17p, 2011.

BUCHNER, A.; BAUMGARTNER, W.; HELM, U. Vergleichende Bestimmung der Kreatinkinase Aktivität im Liquor cerebrospinalis und im Blut bei gesunden Rindern. **Tierärztliche Praxis**, v. 24, p. 353-356, 1996.

CALAZANS, S.G. et al. Proteinograma sérico de cães sadios e com linfoma obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1044-1048, 2009.

CAMELIER, A.A. et al. Deficiência de alfa-1 antitripsina: diagnóstico e tratamento. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 34, n. 7, p. 514-527, 2008.

CARDOSO, D. et al. Perfil bioquímico de bovinos de raças localmente adaptada sem sistema intensivo de criação. In: Anais- **XIX Seminário de Iniciação Científica.** Universidade Federal de Goiás, Goiânia, MT, Brasil. 2011.

CARNEIRO, L.F.R. **Proteínas de fase aguda em cães com diferentes escores corporais.** 2013. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás, Goiânia-MT. 2013.

CARVALHO, V.S. **Pododermatite ovina: evolução clínica, etiologia e efeitos no leucograma e proteínas de fase aguda.** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado Saúde Animal)- Universidade Federal da Bahia, Salvador-BH. 2010.

CECILIANI, F. et al. Acute phase proteins in ruminants. **Journal Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207- 4231, 2012.

CECILIANI, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. **Protein and Peptide Letters**, n. 9, p. 211-223, 2002.

CASTELL, L.F. Manejo de fístulas de LCR de la lamela lateral de la lámina cribosa. **Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza Cuello**, v. 67, p. 46-52, 2007.

CLÁUDIO, L.D.G. **Fatores associados à injúria muscular em bovinos abatidos e suas relações com enzimas séricas e qualidade da carcaça.** 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal- SP. 2012.

COSTA, A.G.; GAGO, M.F.; GARRETT, C. Biomarcadores no Líquido Cefalorraquidiano para o Diagnóstico Precocede Doença de Parkinson. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, n. S4, p. 761-768, 2011.

COUTINHO, L.T. et al. Intoxicação Natural de Bovinos Leiteiros por *Cestrum laevigatum* (Solanaceae) no Agreste de Pernambuco – Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 3, p. 352-359, 2013.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. Acute Phase Response in Animals: A Review. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 59, n. 6, p. 517–526, 2009.

CUNHA, P.H.J. et al. Identificação molecular do herpesvirus bovino tipo 5 em um bovino confinado associado com diagnóstico diferencial laboratorial de outras causas de polioencefalomalacia. Anais: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. **Ciência Animal Brasileira**, Suplemento 1, p. 93-98, 2009.

CRUVINEL, W.M. et al. Sistema Imunitário – Parte I- Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DI FILIPPO, P.A. et al. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, α 1-glicoproteína ácida, transferrina e α 1-antitripsina, em equinos com cólica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2108-2113, 2011.

DI FILIPPO, P.A. et al. Proteinograma do líquido sinovial de equinos hígidos obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1268-1271, 2014.

DIMAS, L.F.; PUCCIONI-SOHLER, M. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 97-106, 2008.

DOBRYZYCKA, W. Biological Functions of Haptoglobin - New Pieces to an Old Puzzle. **European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 647-654, 1997.

EARLEY, C.J. et al. Abnormalities in CSF concentrations of ferritin and transferrin in restless legs syndrome. **Neurology**, v. 54, n. 8, p. 1698-700, 2000.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. 6ª edição. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. San Diego, California, USA: Elsevier, 2008, p. 117-155.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Revue de Medecine Veterinaire**, n. 151, p. 577-584, 2000.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 7-23, 2010.

FAGLIARI, J.J. et al. Proteinograma sérico de bezerros recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 450-453, 2006.

FAGLIARI, J.J. et al. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 6, p. 1355-1358, 2007.

FAGLIARI, J.J. et al. Serum protein concentrations, including acute phase proteins, in calves with hepatogenous photosensitization. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, p. 1355-1358, 2007.

FEITOSA, F.L.F. et al. Determinação do perfil bioquímico hepático sérico de bezerros holandeses e mestiços, na região de Araçatuba/spSP. Anais: VIII Congresso Brasileiro de Buiatria. **Ciência Animal Brasileira** – Suplemento 1, 2009.

GALLO, C.B., TADICH, T.A. South America. In: APPLEBY, M. C. et al. Long distance transport and welfare of farm animals. **Wallingford: CAB Internacional**, 2008. cap.7, p.157-181.

GAMA, F.G.V. et al. Caracteres físico-químicos e citológicos do liquor de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural de Santa Maria**, v. 35, n. 3, p. 596-601, 2005.

GAMA, F.G.V. et al. Evaluation of electrophoretic profile and albumin quota in the cerebrospinal fluid of dogs with distemper showing or not nervous signs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 77-80, 2007.

GANHEIM, C.; ALENIUS, S.; WALLER, K.P. Acute phase proteins as indicators of calf herd health. **Veterinary Journal**, v. 173, p. 645-651, 2007.

GARY, H.M.D. et al. The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. **The New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 13, p. 924-930, 1996.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica clínica de proteínas e compostos nitrogenados. In: **Introdução à bioquímica clínica veterinária**, 2ª ed. Porto Alegre, RS, Brasil: Editora da UFRS, 2006, cap. 3, p. 81-96.

GRANDIN, T. Livestock handling and transport. 2. ed., **Wallingford: CAB International**, 2000. 449 p.

GREGORY, L. et al. Valores de referência da atividade enzimática da aspartato-aminotransferase e da gama-glutamyltransferase em bovinos da raça Jersey. Influência dos fatores etários, sexuais e da infecção pelo vírus da leucose dos bovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 6, 1999.

HAYES, T. E. Examination of cerebrospinal fluid in the horse. **The Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 3, n. 2, p. 283-291, 1987.

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

HERINGER, R.R. **Avaliação da resposta IgG, IgA e IgM aos antígenos recombinantes mpt-64 e mt-10.3 de mycobacterium tuberculosis no líquido cefalorraquiano de pacientes com meningite tuberculosa.** 2006. 94 f.

Dissertação (Mestrado em Neurologia)- Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro-RJ. 2006.

HIRVONEN, J. **Acute phase response in dairy cattle**. 2000. 79 f. Dissertação (Mestrado)- Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki, Helsinki. 2000.

HOCHSTRASSER, D.F. et al. Elevation of apolipoprotein E in the CSF of cattle affected by BSE. **FEBS Lettlers**, v. 416, n. 2, p. 161-163, 1997.

ITOH, H. et al. The influence of age and health status and the serum alpha-1 acid glycoprotein level of conventional and specific pathogen free pigs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 57, p. 74-78, 1992.

JACKSON, C. et al. The diagnostic utility of cerebrospinal fluid creatine kinase activity in the horse. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, n. 4, p. 246-251, 1996.

JAIN, S.; GAUTAM, V.; NASEEM, S. Acute phase proteins: As diagnostic tool. **Journal Pharmaceutical of and Biomedical Sciences**, v. 3, p. 118-127, 2011.

JEAN, G. St. et al. Cerebrospinal Fluid Constituents Collected at the Atlanto-Occipital Site of Xylazine Hydrochloride Sedated, Healthy 8-week-old Holstein Calves. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 108-112, 1997.

JULIANO, R.S. et al. Proteinograma sérico de bovinos da raça Curraleiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 533-538, 2009.

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

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. 6.ed. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6.ed. New York: Academic Press, 2007, 1000p.

KERR, M. G. Substâncias nitrogenadas. In: Exames laboratoriais em medicina veterinária. In: **Bioquímica clínica e hematologia**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003.

KHALIL, M. et al. Cerebrospinal fluid transferrin levels are reduced in patients with early multiple sclerosis. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 20, n. 12, p. 1569-1577, 2014.

KRAMER, J. W.; HOFFMANN, W. E. Clinical enzymology. IN: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. (ed.) **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap.12, p.303-325.

KULKARNI, S.P., MALLIKARJUNA, C.R., MURTHY, D.S.J. Cerebrospinal fluid free sialic acid and aspartate transaminase levels in meningitis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 21 n. 1, p. 185-188, 2006.

LATERA, J.; GOLDSTEIN, G. W. Development of the blood-brain barrier. In: Neonatal and fetal medicine- **Physiology and pathophysiology**. Philadelphia: Saunders, 1991. cap. 10, p.1525-1531.

LASSEN, E.D. Laboratory Detection of Muscle Injury. In: THRALL, MA. **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2004. p.417-420.

LECCHI, C.; et al. Extra hepatic expression of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in normal bovine tissues. **Veterinary Journal**., v. 180, p. 256-258, 2009.

LEMOS, R.A.A. **Enfermidades do sistema nervoso de bovinos de corte das regiões Centro-oeste e Sudeste do Brasil**. 2005. 149 f. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Jaboticabal. 2005.

LENSINK, B.J. et al. The influence of farmers' behaviour on calves reactions to transport and quality of veal meat. **Journal of Animal Science**, v. 79, n. 3, p. 642-652, 2001.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S. et al. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v. 17, p. 97-114, 2001.

MATEOS, A.G.L.; MARTÍNEZ, J.L.; CASTILLA, M.S. Respuesta inflamatoria sistêmica: fisiopatología y mediadores. **Medicina Intensiva**, n. 24, p. 353-360, 2000.

McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia e Veterinária**. 4ª .eEd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 1476p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Análise de indicadores epidemiológicos da raiva dos herbívoros no Brasil. Coordenação da raiva dos herbívoros e das encefalopatias espongiformes transmissíveis – CRHE. Maio, 2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Bovinos e Bubalinos. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>. Acesso em: 04 jan. 2015.

MIZUNO, S. et al. CSF iron, ferritin and transferrin levels in restless legs syndrome. **Journal of Sleep Research**, v. 14, p. 43–47, 2005.

MOORE, D.F. et al. Human α 1-acid glycoprotein inhibits TNF production in the CNS of rabbits with meningitis: A report of preliminary observations. **Inflammation**, v. 24, n. 3, 2000.

MOSCARDINI, A.R.C. **Ação do dimetilsulfóxido e da dexametasona nos parâmetros do líquido cefalorraquidiano e na permeabilidade da barreira hematoencefálica de bovinos**. 2007. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Goiás. Goiânia- MT. 2007.

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

NETO, R.M. et al. Concentração de IgG sérica em bezerros das raças nelore, guzerá, gir e caracu: Estatísticas descritivas e causas de variação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 26, n. 5, p. 914-919, 1997.

NOGUEIRA, A.F.S. **Análise Multivariada do Leucograma e da Resposta de Fase Aguda em Equinos Acometidos por Síndrome Cólica de Origem Natural ou Experimental**. 2014. 43 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica Veterinária)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal-SP. 2014.

NOGUEIRA, A.F.S. et al. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos hípidos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. **Ciência Rural**, v. 43, n. 11, p. 2018-2024, 2013.

NOLETO, P.G. **Perfil Bioquímico Sérico de Equinos submetidos a Prova de Esforço Físico**. 2012. 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)-Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia- MG. 2012.

NORIS-GARCÍA, E. et al. Haptoglobina no líquido cefalorraquidiano como marcador de patologia infecciosa do sistema nervoso central. **Revista de neurologia**, v. 29, p. 117-120, 1999.

NUSSINOVITCH, M. et al. Increased Creatine Kinase Brain Isoenzyme Concentration in Cerebrospinal Fluid with Meningitis. **Clinical Pediatrics**, v. 40, p. 349-351, 1996.

PANG, W.Y. et al. Effect of carprofen administration during banding or burdizzo castration of bulls on plasma cortisol, in vitro interferon- γ production, acute-phase proteins, feed intake, and growth. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 351-359, 2006.

PARADOWSKI, M. et al. Acute phase proteins in serum and cerebrospinal fluid in the course of bacterial meningitis. **Clinical Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 459-66, 1995.

PETERSEN, 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.

ORRO T., et al. Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves. **Veterinary Journal**, v. 176, p. 182-187, 2008.

OSMAN, T.E.A.; AL-BUSADAH, K.A. Normal concentrations of twenty serum biochemical parameters of she-camels, cows and ewes in Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Science**, v. 6, n. 14, p. 1253-1256, 2003.

REGO, R.O. et al. Alterações no SNC e morfometria cerebelar de bovinos intoxicados experimentalmente por *Solanum paniculatum*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p.1107-1115, 2012.

ROCHA, C.C. et al. Hemograma e positividade à proteína c reativa em bovinos da raça flamenga. In: **41º CONBRAVET**, 2014, Gramado/RS, Anais. http://www.conbravet2014.com.br/anais2014/trabalhos_select.php?id_artigo=1532&tt 02 Dez. 2014.

ROCHA, T.G. et al. Hemograma e proteínas de fase aguda de bezerros sadios do nascimento aos 30 dias de idade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n.1, p. 25-31, 2013.

RODRIGUES, D.C. **Avaliação da toxicidade de avermectinas em bovinos com idade inferior a trinta dias**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias e Veterinárias)- Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal- SP. 2007.

RODRIGUES, V. **Hemograma, teores séricos de proteínas e de cortisol de fêmeas caninas (*Canis familiaris* – LINNAEUS,1758) submetidas à operação cesariana**. 2006. 71 f. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal-SP. 2006.

RODRÍGUEZ, Y.S. **Proteínas de fase aguda como biomarcadores en medicina y producción porcina**. 2013. 154 f. Tese (Doutorado em Biomedicina)- Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. 2013.

ROHER, A.E. et al. Proteomics-Derived Cerebrospinal Fluid Markers of Autopsy Confirmed Alzheimer's Disease. **Biomarkers**, v. 14, n. 7, p. 493-501, 2009.

SAMPAIO, P.H. **Resposta imune-humoral e proteinogramas séricos de bovinos naturalmente infectados pelo *Trypanosoma vivax***. 2013. 42 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal-SP. 2013.

SANTOS, C. A. J. et al. Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume *Tephrosia cinerea*. **Journal Veterinary Diagnosis Investigation**, v. 19, p. 690-694, 2007.

SANTOS, J.F. et al. Características físico-químicas e citológicas do líquido de ovinos sadios da raça Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 382-387, 2012.

SAQUETTI, C.H.C. **Hemograma, perfil bioquímico e proteínas de fase aguda em bovinos e bubalinos submetidos a laparotomia exploratória, tratados ou não com fenilbutazona**. 2010. 77 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal-SP. 2010.

SAUT, J.P.E. et al. Influência do período pós-parto no proteinograma de vacas holandesas, obtido através da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida. **Ciência Animal Brasileira- Suplemento 1**. In: Anais do VIII Congresso Brasileiro de Buiatria, p. 244-249, 2009.

SCOTT, P.R. The collection and analysis of cerebrospinal fluid as an aid to diagnosis in ruminant neurological disease. **British Veterinary Journal**, v. 151, p. 603, 1995.

SCOTT, P. R. Diagnostic techniques and clinicopathologic findings in ruminant neurologic disease. In: **Veterinary clinics food animal practice**. 5.ed. London: Elsevier, 2004. p. 215-230.

SILVA, E.B. et al. Característica leucocitária, relação albumina/globulina, proteína plasmática e fibrinogênio de bovinos da raça Nelore, confinados e terminados a pasto. **Ciência Rural**, v. 38, n. 8, p. 2191-2196, 2008.

SIMPLÍCIO, K.M.M.G. et al. Proteinograma sérico, com ênfase em proteínas de fase aguda, de bovinos sadios e bovinos portadores de enfermidade aguda de ocorrência natural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1339-1347, 2013.

SNOECK, V.; PETERS, I.R.; COX, E. The IgA system: a comparison of structure and function indifferent species. **Veterinary Research**, v. 37, p. 455-467, 2006.

SKINNER, J.G. International standardization of acute phase proteins. **Special Report Veterinary Clinical Pathology**, v. 30, p. 2-7, 2001.

SOARES, G.T. **Concentrações plasmáticas e peritoneal de proteínas de fase aguda em bezerros portadores de hérnias umbilicais**. 2008. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- Faculdade de Ondotologia, Universidade Estadual de São Paulo, Araçatuba-SP. 2008.

SOUZA, P.M. **Perfil bioquímico sérico de bovinos das raças Gir, Holandesa e Girolanda, criados no Estado de São Paulo - Influência de fatores de variabilidade etários e sexuais**. 1997. 168 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP. 1997.

SOUZA, R.I.C. **Estudo Retrospectivo de Doenças Tóxicas e Neurológicas em Bovinos no Estado de Mato Grosso do Sul**. 2013. 86 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal)- Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS. 2013.

STÖBER, M. Sistema nervoso central. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.; STÖBER, M. **Exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. cap.12, p.341-362.

STORTS, R.W. Sistema nervoso central, p. 358-363. In: Carlton W.W. & McGavin M.D. (Ed.) **Patologia Veterinária Especial de Thomson**. 2nd. Ed. Artmed, Porto Alegre. 672p, 1998.

STRAPPINI, A. C. et al. Prevalence and risk factors for bruises in Chilean bovine carcasses. **Meat Science**, v. 86, n. 3, p. 859–864, 2010.

THOMASSIAN, A. et al. Atividades séricas da aspartato aminotransferase, creatina quinase e lactato desidrogenase de equinos submetidos ao teste padrão de exercício progressivo em esteira. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 3, p. 183-190, 2007.

TING, S. T. L. et al. Effect of ketoprofen, lidocaine local anesthesia, and combined xylazine and lidocaine immunity, growth, and behavior caudal epidural anesthesia during castration of beef cattle on stress responses, immunity, growth, and behavior. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1281-1293, 2003.

TIZARD, I.R. Veterinary immunology: an introduction. 8.ed. Philadelphia: Elsevier, 2008. p. 147.

TÓTHOVÁ, C. et al. The Effect of Storage Temperature and Time on the Concentrations of Bovine Serum Amyloid A and Its Mammary Associated Isoform. **Veterinary Medicine International**, p. 6, 2012.

WEEKS, C. A.; McNALLY, P. W.; WARISS, P. D. Influence of the design of facilities at auction markets and animal handling procedures on bruising in cattle. **Veterinary Record**, v. 150, n. 24, p. 743-748, 2002.

WELLES, E.G. et al. Composition and analysis of cerebrospinal fluid in clinically normal adult cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 11, p. 2050-2057, 1992.

WELLES, E. et al. Hemostasis in cows with endotoxin-induced mastitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 1230-1234, 1993.

WILSON, J. W. Clinical application of cerebrospinal fluid creatine phosphokinase determination. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 171, n. 15, p. 200-202, 1977.

ANEXOS I



Flávio Augusto Soares Graça – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Protocolo de Exame Clínico Neurológico

Data: ____ / ____ / ____

RG: _____

Identificação do animal: _____

Tempo de evolução: _____

- Início / Curso: _____ / _____

Exame físico: - Estado de nutrição: _____

- Atitude: _____

- Frequência respiratória: _____ mpm

- Grau de desidratação: _____ %

- Frequência cardíaca: _____ bpm

- Coloração de mucosas: _____

- Temperatura: _____ °C

- Linfonodos aparentes: _____

EXAME NEUROLÓGICO

I. CABEÇA:

NÍVEL DE CONSCIÊNCIA: () Atento/Alerta () Delírios () Apático/Deprimido () Semicomatoso/Estupor
() Comatoso () Hiperexcitabilidade

COMPORTAMENTO: () Mugidos () Bocejos () Lamber () Manias () Convulsões
() Agressividade () Pressionar a cabeça () Curso errante () Andar compulsivo () Balançar a cabeça
() Andar em círculo () Pressão da cabeça contra objetos () Agressividade

POSTURA: () Desvio lateral da cabeça () Giro ortotônico da cabeça e pescoço () Tremores
() Balançar da cabeça () Opistótono () Pleurotótono

Outras observações:

2. Nervos cranianos:

N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado
--

Pares de Nervos		Direito	Esquerdo	
I – Olfatório				
II – Óptico (Visão)				
III – Oculomotor	Reflexo pupilar – direto (II, III)			
	Reflexo pupilar – consensual (II, III)			
	Reflexo pupilar – esquerdo (II, III)			
	Reflexo pupilar – consensual (II, III)			
	Estrabismo lateral			
IV – Troclear		Estrabismo dorso medial		
V - Trigêmio	Sens.	Reflexo palpebral		
		Sensibilidade da face		
	Mot.	Mastigação		
Massa muscular				
VI - Abducente		Estrabismo medial		
VII – Facial (Motor)		Ptose auricular		
		Ptose palpebral		
		Ptose labial		
VIII – Vestibulococlear (Sistema Vestibular)		Audição		
		Desvio de cabeça		
		Estrabismo ventro-lateral		
		Nistagmo	Fisiológico	
			Horizontal	
			Vertical	
			Rotacional	
Posicional				
Fase rápida				
IX – Glossofaríngeo (Motor)		Deglutição		
X - Vago		Deglutição		
		“Slap Test”		
XI – Acessório		Atrofia esternocefálico		
		trapézio		
		braquiocefálico		
		omotransverso		
XII - Hipoglosso		Protrusão / Desvio de língua		
		atrofia		
		Apreensão de alimento e água		

		Direito	Esquerdo
Síndrome de Horner (SNA – simpático)	Miose		
	Enoftalmia		
	Prolapso de 3ª- pálpebra		
	Sudorese (face, pescoço)		

Exame de fundo de olho _____

3. Andar:

(A) Ausente (P) Presente

- 0 = padrão normal de locomoção;
- 1 = déficits dificilmente observados durante a locomoção em linha reta, mas confirmados após a realização de manobras especiais;
- 2 = déficits facilmente observados durante a locomoção em linha reta e exarcebados durante a realização de manobras especiais
- 3 = o animal pode cair quando manobras especiais são realizadas e geralmente apresentam posturas anormais mesmo quando parado;
- 4 = quedas espontâneas durante a locomoção;
- 5 = decúbito permanente

	Esquerdo		Direito	
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Ataxia				
Grau				

	Esquerdo		Direito	
	Anterior	Posterior	Anterior	Posterior
Paresia				
Hipermetria				
Hipometria				
Espasticidade				
Flacidez				

Observações:

4. Pescoço, tronco e membros:

N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado
--

Massa muscular ()

Sudorese ()

Reflexo cervico-facial ()

Reflexo músculo-cutâneo ()

Observações:

Membros Anteriores		
	Esquerdo	Direito
Cascos (desgastes)		
Propriocepção		
Tônus		
Sensibilidade	superficial	
	profunda	
Reflexo biceptal		
Reflexo triceptal		
Reflexo carpo-radial		
Reflexo flexor		

Observações:

Membros Anteriores		
	Esquerdo	Direito
Cascos (desgastes)		
Propriocepção		
Tônus		
Sensibilidade	superficial	
	profunda	
Reflexo patelar		
Reflexo tibial cranial		
Reflexo gastrocnêmio		
Reflexo ciático		
Reflexo flexor		

Observações:

5. Cauda e Ânus:

N = Normal; A = Ausente; P = Presente; D = Diminuído; AA = Aumentado

		Cauda	Ânus
Atrofia			
Tônus			
Reflexos			
Sensibilidade	superficial		
	profunda		

6. Palpação Retal:

➤ Local da lesão neurológica: _____

➤ Residente responsável: _____

➤ Docente responsável: _____

➤ Data e assinatura: _____

ANEXOS II

Soluções empregadas na eletroforese (SDS-PAGE)

GEL DE SEPARAÇÃO A 10%

- 11,9 mL de água deionizada
- 5,9 mL de Tris HCl 2 M, pH 8,8 ± 0,1
- 10,5 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87 C)
- 1,7 mL de glicerol
- 0,63 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- 0,63 mL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- 242 □L de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- 27 □L de TEMED

GEL DE EMPILHAMENTO A 4%

- 3,95 mL de água deionizada
- 0,6 mL de Tris HCl 0,617 M, pH 6,8 ± 0,1
- 1 mL de Acrilamida/Bis (30% T / 1,87% C)
- 300 □L de glicerol
- 123 □L de EDTA 0,5 M, pH 8,3 ± 0,1
- 123 □L de lauril sulfato de sódio (SDS) a 10%
- 60 □L de persulfato de amônio a 10% preparado no dia do uso
- 13 □L de TEMED

TRIS HCl – 2 M – pH 8,9 (GEL DE CORRIDA)

Tris Base (PM: 121,1) 121,1g
 Completar para 500 mL com água deionizada.
 Acertar para pH 8,9;
 Filtrar a solução e guardar em geladeira.

TRIS HCl 0,617 M (GEL EMPILHADOR)

Tris Base (PM: 121,1) 7,475g
 Completar para 100 mL com água deionizada.
 Acertar para pH 6,8;
 Filtrar a solução e guardar em geladeira.

ACRILAMIDA/BIS (30% T / 1,87% C)

Acrilamida para eletroforese Sigma (PM: 71,08) 73,6g
 N,N metileno bisacrilamida para eletroforese Sigma 1,4g
 Completar para 250 mL com água deionizada;
 Aquecer se necessário.

EDTA 0,5 M

(Etilenodinitrilo) ácido tetracético tetrassódico (PM: 380,2) 19,01g
 Completar para 100 mL com água deionizada.
 Acertar para pH 8,3.

LAURIL SULFATO DE SÓDIO (SDS) 10%

Lauril sulfato de sódio Sigma (PM: 288,4) 10,0g
 Completar para 100 mL com água deionizada.

COOMASSIE BLUE 0,2% (BRILLIANT BLUE R – 250)

Metanol 500 mL
 Ácido acético 100 mL
 Águabi destilada 400 mL
 Coomassie blue (Brilliant blue R) 2,0g
 Deixar em repouso durante duas horas e filtrar.

GEL MIX (TAMPÃO DA AMOSTRA PARA PROTEÍNAS DESNATURADAS)

Lauril sulfato de sódio 10% 10,0 mL
 EDTA 0,5 M 4,0 mL
 Tris fosfato 0,617 M, pH 6,8 5,0mL
 Mercaptoetanol 3,0 mL
 Glicerol 10,0 mL
 Água deionizada 18,0 mL
 Azul de bromofenol (Bromphenol Blue) 5,0 mg
 Separar em frações de uso (450 ou 900 μ L) – manter no freezer até o momento do uso.

PERSULFATO DE AMÔNIA 10%

Persulfato de amônia 0,1g
 Água deionizada 1,0 mL
 (Preparar no momento da confecção do gel).

DESCORANTE

Metanol 250,0 mL
 Ácido acético 100,0 mL

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Para acelerar o processo de descoloração, os géis podem ser colocados em estufa a 40°C.

TAMPÃO DE CORRIDA CONCENTRADO (10X)

TrizmaBase 63,2g
 Glicina 39,9g
 SDS 10,0g

Completar para 1.000 mL com água deionizada.

Obs: para o uso na corrida usar o tampão de corrida diluído.

TAMPÃO DE CORRIDA DILUÍDO (tampão de uso na cuba)

Medir 100 mL do **tampão de corrida concentrado (10X)** e completar o volume para 1.000 mL.

**PREPARAÇÃO DAS ALÍQUOTAS DO MARKER E DAS PROTEÍNAS
 PURIFICADAS**

8 µL de marker

2 µL de gel mix

Congelar até o momento do fracionamento ou preparar na hora do uso.

PBS – CÁLCIO FREE (TAMPÃO FOSFATO SALINA)

NaCl 2,0g
 KCl 0,0625g
 Na₂HPO₄ 12g
 H₂O 0,2875g
 KH₂PO₄ 0,05g

ANEXO III

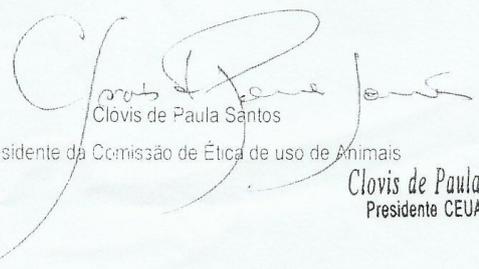


Reitoria
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 291, intitulado "PROTEINOGRAMA SÉRICO E DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO DE BOVINOS HÍGIDOS DE 18 MESES DE IDADE: CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DAS AFECÇÕES NEUROLÓGICAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL" sob a responsabilidade da Dra Paula Alessandra Di Filippo - Centro de Ciências Tecnológicas e Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 23/06/2015. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 23/06/2019.

Campos dos Goytacazes, 23 de junho de 2015.


Clovis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais

Clovis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF