



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

ISABELLA DE OLIVEIRA BARROS

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À
OVARIECTOMIA**

MOSSORÓ-RN
2016

ISABELLA DE OLIVEIRA BARROS

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À
OVARIECTOMIA**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Doutora no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Raimundo Alves Barrêto Júnior – UFERSA

Co-orientador: Prof. Dr. Luís Cláudio Lopes Correia da Silva – FMVZ/USP

MOSSORÓ-RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central Orlando Teixeira (BCOT)
Setor de Informação e Referência (SIR)

B277r Barros, Isabella de Oliveira.

RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA / Isabella de Oliveira Barros. - 2016.

88 f. : il.

Orientador: Raimundo Alves Barrêto Júnior. Coorientador: Luís Cláudio Lopes Correia da

Silva.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 2016.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

ISABELLA DE OLIVEIRA BARROS

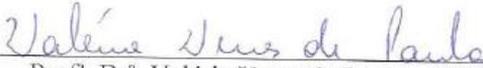
RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À
OVARIECTOMIA

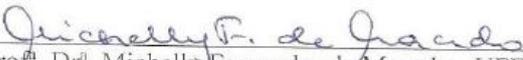
Tese apresentada à Universidade
Federal Rural do Semi-Árido
(UFERSA), como exigência final para
obtenção do título de Doutora no
Curso de Pós-Graduação em Ciência
Animal.

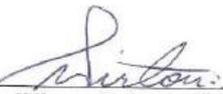
Aprovada em: 31/10/2016

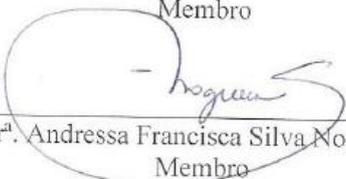
BANCA EXAMINADORA


Prof.^o. Dr. Raimundo Álvés Barrêto Júnior – UFERSA
(Orientador e Presidente)


Prof.^o. Dr.^a. Valéria Veras de Paula – UFERSA
Membro


Prof.^o. Dr.^a. Michelly Fernandes de Macedo - UFERSA
Membro


Prof. Dr. Wirtton Peixoto Costa - UFERSA
Membro


Prof.^o. Dr.^a. Andressa Francisca Silva Nogueira - UFPI
Membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ISABELLA DE OLIVEIRA BARROS - Filha de Maria de Oliveira Neta Barros e Francisco Cleodovaldo Barros nasceu dia 06 de janeiro de 1984 na cidade de Olho D'Água do Borges, Rio Grande do Norte, onde estudou todo ensino fundamental na Escola Estadual 20 de Setembro. Posteriormente, no ano de 1999 foi residir na cidade de Natal, também no Rio Grande do Norte para estudar ensino médio na Escola Estadual Francisco Ivo Cavalcante. Em 2004 entrou na Escola superior de Agricultura de Mossoró para cursar Medicina Veterinária e formou na já Universidade Federal Rural do Semi-Árido no ano de 2008. Durante os anos da graduação foi monitora da disciplina de Clínica Médica de Ruminantes e atuou em estágios, pesquisas e projetos de extensão nas áreas de Clínica, Cirurgia e Anestesiologia de Grandes Animais. No ano de 2009 ingressou no mestrado no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, linha de pesquisa Sanidade Animal da UFERSA, sob orientação do professor doutor Raimundo Alves Barrêto Júnior. A mesma defendeu dissertação no em 2011, cujo título foi “**Avaliação da conservação do sangue total de Asininos (*Equus asinus*) acondicionado em bolsas CPDA-1 e CPD/SAG-M**”. Em 2010 foi aprovada em concurso para professora substituta, também da UFERSA, onde ministrou as disciplinas de Clínica Médica de Equídeos, Equideocultura, Ovinocaprino cultura e Zoologia. No ano de 2014 foi aprovada em concurso para professor efetivo da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas, onde ministra disciplinas de Clínica Médica de Equídeos, Enfermidade de Equídeos, Clínica Médica de Ruminantes e Semiologia Veterinária. Atualmente é professora de Clínica Médica de Equídeos e Clínica Cirúrgica de Grandes Animais da Universidade Federal da Paraíba, Campus de Areia. Por fim, no ano de 2016 defendeu tese para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal pela Universidade Federal Rural do Semi-Árido.

DEDICATÓRIA

Eu dedico ao meus pais (Neta e Cleovaldo) que lutaram para me proporcionar educação e assim vencer mais essa etapa; Dedico aos meus familiares, amigos que torceram sempre por mim; Dedico ao meu orientador que me acolheu desde o mestrado e por fim ao jumentos que tanto me ensinaram ao longo desses anos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS, pai todo poderoso, ao seu filho amado JESUS CRISTO e a Mãe Maria Santíssima que me proporcionaram forças para continuar essa batalha, e assim eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador, meu amigo e eterno mestre Raimundo Alves Barrêto Júnior, que apostou em mim, confiou no meu trabalho e que sempre me proporcionou ensinamentos profissionais e pessoais inesquecíveis, a você Raimundo eu deixo aqui meu muito obrigada! TE AMO MUITO!

Ao professor Luís Cláudio Lopes Correia da Silva e ao Médico Veterinário Júlio Spagnolo pela vinda e grande colaboração e ensinamentos das técnicas cirúrgicas. Agradeço pela vinda e pela dedicação no projeto. Meu muito obrigada a esses dois grandes profissionais.

Agradeço aos meus pais. À minha doce e amável mãe, Maria de Oliveira Neta Barros pela paciência, amor e dedicação que sempre teve e tem comigo. Pelo apoio incondicional que senhora me dedicou eu agradeço e só posso dizer uma coisa: TE AMO MÃE. Ao meu pai (Cleovaldo), pelo apoio e confiança, te amo pai, obrigada por tudo!

Ao meus familiares em especial a minha segunda mãe, minha tia Cledna Barros, seu esposo, meu tio Edvan Sales e meus primos amados Viviane e Vinícius obrigada por todos os nossos anos de convivência, amo vocês. Aos meus tios Vivaldo e Núbia Dantas minha tia Cleuma, meu Tio Francisco, Luciene e Lucas. Obrigada pela torcida, amo vocês!

A toda equipe que me ajudou na execução do projeto: Rejane Santos, minha eterna amiga de todas as horas; meus queridos e amados companheiros de laboratórios, Aluísio, Estela, Jerson, Jocelho (Deputado), Jucélio (Véio), Aline, Feitosa, Anderson, Erick meu Deus como sou eternamente grata a vocês...Aos meus queridos amigos Nayanna e Rodolfo, nem sei como retribuir essa tão grande ajuda...meu muito obrigada. Aos meus queridos amigos Naftali e João Paulo (que se deslocou de Bom Jesus para me ajudar) as minhas noites não seriam perfeitas, mesmo cansadas sem vocês...meu muito OBRIGADA! Saibam que essa conquista foi fruto da ajuda de todos vocês...

A equipe da anestesia (Alice, Talyta, Ariana e Gláucia), em especial a minha eterna orientadora Valéria Veras pela ajuda na condução do experimento, por anestesiarem os animais e por me ajudarem nos momentos de desespero. Meninas amo vocês...Veras te amo demais, obrigada por mais uma vez me ajudar e confiar em mim.

A Andressa Nogueira que se disponibilizou incondicionalmente a me ajudar, com meus dados, com minhas dúvidas e loucuras...Minha querida amiga obrigada.

Ao meus queridos amigos de Bom Jesus que acompanharam boa parte dessa saga, compartilharam comigo minhas angústias e acima de tudo me proporcionaram muitos momentos de alegrias. Obrigada: Edivânia (minha dinda), Nair (mãe rainha), Wiara (amiga Ui), Alexandre (Jales), Márcia Paula e Marcos, Silvo (Cabesilvo) e Diane (Dona Kléia), Eulaíza (Bebê), Marcinho (marido), Jânio, Maria (Mary Jane), Éverton, Marta, Hatawa, Viviane, Ana Paula, Gleissinho, minhas filhas lindas (Marina e Emily).

A todos os meus alunos, orientados que puder conviver e ensinar durante os mais de dois anos que passei na UFPI. Obrigado meus queridos vocês foram muito importantes para mim. Em nome de todos os alunos obrigada João Paulo pela ajuda no experimento.

A UFPI, aos colegas, funcionários, terceirizados que convivi durante o tempo que passei lá.

As minhas eternas amigas das TURMA DAS 7 MULHERES: Gabriela, Leíse, Carla, Geyanna, Gezzana, Fabrícia, Maíra, Alice. Obrigada meninas por sempre me confortarem nos meus momentos de loucuras.

A minha querida amiga Rociene, que sempre se dispôs a me ajudar. Valeu amiga.

Ao Hospital Veterinário da UFERSA, nas pessoas dos diretores Paulo Cisneiro e Heider Irinaldo por disponibilizar a estrutura e equipamentos do HOVET.

Ao meus queridos colegas do Doutorado, que pude compartilhar conhecimentos, alegrias e amizades. Obrigado amigos.

Aos membros da minha banca, que aceitaram o convite.

Aos meus amigos de ODB, que sempre torceram por mim, em especial Aline e Geórgia. Obrigada a todos.

Ao programa de Pós-graduação em Ciência Animal, nas pessoas dos professores Jean Berg e Valéria Veras, em gratidão a todos que o compõem meu muito obrigada.

A todos os meus professores da UFERSA que sempre contribuíram com meu crescimento em todos os momentos da minha formação.

A UFPB, minha atual casa, em especial aos amigos Felipe e Érika e a todos os colegas de departamento e de hospital veterinário.

Ao meus alunos da UFPB, pelo apoio, torcida e compreensão.

A UNESP, campus Jaboticabal, mas pessoas do Paulo e Letícia pela ajuda nas análises das proteínas de fase aguda.

A CAPES pela concessão da bolsa, que tanto contribuiu pra minha formação. E ao CNPq pela ajuda na ida a Universidade de São Paulo para treinamento.

Ao senhor Jesus que disponibilizou os animais pra o trabalho e que se dedica a essa espécie.

Ao meus amados jumentos, em especial as jumentas, que participaram do projeto, que tanto me proporcionaram conhecimento e a qual e devo muitos aprendizados. Que vocês possam serem preservados e bem tratados sempre. MEU MUITO OBRIGADA.

RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA

BARROS, Isabella de Oliveira. **Resposta inflamatória em asininos (*Equus asinus*) submetidos à ovariectomia.** 87f. 2016. Tese (Doutorado em Ciência Animal: Curso de Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN. 2016.

RESUMO:

Proteínas de fase aguda são glicoproteínas produzidas pelos hepatócitos e liberadas na corrente sanguínea em resposta a dano tecidual, decorrente de processos inflamatórios agudos. Atualmente, são consideradas biomarcadores da resposta inflamatória e infecciosa, quando comparada com outras variáveis como hipertermia, leucocitose e neutrofilia, porém em asininos ainda não foram bem analisadas. Objetivou-se avaliar resposta inflamatória aguda em asininos submetidos à ovariectomia por duas diferentes abordagens. Foram utilizados 18 animais, fêmeas adultas, pesando em média 100 kg, as quais foram divididas em dois grupos, de 09 animais cada, onde grupo I, foram ovariectomizadas por laparotomia e o grupo II por laparoscopia. Após as cirurgias foram avaliadas as seguintes variáveis no sangue total: hemograma, fibrinogênio, haptoglobina, albumina, antitripsina, alfa-1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina, transferrina, imunoglobulinas A e G. Nos mesmos momentos, no líquido peritoneal, foram mensuradas: número de hemácias e leucócitos, análise citológica diferencial (leucócitos e células mesoteliais), proteínas totais, pH e proteínas de fase aguda. Todas as variáveis foram analisadas antes das cirurgias, 12, 24, 48, 72 horas, 8 e 16 dias após os procedimentos cirúrgicos. Houve um aumento ($p < 0,05$) do número de leucócitos com neutrofilia após as cirurgias, independente do procedimento cirúrgico, no soro e líquido peritoneal. As proteínas de fase aguda tiveram comportamentos diferentes no sangue e líquido peritoneal. Neste trabalho identificamos, pela primeira vez, a proteína P23.000kD no soro e amostras peritoneais de asininos. O interesse sobre o papel das proteínas de fase aguda na medicina veterinária, em especial em equídeos vem crescendo, principalmente, visando utilizá-las como marcadores precoces do processo inflamatório.

Palavras-chaves: inflamação; líquido peritoneal; proteína de fase aguda. jumentos

INFLAMMATORY RESPONSE IN DONKEYS (*Equus asinus*) SUBMITTED TO OVARIECTOMY

BARROS, Isabella de Oliveira. **Inflammatory response in donkeys (*Equus asinus*) submitted to ovariectomy**. 169f. Thesis (Doctorate in Animal Science: Animal Health) – Postgraduate Programme in Animal Science, Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró-RN, Brazil, in 2016.

ABSTRACT

Acute phase proteins are glycoproteins produced by hepatocytes and released into the bloodstream in response to tissue damage resulting from acute inflammatory processes. Currently, they are considered biomarkers of inflammation or infection, compared with other variables such as hyperthermia, leukocytosis and neutrophilia, but in donkeys have not yet been analyzed. This study aimed to evaluate acute inflammatory response in donkeys submitted to ovariectomy by two different approaches. We randomly selected 18 adult females animals weighing on average 100 kg, which were divided into two groups: Group I, 9 animals were ovariectomized by laparotomy and group II, 9 animals by laparoscopy. After the surgeries were evaluated the following variables in whole blood: blood count, white blood cell count differential cell count, fibrinogen, haptoglobin, albumin, antitrypsin, alpha-1-acid glycoprotein, ceruloplasmin, transferrin, immunoglobulins A and G (acute phase proteins) . In the same time, the peritoneal fluid were measured: number of erythrocytes and leukocytes, cytological analysis differential (leukocytes and mesothelial cells), total protein, pH and acute phase proteins. All variables were analyzed before surgery, 12, 24, 48, 72 hours, 8 and 16 days after surgery. There was an increase ($p < 0.05$) in the number of leukocytes with neutrophilia after surgery, regardless of the surgical serum and peritoneal procedure. Acute phase proteins had different behaviors in blood and peritoneal fluid. For the first time, we identified a 23.000kD protein in serum and peritoneal samples in donkeys. The interest on the role of acute phase proteins in the veterinary medicine, particularly in horses is growing, mainly aiming to use them as early markers of inflammation.

Keywords: inflammation; peritoneal fluid; acute phase proteins. donkeys.

LISTA DE TABELAS

Capítulo II - Resposta inflamatória sistêmica e de proteínas de fase aguda em asininos (*equus asinus*) submetidos à ovariectomia convencional e por laparoscopia.

Tabela 1 - Média e desvio padrão da contagem hemácias ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....46

Tabela 2 - Média e desvio padrão do volume globular (%) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....46

Tabela 3 - Média e desvio padrão da contagem de proteínas totais (g/dL) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....47

Tabela 4 - Média e desvio padrão da contagem de leucócitos totais ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....47

Tabela 5 - Média e desvio padrão da contagem de neutrófilos sanguíneos ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....47

Tabela 6. Média e desvio padrão de linfócitos sanguíneos ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....48

Tabela 7. Média e desvio padrão de monócitos sanguíneos ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....48

Tabela 8 - Média e desvio padrão da contagem eosinófilos sanguíneos ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....49

Tabela 9 - Média e desvio padrão da contagem de proteínas de fase aguda de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).....49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH – adrenocorticotrófico
AGP - alfa-1 glicoproteína ácida
AAS – amilóide A sérica
Cr – ceruloplasmina
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético
Fb – fibrinogênio
FC – frequência cardíaca
FR – frequência respiratória
g/dL – grama por decilitro
g/L – grama por litro
GLAP – grupo laparotomia
GVLA – grupo videolaparoscopia
Hp – haptoglobina
IL-1 – interleucina 1
IL-6 - interleucina 6
kDa – kilo Dáltons
Kg – kilograma
mA - miliampères
mg/dL – miligrama por decilitro
mg/kg – miligrama por kilo
mg/kg/h – miligrama por kilo por hora
mg/L – miligrama por litro
mL – mililitros
mm³ – milímetro cúbico
NF-IL-6 - fator de transcrição
°C – graus Célsius
PBS – fosfato salino
PCr – proteína C reativa
PFA – proteína de fase aguda
pH – potencial hidrogeniônico
PMN – polimorfonucleares
TNF – fator de necrose tumoral

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

Tf – transferrina

UI/kg – unidade internacional por quilograma

μ L – micrograma por litro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
REFERÊNCIAS	20
2 OBJETIVOS	22
2.1 GERAL	22
2.2 ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO	23
3.1. Laparotomia e laparoscopia em equídeos	23
3.2. Resposta de fase aguda	25
3.3. Proteínas de fase aguda mensuradas em equídeos	27
3.3.1. Classificação das proteínas de fase aguda	27
3.3.1.1. Amilóide Sérica A (ASA)	28
3.3.1.2. Haptoglobina (Hp).....	30
3.3.1.3. Fibrinogênio (Fb)	31
3.3.1.4. Alfa-1 glicoproteína ácida (AGA).....	33
3.3.1.5. Proteína Creativa (PCr)	34
3.3.1.6. Ceruloplasmina (Cr).....	35
3.3.1.7. Transferrina (Tr).....	35
3.4. Avaliação de líquido peritoneal em equídeos	36
4 MATERIAS E MÉTODOS.....	40
4.1 Local do experimento.....	40
4.2 Animais e preparação	40
4.3 Delineamento experimental.....	40
4.4 Procedimento pré-operatório.....	41
4.5 Pós-cirúrgico	43
4.6 Coleta e processamento das amostras	43
4.6.1 Amostra de Sangue.....	43
4.6.2. Amostras de Líquido Peritoneal	44
4.6.3. Avaliação das proteínas de fase aguda	45
4.8 REFERÊNCIAS	47
4 CAPÍTULO 2 – RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA SÉRICAS EM ASININOS (<i>Equus asinus</i>) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA POR LAPAROTOMIA E LAPAROSCOPIA.	58
Resposta inflamatória sistêmica e proteínas de fase aguda séricas em asininos (<i>Equus asinus</i>) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia.	59
1. INTRODUÇÃO	60
2. MATERIAL E MÉTODOS	61

3. RESULTADOS	64
4. DISCUSSÃO	67
5. CONCLUSÕES	71
6. REFERÊNCIAS	72
5 CAPÍTULO 3 – RESPOSTA INFLAMATÓRIA PERITONEAL DE ASININOS (<i>Equus asinus</i>) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA POR LAPAROTOMIA E LAPAROSCOPIA.. 74	
Resposta inflamatória peritoneal de asininos (<i>Equus asinus</i>) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia. 75	
1. INTRODUÇÃO	76
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
3. RESULTADOS	80
4. DISCUSSÃO	83
5. CONCLUSÕES	86
6. REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A criação de jumentos (*Equus asinus*) é conhecida pela humanidade desde os tempos bíblicos. Esses animais foram importantes instrumentos utilizados pelo homem no desenvolvimento da agricultura. Atualmente, o Brasil possui um rebanho de 1 milhão de asininos, sendo destaque a região Nordeste, detentora de 90% do total desses animais do país (IBGE, 2012).

Asininos apresentam características peculiares, que garantem sua grande utilização em regiões semiáridas, tais como: força, rusticidade e resistência, principalmente, ao clima quente e à escassez de alimentos (MARQUES et al., 2013). São considerados patrimônio de importância social, cultural, econômica e ecológica. Ainda são bastante utilizados para serviços de carga, transporte e, principalmente produção de híbridos (muars), atividade esta que cresce a cada dia (AEPGA, 2007). É crescente sua utilização como animais de companhia, na terapia ocupacional (asininoterapia), atividades ecoturísticas também como modelo para estudos na medicina veterinária (MADEIRA DE CARVALHO et al, 2007). Entretanto, muitos asininos, depois do intenso processo de mecanização passaram a ser abandonados nas estradas, provocando sérios acidentes, inclusive, com vítimas fatais (SOUSA, 2012). Uma das formas de controle populacional dessa espécie é através da ovariectomia.

A ovariectomia é a técnica cirúrgica utilizada para remoção dos ovários. Em jumentas, assim como éguas, ela é utilizada para inibir comportamento indesejado do estro (como micção frequente, agitação) e gestação; tratar algumas enfermidades com teratoma, hematoma, tumor de células da granulosa, que possam acometer os ovários e na prevenção de cólicas associadas ao período de estro (PALMER, 2002; CATONE et al, 2004); também é indicada quando se deseja um melhor desempenho na lida ou na tração (SILVA et al., 2007).

A técnica padrão de ovariectomia em éguas, aplicada em jumentas (laparotomia em posição quadrupedal) é realizada por meio de grandes incisões da parede abdominal, provocando demora na recuperação. Uso de laparoscopia para realização de ovariectomias permite exploração ovariana, com animal em pé, através de pequenas incisões e com isso, reduzindo dor e desenvolvimento de complicações no pós-operatório, favorecendo assim, rápido retorno do animal as atividades (BOURE et al, 1997; AL-BADRANY, 2007).

Qualquer procedimento cirúrgico aplicado aos animais induz resposta inflamatória aguda, que representa um dos mecanismos de resposta imune inespecífica e envolve mecanismos fisiopatológicos que interagem entre si com intuito de minimizar a lesão tecidual (ECKERSALL, 2000). Estudos em animais domésticos tem propiciado identificação de proteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA), cujas concentrações plasmáticas aumentam precocemente nos processos inflamatórios, como traumas cirúrgicos, neoplasias, estresse (JAIN, 1993; ECKERSALL, 2004; MURATA et al., 2004; MURATA, 2007).

A avaliação destas proteínas podem fornecer informações mais rápidas e importantes para detecção da inflamação, em comparação com outros marcadores, como leucocitose e neutrofilia (SOLTER et al., 1991; MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004). A prevenção de complicações após cirurgias depende de cuidadosa monitorização da saúde do animal. As concentrações séricas de proteínas de fase aguda refletem a gravidade da inflamação, e utilizá-las como biomarcador pode determinar rapidamente início do processo, particularmente nos casos quando os sinais clínicos estão ausentes (SERIN; ULUTAS, 2010). Em cavalos as principais proteínas de fase aguda mensuradas são: amilóide sérica A, haptoglobina e fibrinogênio (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008).

Sabe-se que asininos também são frequentemente submetidos a procedimentos que possam alterar sua homeostase orgânica e desencadear inflamação, como castrações (orquiectomias e ovariectomias), neoplasias, excesso de trabalho, lesões corporais (fraturas de membros), dessa forma ações que visem garantir e melhorar as condições de bem-estar são de suma importância para esses animais.

Atualmente, a medicina veterinária vem buscando biomarcadores para tais processos, dentre eles destacam-se as proteínas de fase aguda, e com isso melhorar a qualidade do diagnóstico das enfermidades, oferecer melhor tratamento e contribuir na previsão de prognósticos. Recentemente, essas proteínas vem sendo utilizadas em equinos para avaliar a técnica cirúrgica adotada; prognóstico de cólicas e como marcadores de stress durante transporte (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007; PIHL et al. 2013; CASELLA et al. 2012). Porém, poucas informações são encontradas esclarecendo a maneira como asininos reagem diante de processos inflamatórios agudos. Devido à escassez de informações a respeito dos tipos de proteínas e resposta inflamatória desencadeada pelos asininos durante inflamações agudas a realização do presente estudo é justificada.

REFERÊNCIAS

AEPGA, 2007. **Associação para o Estudo do Gado Asinino**. Disponível em: <http://www.aepga.pt/portal/PT/60/default.aspx>, acesso em 21 mai 2013.

AL-BADRANY, M.S. Laparoscopic ovariectomy in standing donkeys by titanium clips and monopolar electrocautery. **Journal Animal Veterinary Advances**, v. 6, p. 663–667. 2007.

BOURE, L., MARCOUX, M., LAVERTY, S. Paralumbar fossa laparoscopic ovariectomy in horses with use of endoloop ligatures. **Veterinary Surgery**, v. 26, p. 478–483. 1997.

CASSELLA, S.; FAZIO, F.; GIANNETTO, C. et al. Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse, **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 914-917, 2012.

CATONE, G.; MARINO, G.; MANCUSO, R.; ZANGHI, A. Clinicopathological features of an equine ovarian teratoma. **Reproduction in Domestic Animals**. V.39, p. 65–69. 2004.

CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W.K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood protein and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.24, p. 285-297, 2008.

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

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

IBGE 2012. Produção da Pecuária Municipal (PPM). Vol.39. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, RJ. 63p.

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

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febinger, 1993. 417p.

MADEIRA DE CARVALHO, L. M.; GOMES, L.; CERNEA, M.; CERNEA, C.; SANTOS, C. A.; BERNARDES, N.; ROSÁRIO, M. A.; SOARES, M. J.; FAZENDEIRO, I. Parasitismo gastrointestinal e seu controle em asininos e híbridos estabulados. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 102, p. 225 – 231. 2007.

MARQUES, D.D.; NÓBREGA NETO, P.I.; CARVAL, K. S. Emprego da cola de cianoacrilato em feridas cutâneas de asininos. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.1, p. 74-80.2013.

MURATA, H. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. **The Veterinary Journal**, London, v. 173, p. 473-474, 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.

PALMER, S. E. Laparoscopic ovariectomy in the standing horse. In: Fischer, A.T. (Ed.), **Equine Diagnostic and Surgical Laparoscopy**. W.B. Saunders Co., USA, pp. 189–195. 2002.

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

PIHL, T.H.; ANDERSE, P. A.; HANSEN, M. K.; MORCK, N.B.; JACOBSEN, S.. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n.2, p. 177-183, 2013.

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

SILVA, L. A. F.; FRANÇA, R. O.; VIEIRA, D.; GARCIA, M. A.; MOURA, M. I.; SILVA, M. A. M.; SILVA, E. B.; TRINDADE, B. R.; FRANCO, L. G. Emprego da abraçadeira de náilon, do categute e do emasculador na hemostasia preventiva de ovariectomia em éguas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n.1, p.135-146. 2007.

SOUSA, L. O. Análise populacional dos equídeos no semi-árido paraibano. 2012. 22f. **Trabalho de conclusão de curso**, Universidade Estadual da Paraíba, 2012.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar resposta inflamatória em asininos submetidos à ovariectomia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Observar perfil sérico das proteínas de fase aguda nas fêmeas asininas ovariectomizadas;
- Avaliar líquido peritoneal das fêmeas submetidas à intervenção cirúrgica;
- Demonstrar resposta inflamatória leucocitária nas fêmeas ovariectomizadas;
- Correlacionar os resultados obtidos através do leucograma, avaliação do líquido peritoneal e das proteínas de fase aguda em fêmeas asininas ovariectomizadas;
- Comparar resposta inflamatória das fêmeas asininas ovariectomizadas por laparoscopia e por laparotomia bilateral do flanco;

CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Laparotomia e laparoscopia em equídeos

A ovariectomia é cirurgia para retirada de um ou ambos ovários (AZIZ; BADRANY; TAHA, 2008). Em equídeos essa cirurgia é recomendada para remoção de tumores de ovários (tumores de células da granulosa, teratoma), tratamento de cistos ovarianos, manipulação folicular, controle de ciclo estral, inibição de prenhez (PALMER, 1993; RODGERSON; BELKNAP; WILSON, 2001). Em fêmeas asininas, assim como em éguas, a ovariectomia bilateral também é recomendada para controle populacional, melhora no comportamento, favorecimento do convívio em grupo (FRANÇA, 2005).

Várias são as abordagens para realização de ovariectomia, como laparotomia pela linha média ventral, pelos flancos, paramediana (ventral, diagonal ou oblíqua), vaginal (colpotomia) e por laparoscopia (lateral ou ventral). Segundo Loesch e Rodgeron (2003) a decisão da abordagem dependerá dos seguintes fatores: tamanho do ovário afetado; temperamento da égua; preferência do cirurgião; equipamentos disponíveis de equipamentos; custos e expectativas dos proprietários.

A laparotomia lateral pelos flancos em posição quadrupedal permite retirada de grandes tumores ovarianos, com melhor exposição do mesovário. Essa abordagem não requer anestesia geral, nem equipamentos específicos para realização. O baixo custo dessa técnica, permite que ela possa ser empregada para castração de fêmeas asininas, principalmente para controle populacional. Em contrapartida, para realização de ovariectomia com animal em estação é preciso que a fêmea tenha bom temperamento para que possa colaborar com equipe cirúrgica. Outro inconveniente é que na técnica em estação a incisão é grande, com divulsão de muitos músculos, causando um maior dano tecidual e demora na cicatrização. As complicações que também podem acontecer são hemorragias internas e cólicas pós-cirurgias (BARTMANN et al., 2003).

Outra abordagem bastante utilizada para retirada dos ovários é através da laparoscopia, principalmente posição quadrupedal, sob efeito de sedação (SILVA et al., 2008). Essa técnica, considerada “minimamente invasiva”, pois de acordo com Vierra (2005), permite acesso ao interior do corpo causando pouca injúria, já que o acesso é realizado por pequenas incisões, através dos quais são inseridos os instrumentos e a câmera dentro da cavidade abdominal. Conforme Fischer (1991), laparoscopia em estação

permite melhor visualização dos órgãos da cavidade abdominal usando apenas pequenas incisões.

As demais vantagens da laparoscopia em estação em relação a laparotomia é diminuição dos riscos de complicações oriundos da anestesia geral (HENDRICKSON; WILSON, 1996; SILVA et al., 2008); menor desconforto pós-operatório (BECK et al., 2003); menor riscos de infecções (GLUNTZ et al., 1998); redução de gastos com medicamentos (DECHANT; HANDRICKSON, 2000). De acordo com Nóbrega (2010) o tempo de recuperação de equinos submetidos a laparoscopia é menor, quando comparado a cirurgia convencional, permitindo assim um retorno mais rápido dos animais as suas funções. A cirurgia via laparoscopia também é mais indicada para identificar estruturas mais dorsais da cavidade abdominal, como por exemplo os ovários e também determinar as alterações percebidas durante palpação retal (tumores ovarianos) (REGLE, 1997). A ovariectomia é considerado um dos procedimentos mais realizados através da laparoscopia (LEE; HANDRICKSON, 2008). Silva et al. (2008) afirma que não existe limite para benefícios das cirurgias por videolaparoscopia, principalmente após intenso planejamento e exames pré-operatórios.

As desvantagens apresentadas à laparoscopia em equídeos seria alto custo dos equipamentos; risco de perfurações de vísceras pela passagem do trocater, com avaliação limitada da cavidade e dificuldade de identificação de algumas estruturas (SILVA, 2008). Além disso, a técnica laparoscópica requer treinamento da equipe cirúrgica específico para trabalhar em ambiente tridimensional (SEITTKO; HENDRICKSON, 2008).

Algumas complicações são descritas em laparoscopias em equinos, dentre elas Handrickson (2009) cita que punção do intestino seja uma das mais graves que possam ocorrer. Por isso, uso de trocateres afiados e técnicas de penetração abdominal agressivas devem ser evitadas, bem como excesso de gás e comida nas vísceras. Para isso recomenda-se antes dos procedimentos jejum alimentar de pelo menos 24 horas.

Uma das complicações mais descritas nas laparoscopias é pneumoperitônio provocado com CO₂ (dióxido de carbono), conforme afirma Reagle (1997). Auler e Carmona (1997) relataram que pneumoperitônio pode provocar hipercarbia, que pode desencadear arritmias cardíacas, embolia gasosa, hipoventilação. Para Normando et al (2004) o aumento da pressão intra-abdominal pode desencadear deslocamento do diafragma, com conseqüente redução do volume pulmonar. Para Handrickson (2012) o pneumoperitônio ideal em equinos varia de 10 a 15 mmHg, nunca ultrapassando 20 mmHg. Para fêmeas asininas ovariectomizadas por laparoscopia em estação Aziz, Al-

Badrany e Taha (2008) preconizou pressão intra-abdominal de 16 mmHg sem relatos de intercorrências. Handrickson (2009) em estudo sobre pneumoperitônio em equinos não observou alterações cardiopulmonares, hematológicas e nas variáveis químicas do plasma, porém notou leve resposta inflamatória do peritônio. Para esse autor também pode ocorrer leve enfisema subcutâneo no pós-operatório, principalmente quando animal se excita e o CO₂ escapa pela incisão.

Independente da técnica utilizada (laparotomia ou laparoscopia) os quadros de hemorragia intra-abdominal, principalmente por falhas na hemostasia do pedículo ovariano, que pode passar despercebido e provocar morte dos animais. Além disso, foram descritos em ovariectomias de éguas: peritonite, eventração, dor no pós-operatório, aderências intra-abdominais, infecções, edema incisional (HANDRICKSON 2009).

3.2. Resposta de fase aguda

A resposta inflamatória de fase aguda é uma reação sistêmica do organismo em decorrência ao desequilíbrio homeostático provocado por infecções, lesões de tecidos, trauma, desordens cirúrgicas e também crescimento neoplásico, com objetivo de manter integridade do tecido, limitando assim área lesionada, destruir microrganismos invasores e toxinas inativas (GRUYS et al., 2005; CECILIANE; GIORDANO; SPAGNOLO, 2002). A resposta de fase aguda é processo dinâmico que envolve alterações metabólicas e sistêmicas, que fornece um mecanismo de defesa inespecífico contra injúria antes do aparecimento da imunidade específica (PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004).

A resposta de fase aguda em equinos é estimulada pela liberação de citocinas, dentre elas destacam-se a interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF), que são liberados pelos macrófagos e monócitos no local da lesão ou inflamação (DINARELLO, 1983, BEUTLER; CERAMI, 1994; HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). Estas respostas por sua vez estão associadas com uma produção de mais citocinas e outros mediadores inflamatórios que se difundem para corrente sanguínea (GRUYS et al., 2005). Essas citocinas atuam em diferentes célula-alvo, provocando reações sistêmicas que resultam na ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, causando redução da secreção do hormônio do crescimento e reações físicas como febre, anorexia, catabolismo de células musculares, ativação do sistema de coagulação, diminuição das concentrações de cálcio, ferro, zinco e vitamina A (DINARELLO, 1984;

BLACKBURN, 1994; GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994; INGENBLEEK; YOUNG, 1994; GRUYS et al. 2005). Além disso, aumentos na circulação sanguínea de citocinas estimulam respostas hepáticas de fase aguda (MOSHAGE, 1997).

O mecanismo para estimulação da produção hepática da proteína de fase aguda por citocinas pró-inflamatórias tem sido extensivamente estudado na medicina humana e veterinária (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). A indução da liberação das proteínas de fase aguda é realizada principalmente pela IL-6, que após ligar-se aos seus receptores no fígado promove fosforilação do fator de transcrição (NF-IL-6) e com isso provoca transcrição dos genes no núcleo dos hepatócitos, responsáveis por liberar as proteínas de fase aguda. A IL-1 e TNF-alfa são ligados aos seus respectivos receptores e provocam a degradação do fator de inibição de transcrição, permitindo assim, produção deste fator e subsequente ativação dos genes que ativam a produção das proteínas de fase aguda no núcleo das células hepáticas (JENSEN; WHITEHEAD, 1998).

Por sua vez, a IL-6 e TNF-alfa estimula liberação ACTH (adrenocorticotrófico), aumentando assim liberação de glicocorticoides por parte das glândulas supra-renais. Os glicocorticoides exercem uma função dupla contraditória e ainda não é conhecida sua precisão, porque, por um lado, aumenta efeito estimulador de citocinas no fígado, mas, por sua vez, estabiliza os monócitos, assim, inibindo liberação de citocinas pró-inflamatórias (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990). As combinações de citocinas em diversas células alvo podem ter efeitos estimulador ou supressor. Por exemplo, produção de amilóide sérica A (ASA), geralmente requer a IL-6 e IL-1 ou TNF- α , ao passo que a IL-1 e TNF- α inibe liberação de fibrinogênio (Fb) induzida pela IL-6 (GABAY; KUSHNER, 1999). De acordo com Petersen, Nielsen e Heegaard (2004) A resposta de fase aguda é detectável durante vários dias após o estímulo, mas a cinética da resposta é espécie-específica e depende da causa e extensão do dano tecidual.

Em asininos as informações sobre resposta inflamatória aguda é escassa, porém sabe-se que esses animais estão expostos frequentemente a doenças e processos que possam desencadear inflamações. Em estudo realizado por Pessoa et al (2014) com levantamento de doenças em asininos do semiárido, observou-se alta prevalência de doenças com potencial inflamatório e doloroso, como fraturas, osteoartrites, pododermatite séptica, feridas traumáticas e cólicas.

3.3. Proteínas de fase aguda mensuradas em equídeos

3.3.1. Classificação das proteínas de fase aguda

Proteínas de fase aguda (PFAs) são grupo moléculas presentes no soro ou plasma, que tem suas concentrações alteradas em decorrência a uma variedade de processos inflamatórios, como infecções virais e bacterianas, estresse, neoplasias e traumas cirúrgicos (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004; CÉRON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA 2005). Essas proteínas são sintetizadas pelos hepatócitos em decorrência da resposta inflamatória de fase aguda (TOTHOVA; NAGY; KOVAC, 2014).

Segundo Jain et al (2011) PFAs podem ser classificadas de acordo com concentração plasmática, modo de ação, mecanismo de síntese e magnitude de aumento. Quanto a concentração plasmática são denominadas negativas, aquelas que diminuem a concentração durante resposta inflamatória aguda, exemplo: albumina, pré-albumina, transferrina, transtiretina, transcortina e proteína de ligação do retinol (HEINRICH; CASTELL; ANDUS 1990). E positivas, aquelas que aumentam os níveis quando produzem resposta inflamatória, como fibrinogênio, ceruloplasmina, amilóide sérica A, haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida, alfa-1 antitripsina, proteína C reativa (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA ECKERSALL, 2008, JAIN et al., 2011).

Quando ao modo de ação classificam-se em: inibidoras de proteases (alfa-1-antitripsina); proteínas de coagulação (fibrinogênio); do sistema complemento; de transporte. São classificadas quanto a síntese em produzidas pelos hepatócitos e de estimulação extra-hepática (JAIN et al., 2011). Também são divididas pela quantidade de aumento durante processo inflamatório, tais como maior ou principais (aumentam mais de 10 vezes, como amilóide sérica A) moderada (aumentam de 5 a 10 vezes, haptoglobina) e menor (aumentam até 5 vezes, proteína C reativa) (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007).

As proteínas de fase aguda podem ser usadas para auxiliar no diagnóstico e prognóstico de doenças, como biomarcadores quantitativos de enfermidades, monitorização em resposta às terapias, mensurar magnitude de traumas cirúrgicos. Esses biomarcadores são indicadores altamente sensíveis de inflamação, mas carecem de especificidade, pois há grande diferenças de espécies na quantidade e tipo de proteínas

que são liberadas durante resposta inflamatória de fase aguda (JACOBSEN et al., 2009; ECKERSALL; BELL, 2010). Para espécie equina, as principais proteínas de fase aguda mensuradas são: fibrinogênio, amilóide sérica A, haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina e proteína C reativa (NUNOKAWA et al., 1993; TAIRA et al., 1992; YAMASHITA et al., 1991). Em asininos ainda não foram estabelecidos as principais proteínas de fase aguda liberadas durante resposta inflamatória aguda.

3.3.1.1. Amilóide A sérica (AAS)

A amilóide sérica A é uma apolipoproteína, produzida pelos hepatócitos após injúrias teciduais, infecção ou inflamação (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008). É considerada a proteína de fase aguda mais importante em equinos, podendo aumentar cerca de 100 vezes em casos de infecções bacterianas, víricas em animais jovens ou adultos (PEPYS et al., 1989; KENT; GOODALL, 1991). Em equinos normais a concentração de amilóide sérica A varia entre 0,5 a 20mg/L (HULTEN et al., 1999; STONEHAM et al., 2001; JACOBSEN et al., 2006). Durante processo inflamatório sua concentração pode variar de 50 a 800 mg/L (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007).

Estudos realizados por Pihl et al. (2013) ao determinar os valores de ASA sérico e no fluido peritoneal de equinos com cólica observaram valores de 249,3 mg/L e 97,0 mg/L, respectivamente. Enquanto nos animais sem cólica esses valores variaram entre 0,5 – 1,2 mg/L (sérico) e 0,5 – 8,8 mg/L (fluido peritoneal). Não está claro se os níveis de ASA são afetados pela idade. Nunokawa et al. (1993) demonstraram que níveis basais de ASA em potros neonatais (menos de 1 semana de idade) e cavalos com mais de 8 anos foram ligeiramente maiores do que em outra idade. Entre os sexos não foram observadas diferenças nas concentrações de amilóide sérica A e que também parece não serem influenciadas pela gestação. As concentrações de AAS parecem não serem influenciadas pelo sexo e gestação.

A baixa expressão da AAS em animais saudáveis permite boa interpretação do aumento moderado desta proteína em casos de processos inflamatórios. A meia-vida curta da amilóide sérica permite acompanhamento da doença e com isso favorece escolha da melhor terapêutica a ser adotada. Portanto, determinação das concentrações séricas da AAS pode ser potencialmente útil no manejo do paciente, assim como na estimativa do prognóstico da enfermidade (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008).

Várias condições podem elevar as concentrações de amilóide sérica no sangue de equinos como, trauma cirúrgico, cólica, laminite, artrite séptica, broncopneumonia, pneumonia bacteriana, influenza, estresse de treinamento ou transporte (HULTÉN et al., 1999; JACOBSEN et al., 2006; HOBBO; NIWA; ANZAI, 2007; JACOBSEN et al., 2009; FAZIO et al., 2010). Em potros utilização de ASA auxilia no diagnóstico de septicemia neonatal, broncopneumonia associada à *Rodococcus equi* e onfalopatias (COHEN et al., 2005; PALTRINIERI et al., 2008).

A mensuração da concentração de amilóide sérica A tem se mostrado eficiente para refletir intensidade do trauma cirúrgico e assim poderá ser usada para estabelecer a melhor técnica cirúrgica a ser escolhida, tendo em vista que quanto maior o grau da lesão, maiores serão as concentrações de ASA (JACOBSEN et al., 2009). Em três tipos de cirurgias diferentes, como artroscopia, correção de neuropatia do nervo laringo recorrente e videolaparoscopia para ovarietomia, Jacobsen et al (2009) observou aumento dos níveis de amilóide sérica A.

Recentemente, Casella et al. (2012) demonstraram que haptoglobina e AAS são excelentes biomarcadores do estresse provocado pelo transporte em equinos. Em estudos com cavalos de enduro, Cywinska et al. (2013) observaram que a concentração de ASA pode ser útil para monitorização da adaptação da resistência ao esforço ou indicativo que este esteja sendo realizado de forma muito intensa. Em equinos acometidos de rabdomiólise por esforço, El-Deeb e El-Bahr (2014) demonstraram aumento na concentração de ASA ($162,6 \pm 5,32$ mg/L), quando comparado aos animais saudáveis ($11,3 \pm 2,2$ mg/L).

As concentrações de AAS foram determinadas em cavalos com cólica resultantes de causas inflamatórias e não inflamatórias. Nos animais com cólica atribuída a causas inflamatórias (enterite, peritonite, colite ou abscessos abdominais) observaram-se maiores concentrações de AAS em cavalos com causas não inflamatórias (deslocamento ou obstrução). Adicionalmente, concentrações de amiloide A foram maiores em cavalos que não conseguiram sobreviver ao episódio de cólica comparado com sobreviventes, no entanto, a diferença não foi significativa o suficiente para ser clinicamente útil (VANDENPLAS et al., 2005). Estudos da resposta da AAS em casos de doenças articulares de equinos foram recentemente realizados mensurando as concentrações desta proteína no soro e líquido sinovial. As concentrações de AAS no líquido sinovial e soro foram significativamente mais elevadas em cavalos com suspeita de artrite e tendinite

infecciosas, sugerindo que ASA pode ser útil como marcador biológico para cavalos com doença articular (JACOBSEN; HALLING-THOMSEN; NANNI, 2006).

O verdadeiro papel fisiológico da ASA em equinos ainda não foi totalmente compreendido, pois está associado a vários efeitos, tais como melhoria ou a inibição da função quimiotática dos leucócitos, recrutamento de células inflamatórias para o local da infecção, inibição da proliferação de células endoteliais e linfócitos, inibição da agregação plaquetária e fagocitose. A AAS também pode inibir liberação de mieloperoxidase, dirigido à migração dos fagócitos e modulando a ruptura do tecido conjuntivo na remodelação normal (XU et al., 1995).

A determinação dos valores da proteína amilóide sérica A em asininos não foi estabelecida durante processo de resposta inflamatória de fase aguda

3.3.1.2. Haptoglobina (Hp)

A Hp é produzida principalmente pelos hepatócitos, sendo sua principal função evitar perda do ferro, pela formação de complexos estáveis com hemoglobina (Hb). Acredita-se que haptoglobina tenha efeito bacteriostático, restringindo a disponibilidade de ferro para crescimento bacteriano. A Hp também podem ter ação antiinflamatória, protegendo contra espécies reativas de oxigênio e inibe a quimiotaxia de granulócitos e fagocitose (MURATA; SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). A Hp também ajuda no reparo de feridas, estimulando a angiogênese (CID; GRANT; HOFFMANN, 1993).

Em equinos Hp é considerada PFA moderada, aumentando de 1 a 10 vezes durante o processo inflamatório. Já em ruminantes é considerado principal biomarcador inflamatório agudo, aumentando suas concentrações em casos de mastites, pneumonias e endocardites (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008). Em equinos saudáveis os valores de haptoglobina variam de 20 a 1000 mg/L, enquanto esses valores podem variar entre 400 e 2700 mg/L nos animais com processos inflamatórios agudos (JACOBSEN; ANDERSEN, 2007). Cray e Belgrave (2013) avaliaram níveis de haptoglobina em equinos saudáveis e doentes (pneumonia, colite, cólica, úlcera gástrica, tenossinovite séptica, fratura de tarso) e observaram diferenças significativas dos valores 1,30 mg/ml (saudáveis) e 4,23 mg/ml (doentes).

Estudos realizados por Pihl et al. (2013) para determinar concentrações de Hp no sangue e fluído peritoneal de equinos com e sem cólica, observaram valores de

haptoglobina sérico de 1885 mg/L nos animais doentes, enquanto que, os saudáveis foram entre 491 a 4431 mg/L. Já no LP de animais doentes (cólica) a média de Hp foi de 809 mg/L e em cavalos saudáveis variou ente 106 e 744 mg/L.

Ao avaliar concentrações de proteínas de fase aguda, como haptoglobina, em líquido sinovial de equinos saudáveis durante 22 dias, Basile et al. (2013) encontraram valores bem abaixo (0,005 g/dL) do encontrado no soro sanguíneo (0,033 g/dL), demonstrando importância da mensuração para monitoramento de problemas articulares. Segundo Casella et al (2012) haptoglobina pode ser usado como biomarcador da condição de estresse de transporte em equinos.

Em equinos observou-se aumento nas concentrações de Hp em cirurgias, infecções virais, laminite, artrites não infecciosas e após vacinações contra gripe, tétano em éguas prenhes e pós-parto (KENT; GOODALL, 1991; TAIRA et al., 1992; FAGLIARI et al., 1998; HULTÉN et al., 2002). Observou-se aumento da Hp em equinos submetidos à castrações, laparotomia exploratória e esplenectomia (KENT; GOODALL, 1991; EURELL et al., 1993; HANZAWA et al., 2002). Os níveis séricos de Hp podem aumentar 2 a 3 vezes após primeira semana de cirurgia (KENT; GOODALL 1991; HANZAWA et al., 2002). Ao avaliar as concentrações de haptoglobina em jumentas Aziz et al.(2012) observaram maiores valores nos animais submetidos à ovariectomia por laparotomia do que laparoscopia (359,88mg/L e 278,84 mg/L após 5 dias; 285,12 mg/L e 262,89 mg/L após 8 dias, respectivamente). Também ocorreu aumento de Hp em equinos com abscessos profundos e durante a fase migratória de larvas de *Strongylus vulgaris* (KENT; GOODALL, 1991). De acordo com Milne, Doxey e Kent, (1991) a haptoglobina não aumenta em equinos com cólicas, entretanto, segundo Di Filippo, Nogueira e Santana (2011), esta proteína se eleva após laparotomia, principalmente, em animais com obstrução de intestino delgado. Fagliari et al (2008) demonstrou níveis de Hp mais elevados em cavalos com cólica que não sobreviveram, quando comparado com os equinos que sobreviveram.

3.3.1.3.Fibrinogênio (Fb)

Fibrinogênio foi uma das primeiras proteínas de fase aguda identificada em animais. Em bovinos e ovinos é usado como indicador confiável durante presença da

inflamação, infecção bacteriana e trauma cirúrgico (PFEFFER et al., 1993; HIRVONEN et al., 1996; CHERYK ET AL., 1998; HIRVONEN; PYORALA, 1998). Em equinos tem sido utilizada para diagnóstico de infecções (FALCON et al., 1985; JOHNSTONE; CRANE, 1986; MORRIS et al., 1988).

Fibrinogênio está envolvido na homeostase, fornecendo um substrato para formação de fibrina, e na reparação de tecidos, proporcionando matriz para migração das células inflamatórias relacionadas (THOMAS, 2000). Fb se liga especificamente a Integrinas CD11/CD18 na superfície dos fagócitos, desencadeando uma cascata intracelular e sinais que levam ao aumento da desgranulação, fagocitose, citotoxicidade celular dependente de anticorpos e atraso na apoptose (SITRIN et al., 1998; RUBEL et al., 2001).

O Fb é considerado uma PFA com concentrações moderadas em equinos, aumentando de 1 a 10 vezes ao longo de 24 a 72 horas após indução da inflamação. O intervalo de referência para concentrações relativamente amplas de Fb em cavalos saudáveis é de 200-400 mg/dL ou 2-4g/L e período de resposta longa depois do estímulo inflamatório tornaram Fb uma PFA bastante insensível (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008). Em asininos, o valor de fibrinogênio estabelecido em animais saudáveis varia entre 300 e 400 mg/dL (BURNHAM, 2002). Para Gul et al (2007) o valor médio de fibrinogênio encontrado em asininos saudáveis foi de 692, 30 mg/dL. Durante injúria inflamatória as concentrações de fibrinogênio podem variar entre 300 a 1100 mg/dL (JACOBSEN; ANDERSEN, 2009). Para Campbell et al (1981) elevações de 1000 mg/dL de fibrinogênio em equinos indica processo inflamatório em estágio bastante avançado e com mau prognóstico. No fluido peritoneal de equinos saudáveis, de acordo com Neves et al. (2000) a concentração média de fibrinogênio é de 0,05 g/dL.

O Fb tem sido utilizado para diagnosticar e monitorar várias condições inflamatórias em equinos. Em estudo avaliando ferro sérico e concentrações plasmáticas Fb em doenças inflamatórias sistêmicas de cavalos, concluiu-se que aumento nas concentrações de fibrinogênio foi associado com mau prognóstico e as concentrações de fibrinogênio sempre se mostraram mais elevadas em processos inflamatórios (locais ou sistêmicos), quando comparados a animais saudáveis (BORGES et al., 2007). As concentrações plasmáticas de Fb também tem sido utilizadas para detectar e monitorar potros com pneumonia por *Rodococcus equi* (GIGUERE et al., 2003). Outro estudo avaliou as ASA e Fb em equinos infectados experimentalmente com *Streptococcus zooepidemicus* e monitorados com pneumonia. Os resultados indicaram que a ASA

respondeu mais rapidamente que Fb (HOBO; NIWA; ANZAI, 2007). Em cavalos submetidos a obstruções de cólon menor o Fb elevou-se (0,4 g/dL), após 120 e 190 horas de obstrução, quando comparado antes do procedimento cirúrgico (0,2 g/dL), conforme afirma Oliveira et al 2011.

Embora a determinação da concentração plasmática de Fb tenha sido muito utilizada para detecção de doenças inflamatórias em cavalos, a sua resposta inflamatória aguda relativamente lenta dificulta seriamente sua utilidade clínica. Jacobsen et al (2005) ao comparar Fb e ASA para monitorar inflamação durante castração observaram que amilóide A seria mais sensível que fibrinogênio, tendo em vista que seus níveis elevam-se rapidamente durante injúria inflamatória. No entanto, como as mensurações de Fb são relativamente fáceis e baratas, provavelmente tenham garantido sua ampla utilização na medicina veterinária (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008).

3.3.1.4. Alfa-1 glicoproteína ácida (AGP)

A AGP é considerada proteína de fase aguda moderada em equinos e tem como principais funções as ligações as drogas, imunomodulação, proteção contra bactérias (CRISMAN; SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008; CECILIANI et al., 2010). Assim como albumina tem capacidade ligar-se as substâncias endógenas e exógenas como histamina, heparina, serotonina e esteroides, esta função faz com que os níveis de alfa-1 glicoproteína ácida se mantenham constantes durante resposta inflamatória, enquanto os da albumina, proteína considerada negativa diminuem. Isso também confere a AGA enorme capacidade de aumentar seus níveis no soro durante processo inflamatório agudo. Segundo Murata, Shimada e Yoshioka (2004); Cerón, Eckersall, e Martínez-Subiela, (2005) os níveis de AGP se elevam em inflamações agudas por indução da interleucina 1 (IL-1). A elevação dessa proteína inicia-se cinco dias após injúria, com pico máximo de 7 dias.

Em equinos é usada para monitoramento de cólicas (FAGLIARE et al., 2008; DI FILIPPO; SILVA; SANTANA, 2011), orquiectomias (DI FILIPPO et al., 2014), endometrite (MENDONÇA, 2012), artrites (HULTÉN et al., 2002; DI FILIPPO et al., 2014). Segundo Cavalcante et al (2010) os valores médios no soro de alfa-1 glicoproteína ácida para equinos e asininos saudáveis criados no semiárido eram de 6,26 mg/dL e 6,53 mg/dL, respectivamente. No líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução de

duodeno, íleo e cólon menor observou-se valores de AGA elevados, quando comparados animais não sobreviventes e sobreviventes (DI FILIPPO et al., 2010). Também houve aumento nos níveis de alfa-1 glicoproteína ácida de cavalos submetidos à orquiectomia, passando de 0,10 g/dL (valor basal) para 0,50 g/dL após 6 dias do procedimento cirúrgico, refletindo assim intensidade do processo inflamatório no pós-cirúrgico (DI FILIPPO et al., 2014). Em asininos não foram estabelecidos concentrações de AGP no líquido peritoneal.

No líquido sinovial de equinos os valores de alfa-1 glicoproteína ácida foi mais baixa que os níveis séricos (0,012 g/dL e 0,003 g/dL, respectivamente). O mesmo foi observado por Di Filippo et al (2014), que observaram valores séricos também de 0,12 g/dL e sinovial de 0,20 g/dL em equinos hígidos. Análise de proteínas de fase aguda em líquido sinovial pode auxiliar no monitoramento de equinos com artrite séptica.

3.3.1.5. Proteína Creativa (PCr)

Proteína C reativa (PCr) tem sido bastante descrita durante processo inflamatório agudo de seres humanos, ruminantes e cães (GABAY; KUSHNER, 1999; MURATA, SHIMADA; YOSHIOKA, 2004). Em equinos é considerada como PFA moderada e seus níveis séricos aumentam de duas a três vezes após estímulo inflamatório (TAKIGUCHI et al., 1990.; YAMASHITA et al., 1991). Em equinos saudáveis a concentração de PCr é de até 7,5 mg/L, atingindo picos de 10 a 35 mg/L em animais submetidos à injúrias que levem a inflamação. E com picos de aumento de concentração após 24 horas, 72 e 120 horas após lesão inflamatória (JACOBSEN, 2007; JACOBSEN; ANDERSEN, 2009). As concentrações de PCr podem estar elevadas em éguas após o parto (YAMASHITA et al., 1991). Estudos apontam que há aumento das concentrações de PCr em equinos com pneumonia, enterite, artrite e após castração (TAKIGUCHI et al., 1990).

A PCr tem vários efeitos pró-inflamatórios, incluindo ativação da cascata de complemento, indução de citocinas inflamatórias, e fagocitose. PCr também tem efeitos anti-inflamatórios significativos, tais como a quimiotaxia e inibição da geração de superóxido por neutrófilos e prevenindo assim, a adesão de neutrófilos pelas células endoteliais (CRISMAN, SCARRATT; ZIMMERMAN, 2008).

3.3.1.6. Ceruloplasmina (Cr)

É uma glicoproteína responsável pelo transporte do cobre sérico, importante para eritropoiese, removedora de radicais livres e atua como agente imunossupressor. É considerada moderada para equinos. Em cavalos hígidos os valores médios de Cr varia de 300 a 400 mg/dL e em processos inflamatórios podem aumentar de 700 a 900 mg/dL, após 5 dias, com pico entre 6 e 7 dias (JACOBSEN, 2007). Girardi (2012) afirma que valores de ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina e alfa-1 glicoproteína ácida em jumentos da raça Pêga são mais baixos que de equinos. Comparando os resultados de Girardi (2012) obtidos de jumentos Pêga, com de equinos hígidos descritos por Di Filippo, Nogueira e Santana (2011) observou-se concentrações de Cr, transferrina e albumina menores nos jumentos, enquanto Hp e AGA foram maiores nos asininos, que nos equinos.

Em equinos submetidos a obstrução de cólon menor e com cólicas que os levaram a óbito apresentaram elevações dos níveis de ceruloplasmina do líquido peritoneal, como afirmam Saquetti et al (2008) e Fagliare e Silva (2002), diferentemente dos dados obtidos de cavalos com cólica por Di Filippo, Nogueira e Santana (2011), que não obtiveram elevações significativas dessa proteína durante processos de avaliações, mas segundo os autores isso aconteceu porque Cr é proteína de fase aguda tardia e os tempos não foram suficientes para detectar elevações dessa PFA. Em equinos submetidos a orquiectomia, Di Filippo et al (2014) também não observaram alterações das concentrações de Cr no líquido peritoneal após 6 dias de avaliações. Esses mesmos autores também acreditam que concentrações de ceruloplasmina sejam elevados de acordo com tamanho do trauma provocado. Para Nogueira (2010) avaliação eletroforética de proteínas no líquido peritoneal é mais sensível na avaliação inflamatória abdominal que no soro sanguíneo sérico.

3.3.1.7. Transferrina (Tf)

A transferrina é proteína de fase aguda negativa que compõe o grupo das β -globulinas, cuja principal função é transporte de ferro no plasma e líquidos extracelulares, permitindo entrada do ferro nas células. Os níveis séricos de transferrina encontra-se

diminuídos em situações de inflamações agudas e doenças hepáticas crônicas, bem como aumentados em anemias, deficiência de ferro, gestação, enfermidades hepáticas agudas e síndrome nefrótica (KANEKO; HARVEY; BRUSS, 2008). Em equinos hígdos os valores séricos e sinoviais de transferrina são respectivamente 0,420 g/dL e 0,063 g/dL, conforme relata Basile et al (2013).

Na avaliação inflamatória aguda, espera-se que os níveis séricos e líquido peritoneal de transferrina em equinos encontrem-se diminuídos, como foi observado por Di Filippo et al (2014) no líquido peritoneal de cavalos submetidos à orquiectomia, assim como em cólica de ocorrência natural ou submetidos à laparotomia exploratória (DI FILIPPO; NOGUEIRA; SANTANA, 2011). Diferentemente do que foi observado por Yanaka (2013) ao avaliar essa proteína no sangue e líquido peritoneal em equinos submetidos a endotoxemia experimental e tratados com lidocaína observou-se aumento de transferrina ao longo dos momentos de avaliação. Resultados semelhantes foram obtidos por Nogueira et al (2013) ao avaliar líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução intestinal experimental.

Para Murata, Shimada e Yoshioka (2004) a diminuição das concentrações de transferrina é uma ação de defesa do organismo frente a injúria inflamatória, pois essa proteína sequestra íons de ferro, que servem como substrato para diferentes microrganismos. De acordo com Fournier, Medjoubi-n e Porquet, (2000) as diferenças nas concentrações séricas e peritoneais das proteínas de fase aguda deve-se a síntese extra-hepática realizada a partir de células, tecidos e órgãos heterogêneos, induzidos por leucócitos. Para Jacobsen (2007) alterações locais de proteínas de fase aguda pode ajudar obter informações sobre processos inflamatórios ou infecciosos de um determinado órgão e assim resultar em diagnósticos mais precisos.

3.4. Avaliação de líquido peritoneal em equídeos

O peritônio é uma membrana serosa, lisa formado por células mesoteliais, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos (COMAR et al., 2011). A cavidade peritoneal é o espaço formado entre o peritônio parietal, que recobre a parede abdominal e peritônio visceral, que forma superfície serosa dos intestinos, e que contém pequena quantidade de fluído (MENDES et al., 2000).

O fluido peritoneal é um líquido com pH e eletrólitos semelhantes ao plasma e é responsável por lubrificar e proteger a cavidade abdominal, reduzindo assim, o atrito entre os órgãos, e também ajudar na movimentação dos mesmos durante processo digestivo (BACH, 1974; COMAR et al., 2011). Além disso, evita formações de aderências e possui propriedade antibacterianas (MENDES et al., 2000).

Em equídeos avaliação de líquido peritoneal permite monitorar as alterações ocorridas nas células mesoteliais abdominais após injúrias inflamatórias, infecciosas ou traumáticas (NEVES et al., 2000). Sendo também útil para estabelecimento de diagnósticos, terapêutica clínica ou cirúrgica e prognóstico em enfermidade abdominais de equinos (MACKAY, 1992), principalmente quando outros exames apresentam-se inconclusivos (THOMASSIAN, 2005). Em asininos poucos estudos com avaliação de líquido peritoneal são descritos, ao contrário de equinos, cujo esse parâmetro já foi bem avaliado (MENDES et al., 2000; VALENTE et al., 2009; LHAMAS et al., 2014).

Em asininos e equinos a forma de coleta é a mesma, através de abdominocentese, que é punção abdominal, técnica que pode ser realizada com auxílio de objetos perfurantes (agulhas) ou rombos (cânulas mamárias ou cateteres) e mostra-se prática, eficiente e barata (TULLENERS, 1993; WHITE, 1990; LOURO et al., 2006). Em equinos adultos a quantidade de líquido peritoneal, segundo Parry e Brownlow (1992) varia de 100 a 300 ml, sendo a coleta influenciada pela alimentação, repleção e dilatação das alças intestinais, graus de desidratação, tipo de punção, onde pode ser coletado entre 50 a 60 ml de líquido por até 10 minutos (ALVES, 1997). Para asininos esse volume não foi descrito em literatura.

Na avaliação do líquido peritoneal de equídeos são observadas características físico-químicas, como: cor, odor, grau de turbidez, densidade, pH, composição bioquímica (RADOSTITS et al., 2002). Também são importantes as avaliações citológicas, com coloração de Gram, de células mesoteliais, contagem global de leucócitos, citológica diferencial (morfologia e tipo celular) (MENDES et al., 2000; SMITH, 2002).

Além dessas análises, atualmente, vem sendo incorporada a avaliação do líquido peritoneal de equinos as mensurações das proteínas de fase aguda, com objetivo de monitorar enfermidades gastrointestinais (DI FILIPPO et al., 2010; PHIL et al., 2015), cirurgias abdominais (SAQUETTI et al., 2008; JACOBSEN et al., 2009) ou não (DI FILIPPO et al., 2014). Segundo Jacobsen (2007) determinar as concentrações de proteínas de fase aguda em locais específicos, como fluido peritoneal poderão fornecer

informações sobre status infeccioso ou inflamatório, de um órgão ou região específica, e assim melhorar a precisão no diagnóstico e prognóstico das enfermidades, tendo em vista que estudos recentes demonstraram a produção dessas proteínas de forma extra-hepática, principalmente no líquido peritoneal (NOGUEIRA, 2010).

Em equinos hígdos o líquido peritoneal tem coloração pálida/clara, sem odor, com teores de proteínas totais inferiores a 2,5 g/dL e contagem de células nucleadas menores que 5.000 células/ μ L (MENDES et al., 2000), pH alcalino (7,25 a 7,40) e densidade inferior a 1019 (THOMASIAN, 2005). Para Bach (1973) é considerado normal contagem de até 8.000 células/ μ L no líquido peritoneal de equinos e que deve ser levado em consideração reação fisiológica do peritônio frente a desidratação. Segundo Neves et al (2000) a concentração de proteínas totais do líquido peritoneal é de 1,2 g/dL. Já Dabareiner (2006) relatou que esses níveis proteicos devem permanecer menores de 1,0 g/dL.

Em líquido peritoneal normal a distribuição das células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) e polimorfonucleares (PMN) (eosinófilos, basófilos e neutrófilos) varia, mas há maior predominância de PMN, entre 24% a 60% (MENDES et al., 2000). A contagem de hemácias é baixa em líquido peritoneal de equinos saudáveis (DEHEER; PARRY, GRINDEM, 2002), para Thomasian (2005) varia entre 4-6 x $10^3/\text{mm}^3$. Algumas literaturas consideram o padrão de normalidade a maior percentagem de neutrófilos e células mononucleares, com poucos linfócitos e raros eosinófilos (BACH; RICKETTS, 1974; MCGRATH, 1975; SWANWICK; WILKINSON 1976; NELSON 1979; BROWNLOW; HUTCHINS; JOHNSTON, 1981). De acordo com Neves et al (2000) a média de células no líquido peritoneal de cavalos hígdos são: contagem total de leucócitos $< 3567 \pm 3280/\text{mm}^3$ neutrófilos $< 1841 \pm 831$; linfócitos $< 375 \pm 21,4$; basófilos $< 4 \pm 12$; eosinófilos $< 107 \pm 303$; mononucleares $< 1206 \pm 902$.

Em asininos Louro et al (2006) estabeleceu como padrão para líquido peritoneal cor amarelo palha a laranja, ligeiramente turvo, com concentração média de proteínas totais de $1,97 \pm 0,31$ g/dl. Nos asininos hígdos, o número global de leucócitos encontrados foram de $15,8 \pm 6,79 \times 10^3/\text{mm}^3$ e eritrócitos de $24,7 \pm 11,7 \times 10^3/\text{mm}^3$, células mesoteliais $3,85 \pm 1,30 \times 10^3/\text{mm}^3$; neutrófilos $10,9 \pm 4,51 \times 10^3/\text{mm}^3$; linfócitos $1,41 \pm 0,51 \times 10^3/\text{mm}^3$; macrófagos $0,98 \pm 0,55 \times 10^3/\text{mm}^3$; e eosinófilos $2,48 \pm 1,36 \times 10^3/\text{mm}^3$ (LOURO et al., 2006), valores bem superior aos de equinos. Para esses mesmos autores as células mais comuns no líquido peritoneal de asininos seriam neutrófilos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e macrófagos. Em equinos a ordem é um pouco diferente, apresentam primeiro

muitos neutrófilos, seguido de macrófagos, linfócitos e eosinófilos (PARRY; BROWNLOW, 1992).

As principais proteínas de fase aguda descritas por Nogueira et al (2013) em líquido peritoneal de equinos foram imunoglobulina A ($0,15 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), ceruloplasmina ($0,10 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), transferrina ($2,00 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), albumina (42×10^{-2} g/dL⁻¹), imunoglobulina G ($2,96 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), haptoglobina ($0,20 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), alfa 1 glicoproteína ácida ($0,10 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹). Também foi descrita pela mesma autora, que usou eletroforese, uma proteína com peso molecular 24 kDa ($0,25 \times 10^{-2}$ g/dL⁻¹), cuja descrição nominal não foi realizada. Até o momento não foram descritas valores de proteínas de fase aguda em líquido peritoneal de asininos.

Para líquido peritoneal de equinos sem afecções, a concentração de fibrinogênio segundo Mendes et al (2000) é de até 100 mg/dL. Porém, de acordo com Neves et al (2000) o parâmetro de normalidade a ser considerado é de até 50 mg/dL. Em estudo realizado por Silva (2005), em seu grupo controle (equinos saudáveis) a concentração de fibrinogênio no líquido peritoneal foi indetectável (zero).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

Após a aprovação do projeto pelo comitê de ética, sob o número 23091.000415/2014-11, os animais foram alocados em área coletiva cercada, situado nas dependências do Laboratório de Medicina Interna Veterinária (LABMIV) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) para período de adaptação às novas condições de manejo. Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados no LABMIV, bem como coletas, armazenamento das amostras de sangue e líquido peritoneal, sendo estas, após processamentos, acondicionadas em tubos Eppendorf® e refrigeradas a -20°C.

4.2 Animais e preparação

Foram selecionados 18 asininos, fêmeas, com idade média de $4,4 \pm 2,8$ anos, que pesavam em média $102,75 \pm 15,04$ Kg. Em todos os animais foram realizados exames clínicos, hemogramas, parasitológicos, exames para diagnóstico de anemia infecciosa equina e também passaram por desverminação com febendazol via oral ($7,5 \text{ mg/kg}^{-1}$, Fenzol Pasta®, Agener União) antes da realização do estudo. Os asininos foram marcados com colares com distribuições numéricas diferentes. A dieta dos animais consistiu de concentrado comercial à base de farelo de milho e volumoso com capim Canarana (*Echinochloa pyramidalis*), que eram fornecidos 2 vezes ao dia e recebiam água e sal mineral *ad libitum*.

4.3 Delineamento experimental

Os animais foram divididos em dois grupos experimentais iguais, com 9 animais em cada. O grupo I foi submetido à cirurgia de ovariectomia por laparotomia pelo flanco e grupo II à ovariectomia por videolaparoscopia.

Foram realizadas coletas das amostras nos momentos pré-determinados (Tabela 1). De cada animal foi coletado amostras de sangue e líquido peritoneal em tubos com e sem EDTA para realização das análises.

Tabela 1. Momentos das coletas das amostras sanguíneas e peritoneais durante período experimental.

Momentos	Tempos de avaliações experimentais
Momento 0 (M0)	Antes do procedimento cirúrgico
Momento 12 (M12)	Doze horas após cirurgia
Momento 24 (M24)	Vinte e quatro horas após cirurgia
Momento 48 (M48)	Quarenta e oito horas após cirurgia
Momento 72 (M72)	Setenta e duas horas após cirurgia
Momento 8 dias (M8D)	Oito dias após cirurgia
Momento 16 dias (M16D)	Dezesseis dias após cirurgia

4.4 Procedimento pré-operatório

Todos os animais foram submetidos a jejum sólido de 48 horas para concentrado, 24 horas para volumoso e 12 horas de água antes das cirurgias. No dia do procedimento cirúrgico, cada animal foi contido individualmente em tronco de contenção e submetido a ampla tricotomia delimitada cranialmente pela 15^a costela, caudalmente pela tuberosidade coxal e, dorsalmente 30 cm dos processos transversos das vértebras lombares em ambos os flancos, nas regiões de jugulares e também porção ventral do abdômen. Posteriormente, foram submetidos a exame físico pré-cirúrgico, com mensuração de frequência cardíaca (FC), respiratória (FR), auscultação dos quadrantes abdominais, com auxílio de estetoscópio Littmann[®], seguindo recomendações de Speires (1993) e pressão arterial (sistólica, diastólica e média), pelo método não invasivo oscilométrico, com colocação de braçadeira acima da articulação do carpo, próximo artéria cefálica, conectado aparelho Petmap[®] (Ramsey Medical Inc).

Após cateterização de ambas as veias jugulares, para um melhor controle da infusão dos fármacos. Ambos os grupos receberam o mesmo protocolo anestésico, onde cada animal foi sedado com cloridrato de detomidina (Dormiun V[®], Agener União) e sulfato de morfina (Dimorf[®], Cristália), recebendo *bolus* inicial de 0,02 mg/kg⁻¹ e 0,2 mg/kg⁻¹, respectivamente, endovenoso. Imediatamente após, iniciou-se infusão contínua detomidina (Dormiun V[®], Agener União) na velocidade de 0,02 mg/kg/h e morfina (Dimorf[®], Cristália) 0,07 mg/kg/h, em bomba de infusão programada (St680, Samtronic[®]; LF Inject[®], respectivamente). Foi administrado 4 mg/kg⁻¹ de lidocaína (Xylestesin 2%[®], Cristália), distribuídos nas linhas de incisões e nos pedículos ovarianos.

Os animais do grupo I foram submetidos a laparotomia pelo flanco. Após sedação, eram mantidos em posição quadrupedal em tronco de contenção para realização de antissepsia de ambos os flancos com iodopolividona degermante (Riodeine[®], Rioquímica), álcool 70% (Rialcool 70[®], Rioquímica) e depois tricotomia. Três minutos após anestesia local, foi realizada incisão de aproximadamente 10 cm, seguida da divulsão dos músculos oblíquo abdominal externo e interno e transversos do abdômen. Após ruptura do peritônio, conseguiu-se acesso a cavidade abdominal para identificação do ovário e com isso realizava-se anestesia do pedículo com lidocaína (Xylestesin 2%[®], Cristália). Posteriormente, foi realizada homeostasia com auxílio de pinça hemostática e transfixação e ligadura do pedículo ovariano com fio categute número 0 para posterior secção. O peritônio e musculatura abdominal foram suturados em padrão Sultan também com fio absorvível categute 0 (Catgut[®], Shalon). Por fim, a pele foi suturada com fio mononáilon 0 (Nylon[®], Shalon) em padrão simples separado.

No grupo II também foram realizadas tricotomias de ambos os flancos, bem como antissepsia com iodopolividona degermante (Riodeine[®], Rioquímica) e álcool 70% (Rialcool 70[®], Rioquímica). Também foram mantidos em posição quadrupedal em tronco de contenção e submetidos aos mesmo protocolo anestésico do grupo I.

Após anestesia, dois portais foram colocados em cada flanco. O primeiro (P1) sobre o último espaço intercostal, 5 centímetros ventral para o processo transversos vertebral, para a colocação do laparoscópio. Após a criação de um pneumoperitônio de 8 mmHg com gás carbônico, o portal instrumento (P2) foi colocado no centro da fossa paralombar, evitando a punção do baço. Um afastador de circuito laparoscópico foi introduzido para segurar o pedículo ovariano. A incisão de flanco foi então ampliada permitindo retirar ovário externamente ao abdômen, seguido de ligadura e ressecção com categute 0 (Catgut[®], Shalon).

Ao término do procedimento cirúrgico o pneumoperitônio foi desfeito, instrumentos removidos. Os músculos em P1 e P2 foram fechados em com sutura Sultan usando categute 0 (Catgut[®], Shalon). As incisões na pele em P1 e P2 foram fechadas em sutura simples separada, usando fio mononáilon 0 (Nylon[®], Shalon).

4.5 Pós-cirúrgico

Todos os animais, de ambos os grupos, foram submetidos ao mesmo pós-operatório, que consistiu em limpeza diária da ferida cirúrgica, com água potável, sabão neutro, solução salina fisiológica 0,9% (Fisiológico[®], Eurofarma) e aplicação de spray cicatrizante repelente (Aeorcid[®], Agener União) ao redor da ferida até retirada dos pontos, que foi realizado 12 dias após procedimento cirúrgico.

A antibioticoterapia utilizada foi associação entre penicilina procaína, potássica e estreptomicina (Agrosil[®], Vansil), dose de 22.000 UI/kg⁻¹, via intramuscular a cada 48 horas, totalizando 3 aplicações. Concomitantemente, foi aplicado dipirona sódica (D-500[®] Fort Dodge), 25 mg/kg⁻¹, endovenoso, a cada 24 horas, durante 5 dias. Caso animal manifestasse sinais clínicos evidentes de dor seria aplicado cloridrato de tramadol (Tramadol[®], Teuto), 2mg/kg⁻¹, endovenoso, como forma de resgate. Todos animais receberam soro antitetânico (Vencosat[®], Vencofarma), via subcutânea (5.000UI/animal), em dose única após cirurgia.

4.6 Coleta e processamento das amostras

4.6.1 Amostra de Sangue

Após contenção física em brete e antissepsia com álcool 70% (Rialcool 70[®], Rioquímica), colheu-se com auxílio de seringa e agulha por venopunção da jugular, de cada animal, 10 mL de sangue distribuídos em tubos com e sem anticoagulante. Do sangue colhido com EDTA foram realizados hemograma, contagem global e diferencial de leucócitos, dosagem de fibrinogênio. O sangue coletado em tubo sem anticoagulante foi centrifugado para retirada do soro, posteriormente foram identificadas, armazenadas em microtubo de 2 mL (Eppendorf[®]) e acondicionadas em Freezer a -20° para posterior avaliação das proteínas de fase aguda e proteínas totais. A contagem de eritrócitos e leucócitos foi determinada pelo método manual em Câmara de Neubauer por macrodiluição seguindo os procedimentos de Hendrix (2005).

A contagem diferencial de leucócitos foi obtida a partir de exame microscópico realizados de esfregaços sanguíneos, corados pelo método de Panótico (Rápido[®], Renylab), como determinou Jain (1993). Os leucogramas foram obtidos através das

médias das contagens globais e absoluta das variedades leucocitárias, incluindo leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

A mensuração do volume globular foi obtida em centrífuga para microhematócrito, sendo utilizados tubos capilares de 75 mm, onde as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, lidas em tabela de microhematócrito (KERR, 2003). Já fibrinogênio foi realizado pelo método de precipitação a 56° C em tubos de microhematócrito calculando-se a diferença entre a concentração de proteínas no plasma e no soro.

As concentrações de proteínas totais do soro foram obtidas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos (proteínas totais[®], Labtest) e leituras espectrofotométricas (E-225-D, Labquest – CELM[®]).

4.6.2. Amostras de Líquido Peritoneal

Para coleta do líquido peritoneal cada animal de ambos os grupos foi contido em tronco e mantido em posição quadrupedal. Foi realizada ampla tricotomia e antissepsia da região xifoide até cicatriz umbilical. A coleta foi realizada na porção mais ventral do abdômen, com auxílio de agulha 40x12 introduzida lentamente na pele, em inclinação próxima a 90°, na região da linha média, até que o fluido fosse obtido, como descreveu Louro, Dias e Soto-Blanco (2006). As amostras foram coletadas em tubos com e sem EDTA.

Dos frascos coletados com EDTA foram realizadas as contagens de hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer. Para análise citológica diferencial, parte da amostra foi centrifugada a 1500 rpm por cinco minutos. Foram realizados esfregaços com o sedimento, corados pelo método Panótico (Panótico rápido[®], Laboclin). A contagem diferencial foi realizada para um total de 100 leucócitos e células mesoteliais em microscópio óptico comum, em objetiva de 100x.

O pH e a densidade foram mensurados pelo método de química seca em tiras reagentes (Uri-Color Check – Wama Diagnóstica[®]). As concentrações de proteínas totais foram obtidas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos (proteínas totais[®], Labtest) e leituras espectrofotométricas (E-225-D, Labquest – CELM[®]).

4.6.3. Avaliação das proteínas de fase aguda

Para o fracionamento eletroforético dos diferentes constituintes seroproteicos procedeu-se corrida eletroforética das respectivas amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) modificada, utilizando-se o sistema vertical de eletroforese (PROTEAN II XI – VERTICAL ELETROPHORESIS CELLS® - BIO-RAD).

A placa, contendo o gel foi acoplada ao suporte de sustentação apropriado (BRL® – Bethesda Labs) em contato com uma cuba contendo solução tampão de pH 8,9. As placas foram preenchidas com o gel de separação a 10% e, após polimerização, com o gel de empilhamento a 4%. Então, aguardou-se algumas horas para polimerização do material. O próximo passo consistiu no preparo das amostras para o fracionamento das proteínas adicionou-se 10 µL de soro sanguíneo, diluídos em 30 µL de tampão-fosfato (PBS), e 20 µL de gel mix e aquecidas sobre água em ebulição por 10 minutos. Uma alíquota de 5 µL de cada amostra de soro sanguíneo e do líquido peritoneal foi depositada em uma determinada cavidade do gel, tendo a primeira e a última amostra de cada gel em duplicata, além da amostra padrão¹⁶ como referência, que sempre foi colocada em uma cavidade pré-estabelecida.

O conjunto foi, então, submetido à corrente elétrica inicial de 20 mA por gel, fornecido por uma fonte de energia apropriada¹⁷. 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. Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (ABC-VET®, ABX), através do escaneamento das amostras.

Para o cálculo do peso molecular foram utilizados marcadores de pesos moleculares de 200, 116, 97, 66, 55, 45, 36, 29, 24 e 20 kDa, além das proteínas purificadas (Marker 6.500®, Marcador Sigma) albumina, antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e imunoglobulina G (IgG). Para a avaliação densitométrica

das bandas protéicas foram confeccionadas curvas de referência a partir da leitura do marcador padrão.

4.8 REFERÊNCIAS

ALVES, G.E.S. **Tratamento da peritonite experimental em equinos com a associação de dimetilsulfóxido, heparina e enronoxacina: Estudo clínico, cirúrgico e da patologia.** Belo Horizonte, 1997. 177p. Tese (Doutorado). Escola de Veterinária, UFMG.

AULER JR, J.O.C.; CARMONA, M.J.C. Alterações hemodinâmicas durante a laparoscopia. In: COHEN, R.V. **Laparoscopia Intervencionista: Consequências Metabólicas, Sistêmicas e Imunológicas.** 2. ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. cap. 4, p.25-36.

AZIZ, D.M.; AL-BADRANY, M.S.; TAHA, M.B. Laparoscopic ovariectomy in standing donkeys by using a new instrument. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 107-114, 2008.

AZIZ, D.M.; HISS-PESCH, S.; MIELENZ, B. SAUERWEIN, H. Haptoglobin baseline value in jennies and the effect of ovariectomy on its serum concentration. **Animal Reproduction Science**, v.132, p. 83-87, 2012.

BACK, C.A.C.; PIPPI, N.L.; BRUN, M.V.; LEME, M.C.; CONTESINE, E.A.; STEDILE, R. Criptorquidectomia em coelhos: modelo experimental para tratamento laparoscópico. **Ciência Rural**, v.33, n.2, p.331-337, 2003.

BACH, L.G.; RICKETTS, S.W. Paracentesis as an aid to the diagnosis of abdominal disease in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 6, n. 3, p. 116-21, 1973.

BARTMANN, C. P.; SCHIEMANN, V.; ELLENBERGER, C.; HOPPEN, H. O.; SCHOON, H. A. Ovariectomy as a therapeutic principle for ovarian disorders in horses - Indication, surgical procedures and results. **Pferdeheilkunde**, v.19, n. 6, p. 596-603, 2003.

BASILE, R. C.; FERRAZ, G. C.; MARSEL, P. C.; ALBERNAZ, R. M.; ARAÚJO, R. A.; FAGLIARI, J. J.; QUEIROZ-NETO, A. Physiological Concentrations of Acute-Phase Proteins and Immunoglobulins in Equine Synovial Fluid. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, p. 201-204, 2013.

BEUTLER, B.; CERAMI, A. Cachectin/Tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation. **Immunologic Research**, v. 5, p.281-293, 1986.

BLACKBURN, W.D. Validity of acute phase proteins as markers of disease activity. **Journal of Rheumatology**, v. 21(Suppl 42), p.9-13. 1994.

BORGES, A.S.; DIVERS, T.J.; STOKOL, T.; MOHAMMED, O. H. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. **The Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 21, p.489-94, 2007.

BROWNLOW, M.A.; HUTCHINS, D. R.; JOHNSTON, K. G. Reference values for equine peritoneal fluid. **Equine Veterinary Journal**, v.13, p.127-130, 1981.

BURNHAM, S. L. Anatomical differences of the donkey and mule. **In IVIS: in depth: mule/donkey medicine and surgery.** Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2002/910102000102.pdf>. Acesso em 15 jul 2014.

CAMPBELL, M. D.; BELLAMY, J. E. C.; SEARCY, G. P. Determination of plasma fibrinogen concentration in the horse. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p. 100-104. 1981.

CAVALCANTE, P. H.; SILVA, A. C. C.; SAKAMOTO, S. M.; SOTO-BLANCO, B. Serum protein fractions in Brazilian-breed donkeys using agarose gel electrophoresis. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 36, n.1, p. 9-12, 2012.

CASSELLA, S.; FAZIO, F.; GIANNETTO, C. et al. Influence of transportation on serum concentrations of acute phase proteins in horse, **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 914-917, 2012.

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

CECILIANI, F.; CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; SAUERWEIN, H. Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 4207-4231, 2010.

CERÓN J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute Phase Proteins in Dogs and Cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.

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

CID, M.C.; GRANT, D.S.; HOFFMANN, G.S. AUERBACH, R.; FAUCIA, S.; KLEINMAN, H. K. Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. **The Journal of Clinical Investigation**, v.91, p.977–85, 1993.

COHEN, N.D.; CHAFFIN, M.K.; VANDENPLAS, M.L.; EDWARDS, R. F.; NEVILL, M.; MOORE, J. N.; MARTENS, R. J. Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, n. 3, p.212-216, 2005.

COMAR, S. R.; SCHULZ, T.; MACHADO, N. A.; FRANÇA, F.S.; HAAS, P. Análise citológica do líquido peritoneal. **Estudos biológicos**, v. 73, n.9. p. 76-81, 2011.

CRAY, C.; BELGRAVE, R. L. Haptoglobin Quantitation in Serum Samples from Clinically Normal and Clinically Abnormal Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, p. 1-4. 2013.

CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W.K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood protein and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.24, p. 285-297, aug, 2008.

DABAREINER, R.M. Peritonite. In: SMITH, B.P. **Medicina Interna de Grandes Animais**. 3 ed. Barueri, SP, 2006. Cap. 30, p. 668-674.

DEHEER, H.L.; PARRY, B.W.; GRINDEM, C.B. Peritoneal Fluid. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D. **Citology and hematology of the horse**. 2 ed. California: American Veterinary, 2002. p. 127-162.

DIFILIPPO, P. A.; SILVA, A. F. N.; SANTANA, A. E. 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, dec, 2011.

DI FILIPPO, P.A.; NOGUEIRA, A. F.S.; ANAI, L. A.; ALVES, A. E.; SANTANA, A. E.; PEREIRA, G. T. Perfil eletroforético das proteínas séricas e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. **Ciência Animal Brasileira**. v.11, n.4, p.938-946, 2010.

DI FILIPPO, P. A.; GOMES, F. R.; MASCARENHAS, L. S.; ALMEIDA, A. J.; RODRIGUES, A. B. F. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos submetidos à orquiectomia. **Ciência Rural**, v.44, n.12, p.2221-2227, 2014.

DINARELLO, C. A. Pathogenesis of fever during hemodialysis. **Contributions to Nephrology**, v. 36, p. 90-99, 1983.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. **New England Journal of Medicine**, v.311, p.1413-1418.1984.

DECHANT, J.E.; HENDRICKSON, D.A. Standing female equine urogenital endoscopic surgery. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v.16, n.2, p.301-315, 2000.

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

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

EL-DEEB, W. M.; EL-BAHR, S. M. Selected Biochemical Indicators of Equine Rhabdomyolysis in Arabian Horses: Acute Phase Proteins and Trace Elements. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, p. 484–488, 2014.

EURELL, T. E.; WILSON, D. A.; BAKER, G. J. The effect of exploratory laparotomy on the serum and peritoneal haptoglobin concentrations of the pony. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 57, n. 1, p. 42-44, 1993.

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

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 559-567, 2002.

FAGLIARI, J. J.; SILVA, S. L.; SILVA, P. C.; PEREIRA, G. T. Leucograma e teores plasmáticos de proteínas de fase aguda de equinos portadores de abdômen agudo e submetidos à laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 2, p. 322-328, 2008.

FALCON, J.; SMITH, B.P.; O'BRIEN, T.R.; CARLSON, G. P.; BIBERSTEIN, E. Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.186, p.593–599, mar, 1985.

FAZIO, F.; ASSENZA, A.; TOSTO, F.; CASELLA, S.; PICCIONE, G.; CAOLA, G. Modifications of some acute phase proteins and the white blood cell count in thoroughbreds during training. **Veterinary Record**, v. 167, n. 10, p. 370-373, 2010.

FISCHER JÚNIOR, A.T. Laparoscopic cryptorchidectomy in the horse. **Veterinary Surgery**, v.20, n.5, p.335, 1991a.

FISCHER JÚNIOR, A.T. Slandng laparoscopy surgery. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.7, n.3, p.641 -7, 1991 b.

FOURNIER T.; MEDJOUBI-N, N.; PORQUET, D. I. Alpha-1-acid glycoprotein. **Biochimica and Biophysica Acta**, Philadelphia, n.1482, p.157-171, 2000.

FRANÇA, R.O. **Ovariectomia e orquiectomia em equinos: uso da abraçadeira de náilon na hemostasia preventiva em comparação ao categute e emasculador**. 76f. 2005. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

GABAY C, KUSHNER I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **New England Journal of Medicine**, p.340:448–54, 1999.

GIGUERE, S.; HERNANDEZ, J.; GASKIN, J.; MILLER, C.; BOWMAN, J. L. Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. **Journal American Veterinary Medical Associated**, v.222, p.775–81, mar, 2003.

GIRARDI, A. M. **Parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos de jumentos (*Equus asinus*) da raça Pêga**. 133f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2012.

GRUYS, E; OBWOLO, M. J; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary Bulling**, v. 64, p.1009-1018, 1994.

GRUYS, E.; TOUSSAINT, M.J.M.; NIEWOLD, T.A.; KOOPMANS, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 11, n.6B, p. 1045-1056, 2005.

GUL, S. T.; AHMAD, M.; KHAN, A.; HUSSAIN, I. Haemato-biochemical observations in apparently healthy equine species. **Pakistan Veterinary Journal**, v.27, n.4, p. 155-158. 2007.

HENDRIX, C. M. **Procedimentos Laboratoriais para Técnicos Veterinários**. 4^a ed., São Paulo: Roca, 576p, 2005.

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

HENDRICKSON, D.A.; WILSON, D.G. Instrumentation and techniques for laparoscopic and thoracoscopic surgery in the horse. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Philadelphia, v.12, n.2, p.235-259, 1996.

HANDRICKSON, D.A. Complications of laparoscopic surgery. **Veterinary Clinics of North American:Equine Practice**. v.24, n.3, p.557-571, 2009.

HANDRICKSON, D.A. Diagnostics Techniques. In: REAGLE, C.A. **Advances Equine Laparoscopy**. Wiley-Blackwell: Iowa, Cap, 8, p.83-91, 2012.

HANZAWA, K., HIRAGA, A., YOSHIDA, Y. et al. Effects of exercise on plasma Hp composition in control and splenectomized thoroughbred horses. **Journal Electrochemical Society**, v. 13, p.89–92, 2002.

HIRVONEN, J.; PYORALA, S.; JOUSIMIES-SOMER, H. Acute phase response in heifers with experimentally induced mastitis. **Journal of Dairy Research**, v.63, p.351–360, 1996.

HIRVONEN, J., PYORALA, S. Acute-phase response in dairy cows with surgically-treated abdominal disorders. **The Veterinary Journal**, v.155, p.53–61, 1998.

HULTEN, C.; SANDGREN, B.; SKIOLDEBRAND, E.; KLINGEBORN, B.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.40, p.323–33, 1999.

HULTÉN, C.; GRÖNLUND, U.; HIRVONEN, J. TULAMO, R. M.; SUOMINEN, M. M.; MARHAUG, G.; FORSBERG, M. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and alpha2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 7, p. 699-704, 2002.

HOBO, S.; NIWA, H.; ANZAI, T. Evaluation of serum amyloid A and surfactant protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 8, p.827-830, 2007.

INGENBLEEK, M.; YOUNG, V. Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. **Annual Review of Nutrition**, v.14, p.495-533. 1994.

JACOBSEN, S. Review of Equine Acute-Phase Proteins. **AAEP proceedings**, v. 53, p. 229-235. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP, Orlando, Florida. 2007. Disponível em: <http://www.aaep.org>. Acesso em 21 jan 2013.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. **Equine Veterinary Education**, v. 19, n. 1, p.38-46, 2007.

JACOBSEN, S.; NIELSEN, J.V.; KJELGAARD-HANSEN, M. TOELBOELL T.; FJELDBORG, J.; HALLING-THOMSEN, M.; MARTINUSSEN, T.; THOEFNER, M. B. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. **Veterinary Surgery**, v. 38, n. 6, p. 762-769, 2009.

JACOBSEN, S.; JENSEN, J. C.; FREI, S.; JENSEN, A. L.; THOEFNER, M. B. Using serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses—a field study. **Equine Veterinary Journal**, v. 37, p. 552–556, nov, 2005.

JACOBSEN, S.; THOMSEN, M.H.; NANNI, S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. **American Journal Veterinary Research**, v.67, p.1738–42, 2006.

JACOBSEN, S.; HALLING-THOMSEN, M.; NANNI, S. Concentrations of serum amyloid A in serum and synovial fluid from healthy horses and horses with joint disease. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 10, p. 1738-1742, Oct, 2006b

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

JAIN, N. C. **Essentials of Veterinary Hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JENSEN L, E.; WHITEHEA, D.A.S. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute phase response. **Biochemical Journal**, v.334, 489-503, 1998.

JOHNSTONE, I.B., CRANE, S. Hemostatic abnormalities in equine colic. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, p.356–358. 1986.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6th ed., Burlington: Academic Press, 2008. p. 117-155, 157-172.

KERR, M. G. **Exames laboratoriais em medicina veterinária: Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2003. p. 95-106.

KENT, J. E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations, **Equine Veterinary Journal**, v.23, p.59–66, 1991.

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

LHAMAS, C. L.; FREITAS, G. S. R.; DUARTE, C. A.; THIESEN, R. Avaliação do líquido peritoneal de equinos. **Ciência Animal**, v. 24, n.2, p. 3-12, 2014.

LEE, M.; HENCRICKSON, D.A. A review of equine standing laparoscopic ovariectomy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.2, 2008.

LOSCH, D.A.; RODGERSON, D.H. Surgical Approaches to Ovariectomy in Mares. Disponível em: <http://www.VetLearn.com>. Acesso em: 27 de janeiro. 2016.

LOURO, M.F.C.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Avaliação do fluido peritoneal de asininos. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 955-958, 2006.

MACKAY, R.J. Endotoxemia In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine** 3. ed., Philadelphia; W.B. Saunders, 1992, p. 225-32.

MCGRATH, J.P. Exfoliative cytology of equine peritoneal fluid - an adjunct to haematological examination. **Proceedings of the First International Symposium on Equine Haematology**, p.408-416, 1975.

MENDES, L.C.N.; PIERÓ, J.R.; MARQUES, L.C.; BORGES, A.S. Avaliação laboratorial do fluido peritoneal em modelos experimentais utilizados para indução de reação inflamatória intra-abdominal em equinos. **Revista de Educação Continuada (CRMV/SP)**, v. 3, n.3, p. 21-27, 2000.

MEDONÇA, V. H. **Quantificação de proteínas de fase aguda em éguas doadoras de embrião da raça Quarto de Milha**. 65f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba 2012.

MILNE, E. M.; DOXEY, D. L.; KENT, J. E. Acute phase proteins in grass sickness (equine dysautonomia). **Research In Veterinary Science**. v.50, p. 273–278. 1991.

MORRIS, D.D.; MESSICK, J.; WHITLOCK, R.H.; PALMER, J.; WARD, M. V.; FELDMAN, B. F. Effect of equine ehrlichial colitis on the hemostatic system in ponies. **American Journal of Veterinary Research**, v.49, p.1030–1036, 1988.

MOSHAGE, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. **Journal of Pathology**, v.181, p.257-266, 1997.

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.

NELSON, A.W. Analysis of equine peritoneal fluid. **Veterinary Clinics of North American and Large Animal Practice.**, v.1, p.267-274, 1979.

NEVES, M. M.; MARQUES Jr, A. P.; ALVES, G. E. S.; FARIAS, E. P. Valores referenciais da análise do líquido peritoneal de equinos sadios. **Ciência Rural**, v.30, p.809-811, 2000.

NÓBREGA, F.S. **Videolaparoscopia topográfica de equinos em estação com três diferentes massas corpóreas**. 2010. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

NOGUEIRA, A. F. S.; DI FILIPPO, P. A.; ANAI, L. A.; PEREIRA, G. T.; SANTANA, A. E. 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.

NORMANDO, V.M.F.; BRITO, M.V.H.; ARAÚJO JÚNIOR, F.A.; ALBUQUERQUE, B.C.M. Repercussões respiratórias do pneumoperitônio em suínos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, n.6, p.664-669, 2004.

NUNOKAWA, Y.; FUJINAGA, T.; TAIRA, T. YAMASHITA, K.; TSUNODA N.; MIZUNO, S. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. **Journal Veterinary Medical Science**, v.55, p.1011-1016, fev.1993.

OLIVEIRA, M. G.; TEIXEIRA, L. G.; SAMPAIO, R.C.L ; SABES, A. F. ; LACERDANETO, J.C . Teores séricos de proteínas de fase aguda e fibrinogênio em equinos submetidos à obstrução experimental do cólon descendente. **In: XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, 2011, Jaboticabal. XXIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP. Jaboticabal, São Paulo. 2011.

PALMER, S. E. Laparoscopic ovariectomy in the standing horse. In: Fischer, A.T. (Ed.), **Equine Diagnostic and Surgical Laparoscopy**. W.B. Saunders Co., USA, pp. 189–195. 2002.

PALTRINIERI, S.; GIORDANO, A.; VILLANI, M. MANFRIN, M.; PANZANI, S.; VERONESI MC. Influence of age and foaling on plasma protein electrophoresis and serum amyloid A and their possible role as markers of equine neonatal septicaemia. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 3, p. 393-396, 2008.

PARRY, B.W.; BROWNLOW, M.A. Peritoneal fluid. In: COWELL R.L.; TYLER, R.D. **Cytology and hematology of the horse**. SI. Louis; Mosby, 1992. p.121-51.

PIHL, T.H.; ANDERSE, P. A.; HANSEN, M. K.; MORCK, N.B.; JACOBSEN, S. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations in serum and peritoneal fluid of healthy horses and horses with acute abdominal pain. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 42, n.2, p. 177-183, 2013.

PIHL, T.H.; SCHEEPERS, E.; SANZ, M.; GODDARD, A.; PAGE, P.; TOFT, N.; ANDERSEN, P.H.; JACOBSEN, S. Influence of Disease Process and Duration on Acute Phase Proteins in Serum and Peritoneal Fluid of Horses with Colic. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, p. 651-658, 2015.

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

PESSOA, A. F. A.; PESSOA, C. R. M.; MIRANDA NETO, E. G.; RIET-CORREA, F. Doenças de asininos e muares no semiárido brasileiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n.12, p. 1210-1214, 2014.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, n. 2, p. 163-187. 2004.

PEPYS, M. B.; BALTZ, M. L.; TENNENT, G. A.; K.; KENT, J.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D. Serum Amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. **Equine Veterinary Journal**, v.21, p.106-109, 1989.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária – um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ª. ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002.159p.

RAGLE, C. Roundtable discussion: Laparoscopy in Equine Practice: Part 1: **Equine Practice**. v. 19, n. 9, p. 7-15, 1997.

RODGERSON, D.H.; BELKNAP, J.K.; WILSON, D.A. Laparoscopic Ovariectomy Using Sequential Electrocoagulation and Sharp Transection of the Equine Mesovarium. **Veterinary Surgery**. v. 30, p. 572-579. 2001.

RUBEL, C.; FERNANDEZ, G.C.; DRAN, G., BOMPADRE, M.B. ISTURIZ, M.A., PALERMO, M.S. Fibrinogen promotes neutrophil activation and delays apoptosis. **Journal of Immunology**, v. 166, 2002–2010, 2001.

SAQUETTI, C.H.C.; FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G.; FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de eqüinos com obstrução experimental do cólon menor. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.4, p.794-799, Ago. 2008.

SHETTKO, D.L.; HANDRICKSON, D.A. Education and the laparoscope: Use of laparoscopy in teaching. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.1, p. 51-53, 2008.

SILVA, C. F. G. K. T. **Valores hematológicos, bioquímicos e exame do líquido peritoneal de eqüinos (*Equus caballus*, Linnaeus, 1758) durante síndrome cólica**. 81f. 2005. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Botucatu.

SILVA, L.C.L.C.; ZOPPA, A.L.V.; HENDRICKSON, D. A. Equine Diagnostic Laparoscopy. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.24, p. 1-8, 2008.

SMITH, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. v.1. São Paulo: Manole, 2002. 900p.

SPEIRS, V.C. **Exame Clínico de Eqüinos**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. 359p.

STONEHAM S.J.; PALMER L.; CASH R.; ROSSDALE, P.D. Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidometric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. **Equine Veterinary Journal**, n. 33, p.599–603, 2001.

SITRIN, R.G.; PAN, P.M.; SRIKANTH, S.; TODD, R.F. Fibrinogen activates NF-kappa B transcription factors in mononuclear phagocytes. **Journal of Immunology**, v. 161, p.1462–1470. Ago. 1998.

SWANWICK, R.A.; WILKINSON, J.A. A Clinical evaluation of abdominal paracentesis in the horse. **Australian Veterinary Journal**, v.52, p.109-117, 1976.

TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M.; MIZUNO, S.; OTOMO, K. Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.51, p.1215–1220, ago. 1990.

TAIRA, T.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; YAMASHITA, K.; TSUNODA N.; MIZUNO, S. Equine haptoglobin: Isolation, characterization and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration, **Journal Veterinary Medical Science**, v.54, p.435–442, 1992.

THOMAS, J.S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G., JAIN, N.C. (Eds.), **Schalm's Veterinary Hematology**, Fifth edition. Lippincott Williams, Wilkins, Philadelphia, pp. 891– 898. 2000.

THOMASSIAN, A. **Enfermidades dos cavalos**. 4^a ed. São Paulo: Varela, 2005. 335p.

TOTHOVA, C.; NAGY, O.; KOVAC, G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. **Veterinarni Medicina**, v.59, n.4, p.163–180. 2014.

TULLENERS, E.P. Complications of abdominocentesis in the horse. **Journal American Veterinary Medicine Association**, v.182, n.3, p.232-234, 1983.

VALENTE, P. P.; CATTELAN, J. W.; SANTANA, A. E.; MALHEIROS, E. B.; DUARTE, C. A.; RASERA, L.; AITA, A. C. Concentrações de fibrinogênio plasmático, fosfatase alcalina sérica e do fibrinogênio e fosfatase alcalina no fluido peritoneal de equinos submetidos à enterorrafias aposicional e invaginante no cólon descendente. **Nucleus Animalium**, v.1, n.2, p. 95-106, 2009.

VANDENPLAS, M. L; MOORE, J. N.; BARTON, M.H. ROUSSEL, A.J.; COHEN, N. D. Concentrations of serum amyloid A and lipopolysaccharide- binding protein in horses with colic. **American Journal Veterinary Research**, v. 66, p.1509–16, set. 2005.

VIERRA, M. Minimally invasive surgery. **Annual Review of Medicine**, v.46, p.147-158, 1995.

XU, L.; BADOLATO, R.; MURPHY, W.J.; LONGO, D.L. ANVER, M.; HALE, S.; OPPENHEIM, J. J.; WANG, J. M. A novel biologic function of serum amyloid A.

Induction of T lymphocyte migration and adhesion. **The Journal of Immunology**, v.155, p.1184–90, 1995.

WHITE, N.A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1990. 443p.

YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; TAKIGUCHI, M.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.53, p.1019– 1024, 1991.

YANAKA, R. **Concentrações sérica e peritoneal de proteínas de fase aguda em equinos submetidos à endotoxemia experimental, tratados ou não com lidocaína**. 51f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. 2013.

4 CAPÍTULO 2 – RESPOSTA INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA SÉRICAS EM ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA POR LAPAROTOMIA E LAPAROSCOPIA.

SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE AND SERUM ACUTE PROTEIN PHASE IN DONKEYS (*Equus asinus*) SUBMITTED OVARIECTOMY BY LAPAROTOMY AND LAPAROSCOPY

Artigo submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – Quallis A2.

**Resposta inflamatória sistêmica e proteínas de fase aguda séricas em asininos
(*Equus asinus*) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia.**

[Systemic inflammatory response and serum acute protein phase in donkeys (*Equus asinus*) submitted ovariectomy by laparotomy and laparoscopy]

I. O. Barros^{1*}, R.G. Vale², V. V. Paula², J. S. Gameleira², J. M. Cavalcante², E. I. B. Lemos², N. S. Fernandes², R. S. Sousa³, L. C. L. C. Silva³, R. A. Barrêto Júnior²

¹Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Paraíba
Rodovia PB-079, s/n, 58397-000 – Areia, PB. E-mail: doutorabella@hotmail.com

²Departamento de Ciências Animais – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

RESUMO

Objetivou-se avaliar perfil inflamatório sistêmico e concentrações séricas de proteínas de fase aguda em asininas submetidas à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia. Foram utilizadas 18 animais, fêmeas adultas, pesando em média 100 kg, as quais foram divididas em dois grupos, de 09 animais cada, onde no grupo I, foram ovariectomizadas por laparotomia e o grupo II laparoscopia. Após as cirurgias, em ambos os grupos foram avaliados as seguintes variáveis séricas: hemograma, leucograma e proteínas de fase aguda (fibrinogênio, haptoglobina, albumina, antitripsina, alfa-1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina, transferrina, imunoglobulinas A e G). Todas as variáveis foram analisadas antes das cirurgias, 12, 24, 48, 72 horas, 8 e 16 dias após os procedimentos cirúrgicos. Houve um aumento ($p < 0,05$) do número de leucócitos com neutrofilia após as cirurgias, independente do procedimento cirúrgico. A haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida e proteínas totais foram diferentes entre os grupos, no M72, com valores superiores para grupo II ($p < 0,05$). A ceruloplasmina diminuiu de concentração nos dois grupos. Albumina e transferrina diminuíram suas concentrações em cada grupo ao longo do tempo. Fibrinogênio reduziu concentrações no primeiro momento depois das cirurgias no grupo I ($p < 0,05$). Foi identificada, nos dois grupos, uma proteína ainda não descrita em asinino, P23.000kD.

Palavras-chaves: trauma, inflamação, fibrinogênio.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate systemic inflammatory status and serum levels of acute phase proteins in asinine submitted to ovariectomy by laparotomy and laparoscopy. 18 animals were used adult females weighing on average 100 kg, which were divided into two groups of 09 animals each, where the group I, were ovariectomized by laparotomy and group II laparoscopy. After surgery in both groups were evaluated serum the following variables: complete blood count, WBC and acute phase proteins (fibrinogen, haptoglobin, albumin, antitrypsin, alpha-1 acid glycoprotein, ceruloplasmin, transferrin,

immunoglobulins A and G). All variables were analyzed before surgery, 12, 24, 48, 72 hours, 8 and 16 days after surgery. There was an increase ($p < 0.05$) the number of neutrophilic leucocytes after surgery, regardless of the surgical procedure. The haptoglobin, alpha-1 glicoproteína acid and total proteins were different between groups, on M72, with higher values for Group II ($p < 0.05$). The ceruloplasmin concentration decreased in both groups. Albumin and transferrin decrease of the concentration in each group over time. Fibrinogen concentrations decreased in the first time after surgery in group I ($p < 0.05$). Was identified in both groups, a protein not yet described in asinine, P23.000kD.

Keywords: trauma, inflammation, fibrinogen

1. INTRODUÇÃO

Os asininos são animais que acompanham a humanidade a mais de 5.000 anos. Em alguns países ainda desempenham importante função econômica e social, pois são utilizados para transporte de carga e pessoas. Além disso, esses animais são utilizados para fornecimento de leite, produtos cosméticos, produção de soro antiofídico, equoterapia e produção de muares (Baber *et al.*, 2014). Apesar de terem papel histórico e cultural para seres humanos, jumentos são alvos constates de maus tratos, que acabam gerando condições que levam aos mais variados graus de inflamações, tais como fraturas, problemas dentários, cólicas, laminite (Pessoa *et al.*, 2014).

Além disso, o crescente processo de mecanização, principalmente do meio rural, fez com que a utilização dos asininos fosse reduzida, e esses animais passassem a ser abandonados nas estradas e se reproduzirem sem controle, causando sérios acidentes, inclusive com vítimas fatais. Uma das formas de minimizar o crescente número desses animais abandonados é realização de ovariectomias. Várias são as técnicas e abordagens que foram propostas para realização de ovariectomia, pelo método convencional, laparotomia bilateral pelo flanco e mais recentemente por videolaparoscopia em posição quadrupedal (Aziz *et al.*, 2008).

A videolaparoscopia é considerada cirurgia minimamente invasiva, podendo causar menor trauma tecidual, diminuir a dor e processo inflamatório local, bem como redução de tempo de recuperação, quando comparada com abordagem convencional pelo flanco (Jacobsen *et al.*, 2009). Para avaliar o impacto do trauma cirúrgico faz-se necessário identificar marcadores inflamatórios (Jacobsen *et al.*, 2009). Dentre eles, em equinos, tem sido sugeridos as proteínas de fase aguda, substâncias liberadas pelo fígado na circulação em resposta ao processo inflamatório agudo (Murata *et al.*, 2004). A

identificação e quantificação das concentrações de proteínas de fase aguda podem fornecer informações importantes sobre intensidade da lesão provocada pela cirurgia, desenvolver técnicas menos agressivas e assim reduzir permanência hospitalar, dor, fadiga e morbidade pós-operatória (Jacobsen *et al.*, 2009).

Em cavalos tem sido relatadas várias proteínas de fase aguda (amilóide sérica A, haptoglobina, ceruloplasmina,) após cirurgias (Jacobsen *et al.*, 2009; Di Filippo *et al.*, 2011). Entretanto, em asininos a dinâmica da resposta dessas proteínas ainda não foram bem estabelecidas, principalmente em fêmeas ovariectomizadas. Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar perfil inflamatório sistêmico e concentrações séricas de proteínas de fase aguda fêmeas asininas submetidas à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação da realização do estudo pelo comitê de ética da UFERSA, sob número 23091.000415/2014-11 foram selecionados 18 asininos, fêmeas, pesando em média $102,75 \pm 15,04$ Kg, com idade de $4,4 \pm 2,8$ anos. Para todos os animais, antes do experimento, foram realizados exames clínicos, hemogramas, parasitológicos, exames para diagnóstico de anemia infecciosa equina e também foram desverminados ($7,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, Fenzol Pasta[®], Agener União, Brasil). Passaram por jejum sólido de 48 horas para concentrado, 24 horas para volumoso e 12 horas de água.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, com 9 animais cada, onde os do grupo I (GI), foram submetidos à cirurgia por laparotomia bilateral do flanco e os do grupo II (GII) à cirurgia por videolaparoscopia. Os dois grupos foram submetidos ao mesmo protocolo de antisepsia, anestesia e de pós-operatório. Ambos os grupos foram mantidos em posições quadrupedais em tronco de contenção, realizados tricotomias em ambos os flancos e antisepsia com iodopolividona degermante (Riodeine[®], Rioquímica, Brasil) e álcool 70% (Rialcool 70[®], Rioquímica, Brasil).

Após cateterização de ambas as veias jugulares, para um melhor controle da infusão dos fármacos os grupos receberam o mesmo protocolo anestésico, onde cada animal foi sedado com cloridrato de detomidina (Dormiun V[®], Agener União, Brasil) e sulfato de morfina (Dimorf[®], Cristália, Brasil), recebendo *bolus* inicial de $0,02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectivamente, endovenoso. Imediatamente após sedação, iniciou-se infusão contínua de detomidina (Dormiun V[®], Agener União, Brasil) na velocidade de $0,02$

mg/kg/h⁻¹ e morfina (Dimorf[®], Cristália) 0,07 mg/kg/h⁻¹, em bomba de infusão programada (St680, Samtronic[®]; LF Inject[®], Brasil, respectivamente). Foi administrado 4 mg/kg⁻¹ de lidocaína (Xylestesin 2%[®], Cristália, Brasil), distribuídos nas linhas de incisões e nos pedículos ovarianos.

No grupo I, três minutos após anestesia local, foi realizada incisão de aproximadamente 10 cm em ambos os flancos, seguido da divulsão dos músculos oblíquo abdominal externo, interno e transversal do abdômen. Após ruptura do peritônio, conseguiu-se acesso a cavidade abdominal para identificação do ovário, realizou-se anestesia dos pedículos ovarianos com lidocaína (Xylestesin 2%[®], Cristália, Brasil). Posteriormente, foi feita homeostasia com auxílio de pinça hemostática e transfixação e ligadura do pedículo ovariano com fio catégute número 0 (Catgut[®], Shalon, Brasil) e posterior secção. O peritônio e musculatura abdominal foram suturados em padrão Sultan com fio absorvível catégute 0 (Catgut[®], Shalon, Brasil). A pele foi suturada com fio mononáilon 0 (Nylon[®], Shalon, Brasil) em padrão simples separado.

No grupo II, após anestesia, dois portais foram colocados no flanco. O primeiro (P1) sobre o último espaço intercostal, 5 centímetros ventral para o processo transversal vertebral, para a colocação do laparoscópio acoplado a uma fonte de luz alógena (Ferrari Medical[®], Brasil) e videocâmara (Pop Cam II[®], Asap, Ferrari Medical, Brasil). Após a criação de um pneumoperitônio de 08 mmHg com gás carbônico, o portal instrumento (P2) foi colocado no centro da fossa paralombar, evitando a punção do baço. Um afastador de circuito laparoscópico foi introduzido para segurar o pedículo ovariano. A incisão de flanco foi então ampliada permitindo retirar ovário externamente ao abdômen, seguido de ligadura do pedículo com catégute 0 (Catgut[®], Shalon, Brasil) e ressecção ovariana. Ao término do procedimento cirúrgico, o pneumoperitônio foi desfeito, instrumentos removidos. Os músculos em P1 e P2 foram fechados com sutura Sultan usando catégute 0 (Catgut[®], Shalon, Brasil). As incisões na pele em P1 e P2 foram fechadas em sutura simples separada, usando fio mononáilon 0 (Nylon[®], Shalon, Brasil).

O pós-operatório consistiu de limpeza diária da ferida cirúrgica, com água potável, sabão neutro, solução fisiológica 0,9% (Fisiológico[®], Eurofarma, Brasil) e aplicação de spray cicatrizante repelente (Aeorcid[®], Agener União, Brasil) ao redor da ferida até retirada dos pontos, que foram realizados 12 dias pós cirurgias. A antibioticoterapia utilizada foi associação entre penicilina procaína, potássica e estreptomicina (Agrosil[®], Vansi, Brasil) na dose de 22.000 UI/kg⁻¹, via intramuscular a cada 48 horas, totalizando 3 aplicações. Concomitantemente, foi utilizado dipirona sódica (D-500[®] Fort Dodge,

Brasil), 25 mg/kg⁻¹, endovenoso, a cada 24 horas, durante 5 dias. Caso animal manifestasse sinais clínicos evidentes de dor seria aplicado cloridrato de tramadol (Tramadol[®], Teuto, Brasil), 2mg/kg⁻¹, endovenoso, como forma de resgate. Todos animais receberam soro antitetânico (Vencosat[®], Vencofarma, Brasil), via subcutânea (5.000UI/animal) após cirurgia.

Foram coletadas amostras de sangue, mediante punção de jugular, utilizando agulhas e seringas descartáveis e colocadas em tubos com EDTA pra realização de hemograma e leucograma e tubos sem anticoagulante para dosagem das proteínas de fase aguda. Elas foram obtidas antes de cada procedimento cirúrgico (M0), as 12 (M12), 24 (M24), 48 (M48), 72 (M72), 8 dias (M8D), 16 (M16D) dias após ovariectomias. O hemograma e leucograma foram realizados bem como as contagens de células, que foram feitas de forma manual. Para realização do diferencial de leucócitos foi utilizado esfregaço sanguíneo corado pelo método do Panótico (Panótico Rápido[®], Renylab, Brasil) como determinou. A mensuração do volume globular foi obtida em centrífuga para microhematócrito (LB – 116/30[®], Benfer, Brasil) onde as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos e, posteriormente, lidas em tabela de microhematócrito. A determinação do fibrinogênio foi realizada pelo método de precipitação a 56° C em tubos de microhematócrito, calculando-se as diferenças entre concentração de proteínas no plasma e no soro.

As concentrações de proteínas totais do soro foram obtidas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos (Labtest[®], Sistema de Diagnósticos Ltda, Brasil) e leituras espectrofotométricas (E-225-D, Labquest – CELM[®], Brasil). Para fracionamento das proteínas, procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Fotodyne[®], Fotodyne Inc, Estados Unidos). 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 (Sigma Marker 6.500 – 200.000) albumina, α 1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e imunoglobulina G (IgG).

A análise estatística foi processada com auxílio do programa estatístico Statistical Analysis System - SAS. Os dados foram analisados quanto a sua distribuição normal pela prova de Kolgomorov-Sminorv e avaliada a homogeneidade das variâncias. Os dados que obedeceram à distribuição normal foram submetidos a análise de variância utilizando o

procedimento PROC MIXED (SAS), para medidas repetidas no tempo, sendo estudado para cada variável o efeito de tratamento, tempo e interação entre tratamento e tempo. Sendo considerado o critério de Akaike (AIC) para a escolha da melhor estrutura de covariância. Após a escolha da melhor estrutura de covariância foi analisado o efeito de tempo entre os momentos estudados. Foi adotado grau de significância $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Os valores de hemácias (Tabela 1) em cada grupo aos longo do tempo não variaram ($p > 0,05$). Quando comparados número de eritrócitos entre os grupos apresentaram diferenças ($p < 0,05$) somente no último dia de avaliação, após 16 dias dos procedimentos cirúrgicos, com valores superiores para o grupo II. O volume globular (Tabela 1) de ambos os grupos aumentaram 12 horas após procedimentos cirúrgicos. Nos momentos 12, 72 e após 8 dias foram diferentes significativamente ($p < 0,05$), sendo os valores do GII sempre superiores aos do GI.

Tabela 1. Médias e desvios padrões dos números de hemácias ($\times 10^3/\text{UL}$) e volumes globulares (%) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).

Grupos	M0	M12	Momentos				
			M24	M48	M72	M8D	M16D
			Hemácias ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	5,03 \pm 0,68	5,42 \pm 0,77	5,06 \pm 0,81	4,53 \pm 0,72	4,84 \pm 0,73	4,82 \pm 0,73	4,67 \pm 0,88 ^B
GII	5,92 \pm 1,34	5,72 \pm 0,96	5,47 \pm 1,56	5,69 \pm 1,46	5,12 \pm 1,10	4,90 \pm 0,65	6,01 \pm 1,61 ^A
			Volume Globular (%)				
GI	26,55 \pm 3,60	29,44 \pm 3,57 ^B	27,33 \pm 3,70	25,12 \pm 1,88	25,33 \pm 2,87 ^B	25,44 \pm 2,87 ^B	25,44 \pm 2,69
	29,77 \pm 4,54 ^{ab}	34,22 \pm 5,65 ^{Aa}	30,66 \pm 6,83 ^{ab}	26,50 \pm 4,07 ^b	32,55 \pm 4,39 ^{Aab}	30,11 \pm 4,31 ^{Aab}	28,44 \pm 4,47 ^{ab}

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si, segundo o teste de Kolgomorov-Sminorv ($p < 0,05$).

Médias acompanhadas de letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si, segundo Análise de variância (PROC MIXED (SAS) ($p < 0,05$).

Houve um aumento ($p < 0,05$) do número de leucócitos (Tabela 2) 12 horas após cirurgia independente do procedimento cirúrgico utilizado. Porém, a maior concentração observada foi no grupo operado por laparoscopia, principalmente após 24 horas ($p < 0,05$).

A contagem de neutrófilos (Tabela 2) também não diferiu entre os grupos, porém em cada grupo aumentou 12 horas após procedimento cirúrgico ($p < 0,05$), permanecendo elevados até 24 horas. Nos dois grupos avaliados a quantidade de neutrófilos voltou a diminuir 2 dias após as cirurgias, permanecendo com valores inferiores ao tempo zero nos momentos M16D. Não houveram diferenças dos número de linfócitos (Tabela 2) quando comparados os grupos e nem ao longo do tempo no grupo I. No grupo II a

quantidade de linfócitos diminuiu no M24 e voltou a elevar-se 16 dias depois da realização das cirurgias.

A quantidade de monócitos foram diferentes entre os grupos ($p < 0,05$) apenas após 16 dias das cirurgias, com menores valores no grupo II (Tabela 2). No GII a diminuição na contagem de monócitos ocorreu principalmente 48 horas e 16 dias depois dos procedimentos cirúrgicos.

Não houveram diferenças entre os grupos quando comparado valores de eosinófilos. No grupo I e II houveram aumentos na contagens ($p < 0,05$) de eosinófilos após 16 dias da realização das cirurgias (Tabela 2).

Tabela 2. Médias e desvios padrões dos números absolutos de leucócitos ($\times 10^3/\text{UL}$), neutrófilos ($\times 10^3/\text{UL}$), linfócitos ($\times 10^3/\text{UL}$), monócitos ($\times 10^3/\text{UL}$) e eosinófilos ($\times 10^3/\text{UL}$) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).

Grupos	M0	M12	Momentos		M72	M8D	M16D
			M24	M48			
			Leucócitos ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	10,41 \pm 2,46 ^b	16,78 \pm 5,24 ^a	14,40 \pm 4,27 ^{ab}	11,08 \pm 4,50 ^b	10,29 \pm 3,70 ^b	12,85 \pm 2,58 ^{ab}	9,75 \pm 1,80 ^b
GII	12,07 \pm 2,69 ^{bc}	18,55 \pm 5,63 ^a	17,50 \pm 5,17 ^{ab}	13,94 \pm 3,22 ^{abc}	12,32 \pm 2,27 ^{bc}	14,47 \pm 2,78 ^{abc}	11,75 \pm 3,29 ^c
			Neutrófilos ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	6,91 \pm 1,87 ^{bc}	14,52 \pm 5,54 ^a	11,68 \pm 4,22 ^{ab}	8,25 \pm 3,25 ^{bc}	6,79 \pm 3,14 ^{bc}	9,09 \pm 2,53 ^{bc}	5,57 \pm 1,52 ^c
GII	8,81 \pm 2,09 ^c	16,24 \pm 6,13 ^a	15,14 \pm 5,24 ^{ab}	10,38 \pm 2,99 ^{bc}	8,80 \pm 1,89 ^c	10,20 \pm 2,43 ^{bc}	6,95 \pm 1,95 ^c
			Linfócitos ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	2,34 \pm 1,51	1,72 \pm 0,44	2,08 \pm 0,65	2,16 \pm 1,20	2,74 \pm 0,83	3,14 \pm 1,38	3,15 \pm 1,12
GII	2,04 \pm 1,10 ^{ab}	1,96 \pm 0,75 ^{ab}	1,81 \pm 1,02 ^b	2,96 \pm 1,35 ^{ab}	2,73 \pm 0,59 ^{ab}	3,49 \pm 1,82 ^{ab}	3,79 \pm 1,59 ^a
			Monócitos ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	0,62 \pm 0,42	0,59 \pm 0,47	0,56 \pm 0,40	0,30 \pm 0,27	0,39 \pm 0,22	0,26 \pm 0,22	0,47 \pm 0,25 ^A
GII	0,76 \pm 0,42 ^a	0,42 \pm 0,41 ^{ab}	0,50 \pm 0,41 ^{ab}	0,25 \pm 0,18 ^b	0,39 \pm 0,26 ^{ab}	0,22 \pm 0,16 ^b	0,17 \pm 0,20 ^{Bb}
			Eosinófilos ($\times 10^3/\text{UL}$)				
GI	0,30 \pm 0,48 ^{ab}	0,15 \pm 0,19 ^{ab}	0,02 \pm 0,05 ^b	0,19 \pm 0,25 ^{ab}	0,18 \pm 0,25 ^{ab}	0,26 \pm 0,14 ^{ab}	0,46 \pm 0,21 ^a
GII	0,55 \pm 0,44 ^{ab}	0,05 \pm 0,44 ^b	0,03 \pm 0,07 ^b	0,24 \pm 0,35 ^{ab}	0,18 \pm 0,21 ^{ab}	0,49 \pm 0,53 ^{ab}	0,75 \pm 0,63 ^a

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si, segundo o teste de Kolgomorov-Sminorv ($p < 0,05$).

Médias acompanhadas de letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si, segundo Análise de variância (PROC MIXED (SAS) ($p < 0,05$).

As concentrações de proteínas totais foram diferentes quando comparados os grupos no M72 ($p < 0,05$). Em cada grupo, quando avaliado individualmente, não foram observadas diferenças ao logo dos tempos de avaliações. As proteínas de fase aguda se comportaram de forma diferente entre os grupos (Tabela 3). A haptoglobina (Hp) apresentou diferenças de concentrações quando comparada entre os grupos somente no M8D ($p < 0,05$). Os valores dessa proteína foram menores nos animais do grupo I, que do grupo II em todos os momentos de avaliações. O grupo II apresentou dinâmica diferente, pois as concentrações de Hp aumentaram, principalmente após 72 horas (Tabela 3).

A ceruloplasmina (Cr) não apresentou diferenças entre os grupos. Nos dois grupos essa proteína reduziu os valores ao longo dos tempos ($p < 0,05$), para o grupo I a redução deu início a partir de 48 horas, persistindo até 16 dias. Já no GII, a redução foi significativa somente 8 e 16 dias após realização das cirurgias (Tabela 3).

Os valores de antitripsina não diferiram quando comparada entre os grupos. Ambos os grupos demonstraram aumento ($p < 0,05$) nas concentrações de antitripsina nos momentos M24 e M48 (Tabela 3). As concentrações de alfa-1 glicoproteína ácida (AGA) diferiram entre os grupos ($p < 0,05$) no momento M72, com valores mais elevados pro grupo II. No grupo II a glicoproteína teve um pico de aumento significativo ($p < 0,05$) somente 72 horas depois da laparoscopia (Tabela 3). No grupo operado por laparotomia houve aumento no valor de IgA no momento 16D, quando comparado ao momento inicial ($p < 0,05$). No GII houve aumento de IgA após 16 dias, quando comparado com 12 e 48 horas. Não houveram diferenças quando comparados os grupos (Tabela 3).

O fibrinogênio (Fb) também não diferiu entre os grupos e nem ao longo do tempo para o GII. No grupo I reduziram ($p < 0,05$) os níveis a partir de 12 horas, 48 horas e 8 dias depois das cirurgias (Tabela 3).

A transferrina, albumina e imunoglobulina G não apresentaram alterações quando comparadas os momentos e os grupos ($p > 0,05$). Foi identificada uma proteína não descrita nominalmente na literatura para equídeos. Essa proteína foi separada pelo peso (P23.000kD) e foi identificada em ambos os grupos. Mas não apresentou diferença entre os grupos e nem ao longo dos momentos de avaliação.

Tabela 3. Médias e desvios padrões dos valores de proteínas totais (g/dL⁻¹), haptoglobina(g/dL⁻¹), ceruloplasmina (g/dL⁻¹), antitripsina (g/dL⁻¹), alfa-1-glicoproteína (g/dL⁻¹), imunoglobulinas A e G (g/dL⁻¹), fibrinogênio (mg/dL⁻¹), albumina (g/dL⁻¹), transferrina (g/dL⁻¹) e P.23.000 kD (g/dL⁻¹) de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).

Grupos	Momentos						
	M0	M12	M24	M48	M72	M8D	M16D
	Proteínas Totais (g/dL⁻¹)						
GI	9,35±0,38	9,13±0,67	8,97±0,52	8,64±8,81	8,81±0,72 ^B	8,55±0,35	8,82±0,30
GII	9,24±0,69	9,57±0,71	9,28±1,14	8,97±0,73	9,60±0,43 ^A	8,71±0,62	8,71±0,61
	Haptoglobina (g/dL⁻¹)						
GI	0,07±0,01	0,06±0,03	0,07±0,03	0,08±0,03	0,09±0,04	0,08±0,02 ^B	0,07±0,03
GII	0,10±0,03 ^{ab}	0,07±0,04 ^b	0,09±0,06 ^{ab}	0,11±0,03 ^{ab}	0,14±0,08 ^a	0,11±0,02 ^{Aab}	0,09±0,02 ^{ab}
	Ceruloplasmina (g/dL⁻¹)						
GI	0,027±0,007 ^a	0,021±0,005 ^{ab}	0,020±0,004 ^{ab}	0,014±0,005 ^b	0,014±0,002 ^b	0,016±0,006 ^b	0,018±0,003 ^b
GII	0,025±0,005 ^a	0,023±0,009 ^{ab}	0,021±0,008 ^{ab}	0,017±0,005 ^{ab}	0,017±0,006 ^{ab}	0,014±0,004 ^b	0,015±0,005 ^b
	Antitripsina (g/dL⁻¹)						
GI	0,67±0,19 ^b	0,67±0,19 ^b	3,38±0,44 ^a	3,40±0,74 ^a	0,56±0,20 ^b	0,59±0,15 ^b	0,63±0,27 ^b
GII	0,60±0,19 ^b	0,62±0,19 ^b	3,12±0,42 ^a	3,02±0,48 ^a	0,65±0,25 ^b	0,56±0,18 ^b	0,59±0,13 ^b
	Alfa-1-glicoproteína ácida (g/dL⁻¹)						
GI	0,014±0,001	0,013±0,002	0,015±0,001	0,018±0,004	0,017±0,005 ^B	0,014±0,005	0,013±0,003
GII	0,013±0,004 ^b	0,014±0,005 ^b	0,014±0,004 ^b	0,019±0,007 ^{ab}	0,028±0,001 ^{Aa}	0,015±0,004 ^b	0,013±0,003 ^b
	IgA (g/dL⁻¹)						
GI	0,21±0,02 ^b	0,20±0,04 ^b	0,19±0,05 ^b	0,21±0,03 ^b	0,19±0,07 ^b	0,23±0,06 ^{ab}	0,29±0,04 ^a
GII	0,25±0,07 ^{ab}	0,20±0,04 ^b	0,23±0,12 ^{ab}	0,19±0,06 ^b	0,21±0,07 ^{ab}	0,25±0,04 ^{ab}	0,31±0,07 ^a
	IgG (g/dL⁻¹)						
GI	2,01±0,36	2,01±0,36	1,86±0,32	1,99±0,38	1,81±0,37	2,06±0,28	2,09±0,22
GII	1,77±0,29	1,73±0,29	1,84±0,36	1,84±0,45	1,81±0,35	1,89±0,36	1,92±0,25
	Fibrinogênio (mg/dL⁻¹)						
GI	766,6±421,3 ^a	333,3±269,2 ^b	466,6±360,5 ^{ab}	328,5±125,3 ^b	466,6±259,8 ^{ab}	333,3±173,2 ^b	366,6±187,0 ^{ab}
GII	422,2±405,5	522,2±473,7	577,7±578,3	400,0±165,8	411,1±333,3	466,6±300,0	244,4±133,1
	Albumina (g/dL⁻¹)						
GI	3,77±0,73	2,33±1,10	3,38±0,44	3,18±0,46	3,02±0,28	3,01±0,35	3,30±0,27
GII	3,36±0,54	3,34±0,40	3,12±0,42	3,02±0,48	3,26±0,37	2,96±0,41	3,16±0,48
	Transferrina (g/dL⁻¹)						
GI	0,31±0,16	0,33±0,06	0,35±0,09	0,36±0,12	0,33±0,07	0,38±0,08	0,35±0,04
GII	0,33±0,08	0,34±0,11	0,40±0,13	0,33±0,07	0,48±0,15	0,41±0,09	0,39±0,07
	P.23.000 (g/dL⁻¹)						
GI	0,195±0,014	0,196±0,032	0,205±0,034	0,195±0,033	0,196±0,006	0,202±0,026	0,201±0,023
GII	0,190±0,033	0,208±0,05	0,200±0,04	0,185±0,05	0,275±0,115	0,204±0,003	0,222±0,056

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si, segundo o teste de Kolgomorov-Sminorv (p<0,05).

Médias acompanhadas de letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si, segundo Análise de variância (PROC MIXED (SAS) (p<0,05).

4. DISCUSSÃO

A diferença significativa entre valores de hemácias e dos volumes globulares podem ser atribuídas a resposta ao processo inflamatório provocado pelos dois tipos de abordagens para retirada dos ovários, ficando mais evidente nos animais operados pela videocirurgia, que apresentaram valores sempre mais elevados que os cirurgiados por laparotomia (Tabela 1). Essas variações poderiam ser esperadas em virtude da mobilização esplênica motivada pela manipulação e alterações impostas pelo processo de contenção e agressão cirúrgicas. O baço funciona como reservatório de eritrócitos (40 a 50%) e a liberação dessas células é induzida pelo sistema nervoso simpático e catecolaminas circulantes, que ocorre em maior intensidade em resposta a maior grau de injúria recebido pelo tecido (Cuniberti *et al.*,2010).

Houve uma resposta leucocitária aguda evidente em ambos os grupos avaliados a partir de 12 horas, independente da técnica cirúrgica utilizada para realizar ovariectomia, sendo observado pelo aumento do número de leucócitos totais e também pelo aumento de neutrófilos, principalmente nos animais do grupo II (Tabela 2). Nos animais operados por laparoscopia o maior aumento da quantidade de células leucocitárias foi bastante elevado após 24 horas depois de realizada cirurgia, assim como aumento de neutrófilos. Esse achado foi diferente do encontrado por Alves et al (2010) quando comparou laparotomia e laparoscopia para ovariectomizar gatas, onde essa neutrofilia ocorreu nos animais da laparotomia.

O aumento do número de leucócitos observado nos dois grupos ocorreu possivelmente devido ação do cortisol que é liberado devido estresse e dor, assim afirma Alves et al (2010), situação essa que ocorreu em ambas as técnicas utilizadas. No caso da laparoscopia, que é considerada minimamente invasiva, esperava-se que a resposta leucocitária fosse menor, porém vale lembrar que nessa modalidade existe insuflação de gás carbônico, para distender cavidade, além de manipulação de órgão com instrumentais específicos e por isso, podem justificar maior indução de dor e estresse. Considera-se também o fato de que laparoscopia necessita de equipe cirúrgica bem treinada e alinhada para evitar demora na manipulação e localização dos órgãos e assim menos resposta celular aguda. Nos asininos utilizados nesse estudo notou-se bastante incômodo durante colocação do gás na cavidade.

Em asininos a resposta neutrofílica persistiu nos dois grupos até 48 horas depois das cirurgias e retornaram aos valores de antes da cirurgia após 72 horas (Tabela 2). Em cadelas e gatas foram observados semelhantes respostas neutrofílicas, quando comparadas técnica aberta e videocirurgia, porém ao contrário do visto em asininos, em cães e gatos, o menor número de neutrófilos foi visto na técnica menos invasiva (laparoscopia) (Alves *et al.*, 2010; Rubio, 2013). A linfocitose observada no grupo II, após 16 dias quando comparada com momento M24 pode ser atribuída ao estresse da coleta, tendo em vista que não apresentou diferenças significativas com os demais momentos.

As concentrações de proteínas séricas totais de ambos os grupos encontravam-se acima dos valores médios descritos por Mori et al (2003) para fêmeas asininas brasileiras, ($6,27 \pm 0,62$ g/dL) em todos os tempos avaliados. O aumento da concentração de proteínas totais pode ocorrer em função da desidratação e também pela inflamação, além disso, as concentrações de albuminas também estariam proporcionalmente aumentadas (Eckersall,

2008). Neste caso, a causa do aumento da concentração de proteínas totais séricas foi o processo inflamatório desencadeado pela cirurgia, tendo em vista que, segundo Ayo et al (2013) asininos toleram e recuperam de desidratação mais rápido que equinos.

De forma geral, em equinos a liberação das proteínas de fase aguda inicia entre 6 a 8 horas após injúria tecidual, com concentração máxima alcançada entre 2 a 5 dias (Murata *et al.*, 2004). Neste estudo, as alterações mais significativas das proteínas de fase aguda ocorreram juntamente entre 72 horas e 8 dias depois dos traumas cirúrgicos. De acordo com Céron et al (2005) a liberação de proteínas de fase aguda é proporcional a intensidade da lesão tecidual e/ou inflamação, espera-se, que quanto mais complicações pós-cirúrgicas presente, maiores os níveis de proteínas produzidos. No caso deste trabalho, a maioria das proteínas de fase aguda avaliadas apresentaram valores superiores nos animais do grupo II, do que nos animais do grupo I.

A haptoglobina aumentou seus níveis séricos durante processos inflamatórios agudos e também em procedimentos cirúrgicos realizados em equinos. Neste estudo os picos ocorreram, significativamente no grupo II ($p < 0,05$), no 3º e 8º dia de pós-cirúrgico, corroborando o que foi descrito por Milne et al (1991) em equinos. Aziz et al (2012) ao comparar valores de haptoglobina entre asininas ovariectomizadas por laparotomia e laparoscopia encontrou valores dessa proteína menores no grupo operado por videocirurgia, do que pela técnica convencional, ao contrário deste experimento. Haptoglobina é uma proteína moderada em equídeos induzida pela interleucina-6 e que eleva-se mais tardiamente após trauma ou injúria tecidual, e em asininos ela se comportou desta forma, pois elevou-se depois de 72 horas.

Ao contrário do observado em cavalos (Nogueira *et al.*, 2013) e cadelas (Rubio, 2013) após injúria inflamatória, a ceruloplasmina em fêmeas asininas ovariectomizadas diminuiu de concentração ao longo do tempo, a partir de 48 horas no grupo I e mais tardiamente no grupo II (8 dias) (Tabela 3). A ceruloplasmina é considerada proteína de fase aguda tardia em equinos e que aumenta concentração durante processo inflamatório (Murata *et al.*, 2004), porém neste estudo com asininos ela comportou-se como negativa, pois seus valores diminuiram ao longo dos momentos de avaliação.

O aumento significativo ($p < 0,05$) da antitripsina em asininos ocorreu com 1 e 2 dias depois das intervenções cirúrgicas, nos dois tipos de abordagens cirúrgicas, principalmente, nos operados por laparotomia. Posteriormente, as concentrações dessa proteína retomaram os valores iniciais. O aumento da sua síntese é estimulada pelo processo inflamatório agudo, pois a função é neutralizar atividades de enzimas

proteolíticas (Kaneko, 1997). O comportamento foi semelhante em equinos submetidos a injúria inflamatória abdominal (Saquetti *et al.*, 2008; Di Filippo *et al.*, 2011).

A alfa-1 glicoproteína ácida (AGA) é considerada uma proteína moderada em equinos, cuja liberação é induzida pela interleucina-1 (Murata *et al.*, 2004; Cerón *et al.*, 2005). Nas fêmeas asininas deste estudo a AGA aumentou significativamente 72 horas ($p < 0,05$) após procedimentos cirúrgicos, em especial no grupo II. Posteriormente, os valores retomaram aos vistos no momento antes da cirurgia. A AGA pode estar relacionada com aumento da gravidade inflamatória, como também demonstrou Fagliari *et al.* (2008), Di Filippo *et al.* (2010) ao observarem que equinos com cólica que não sobreviveram após cirurgia apresentaram níveis superiores desta proteína, quando comparados com animais sobreviventes. Di Filippo *et al.* (2011) também encontrou resultados semelhantes, pois os valores de alfa-1 glicoproteína foram significativamente maiores em cavalos que apresentaram compactação de cólon maior e obstrução de íleo, do que animais hípidos.

As imunoglobulinas A e G são parte da fração γ (Gama), que são sintetizadas pelo sistema imunológico em resposta a agentes virais e estímulos antigênicos (Eckersall, 2008). Os grupos avaliados apresentaram aumentos nas concentrações de IgA, de forma destacada o grupo II, que possivelmente apresentou maiores injúrias. Nogueira *et al.* (2013) também encontraram elevações nas concentrações de maiores gamaglobulinas, como IgA de cavalos submetidos a obstrução de cólon maior.

O fibrinogênio (Fb) apresentou comportamento diferente em cada grupo avaliado. Nos animais ovariectomizados por laparotomia as concentrações de Fb declinaram (Tabela 3) ($p < 0,05$) ao contrário dos cirurgiados pela técnica de videolaparoscopia, que mesmo não sendo significativo apresentaram valores fibrinogênio maiores, quando comparados com avaliação pré-cirúrgica. O Fb é considerado proteína de fase aguda positiva e moderada em equinos, na qual espera-se que eleve-se após injúria inflamatória (Crisman *et al.*, 2008). Porém, essa proteína comportou-se de forma inesperada para o grupo I. Isso pode ter ocorrido devido a menor desencadeamento inflamatório imposto pela técnica adotada. Para Jacobsen *et al.* (2009) elevações de fibrinogênio refletem intensidade de trauma cirúrgico, considerando-o melhor marcador inflamatório que contagem de leucócitos. O pico de elevação dos níveis de Fb neste estudo corrobora com o descrito na literatura para equinos, que é entre 24 e 72 horas (Crisman *et al.*, 2008).

Albumina (Ab) e transferrina (Tr) são proteínas de fase aguda negativas, ou seja diminuem suas concentrações com aumento do processo inflamatório, devido a uma

diminuição nas suas produções pelos hepatócitos (Eckersall, 2008). Apesar de não serem significativas, as concentrações da albumina nos dois grupos diminuíram ao longo dos períodos de avaliações. Esse processo de redução na concentração de proteínas de fase aguda negativas ocorre nas primeiras 24 horas ou pode ser mais gradual, perdurando por dias (Eckersall, 2008), fato esse observado no grupo I (Tabela 3). As concentrações de transferrinas em asininas aumentaram nos dois tipos de técnicas cirúrgicas utilizadas. Esses dados contrapõem os que afirma a literatura, na qual cita que teores séricos de Tr diminuem frente a condições inflamatórias. A dinâmica da Tr encontrada nesse estudo com asininos é diferente do que foi observado em equinos com afecções abdominais (lesões de intestino delgado e grosso), onde em cavalos as concentrações da transferrina reduziram durante períodos de avaliações (Saquetti *et al.*, 2008; Di Filippo *et al.*, 2011).

A proteína sérica de P23.000kD encontrada nos traçados eletroforético nos dois grupos não havia sido citada na literatura em asininos. Essa proteína também foi descrita em cavalos, cujo objetivo foi avaliar intensidade de exercício e assim como nos asininos, também não variou quando comparados os grupos (Assunção, 2013). Nos asininos alcançou picos de concentrações elevadas depois de 24 horas (grupo I) e 8 dias (grupo II). A P23.000kD tem dinâmica semelhante a de proteínas da fração alfa-2 globulinas (Murata *et al.*, 2004), pois houve forte tendência de aumento em ambos os grupos de asininos avaliados (Tabela 3). Entretanto, outras pesquisas devem ser realizadas para determinar a real função dessa proteína em asininos.

5. CONCLUSÕES

O perfil inflamatório sistêmico foi diferente para duas técnicas adotadas, sendo observadas maiores respostas inflamatórias nos animais ovariectomizados por laparoscopia. Algumas proteínas de fase aguda se comportaram com dinâmicas diferentes das descritas para equinos, fazendo necessário estudo específico em asininos. Os resultados obtidos do leucograma também mostraram a magnitude da resposta inflamatória aguda em laparotomia e laparoscopia.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, A.E.; RIBEIRO, A.P.C.; Di FILIPPO, P.A. et al. Leucogram and serum acute phase protein concentrations in queens submitted to conventional or videolaparoscopic ovariectomy. *Arq. Bras. Med. Vet.Zootec.*, v.62, n.1, p.86-91, 2010.
- ASSUNÇÃO, P.C.F. *Eletroforetograma das proteínas do soro de equinos submetidos a diferentes Protocolos de exercício*. 2013. 86f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- AYO, J. O.; OLAIFA, F. H.; AKE, A. S. Physiological responses of donkeys (*Equus asinus*, Perissodactyla) to work stress and potential ameliorative role of ascorbic acid. *Afric. J. Biotc.*, v. 12, n.14, p. 1585-1593, 2013.
- AZIZ, D.M.; AL-BADRANY, M.S.; TAHA, M.B. Laparoscopic ovariectomy in standing donkeys by using a new instrument. *Ani. Repro. Sc.*, v. 107, p. 107-114, 2008.
- AZIZ, D.M.; HISS-PESCH, S.; MIELENZ, B. et al. Haptoglobin baseline value in jennies and the effect of ovariectomy on its serum concentration. *Anim. Repro. Sc.*, v.132, p. 83-87, 2012.
- BABER, M. A. M.; HUSSAIN, T.; AWAN, F. et al. The contribution of donkeys to human health. *Equi. Vet. J.*, v. 46, p. 766–767, 2014.
- CERÓN J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute Phase Proteins in Dogs and Cats. *Vet. Clin. Pat*, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W.K.; ZIMMERMAN, K. L. Blood protein and inflammation in the horse. *Vet. Clin. Equi. Pract*, v.24, p. 285-297, 2008.
- CUNIBERTI. B.; BADINO, P.; ODORE. R. et al. Effects induced by exercise on lymphocyte β -adrenergic receptors and plasma catecholamine levels in performance horses. *Res. Vet. Sc.*, v. 92, p.116-120, 2010.
- DI FILIPPO, P.A.; NOGUEIRA, A. F.; SILVA.; ANAI, L. A. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas e do líquido peritoneal de equinos submetidos à obstrução experimental do duodeno, íleo e cólon maior. *Cien. Anim.Bras.*, v.11, n.4, p.938-946, 2010.
- DIFILIPPO, P. A.; SILVA, A. F. N.; SANTANA, A. E. Determinação sérica de haptoglobina, ceruloplasmina, α -1-glicoproteína ácida, transferrina e α -1-antitripsina, em equinos com cólica. *Cien. Rur.*, v. 41, n.12, p.2108-2113, 2011.
- ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J.J. et al. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Burlington: Academic, 2008. Cap.5, p.117-156.

JACOBSEN, S.; NIELSEN, J.V.; KJELGAARD-HANSEN, M. et al. Acute phase response to surgery of varying intensity in horses: a preliminary study. *Vet. Surg.*, v. 38, n. 6, p. 762-769, 2009.

MILNE, E. M.; DOXEY, D. L.; KENT, J. E. Acute phase proteins in grass sickness (equine dysautonomia). *Res.Vet. Sc.*, v.50, p. 273–278, 1991.

MORI, E.; FERNANDES, W.R.; MIRANDOLA, R.M.S. et al. Reference Values on Serum Biochemical Parameters of Brazilian Donkey (*Equus asinus*) Breed. *J.Equi.Vet. Sc.*, v.23, n. 8, p. 358-364, 2003.

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

NOGUEIRA, A. F. S.; DI FILIPPO, P. A.; ANAI, L. A. et al. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos hígdos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. *Cinc. Rur.*, v.43, n.11, p.2018-2024, 2013.

PESSOA, A. F. A.; PESSOA, C. R. M.; MIRANDA NETO, E. G. et al. Doenças de asininos e muares no semiárido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 34, n.12, p. 1210-1214, 2014.

RUBIO, C.P. *Leucograma e proteínas de fase aguda de cadelas submetidas à ovariossalpingohisterectomia pelas técnicas convencional e minimamente invasiva*. 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

SAQUETTI, C.H.C.; FALEIROS, R.R.; MACORIS, D.G. et al. Perfil eletroforético do proteinograma sérico de equinos com obstrução experimental do cólon menor. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec*, v.60, n.4, p.794-799, 2008.

5 CAPÍTULO 3 – RESPOSTA INFLAMATÓRIA PERITONEAL DE ASININOS (*Equus asinus*) SUBMETIDOS À OVARIECTOMIA POR LAPAROTOMIA E LAPAROSCOPIA.

PERITONEAL INFLAMMATORY RESPONSE OF THE DONKEYS (*Equus asinus*) SUBMITTED OVARIECTOMY BY LAPAROTOMY AND LAPAROSCOPY

Artigo submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia – Quallis A2.

Resposta inflamatória peritoneal de asininos (*Equus asinus*) submetidos à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia.

[Peritoneal inflammatory response of the donkeys (*Equus asinus*) submitted ovariectomy by laparotomy and laparoscopy]

I. O. Barros^{1*}, N. B. S. Fonseca², T. L. Nunes², J. D. Spagnolo², J. P. A. Santos⁴, A. S. Neto², M. G. C. Oliveira², A. F. S. Nogueira⁴, R. S. Sousa³, L. C. L. C. Silva³, R. A. Barrêto Júnior²

¹Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias – Universidade Federal da Paraíba
Rodovia PB-079, s/n, 58397-000 – Areia, PB. E-mail: doutorabella@hotmail.com

²Departamento de Ciências Animais – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

⁴Colegiado de Medicina Veterinária, Campus Prof.^a Cinobelina Elvas – Universidade Federal do Piauí

RESUMO

Objetivou-se avaliar a resposta inflamatória, com determinação da concentração de proteínas de fase aguda, em líquido peritoneal em asininas submetidas à ovariectomia por laparotomia e laparoscopia. Foram utilizadas 18 fêmeas adultas, pesando aproximadamente 100 kg, as quais foram divididas em dois grupos, de 09 animais cada, onde no grupo I, foram ovariectomizadas por laparotomia e o grupo II por laparoscopia. Após as cirurgias, em ambos os grupos foram avaliados as seguintes variáveis no líquido peritoneal: pH, densidade, número de hemácias, leucócitos e proteínas de fase aguda (fibrinogênio, haptoglobina, albumina, antitripsina, alfa-1 glicoproteína ácida, ceruloplasmina, transferrina, imunoglobulinas A e G). Todas as variáveis foram analisadas antes das cirurgias, 12, 24, 48, 72 horas, 8 e 16 dias após os procedimentos cirúrgicos. O número de hemácias e leucócitos aumentaram ($p < 0,05$) 24 depois das cirurgias nos dois grupos. Haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida, albumina, transferrina, gamaglobulinas A e G, e proteínas totais aumentaram nos dois grupos ($p < 0,05$). Foi identificada proteína denominada P23.000kD, que não tem denominação nem descrição no líquido peritoneal de asininos. A antitripsina não foi detectada no líquido peritoneal de asininos.

Palavras-chaves: trauma, inflamação, haptoglobina.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the inflammatory response to determining the concentration of acute phase proteins in peritoneal fluid in asinine submitted to ovariectomy by laparotomy and laparoscopy. 18 adult females were used, weighing approximately 100

kg which were divided into two groups of 09 animals each, where in group I were ovariectomized by laparotomy and laparoscopy group II. After surgery in both groups were evaluated the following variables in the peritoneal fluid: pH, density, number of erythrocytes, leukocytes, and acute phase proteins (fibrinogen, haptoglobin, albumin, antitrypsin, alpha-1 acid glycoprotein, ceruloplasmin, transferrin, immunoglobulins A and G). All variables were analyzed before surgery, 12, 24, 48, 72 hours, 8 and 16 days after surgery. The number of erythrocytes and leukocytes increased ($p < 0.05$) 24 after surgery in both groups. Haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein, albumin, transferrin, gamma globulins A and G, and total protein increased in both groups ($p < 0.05$). Was identified protein called P23.000kD, which has no name or description in the peritoneal fluid of donkeys. The antitrypsin was not detected in peritoneal fluid donkeys.

Keywords: trauma, inflammation, haptoglobin.

1. INTRODUÇÃO

Os jumentos sempre acompanharam as populações mais pobres, sendo utilizados principalmente para transporte de pessoas, cargas e tração (Polidori e Vincenzetti, 2012). Atualmente, ainda são utilizados para produção de muare, atividades de lazer, turismo rural, terapia (FAO/WEP, 2015) e produção de leite e derivados (Barlowska *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, no Semiárido brasileiro, esta espécie tem sido considerada um problema ambiental devido à superpopulação destes animais às margens das rodovias, sendo responsáveis por 70% dos acidentes envolvendo animais nas estradas. A esterilização de fêmeas, por ovariectomia, tem sido sugerida no controle populacional em muitas propriedades onde são mantidos os animais recolhidos nas rodovias, e como medida de manejo para fêmeas que não devem ser fecundadas por outros motivos.

As feridas traumáticas, fraturas em membros, problemas odontológicos e cólicas são as afecções mais comuns em animais do Semiárido brasileiro (Pessoa *et al.*, 2014). O padrão inflamatório observado nas fêmeas submetidas a laparotomias com objetivo de esterilização, pode contribuir com informações importantes para auxiliar na elaboração do prognóstico de animais que precisem da realização da abertura da cavidade abdominal.

A avaliação do líquido peritoneal tem sido preconizada há décadas para fornecer informações que possam ser utilizadas para estabelecer diagnóstico, terapêutica clínica ou cirúrgica, e prognóstico de enfermidades que envolvam processos inflamatórios na cavidade abdominal dos equinos (Thomassian, 2005). Atualmente, o incremento da identificação e uso das proteínas de fase aguda e outros metabólitos, tem objetivado melhorar ainda mais a eficácia da análise do líquido peritoneal para medicina equina,

como mostra estudos recentes encontrados na literatura mundial (Pihl *et al.*, 2015 e 2016; Smuts *et al.*, 2016).

Apesar da importância econômica e conservacionista da criação dos asininos, inexistente na literatura científica mundial, estudos que caracterize a resposta inflamatória no líquido peritoneal de asininos, nem tampouco identifique as proteínas de fase aguda presentes neste fluido. Desta forma, este trabalho objetiva contribuir para o entendimento da resposta inflamatória na cavidade abdominal de asininos submetidos a duas diferentes intervenções cirúrgicas, e quantificar as proteínas de fase aguda presentes no fluido em diferentes tempos pós-cirúrgicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 18 fêmeas, pesando em média $102,75 \pm 15,04$ Kg, com idade de $4,4 \pm 2,8$ anos. Para todos os animais, antes do experimento, foram realizados exames clínicos, hemogramas, parasitológicos, exames para diagnóstico de anemia infecciosa equina e também foram desverminados ($7,5 \text{ mg.kg}^{-1}$, Fenzol Pasta[®], Agener União, Brasil). Passaram por jejum sólido de 48 horas para concentrado, 24 horas para volumoso e 12 horas de água. O estudo foi aprovado pela comissão de ética da Universidade Federal Rural do Semi-Árido sob número 23091.000415/2014-11.

Divididos aleatoriamente em 2 grupos, com 9 animais cada, os do grupo I (GI), foram submetidos à cirurgia por laparotomia bilateral do flanco e os do grupo II (GII) à cirurgia por videolaparoscopia. Sendo todos submetidos ao mesmo protocolo de antisepsia, anestesia e de pós-operatório, e as intervenções realizadas em posição quadrupedal.

Os animais receberam o mesmo protocolo anestésico, sedação com cloridrato de detomidina (Dormiun V[®], Agener União, Brasil) e sulfato de morfina (Dimorf[®], Cristália, Brasil), recebendo *bolus* inicial de $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}$ e $0,2 \text{ mg.kg}^{-1}$, respectivamente, endovenoso. Imediatamente após sedação, iniciou-se infusão contínua de detomidina (Dormiun V[®], Agener União, Brasil) na velocidade de $0,02 \text{ mg.kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ e morfina (Dimorf[®], Cristália) $0,07 \text{ mg.kg}^{-1}\text{h}^{-1}$, em bomba de infusão programada (St680, Samtronic[®]; LF Inject[®], Brasil, respectivamente). Foi administrado 4 mg.kg^{-1} de lidocaína (Xylestesin 2%[®], Cristália, Brasil), distribuídos nas linhas de incisões e nos pedículos ovarianos.

No grupo I, três minutos após anestesia local, foi realizada incisão de aproximadamente 10 cm em ambos os flancos, seguido da divulsão dos músculos oblíquo abdominal externo, interno e transversos do abdômen. Após ruptura do peritônio, conseguiu-se acesso a cavidade abdominal para identificação do ovário, realizou-se anestesia dos pedículos ovarianos com lidocaína (Xylestesin 2%®, Cristália, Brasil). Posteriormente, foi feita homeostasia com auxílio de pinça hemostática e transfixação e ligadura do pedículo ovariano com fio catégute número 0 (Catgut®, Shalon, Brasil) e posterior secção. O peritônio e musculatura abdominal foram suturados em padrão Sultan com fio absorvível catégute 0 (Catgut®, Shalon, Brasil). A pele foi suturada com fio mononylon 0 (Nylon®, Shalon, Brasil) em padrão simples separado.

No grupo II, após anestesia, dois portais foram colocados no flanco. O primeiro (P1) sobre o último espaço intercostal, 5 centímetros ventral para o processo transversal vertebral, para a colocação do laparoscópio acoplado a uma fonte de luz alógena (Ferrari Medical®, Brasil) e videocâmara (Pop Cam II®, Asap, Ferrari Medical, Brasil). Após a criação de um pneumoperitônio de 08 mmHg com gás carbônico, o portal instrumento (P2) foi colocado no centro da fossa paralombar, evitando a punção do baço. Um afastador de circuito laparoscópico foi introduzido para segurar o pedículo ovariano. A incisão de flanco foi então ampliada permitindo retirar ovário externamente ao abdômen, seguido de ligadura do pedículo com catégute 0 (Catgut®, Shalon, Brasil) e ressecção ovariana. Ao término do procedimento cirúrgico, o pneumoperitônio foi desfeito, instrumentos removidos. Os músculos em P1 e P2 foram fechados em com sutura Sultan usando catégute 0 (Catgut®, Shalon, Brasil). As incisões na pele em P1 e P2 foram fechadas em sutura simples separada, usando fio mononylon 0 (Nylon®, Shalon, Brasil).

O pós-operatório consistiu de limpeza diária da ferida cirúrgica, com água potável, sabão neutro, solução fisiológica 0,9% (Fisiológico®, Eurofarma, Brasil) e aplicação de spray cicatrizante repelente (Aeorcid®, Agener União, Brasil) ao redor da ferida até retirada dos pontos, que foram realizados 12 dias pós cirurgias. A antibioticoterapia utilizada foi associação entre penicilina procaína, potássica e estreptomicina (Agrosil®, Vansi, Brasil) na dose de 22.000 UI/kg⁻¹, via intramuscular a cada 48 horas, totalizando 3 aplicações. Concomitantemente, foi utilizado dipirona sódica (D-500® Fort Dodge, Brasil), 25 mg/kg⁻¹, endovenoso, a cada 24 horas, durante 5 dias. No animal que manifestou sinais clínicos evidentes de dor foi aplicado uma dose de cloridrato de tramadol (Tramadol®, Teuto, Brasil), 2mg/kg⁻¹, endovenoso, como forma de resgate.

Todos animais receberam soro antitetânico (Vencosat®, Vencofarma, Brasil), via subcutânea (5.000UI/animal) após cirurgia.

A coleta do líquido peritoneal foi realizada com auxílio de agulha 40x12 em tubos com e sem EDTA, conforme descreveram Louro et al. (2006) para esta espécie, antes dos procedimentos cirúrgicos (M0), e 12 (M12), 24 (M24), 48 (M48), 72 (M72) horas, 8 (M8D) e 16 (M16D) dias após as intervenções cirúrgicas.

Dos frascos coletados com EDTA foram realizadas as contagens de hemácias e leucócitos em câmara de Neubauer e leitura manual. Para análise citológica diferencial, parte da amostra foi centrifugada a 1500rpm por cinco minutos. Foram realizados esfregaços com o sedimento, corados pelo método Panótico (Panótico Rápido®, Renylab, Brasil). A contagem diferencial foi realizada para um total de 100 leucócitos e células mesoteliais em microscópio óptico comum, em objetiva de 100x.

O pH e a densidade foram mensurados pelo método de química seca em tiras reagentes (Uri-Color Check® – Wama Diagnóstica, Brasil). O fibrinogênio foi determinado pelo método de precipitação a 56° C em tubos de microhematócrito calculando-se a diferença entre a concentração de proteínas no plasma e no líquido peritoneal.

As concentrações de proteínas totais do soro foram obtidas pelo método do Biureto, com auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos (Labtest®, Sistema de Diagnósticos Ltda, Brasil) e leituras espectrofotométricas (E-225-D, Labquest – CELM®, Brasil). Para fracionamento das proteínas, procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida, contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os pesos moleculares e as concentrações das frações proteicas foram determinados por densitometria computadorizada (Fotodyne®, Fotodyne Inc, Estados Unidos). 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 (Sigma Marker 6.500 – 200.000) albumina, α 1-antitripsina, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina e imunoglobulina G (IgG).

Os dados obtidos durante o período experimental foram analisados quanto a sua distribuição normal pela prova de Kolmogorov-Sminorv e avaliada a homogeneidade das variâncias. Os dados que obedeceram à distribuição normal foram submetidos a análise de variância (Teste F) utilizando o procedimento PROC MIXED (SAS 9.3, 2012), para medidas repetidas no tempo, sendo estudado para cada variável o efeito de tratamento,

tempo e interação entre tratamento e tempo. Foi considerado o critério de Akaike (AIC) para a escolha da melhor estrutura de covariância.

Os dados do número de hemácias e neutrófilos foram submetidos à transformação logarítmica, enquanto os dados de densidade, número de neutrófilos e fibrinogênio não obedeceram à distribuição normal sendo utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon para a análise estatística. O grau de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Nos animais ovariectomizados por laparoscopia observou-se grande incômodo durante insuflação de CO_2 . O volume médio de coleta de líquido peritoneal foi de 25 mL. Alguns animais apresentaram coleta improdutiva. As amostras, em maioria mostraram-se ligeiramente amareladas e turvas. Os valores dos números de hemácias, leucócitos e pH obtidos das amostras peritoneais estão descritos na tabela 1.

A contagem de hemácias não apresentou diferenças quando comparados os grupos. No grupo I, ao comparar com o momento antes da cirurgia, os números de eritrócitos aumentaram ao longo de todos os tempos de avaliação ($p < 0,05$). No II também houveram aumentos nas contagens de células vermelhas ao longo dos tempos, porém só até 8 dias após realização das cirurgias ($p < 0,05$). O maior número de células obtidas das laparoscopias ocorreu depois de 24 horas (Tabela 1).

Os dois grupos apresentaram aumento no número total de leucócitos durante os tempos de avaliações, principalmente depois de 24 horas das realizações das ovariectomias ($p < 0,05$). A contagem do número de neutrófilos não foram diferentes quando comparados os grupos e ao longo dos tempos em cada grupo ($p > 0,672$). A contagem dos demais tipos celulares também não foram diferentes nos grupos nem tão pouco ao longo dos momentos.

Houveram mudanças em relação aos valores do pH, quando comparados os grupos, 12 horas e 48 horas depois das cirurgias ($p < 0,05$). Individualmente, os grupos não alteraram pH do líquido peritoneal durante todos os momentos de avaliação (tabela 1). Os valores das medianas da densidade não diferiram entre os grupos (1.015), nem individualmente nos momentos ($p > 0,682$).

Tabela 1. Médias e desvios padrões dos números de hemácias ($\times 10^3/\text{UL}$), leucócitos ($\times 10^3/\text{UL}$) e pH do líquido peritoneal de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).

Grupos	Momentos						
	M0	M12	M24	M48	M72	M8D	M16D
	Hemácias ($\times 10^3/\text{UL}$)						
GI	2,85 \pm 3,06 ^b	9,78 \pm 1,42 ^a	9,44 \pm 1,64 ^a	8,35 \pm 1,56 ^a	7,88 \pm 1,37 ^a	8,09 \pm 1,61 ^a	6,71 \pm 1,28 ^a
GII	4,11 \pm 2,60 ^c	9,17 \pm 1,99 ^{ab}	10,80 \pm 1,13 ^a	9,09 \pm 2,55 ^{ab}	8,28 \pm 2,21 ^{ab}	7,56 \pm 0,68 ^{ab}	6,55 \pm 1,50 ^{bc}
	Leucócitos ($\times 10^3/\text{UL}$)						
GI	3,20 \pm 1,46 ^b	7,57 \pm 1,17 ^a	8,22 \pm 0,80 ^a	7,54 \pm 0,97 ^a	7,17 \pm 0,94 ^a	7,62 \pm 0,98 ^a	6,89 \pm 0,91 ^a
GII	2,89 \pm 1,30 ^b	7,29 \pm 1,34 ^a	8,19 \pm 0,42 ^a	7,44 \pm 0,62 ^a	7,75 \pm 0,77 ^a	7,75 \pm 0,64 ^a	6,73 \pm 1,03 ^a
	pH						
GI	7,62 \pm 0,20	7,61 \pm 0,06 ^A	7,53 \pm 0,27	7,51 \pm 0,03 ^B	7,50 \pm 0,06	7,43 \pm 0,17	7,51 \pm 0,12
GII	7,53 \pm 0,09	7,49 \pm 0,09 ^B	7,54 \pm 0,16	7,57 \pm 0,04 ^A	7,51 \pm 0,09	7,37 \pm 0,14	7,41 \pm 0,13

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si, segundo o teste de Kolgomorov-Sminorv ($p < 0,05$).

Médias acompanhadas de letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si, segundo Análise de variância (PROC MIXED (SAS) ($p < 0,05$).

As concentrações de proteínas totais e das proteínas de fase aguda mensurados no líquido peritoneal (haptoglobina, ceruloplasmina, albumina, transferrina, alfa-1 glicoproteína ácida, imunoglobulinas A e G, fibrinogênio e P23.000kD) estão agrupadas na tabela 2

Tabela 2. Médias e desvios padrões dos valores de proteínas totais (mg/dL), haptoglobina(mg/dL), ceruloplasmina (mg/dL), antitripsina (mg/dL), alfa-1-glicoproteína (mg/dL), imunoglobulinas A e G (mg/dL), fibrinogênio (mg/dL), albumina (mg/dL), transferrina (mg/dL) e P.23.000 kD (mg/dL) do líquido peritoneal de asininas submetidas a ovariectomia por laparotomia (GI) ou por laparoscopia (GII).

Grupos	Momentos						
	M0	M12	M24	M48	M72	M8D	M16D
	Proteínas Totais (g/dL)						
GI	0,71±0,34 ^b	3,90±1,26 ^a	4,54±1,67 ^a	3,31±1,97 ^a	3,66±1,80 ^a	4,14±2,18 ^a	2,33±0,49 ^{ab}
GII	0,74±0,50 ^c	4,06±1,57 ^{ab}	4,95±1,03 ^a	3,25±1,30 ^b	3,26±0,77 ^{ab}	3,22±0,72 ^b	2,71±1,01 ^b
	Haptoglobina (mg/dL)						
GI	0,43±0,29 ^c	7,61±3,04 ^{abc}	9,64±5,49 ^{ab}	5,82±4,00 ^{abc}	6,67±3,16 ^{abc}	13,09±10,86 ^a	3,85±2,24 ^{bc}
GII	0,91±0,82 ^b	9,19±3,64 ^a	11,25±5,35 ^a	9,32±5,06 ^a	9,48±4,51 ^a	9,24±4,08 ^a	6,89±5,42 ^{ab}
	Ceruloplasmina (mg/dL)						
GI	0,12±0,07	0,22±0,19	0,19±0,19	0,29±0,18	0,27±0,19	0,24±0,12	0,20±0,08
GII	0,20±0,14	0,32±0,25	0,17±0,17	0,29±0,20	0,23±0,15	0,38±0,19	0,22±0,09
	Albumina (mg/dL)						
GI	45,78±21,72 ^b	243,28±81,34 ^a	260,16±90,18 ^a	207,70±158,03 ^a	195,19±103,73 ^a	188,14±89,46 ^{ab}	140,82±55,00 ^{ab}
GII	51,85±36,33 ^d	260,94±102,36 ^{ab}	281,56±52,99 ^a	192,99±81,76 ^{abc}	176,20±44,86 ^{bc}	169,74±43,69 ^{bc}	150,29±53,24 ^{cd}
	Transferrina (mg/dL)						
GI	4,12±2,53 ^b	23,26±9,52 ^a	24,44±7,97 ^a	13,62±2,84 ^{ab}	18,08±6,69 ^a	17,86±9,01 ^a	13,75±5,64 ^{ab}
GII	4,18±2,17 ^b	26,78±10,51 ^a	27,79±12,71 ^a	18,63±7,71 ^a	22,09±4,90 ^a	15,51±7,10 ^{ab}	14,47±8,22 ^{ab}
	Alfa-1 Glicoproteína Ácida(mg/dL)						
GI	0,12±0,13 ^b	1,06±0,37 ^{ab}	1,06±0,56 ^{ab}	0,75±0,50 ^{ab}	1,16±0,51 ^{ab}	1,45±1,13 ^a	0,86±0,72 ^{ab}
GII	0,10±0,14 ^b	0,91±0,37 ^{ab}	1,67±0,90 ^a	1,41±0,97 ^a	1,25±0,50 ^a	1,46±0,74 ^a	0,83±0,43 ^{ab}
	IgA (mg/dL)						
GI	0,39±0,19 ^b	4,54±2,11 ^{ab}	8,48±6,24 ^a	2,43±0,56 ^{Bb}	5,21±3,61 ^{ab}	5,25±2,38 ^{ab}	5,04±2,95 ^{ab}
GII	0,47±0,36 ^b	5,53±2,69 ^a	6,62±2,11 ^a	5,01±2,29 ^{Aa}	4,43±2,11 ^a	5,59±1,56 ^a	3,99±2,20 ^a
	IgG (mg/dL)						
GI	16,76±8,99 ^b	72,22±40,03 ^{ab}	115,06±43,37 ^a	77,78±21,97 ^{ab}	104,72±59,00 ^a	118,49±61,09 ^a	61,73±13,05 ^{ab}
GII	18,05±16,22 ^c	85,09±38,72 ^{ab}	128,22±50,54 ^a	80,21±35,73 ^{ab}	82,31±28,94 ^{ab}	81,40±16,19 ^{ab}	64,60±20,85 ^{bc}
	P.23.000kD (mg/dL)						
GI	1,08±0,85 ^b	7,87±5,47 ^{ab}	6,48±4,20 ^{ab}	8,10±4,62 ^{ab}	9,39±6,17 ^a	9,61±4,33 ^a	7,14±4,09 ^{ab}
GII	0,77±0,48 ^b	8,05±4,06 ^a	9,98±1,39 ^a	9,90±5,30 ^a	9,03±3,81 ^a	8,35±1,79 ^a	8,33±3,98 ^a

Médias seguidas de letras diferentes minúsculas na linha diferem entre si, segundo o teste de Kolgomorov-Sminorv ($p < 0,05$).

Médias acompanhadas de letras diferentes maiúsculas na coluna diferem entre si, segundo Análise de variância (PROC MIXED (SAS) ($p < 0,05$).

As fêmeas ovariectomizadas por laparotomia mostraram aumento nas concentrações de proteínas totais ao longo dos tempos avaliados, quando comparados com valores antes das realizações das cirurgias, com destaque nos momentos M24 e M8D ($p < 0,05$).

De todas as proteínas de fase aguda avaliadas, somente as concentrações de imunoglobulina A (IgA) apresentaram diferenças entre os grupos. Isso ocorreu apenas no momento M48 ($p < 0,05$). A haptoglobina (Hb), no grupo I apresentou dois picos de elevações ($p < 0,05$), primeiro com 24 horas e segundo com 8 dias depois de realizados procedimentos cirúrgicos. No grupo II esta proteína (Hb) apresentou picos de aumentos ($p < 0,05$) em todos os momentos (principalmente M24) depois das cirurgias, com exceção do M16D. A concentração de ceruloplasmina não diferiu entre grupos e nem em cada grupo ao longo dos tempos ($p > 0,05$).

No grupo I as concentrações de albumina aumentaram até 3 dias depois que os animais foram operados, com grande elevação no M24 ($p < 0,05$). Já o grupo II, o aumento

foi significativo até 8 dias depois, com pico máximo de elevação também no M24 ($p < 0,05$).

A transferrina nos dois grupos demonstrou comportamento semelhante. No grupo I aumentou em todos tempos avaliados ($p < 0,05$), porém nos tempos M48 e M16D não variou. No GII, ela também elevou-se em vários momentos, com exceção no M8D e M16D. A alfa-1 glicoproteína ácida, no GI aumentou somente 8 dias depois. No GII, aumentou ($p < 0,05$) com um, dois, três e oito dias após realização das laparoscopias.

A IgA aumentou somente 24 horas nos animais do GI. Nos animais do GII ela aumentou em todos os tempos depois da cirurgia, com destaque para M24 ($p < 0,05$). A imunoglobulina G aumentou sua concentração, no grupo I, nos momentos M24, M72 e M8D ($p < 0,05$). No grupo II a IgG aumentou em cinco períodos de avaliação, excetuando no período 16 dias. As concentrações de fibrinogênio (Fb) não foram diferentes entre os grupos. Também não apresentaram diferenças ao longo dos tempos ($p > 0,672$) em cada grupo

Através da eletroforese foi identificada uma proteína, cujo peso era de 23.000kD nos dois grupos experimentais. Quando comparados os valores entre os grupos não diferiram. No GI ela aumentou concentração no M72 e M8D. Já no GII ela aumentou em todos os momentos depois de realizadas cirurgias por laparoscopia. A antitripsina ou estava ausente ou não foi detectada no líquido peritoneal de asininos dos grupos estudados.

4. DISCUSSÃO

O volume médio coletado nos asininos deste estudo foi bem inferior ao descrito por Parry e Browlow (1992) para equinos (50 a 60 mL). A quantidade de líquido na cavidade abdominal pode ser influenciada pelo tipo de punção (agulha ou sonda), alimentação, posição, grau de repleção de alças e grau de desidratação. As alterações na coloração e grau de turbidez podem ser influenciadas pela contaminação sanguínea durante punção, aumento de celularidade, elevação da taxa de proteínas totais que podem ocorrer em processos inflamatórios e/ou infecciosos (Macoris, 1995; Faria *et al.*, 1999). A cor amarelada e grau de turbidez (ligeiramente turvo) encontrado neste estudo corroboram os descritos por Louro *et al.* (2006) para asininos, no único estudo realizado com esta espécie.

O aumento de hemácias pode estar relacionado ao tipo de técnica utilizada para coleta do líquido peritoneal. Louro et al. (2006) também observaram aumento no número de hemácias peritoneais de asininos ao utilizar agulha hipodérmica 40x12 para paracentese. Se comparado com pH de equinos hígidos (7,25-7,40), descritos por Mendes et al (2000), os apresentados pelos asininos antes das cirurgias (M0), nos dois grupos, encontram-se dentro da normalidade. Porém, se comparados com descritos por Silva (2005) para equinos saudáveis, os dados do pH peritoneal deste estudo estão baixos. Não foram encontrados relatos de valores de pH peritoneal de asininos. Os valores de densidade obtidos no estudo em asininos foram iguais aos descritos por n em equinos de tração.

O aumento mais significativo do número de leucócitos ocorreu nos dois grupos 24 horas após as cirurgias. Apesar de não significativo, a contagem de neutrófilos também teve o mesmo pico de elevação ($8,01 \times 10^3/\text{UL}$, GI; $8,14 \times 10^3/\text{UL}$, GII). Os neutrófilos são as principais células constituintes do processo inflamatório inicial, atuam rápida e efetivamente como defesa celular primária contra microrganismos, com sua intensa atividade fagocitária e enzimática, e possuem também efeito quimiotático sobre os monócitos (Di Filippo, 2009). As duas abordagens cirúrgicas desencadearam processo inflamatório. Em todos os momentos avaliados de ambos os grupos, os valores de leucócitos ficaram abaixo de descrito para asininos por Louro et al. (2006).

Na avaliação citológica peritoneal de asininos espera-se, após injúria, que haja aumento no número de neutrófilos, seguido de eosinófilos, linfócitos e macrófagos (Louro et al., 2006), o que difere dos equinos, nos quais essa ordem muda para macrófagos, linfócitos e eosinófilos (Parry e Brownlow, 1992), principalmente nos dois primeiros dias de injúrias. Neste estudo ocorreu aumento dos neutrófilos, porém os outros tipos celulares também não variaram.

Na avaliação proteica peritoneal, observou-se aumento nas concentrações de proteínas totais, principalmente com vinte quatro horas, nos dois grupos. Isso ocorre devido sequestro de proteínas devido exudação inflamatória, estimulada pelo procedimento cirúrgico. A elevação das proteínas totais é um indicador importante de injúria inflamatória aguda de cavidade (Faria et al., 1999). Levando em consideração os dados descritos por Louro et al. (2006), o valor das proteínas totais em asininas ovariectomizadas voltaram a normalidade somente depois de 16 dias.

Não foram identificados na literatura proteínas de fase aguda em líquido peritoneal de asininos. A haptoglobina, no grupo II aumentou logo depois de 12 horas.

Posteriormente, os dois grupos elevaram os valores dessa. De acordo com Fagliari et al. (2008), em líquido peritoneal de equinos, haptoglobina e ceruloplasmina são as primeiras proteínas de fase aguda que se elevam. Porém, em asininos, a ceruloplasmina não alterou em nenhum dos grupos e tempos estudados. Ao avaliar perfil proteico peritoneal em equinos orquiectomizados, Di Filippo et al. (2014) também observaram elevações de haptoglobina no pós cirúrgico imediato, porém sem alterações de ceruloplasmina.

A albumina e transferrina são proteínas de fase aguda negativas, pois elas diminuem suas concentrações ao longo do processo inflamatório (Murata et al., 2004). Entretanto, em asininos elas se comportaram como proteínas positivas, pois as concentrações delas aumentaram ao longo dos tempos. A transferrina apresentou valores maiores nos animais operados pela laparoscopia. Alfa-1 glicoproteína ácida comportou-se diferente em cada grupo. No GI ela aumentou apenas depois de 8 dias. No GII, ela elevou os níveis depois de 24 horas do procedimento cirúrgico, permanecendo elevados também até 8 dias. É considerada por Eckersall (2008) proteína moderada, com elevação lenta e duradoura, explicando assim os resultados obtidos neste estudo. Di Filippo et al. (2011) ao avaliar cavalos com obstrução intestinal também descreveu aumento de alfa-1 glicoproteína ácida.

A imunoglobulina A aumentou em todos os tempos avaliados no GII. No GI teve pico de aumento somente depois de 24 horas de cirurgia. A imunoglobulina G também teve comportamento semelhante. Aumentos de gamaglobulinas dentre elas IgA e IgG pode estar relacionada ação das interleucinas (principalmente a 6) na ativação inespecífica de células B, resultando em anticorpos a partir de diferentes origens. O mesmo comportamento dessas gamaglobulinas foi descrito por Nogueira et al. (2014) em equinos.

O fibrinogênio, neste estudo comportou-se de forma atípica, pois em estimulações inflamatórias abdominais espera-se que as concentrações dessa proteína se elevem. Porém, no líquido peritoneal de asininos ovariectomizadas por laparotomia ou laparoscopia não houveram mudanças nas concentrações dessa proteína de fase aguda durante os períodos de avaliação ($p > 0,05$). No líquido peritoneal de cavalos saudáveis a concentração de fibrinogênio foi indetectável, de acordo com Silva (2005).

A proteína 23.000kD identificada no líquido peritoneal de asininos apresentou comportamento de proteína de fase aguda positiva, semelhante a fração alfa-2 globulina (Murata et al., 2004). Os valores dessa proteína tiveram pico de aumento no GI 3 dias depois de realizadas as cirurgias e no GII com 2 dias. A P.24.000kD, identificada no

fluido abdominal de equinos por Nogueira et al. (2014), apresentou dinâmica semelhante. A dinâmica da antitripsina no líquido peritoneal de asininos foi igual a relatada em equinos por Nogueira et al. (2014), não variou nos grupos estudados.

Os resultados obtidos do proteinograma peritoneal de asininos também demonstrou que algumas proteínas de fase aguda, (haptoglobina, alfa-1 glicoproteína ácida, P23.000kD) apresentam síntese extra-hepática, como também foi mencionado em equinos (Nogueira et al., 2014; Di Filippo et al., 2014). A determinação de concentrações de proteínas de fase aguda em locais específicos aumenta precisão nos diagnósticos, pois podem fornecer informações mais precisas sobre as condições inflamatórias e/ou infecciosas de um órgão ou região específica, afirmou Jacobsen (2007). As alterações peritoneais que ocorrem neste estudo pode ajudar na rapidez da identificação dos problemas que possam acometer asininos.

5. CONCLUSÕES

O perfil inflamatório peritoneal e concentrações de proteínas de fase aguda foram diferentes para duas técnicas adotadas, sendo observadas maiores respostas inflamatórias nos animais ovariectomizados por laparoscopia. Algumas proteínas de fase aguda avaliadas no líquido peritoneal apresentaram dinâmicas diferentes das descritas para equinos, mostrando serem necessários estudos específicos para asininos. Os resultados obtidos desse trabalho poderão servir de base para posteriores estudos com dinâmica inflamatória aguda de asininos.

6. REFERÊNCIAS

BARLOWSKA, J.; SZWAJKOWSKA, M.; LITWIŃCZUK, Z. et al. Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, p. 291–302, 2011.

DI FILIPPO, P. A.; SANTANA, A. E; COLETA, F.E.D. Avaliação clínica e eritroleucograma de equinos com cólica submetidos à laparotomia, sobreviventes e não sobreviventes. *Cien. Ani. Bras*, v. 10, n. 4, p. 1246-1255, 2009.

DI FILIPPO, P. A. et al. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos submetidos à orquiectomia. *Cien. Rur*, v.44, n.12, p.2221-2227, 2014.

FAO, IFAD and WFP - Food and Agriculture Organization of the United Nations /International Fund for Agricultural Development / World Food Programme (2015) –*The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger*

targets: taking stock of uneven progress. Rome, Italy, 56 pp. Disponível em <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>. Acesso em 12 jul. 2015.

FARIA, E.P.; MARQUES Jr. A. P.; ALVES, G.E.S. Características celulares e bioquímicas do líquido peritoneal de eqüinos submetidos à peritonite experimental. *Arq. Bras. Vet. Zootec*, v.51, p.335-44, 1999.

FRENCH, J. Social behaviour. In: SVENDSEN E.D. (Ed.) *The Professional handbook of the Donkey: Compiled for the Donkey Sanctuary*. 3rd edition. London, United Kingdom: Whittet Books. Pp 113-125. 400 pp. 1997.

JACOBSEN, S.; ANDERSEN, P. H. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equi.Vet. Educ.*, v. 19, n. 1, p.38-46, 2007.

LHAMAS, C. L. et al. Influência do parasitismo intestinal sobre os parâmetros hematológicos e de líquido peritoneal em equinos de tração. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.67, n.2, p.381-390, 2015.

LOURO, M.F.C.; DIAS, R.V.C.; SOTO-BLANCO, B. Avaliação do fluido peritoneal de asininos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 58, n. 5, p. 955-958, 2006.

MACORIS, D.G. Importância da avaliação do líquido peritoneal no diagnóstico e prognóstico da cólica. In: CICLO INTERNACIONAL DE CÓLICA EQUINA, 2., 1995, Jaboticabal. *Anais...* Jaboticabal, 1995. p.21-23.

MENDES, L.C.N.; PIERÓ, J.R.; MARQUES, L.C.; BORGES, A.S. Avaliação laboratorial do fluido peritoneal em modelos experimentais utilizados para indução de reação inflamatória intra-abdominal em equinos. *Rev. Edu. Cont.*, v. 3, n.3, p. 21-27, 2000.

NEVES, M. M. et al. Valores referenciais da análise do líquido peritoneal de equinos sadios. *Cien. Rur*, v.30, p.809-811, 2000.

NOGUEIRA, A. F. S. et al. Establishment of peritoneal liquid electrophoretogram from healthy horses and horses submitted to experimentally induced intestinal obstruction. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, n.3, p.665-671, 2014.

PARRY, B.W.; BROWNLOW, M.A. Peritoneal fluid. In: COWELL R.L.; TYLER, R.D. *Cytology and hematology of the horse*. St. Louis; Mosby, 1992. p.121-51.

PESSOA, A. F. A.; PESSOA, C. R. M.; MIRANDA NETO, E. G. et al. Doenças de asininos e muares no semiárido brasileiro. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 34, n.12, p. 1210-1214, 2014.

PIHL, T. H.; SCHEEPERS, E.; SANZ, M. et al. Acute-phase proteins as diagnostic markers in horses with colic. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, v. 16, n. 5, p. 664-674, 2016.

PIHL, T.H ; SCHEEPERS, E ; SANZ, M ; GODDARD, A. et al. Influence of Disease Process and Duration on Acute Phase Proteins in Serum and Peritoneal Fluid of Horses with Colic. *J. Vet. Intern. Med*, v. 29, n. 2, p. 651-658, 2015.

SILVA, G.F.K.T. *Valores hematológicos, bioquímicos e exame do líquido peritoneal de equinos (Equus caballus, Linnaeus, 1758) durante síndrome cólica*. 2005. 81f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

SMUTS, C.; MILLS, J.; MYLES, R.; GAÁL, T. Lactate Dehydrogenase Activity in Abdominal Fluid From Horses With Colic. *J. Equi. Vet. Sci*, v. 36, p. 58-62, 2016.

STRINGER, A. P. Infectious diseases of working equids. *Vet. Clin. Am. Equi. Pract*, v. 30, n. 3, p. 695-718, 2014.

THOMASSIAN, A. *Enfermidades dos cavalos*. 4^a ed. São Paulo: Varela, 2005. 335p.