

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PLASMÁTICO E
DIFERENCIAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS EM RATITAS.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Luciano de Oliveira Battisti

**Santa Maria, RS, Brasil
2009**

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PLASMÁTICO E
DIFERENCIAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS EM RATITAS

por

Luciano de Oliveira Battisti

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^a Maristela Lovato Flôres

Santa Maria, RS, Brasil.
2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PLASMÁTICO E DIFERENCIAÇÃO
DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM RATITAS.**

Elaborada por
Luciano de Oliveira Battisti

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Maristela Lovato Flôres, Dra,
(Presidente/Orientador)

Cybele Esteves Almeida, Dra, (UFSM)

Sonia Teresinha dos Anjos Lopes, Dra, (UFSM)

Santa Maria, 06 de agosto de 2009.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve ao meu lado, me dando força e iluminando minha vida em todos os momentos alegres e difíceis.

Aos meus amados pais, pelo amor e confiança, e que mesmo fisicamente distantes, caminharam comigo de coração, me apoiando e investindo no meu crescimento em mais uma jornada de estudo e trabalho.

À minha irmã e todos da minha família, que torceram por mim, me aconselharam e contribuíram de várias formas.

À minha orientadora, professora Maristela Lovato Flôres, pelo incentivo e encorajamento, pela confiança, pelos conhecimentos e conselhos transmitidos e pela amizade demonstrada.

Às professoras Cybele Esteves Almeida e Bárbara C. B. Rizatti, pelo fundamental auxílio e pela disponibilização do Laboratório de Imunologia para realização do trabalho.

À Professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes pelo auxílio, disponibilizando o acesso ao LACVET, e à colega Raqueli França, pela ajuda durante o experimento.

Às integrantes do Laboratório de Análises Clínicas do HUSM, pela utilização do equipamento para o trabalho e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao professor José Henrique S. da Silva, pela disponibilidade e paciência com que sempre me ajudou nas análises estatísticas.

Agradeço de forma geral aos colegas e companheiros do LCDPA e do NEPAS, por todas as ajudas, conselhos, aventuras, trabalhos e pela amizade que sempre demonstraram.

Aos proprietários dos estabelecimentos que abriram as portas para o nosso trabalho, pela acolhida e por proporcionarem o material necessário às pesquisas.

Aos amigos do grupo Emaús e colegas de moradia, pela compreensão e apoio nos momentos difíceis e por serem, muitas vezes, como integrantes da minha família.

Finalmente, agradeço a todas as pessoas de todos os laboratórios e departamentos da Universidade e da Cidade de Santa Maria que contribuíram para o meu trabalho e a todos, que de uma forma ou de outra, me auxiliaram nesta longa e árdua caminhada.

Muito Obrigado!

“A percepção do desconhecido
é a mais fascinante das experiências,
o homem que não tem os olhos abertos
para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICAÇÃO DO PERFIL PLASMÁTICO E DIFERENCIAÇÃO DAS FRAÇÕES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM RATITAS.

AUTOR: Luciano de Oliveira Battisti

ORIENTADORA: MARISTELA LOVATO FLÔRES

Santa Maria, 06 de agosto de 2009.

A introdução de novas espécies dentro do setor pecuário vem crescendo e entre os animais que figuram, com importância, está o avestruz (*Struthio camellus*). Essas atividades geram benefícios, mas, a velocidade com que evoluem dificulta o acompanhamento de estudos aprofundados e seguros sobre fisiologia, patologia e clínica desses animais. Muitos parâmetros fisiológicos não estão disponíveis, sendo estes imprescindíveis para o diagnóstico de distúrbios e enfermidades. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi traçar o perfil eletroforético de proteínas plasmáticas de avestruzes, bem como identificar diferenças nas frações dessas proteínas entre determinadas faixas etárias. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue de 72 avestruzes de diferentes criatórios do Rio Grande do Sul, distribuídos em seis grupos, por idade e por sexo, sendo 2 de filhotes, 2 de juvenis e 2 de adultos. Essas amostras passaram pela realização do método de biureto e pela eletroforese, para a quantificação, separação e identificação das proteínas. Dentro da mesma linha de estudo, foram processadas e analisadas 9 amostras de sangue de emas (*Rhea americana*) adultas e de um casal de emus (*Dromaius novaehollandiae*), animais esses que, junto com o avestruz, também pertencem à ordem Struthioniformes. Foram encontrados e determinados os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT) e a relação entre albumina e globulinas (A/G), por meio da realização do método de biureto e da técnica da eletroforese. Para o grupo de avestruzes filhotes fêmeas, a média de PPT foi de 2.23 ± 0.23 g/dL, para os filhotes machos foi 2.40 ± 0.30 g/dL; para as fêmeas juvenis a média foi de 3.67 ± 0.42 g/dL e para os machos juvenis foi 3.90 ± 0.44 g/dL; as fêmeas adultas, por sua vez, apresentaram uma média de 4.11 ± 0.65 g/dL e os machos adultos, 4.07 ± 0.69 g/dL. Para o grupo das emas foram encontradas médias de valores de 5.22 ± 0.66 g/dL de proteínas plasmáticas totais e 0.97 ± 0.24 para a relação entre a albumina e as globulinas. Para o casal de emus, por sua vez, obteve-se valores de 5,30 g/dL e 4,10 g/dL de proteínas plasmáticas totais e 0,67 e 0,81 para a relação entre a albumina e as globulinas, para a fêmea e o macho respectivamente. As frações protéicas, nesse estudo, foram definidas como albumina, alfa-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina, para as três espécies.

Palavras-chave: proteinograma, proteínas, avestruz, ema, emu.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

IDENTIFICATION OF THE PLASMATIC PROFILE AND DIFFERENTIATION OF PLASMATIC PROTEIN FRACTIONS IN RATITES.

AUTHOR: Luciano de Oliveira Battisti
ADVISER: MARISTELA LOVATO FLÔRES
Santa Maria, August, 06th, 2009.

The introduction of new species within the cattle sector has been growing and among the most representative animals in this sector is the ostrich (*Struthio camellus*). Although generating benefits, these activities are difficult to be deeply studied in terms of their physiology, pathology and clinics due to the speed they evolve. Many physiological parameters which are essential for the diagnosis of disturb and diseases are not available. Thus, the objective of this work was to outline the plasmatic protein electrophoresis profile of ostrich, as well as to identify differences among the fractions of these proteins among specific age groups. Blood samples of 72 ostriches were collected in different farms in Rio Grande do Sul. The samples were distributed in six groups, according to the animal's age and gender, in which 2 were chick, 2 young and 2 adults. These samples were submitted to the biuret method and to the electrophoresis, for quantification, separation and identification of proteins. Along the same line of study, there were also processed and analyzed 9 blood samples of adult rheas (*Rhea americana*) and a couple of emus (*Dromaius novaehollandiae*), these animals that, along with the ostrich, which also belong to the Struthioniformes order. The levels of Total Proteins (PPT) and the relation between Albumin and Globulin (A/G) were found and determined through the biuret method and the technique of electrophoresis. For each group of female ostrich chick, the average PPT was $2.23 \pm 0.23\text{g/dL}$, for male chick it was $2.40 \pm 0.30\text{g/dL}$, for young females the average was $3.67 \pm 0.42\text{g/dL}$ and young males it was $3.90 \pm 0.44\text{g/dL}$; the adult females presented an average of $4.11 \pm 0.65\text{g/dL}$ and the adult males, $4.07 \pm 0.69\text{g/dL}$. For the group of adult rheas were found average values of $5.22 \pm 0.66 \text{ g / dL}$ of total plasma proteins and 0.97 ± 0.24 for the relationship between albumin and globulins. For a couple of emus, in turn, resulted in values of 5.30 g / dL and 4.10 g / dL of plasma total protein and 0.67 and 0.81 for the ratio of albumin and globulin, for female and male respectively. The protein fractions were defined as albumin, alpha-globulin, beta 1-globulin, beta2-globulin e gamma-globulin for the three species.

Key-words: proteinogram, proteins, ostrich, rhea, emu.

LISTA DE FIGURAS

1. INTRODUÇÃO

FIGURA 1. Exemplar de avestruz (*S. camellus*) macho adulto..... 12

2. REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 2. Vista parcial demonstrando fonte e cuba utilizadas para eletroforese..... 20

FIGURA 3. Eletroforese em gel de agarose apresentando bandas protéicas típicas..... 21

3. CAPÍTULO 1

FIGURA 4. Municípios do Rio Grande do Sul de onde foram obtidas as amostras..... 26

FIGURA 5. – A - Coleta do sangue. B – Avaliação do volume obtido..... 27

FIGURA 6. Interpretação gráfica das bandas protéicas encontradas na eletroforese em gel de Agar..... 29

FIGURA 7. Gráfico de um dos animais amostrados, demonstrando as bandas encontradas (1 – albumina, 2 – alfa-globulina, 3 – beta1-globulina, 4 – beta2-globulina e 5 – gama-globulina)..... 34

FIGURA 8. Eletroforetograma das proteínas séricas de tartarugas cabeçudas (*C. caretta*). A – albumina, B – alfa1-globulina, C – alfa2-globulina, D – beta-globulina, e E – gama-globulina..... 35

5. CAPÍTULO 3

FIGURA 9. Perfil eletroforético e frações protéicas pré-albumina, albumina, α , β 1, β 2, γ no macho (a) e na fêmea (b) de meu..... 59

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1. Municípios de origem dos animais componentes dos grupos de idade e sexo..... 30

TABELA 2. Valores médios de proteínas totais (PPT) em g/dL, e da relação albumina/globulina (A/G) dos grupos de avestruzes 31

TABELA 3. Valores médios das frações protéicas albumina, alfa-globulina, beta-globulina e gama-globulina, em g/dL dos grupos de avestruzes..... 36

TABELA 4. Valores das médias das porcentagens de cada fração protéica (albumina, alfa, beta e gama-globulinas), dentro do conjunto de proteínas totais, dos grupos de avestruzes..... 37

4. CAPÍTULO 2

TABELA 5. Valores médios das frações protéicas (albumina, alfa-globulina, beta-globulina e gama-globulina), em g/dL e em porcentagem comparada ao total de proteínas plasmáticas (PPT) do grupo das emas estudadas..... 47

5. CAPÍTULO 3

TABELA 6. Valores médios da concentração de proteínas plasmáticas totais, pré-albumina, albumina, alfa-globulina, beta-globulina, gama-globulina e relação albumina/globulina em emus, fêmea (F) e macho (M)..... 58

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A – Eletroforetograma obtido de uma das amostras de plasma de avestruz.....	65
APÊNDICE B – Dados dos exames de proteínas das avestruzes.....	66
APÊNDICE C – Dados dos exames de proteínas das emas.....	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Nutrição dos avestruzes e as taxas de proteínas.....	15
2.2. As proteínas plasmáticas e sua importância clínica.....	16
2.3. O método do Biureto.....	19
2.4. A técnica da eletroforese.....	20
3. CAPÍTULO 1. Identificação do perfil plasmático e diferenciação das frações de proteínas plasmáticas em avestruz (<i>Struthio camellus</i>).....	22
Resumo.....	22
Abstract.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos.....	26
Resultados e Discussão.....	30
Conclusão.....	38
Referências.....	38
4. CAPÍTULO 2. Perfil plasmático e diferenciação de frações de proteínas plasmáticas em emas (<i>Rhea americana</i>) no Rio Grande do Sul.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	47
Conclusão.....	49

Referências.....	49
5. CAPÍTULO 3 Perfil eletroforético e diferenciação de frações protéicas de emus (<i>Dromaius novaehollandiae</i>) criados em cativeiro.....	52
Resumo.....	52
Abstract.....	53
Nota Científica.....	52
Agradecimentos.....	56
Referências.....	56
6. CONCLUSÃO.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	61
8. APÊNDICES.....	64

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, vem crescendo consideravelmente no Brasil a criação de novas espécies animais, sendo algumas exóticas à nossa fauna. Estas atividades se desenvolvem tanto para finalidade conservacionista como para a produção comercial. Dentre elas, o avestruz (*Struthio camellus*) e a ema (*Rhea americana*) destacam-se devido aos seus altos potenciais reprodutivos, adaptabilidade, produtos e subprodutos de excelente qualidade, muito procurados no mercado mundial (ALMEIDA, 2006). O Ministério do Meio Ambiente classificou no Brasil, segundo a Portaria N° 36 de 15 de março de 2002, o avestruz africano de animal selvagem e exótico, para doméstico (BRASIL, 2002). A ema continua classificada como animal selvagem da fauna brasileira, dificultando assim o desenvolvimento de criações de emas. Esse quadro gerou, aliado a outros fatores, um aumento do interesse pela criação de avestruz e ajudou a impulsionar a atividade.

Ambas as espécies pertencem à ordem Struthioniformes. Segundo os critérios do Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, essa ordem compreende as famílias Struthionidae (avestruzes), Rheidae (emas), Casuariidae (casuares), Dromaiidae (emus) e Apterygidae (kiwis). Todos os animais pertencentes a essa ordem são conhecidos como ratitas, por possuírem características anatômicas específicas que os diferenciam das outras aves, como músculos peitorais pouco desenvolvidos, ausência de quilha ou carena no osso esterno, clavículas pouco desenvolvidas ou ausentes, incapacidade de vôo, pernas robustas, capacidade de separação de urina e fezes, ausência de glândula uropigiana, entre outras (ALMEIDA, 2006).

No Brasil observa-se que o avestruz vem ganhando destaque entre os produtores, sendo amplamente criado em todas as regiões, comparando-se com outras ratitas e criações silvestres ou exóticas. Também em termos comerciais, é a principal ratita do mundo, já que a maioria dos criatórios é dessa espécie e, conseqüentemente, grande parte dos produtos de ratitas do mercado é dessa ave.

Segundo Huchzermeyer (2000), o avestruz, é a maior ave viva e, na natureza, atualmente, se restringe ao leste e sul da África. É a única ratita cuja distribuição natural estende-se ao norte da linha do equador. Ao mesmo tempo em que é um animal habitante de planícies e prados abertos áridos e semi-áridos, ele se adapta bem a uma grande variedade de climas em sua ampla distribuição geográfica, desde os invernos chuvosos e algumas vezes com

neve na Cidade do Cabo, África, até condições extremamente quentes dos verões no deserto. A umidade ocasionalmente alta nas áreas chuvosas de verão também é bem tolerada.

Este animal (figura 1) caracteriza-se pelo pescoço comprido, sem penas em quase toda a extensão, provido apenas de uma penugem lanosa. As fêmeas podem atingir entre 1,8 a 2m, e os machos atingem de 2,1 a 2,7m de altura. Quanto ao peso, esse pode variar entre 80 a 150kg, conforme a subespécie e sexo. Aos 12 meses de idade atingem a altura dos adultos e apenas 80% do peso adulto. O dimorfismo sexual na plumagem dos adultos é um fato bastante evidente. As penas das asas são macias e soltas e, assim como as da cauda, são de cor branca nos adultos. A plumagem do tronco é negra e brilhante nos machos e predominantemente parda nas fêmeas (ALMEIDA, 2006).



Figura 1 - Exemplar de avestruz (*S.camelus*) macho adulto.

Outra característica marcante, segundo Huchzermeyer (2000), é que avestruzes possuem dois dedos nas patas, enquanto todas as outras ratitas possuem três dedos, todos eles apontando para frente.

Conforme Portella (2006), os registros mais antigos que dão conta do relacionamento humano com essa ave datam de mais de 5.500 a.C. Outros registros também relatam a utilização, no Antigo Egito, das plumas como símbolo de justiça, em razão de sua perfeita simetria. A exploração da ave começa com a sua utilização para tração e até monta. É visto também que, posteriormente, no Império Romano, os oficiais legionários utilizavam adornos

com plumas para serem reconhecidos como vencedores nos campos de batalha. A procura pela criação racional é também antiga, sendo que em meados do ano 1100 d.C. tentou-se incubar ovos de avestruz, sem êxito.

A atividade atual de estruthiocultura se iniciou no século XIX na região de Little Karoo, na África do Sul. Nesse local começaram as explorações comerciais do avestruz. Essa primeira fase comercial foi instigada pela demanda no continente europeu pelas plumas para a moda feminina. Em 1838 iniciaram-se as primeiras exportações de plumas da África do Sul para a Europa (PORTELLA, 2006). A partir de então a atividade vem ampliando-se e melhorando tecnicamente.

Além do ponto de vista comercial, essa exploração também traz benefícios para a conservação das avestruzes como espécie, que vêm sofrendo bruscas reduções das populações em suas áreas de ocorrência natural, principalmente em decorrência da destruição abusiva de seu *habitat* natural e da caça predatória (ALMEIDA, 2006).

A ema, por sua vez, é originalmente endêmica da região Neotropical, sendo a maior ave da América do Sul. Sua presença, na época do descobrimento do Brasil pelos europeus, era abundante em todas as regiões descampadas do Brasil Oriental e Central e em outros países sul-americanos como Paraguai, Uruguai e principalmente Argentina. Atualmente tornou-se escassa nesses países e na região nordeste do Brasil, tendo praticamente desaparecido no Rio Grande do Sul e São Paulo. As maiores populações naturais concentram-se nos estados de Mato Grosso e Goiás, podendo ainda ser encontrada nos cerrados das regiões oeste e nordeste do estado de Minas Gerais (ALMEIDA, 2006).

As emas não possuem dimorfismo sexual acentuado, possuindo ambos, macho e fêmea, de acordo com Almeida (2006), um corpo ovóide, com a porção posterior cônica. A cabeça e o pescoço têm penas de cor cinza pardo e a base do pescoço, o peito anterior e a parte mediana do dorso são negras. A base do pescoço é encoberta por um tufo de penas laterais cinzas. A altura de uma ema adulta varia de 1,34 a 1,8m e o peso entre 26 e 52 kg. Seus ovos podem chegar a pesar 600 g e, conforme Silva (2001), um aspecto interessante do comportamento reprodutivo destas aves é o papel desempenhado pelo macho, que faz a corte, constrói o ninho, incuba os ovos e cuida dos filhotes, enquanto a fêmea se limita à cópula e à postura.

Sendo ambas as espécies introduzidas recentemente no setor pecuário brasileiro e tendo em vista a relativa escassez de literatura e trabalhos científicos sobre esses animais, sobretudo em âmbito nacional, em comparação com outras espécies já utilizadas na atividade pecuária, é útil e necessária a ampliação das pesquisas sobre seus parâmetros fisiológicos normais, como auxílio para criadores e médicos veterinários.

Neste contexto, os objetivos destes trabalhos foram traçar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas totais de avestruzes, fazendo a identificação das diferentes frações dessas proteínas, analisando também a existência de diferenças entre os sexos e entre faixas etárias da espécie; traçar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas totais de um grupo de emas (*R. americana*) criadas no estado do Rio Grande do Sul, bem como identificar as diferentes frações protéicas no plasma desses animais e identificar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas e diferenciar as frações protéicas do plasma de um casal de emus (*D. novaehollandiae*), provenientes de um zoológico do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Nutrição das avestruzes e as taxas de proteínas

A grande maioria das proteínas plasmáticas é sintetizada no fígado, a partir de aminoácidos derivados do alimento ou do catabolismo dos tecidos. Os aminoácidos entram no organismo pela circulação portal quase inteiramente em forma livre, mas nem todos os aminoácidos absorvidos são derivados das proteínas da ingesta. Como nos mamíferos, o conjunto de aminoácidos absorvidos pelo organismo das aves recebe também contribuições a partir da hidrólise de células epiteliais descamadas da mucosa intestinal e de enzimas digestivas (STURKIE, 1986).

A presença destas proteínas no plasma é breve, sendo a reposição constante das mesmas, algo essencial, já que exercem pressão coloidosmótica e essa age na preservação do volume sanguíneo e auxilia na manutenção do pH dentro de uma faixa estreita (STURKIE, 1986).

Várias pesquisas sobre nutrição de avestruzes foram realizadas e, de acordo com Garcia Neto (2004), têm mostrado diferenças específicas para esta espécie de ave, assim sendo, o Setor de Zootecnia da Unesp, que elabora suas formulações segundo recomendações do National Research Council (NRC, 1994), indica formulações com 18 % de proteína bruta para animais na categoria inicial (0 a 8 semanas), 17 % para animais da categoria crescimento (8 a 25 semanas), 16 % para os animais da categoria manutenção e 16.5 % para os animais em reprodução.

A empresa RTB Rações (RTB Rações, Bariri, São Paulo, Brasil), que produz produtos para avestruzes utilizados por criadores do Rio Grande do Sul possui, segundo material de divulgação da própria empresa, formulações contando com níveis de garantia de 22 % de proteína bruta para animais de 5 a 45 dias (pré-inicial), 19 % para animais de 45 a 120 dias (inicial), 17 % para os de 120 dias até 10 meses (crescimento), 13 % para os com mais de 10 meses (manutenção) e 16 % para animais em fase de reprodução.

Outro produto utilizado pelos criadores gaúchos é o produzido pela empresa Guabi (Grupo Guabi, Campinas, São Paulo, Brasil). Segundo seu material de divulgação, os produtos possuem níveis de garantia de proteína bruta de 20 % para animais da categoria pré-inicial, 18 % para os da categoria inicial, 16 % para animais em crescimento, 14 % para os animais em

fase de terminação, 12 % para os da fase de manutenção e 15 % para animais em fase reprodutiva.

2.2. As proteínas plasmáticas e sua importância clínica

As proteínas, cujo nome vem da palavra grega *protos* que significa “primeiro” ou “mais importante”, são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Ocorrem em todas as partes de todas as células. Ocorrem também em grande variedade, existindo milhares, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros com pesos moleculares na faixa de milhões. Exibem uma grande diversidade de funções biológicas, sendo os produtos finais mais importantes das vias de informação e são os instrumentos moleculares por meio do qual a informação genética é expressa. Além dessa importante função, é notável observar que a partir de combinações do mesmo conjunto de 20 aminoácidos, as células podem produzir proteínas com propriedades e atividades extraordinariamente diferentes entre si, como enzimas, hormônios, fibras musculares, penas de pássaros, teias de aranhas, proteínas do leite, anticorpos, entre outros (LEHNINGER; COX, 2002).

As proteínas são, portanto, compostos essenciais a todas as células vivas e estão relacionadas, praticamente, a todas as funções fisiológicas, além de desempenharem papéis importantes na estrutura celular. São estruturas moleculares cujas unidades básicas, os aminoácidos, estão unidas entre si por ligações peptídicas. Dentre suas funções biológicas, que são influenciadas por sua estrutura e seqüência de aminoácidos, destacam-se: catálise enzimática, transporte, capacidade de contração ou de movimento, suporte e estrutura, imunoproteção e defesa, coagulação sanguínea, regulação do crescimento e diferenciação celular (SILVA et al., 2005).

Assim como no resto do organismo animal, as proteínas estão presentes também no sangue, desempenhando diversas funções. Para efeito didático, pode-se dividir o sangue em duas frações, uma fração composta pelas células sanguíneas e a outra pelo plasma sanguíneo. Segundo Swenson (1996), o plasma apresenta-se desde amarelado até incolor, dependendo da quantidade, espécie animal e sua dieta. A cor resulta principalmente da variação na concentração do pigmento bilirrubina, embora o caroteno e outros pigmentos sejam fatores que também contribuam. Pode-se obter o plasma pela adição de um anticoagulante ao sangue total coletado, permitindo que as células permaneçam soltas e sedimentem, por serem mais pesadas

do que o plasma. A centrifugação do sangue acelera a sedimentação e assim o plasma pode ser obtido mais rapidamente.

Ainda conforme Swenson (1996), no animal adulto, o plasma contém 91 a 92% de água e 8 a 9% de sólidos. Mais de 7% do plasma consistem de proteínas. As proteínas plasmáticas são identificadas como albumina, globulinas (α , β e γ) e fibrinogênio. As γ -globulinas produzidas por linfócitos e células plasmáticas contém anticorpos normalmente chamados de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são classificadas como IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A IgG é a imunoglobulina mais abundante nos animais normais. Ela está presente no sangue e é encontrada também nos tecidos. A IgE é produzida por animais com vários tipos de alergias. A IgA é uma glicoproteína encontrada nas secreções externas como a saliva, lágrimas e colostro, estando também presente no plasma. A IgM é o anticorpo natural que ocorre no sangue. A IgD está relacionada de algum modo com o reconhecimento dos linfócitos B contra alguns antígenos e a indução dessas células B para proliferar e formar clones.

Segundo Warr et al. (1995) existe ainda a IgY, que é o equivalente funcional de IgG em aves, répteis e anfíbios, entretanto, muitos aspectos da sua biologia são ainda pouco elucidados. Estudos estão obtendo novas informações acerca da genética e das funções desta molécula, e revelam a sua posição como ancestral dos anticorpos IgG e IgE de mamíferos. Da mesma forma que a IgG, a IgY é uma molécula de baixo peso molecular, sendo encontrada em maior quantidade no soro e é o maior mecanismo de defesa contra infecções sistêmicas (MORGULIS, 2002).

A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são formados no fígado. A síntese das proteínas plasmáticas está marcadamente reduzida nas alterações hepáticas graves ou dietas prolongadas, deficientes em proteínas (SWENSON, 1996). Possuem várias funções importantes no organismo e as alterações em seus níveis e características podem auxiliar muito nos diagnósticos.

O soro das galinhas em postura contém aproximadamente 5,40g/dL de proteína. O soro de frangos e galinhas “fora de postura” contém menos (3,6g/dL) e, nos pintos, é menor ainda. Simultaneamente com o aumento das proteínas plasmáticas das galinhas em postura, há um marcante aumento no cálcio sérico (SWENSON, 1996).

De acordo com Kerr (2003), o aumento da concentração de proteínas totais pode indicar deficiência de água, doenças inflamatórias crônicas, como cirrose do fígado, doenças imunomediadas e paraproteinemia. A diminuição das proteínas totais, por sua vez, poderia ser causada por excesso relativo de água, perda excessiva de proteínas (perda renal, perda

intestinal, hemorragias, queimaduras), diminuição da síntese protéica (dieta deficiente em proteína, má absorção, insuficiência hepática, condições virais).

Segundo Rupley (1999), nas aves, uma hiperglobulinemia pode resultar de aumentos nas α -, β - e γ -globulinas, que podem ocorrer no caso de inflamação aguda, micoses sistêmicas, nefrite aguda e hepatite ativa. Um aumento nas γ -globulinas pode ser policlonal (o que pode ocorrer em uma inflamação crônica, doença imunomediada, ou doença supurativa) ou monoclonal (que pode ocorrer no caso de discrasia plasmocítica). Uma falta ou perda de γ -globulinas pode indicar um estado imunodeficiente.

A concentração da proteína sérica total (ou plasmática) nas aves é menor quando comparada a dos mamíferos, variando entre 3,0 e 6,0g/dL (CAMPBELL; DEIN, 1984). Normalmente, resultados abaixo de 3,0g/dL significam hipoalbuminemia, porque a albumina é a maior fração protéica individual do plasma. A hipoproteïnemia pode ocorrer na doença renal crônica ou hepática, má nutrição e absorção ou perda sangüínea crônica. Os valores menores que 2,5g/dL indicam prognóstico grave, e na hipoproteïnemia severa raramente as aves sobrevivem. Os valores acima de 6,0g/dL ocorrem nos quadros de desidratação ou devido ao aumento nas globulinas totais e a hiperglobulinemia pode estar associada a doenças, tais como: tuberculose, aspergilose, clamidiose, septicemias bacterianas ou infecção bacteriana crônica (CAMPBELL; COLES, 1986).

O perfil eletroforético destas proteínas não fornece informações específicas, mas é útil no diagnóstico quando alterações nos valores normais são analisadas e associadas ao quadro clínico, sendo importantes para o diagnóstico, o prognóstico e o curso de algumas enfermidades, podendo-se citar, por exemplo, a relação albumina/globulina nas aves, que é um indicador de alta significância clínica, para se avaliar a resposta inflamatória em caso de enfermidade (KANEKO, 1997).

Existem algumas situações clínicas comuns em que a eletroforese se torna útil como auxílio diagnóstico, entre elas incluem-se infecções, neoplasias, intoxicações, distúrbios comportamentais e doenças nutricionais (TATUM et al., 2000). Entretanto, um grande número de variáveis influencia o padrão eletroforético das proteínas, tais como: espécie, sexo, idade, manejo dos animais, condições ambientais e tipo de meio, e técnica utilizados na eletroforese.

2.3. O método do Biureto

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, têm sido propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos geralmente mais utilizados são o do biureto, de Lowry, do “Coomassie brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford, do BCA ou reagente de Smith¹², e de absorção de proteínas no ultravioleta (ZAIA et al., 1998).

No presente trabalho, o método empregado foi o de determinação de proteínas totais através do uso do reagente biureto. De acordo com Zaia et al. (1998) as origens do método do biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915; posteriormente diversos autores propuseram modificações do mesmo, sendo a proposta metodológica de Gornall et al. (1949) a mais utilizada. O método se baseia na reação do reativo do biureto, que é constituído de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio com um complexante que estabiliza o cobre em solução, sendo o tartarato de sódio o recomendado por Gornall et al. (1949). O cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto da reação apresenta duas bandas de absorção, uma em 270nm e outra em 540nm. Apesar da banda na região de 270nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método do biureto, a banda na região de 540nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270nm causando muita interferência no método.

O método de biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinhal (líquor), urina, alimentos, saliva, fibrinogênio e tecido animal. O método de biureto tem sido, também, utilizado em análise por injeção em fluxo, assim como em alguns métodos cinéticos.

Apesar deste método não ser muito sensível, como foi destacado por autores, colocando-o em certa desvantagem, em relação a outras metodologias, e por isto estar sendo, ao longo dos anos, substituído por métodos mais sensíveis, por ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas, continua em uso em diversas pesquisas. O método de biureto continua sendo recomendado para a determinação da concentração de proteínas totais em plasma sanguíneo pela Associação Americana de Análises Clínicas e por diversos autores, bem como para a determinação de proteínas totais em saliva e leite (ZAIA et al., 1998).

2.4. A técnica da eletroforese

As proteínas usualmente têm uma carga líquida positiva ou negativa, que reflete a mistura de aminoácidos carregados que elas contêm. Se um campo elétrico é aplicado a uma solução contendo moléculas de proteínas, estas migrarão a uma velocidade que depende da sua carga líquida e do seu tamanho. Essa técnica, conhecida como eletroforese, foi originalmente usada para separar misturas de proteínas em soluções aquosas ou em soluções presas a uma matriz sólida porosa, como amido (ALBERTS et al., 1997).

A eletroforese é, portanto, uma metodologia utilizada para a separação de moléculas, em função de suas cargas elétricas, de sua conformação e de suas massas, sob influência de um campo elétrico (figura 2). A velocidade e a distância de migração de uma molécula são dependentes da carga elétrica da molécula, do potencial elétrico do meio e do coeficiente de fricção. As condições físico-químicas do meio eletroforético são mantidas em função do sistema-tampão utilizado (MADRUGA et al., 2001).

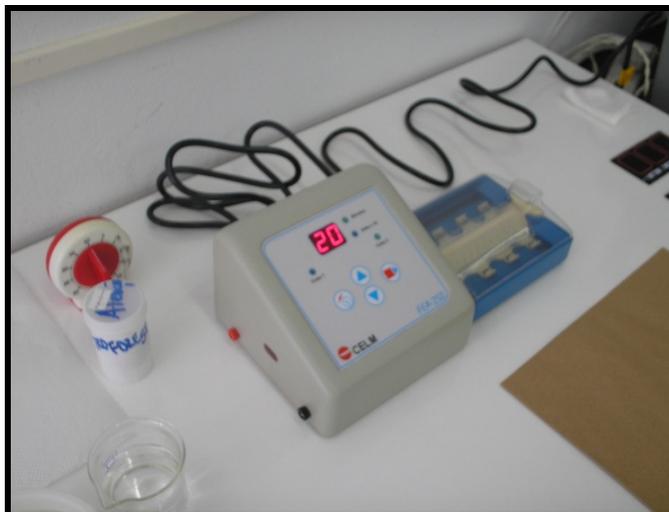


Figura 2 - Vista parcial demonstrando fonte e cuba utilizadas para eletroforese.

De acordo com Lehninger e Cox (2002), essa técnica é especialmente útil como método analítico. Sua vantagem é que as proteínas podem ser visualizadas e separadas (figura 3), permitindo a um pesquisador estimar rapidamente o número de proteínas distintas em uma mistura ou o grau de pureza de uma preparação protéica particular.

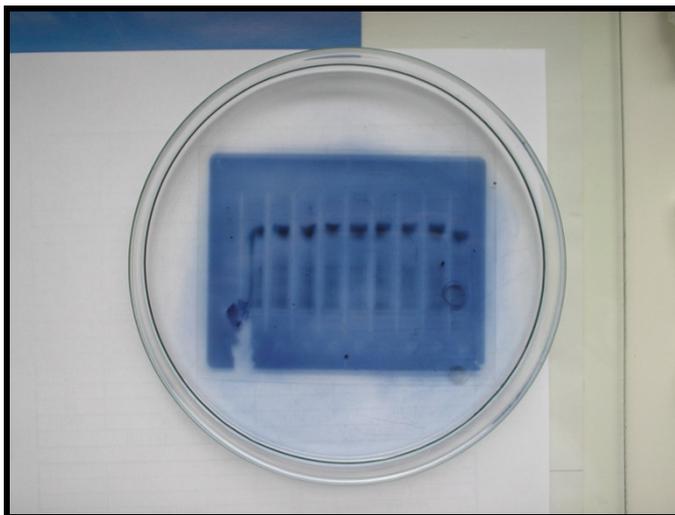


Figura 3 – Eletroforese em gel de agarose apresentando bandas protéicas típicas.

As proteínas plasmáticas podem ser separadas por eletroforese em duas frações principais, sendo uma a fração de albumina e a outra constituída pelas globulinas, as quais se diferenciam da albumina por apresentarem maior tamanho e peso molecular (SILVA et al., 2005). As proteínas sanguíneas são então separadas, devido às suas características de carga, peso molecular e solubilidade em albuminas e globulinas. Essa separação é visualizada pela formação de picos ou focos formados durante a migração das moléculas em direção ao ânodo. Alguns desses picos representam dezenas a centenas de diferentes proteínas plasmáticas, que têm velocidades de migração semelhantes. Entretanto, certas proteínas predominam em cada pico e a variação em suas quantidades relativas é característica de certas doenças (DEVLIN, 1998).

Conforme Naoum (1990) a albumina, também conhecida como soroalbumina, é a mais abundante das proteínas séricas (3,5 a 5,5g/dL), sendo sintetizada no fígado a uma taxa de aproximadamente 12g/dia, o que representa 25% da síntese protéica total do fígado e a metade de toda a proteína exportada pelo órgão. A fração globulínica é uma mistura muito complexa, sendo dividida em 05 subfrações: alfa 1, alfa 2, beta 1, beta 2 e gama-globulinas. Dentre as globulinas a fração de migração eletroforética mais rápida é a alfa 1 e a mais vagarosa é a gama-globulina que, geralmente, é sintetizada pelas células do sistema macrofágico, principalmente pelos linfócitos B. As imunoglobulinas localizam-se no pico γ , isto é, são gamaglobulinas, sendo assim denominadas por muito tempo até que se preferiu a denominação atual de imunoglobulinas (SCROFERNEKER; POHLMANN, 1998).

3. CAPÍTULO 1

Identificação do perfil plasmático e diferenciação das frações de proteínas plasmáticas em avestruz (*Struthio camellus*).

Identification of the plasmatic profile and differentiation of plasmatic protein fractions in ostrich (*Struthio camellus*)

RESUMO

No Brasil o avestruz tem destaque, sendo amplamente criado pela facilidade de manejo e excelente adaptabilidade ao clima brasileiro. Entretanto, como espécie introduzida recentemente no setor pecuário brasileiro e em vista da escassez de trabalhos científicos sobre o animal, é útil e necessária a ampliação das pesquisas sobre seus parâmetros fisiológicos normais. Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi traçar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas totais de avestruzes, bem como identificar as diferentes frações protéicas e diferenças entre sexos e entre determinadas faixas etárias da espécie. Foram coletadas amostras de sangue de 72 avestruzes de criatórios do Rio Grande do Sul, dos quais obteve-se plasma. Essas amostras passaram pela realização do método de biureto e pela eletroforese, para a quantificação, separação e identificação das proteínas. Foram encontrados e determinados os

níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT) e a relação entre albumina e globulinas (A/G). Para o grupo de filhotes fêmeas, a média de PPT foi de 2.23 ± 0.23 g/dL, para os filhotes machos foi 2.40 ± 0.30 g/dL; para as fêmeas juvenis a média foi de 3.67 ± 0.42 g/dL e para os machos juvenis foi 3.90 ± 0.44 g/dL; as fêmeas adultas apresentaram uma média de 4.11 ± 0.65 g/dL e os machos adultos, 4.07 ± 0.69 g/dL. As frações protéicas foram definidas como albumina, alfa-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina. Os níveis em g/dL de proteínas totais e de albumina foram significativamente menores nos grupos de filhotes em comparação com os demais.

Palavras Chaves: proteinograma, proteínas, ratitas.

ABSTRACT

In Brazil, the ostrich stands out and is widely established due to ease of handling and excellent adaptability to the climate of Brazil. However, as a recently introduced specie in the Brazilian cattle sector and given the scarcity of scientific studies on the animal, especially at the national level, it is useful and necessary to extend the research on their normal physiological parameters. In this sense, the objective of this study was to determine the electrophoretic profile of total plasma proteins of ostriches, as well as identify the different protein fractions and differences between sexes and between the age groups of the species. We collected blood samples from 72 ostrich farms in Rio Grande do Sul, from which plasma was obtained. These samples passed through the completion of the biuret method and by electrophoresis for the quantification,

separation and identification of proteins. The levels of total plasma proteins (TPP) and the relationship between albumin and globulin (A/G) were found and determined. For the group of young females, the average TPP was $2.23 \pm 0.23\text{g/dL}$, for the male offspring it was $2.40 \pm 0.30\text{g/dL}$, for juvenile females, the average was $3.67 \pm 0.42\text{g/dL}$ and for male juveniles was $3.90 \pm 0.44\text{g/dL}$, adult females had an average of $4.11 \pm 0.65\text{g/dL}$ and adult males, $4.07 \pm 0.69\text{g/dL}$. The protein fractions were defined as albumin, alpha-globulin, beta1-globulin, beta2-globulin and gamma globulin. Levels in g / dL of total protein and albumin were significantly lower in groups of pups in comparison to the others.

Key words: proteinogram, proteins, ratites.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda por cuidados veterinários na estruturacultura e a freqüente limitação do exame semiológico na clínica das aves, sugerem que os exames laboratoriais são importante auxílio no diagnóstico das enfermidades nos avestruzes (PALOMEQUE et al., 1991; MUSHI et al., 1998; TREVELIN et al. 2008).

Entre parâmetros fisiológicos de importância, figura o perfil plasmático de proteínas, bastante útil quando alterações são analisadas e associadas a quadros clínicos, sendo importante para auxílio diagnóstico, prognóstico e determinação do curso de algumas situações clínicas comuns, como infecções, neoplasias, intoxicações, distúrbios comportamentais e doenças nutricionais (TATUM et al., 2000). Pode-se citar, também, a utilidade do conhecimento da

relação albumina/globulina nas aves, que é indicador de alta significância clínica, na avaliação da resposta inflamatória em caso de enfermidade (KANEKO, 1997).

Em diversas espécies animais, as proteínas plasmáticas são identificadas como albumina, globulinas (α , β e γ) e fibrinogênio. As γ -globulinas produzidas por linfócitos e células plasmáticas contém anticorpos normalmente chamados de imunoglobulinas. As imunoglobulinas são classificadas como IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A IgG é a imunoglobulina mais abundante nos indivíduos normais, estando presente no sangue e também nos tecidos. A IgE é produzida por animais com vários tipos de alergias. A IgA é uma glicoproteína encontrada nas secreções externas como a saliva e lágrimas, estando também presente no plasma. A IgM é o anticorpo natural que ocorre no sangue. A IgD está relacionada de algum modo com o reconhecimento dos linfócitos B contra alguns antígenos e a indução dessas células B para proliferar e formar clones (SWENSON, 1996).

Sabe-se que a equivalente funcional de IgG em aves, répteis e anfíbios é a IgY, entretanto, muitos aspectos da sua biologia são ainda pouco elucidados (WARR et al., 1995). Da mesma forma que a IgG, a IgY é uma molécula de baixo peso molecular, sendo o maior mecanismo de defesa contra infecções sistêmicas (MORGULIS, 2002).

A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são formados no fígado. A síntese das proteínas plasmáticas está marcadamente reduzida nas alterações hepáticas graves ou dietas prolongadas, deficientes em proteínas (SWENSON, 1996). Possuem várias funções importantes no organismo e as alterações em seus níveis e características podem auxiliar muito nos diagnósticos.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi traçar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas totais de avestruzes, bem identificar as diferentes frações protéicas, analisando também as diferenças entre os sexos e entre determinadas faixas etárias da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue de 72 avestruzes, hípidos, de diversas idades e de diferentes criatórios do Rio Grande do Sul, para evitar que os animais utilizados fossem provenientes de criatórios com consanguinidade e/ou criados sob condições idênticas de manejo. Os indivíduos foram escolhidos de acordo com a disponibilidade de acesso, sendo que todos estavam aparentemente saudáveis, não apresentando sinais clínicos de enfermidades.

Os criatórios dos quais foram obtidos os animais para as coletas localizavam-se nos municípios de Júlio de Castilhos, Porto Alegre, Rio Grande, Santa Maria e Santiago, conforme mapa da figura 1. Em Júlio de Castilhos, foram obtidas 10 amostras, em Porto Alegre obteve-se amostras de 13 animais, em Rio Grande, 10 indivíduos foram amostrados, no Município de Santa Maria, 15 avestruzes foram utilizados para coletas e em Santiago, 24 indivíduos foram utilizados.

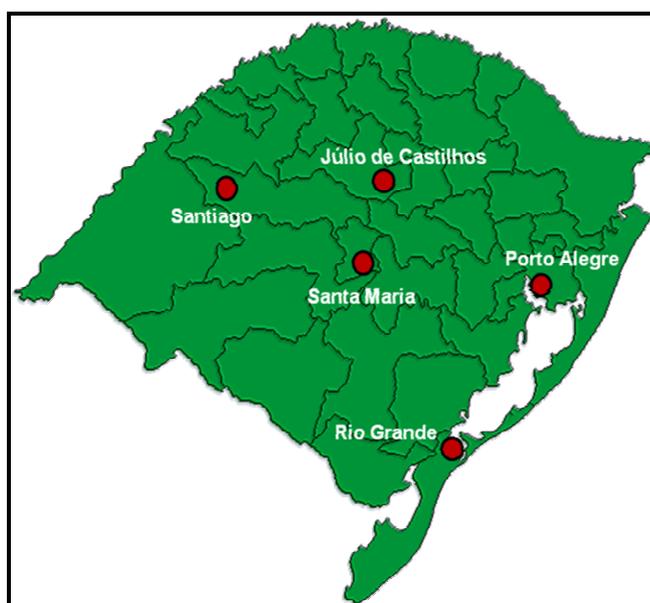


Figura 4 – Municípios do Rio Grande do Sul de onde foram obtidas as amostras.

Fonte: <http://br.viarural.com> (modificado)

Nesses locais foram coletadas amostras de sangue, por punção da veia braquial, conforme a figura 2. Após as coletas, as amostras foram acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina. O sangue total foi submetido à centrifugação por 3 minutos a 3900xg, para a separação do plasma.

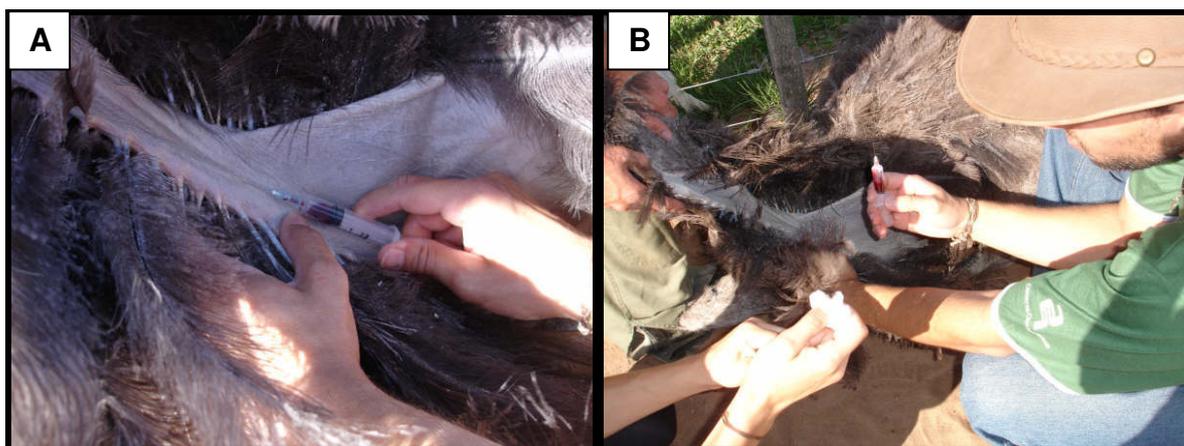


Figura 5 – A - Coleta do sangue. B – Avaliação do volume obtido

Análises bioquímicas podem ser conduzidas usando o plasma ou soro sanguíneo. Soro e plasma são similares, no entanto o plasma contém fatores coagulantes e anticoagulantes que não estão presentes no soro. Em medicina aviária, o plasma é frequentemente usado para análises bioquímicas porque é mais fácil de ser coletado do que o soro e propicia um volume de amostra maior (CLSI, 2009).

HRUBEC et al., (2002) após estudo comparativo entre as vantagens e desvantagens do uso de soro ou plasma, indicam que é recomendado que valores químicos do sangue sejam determinados a partir do plasma. Amostras de plasma podem ser colhidas e processadas rapidamente para separar os componentes líquidos dos celulares, permitindo uma determinação mais exata dos níveis analisados. O plasma também é preferível para a eletroforese sanguínea em aves porque amostras coletadas em tubos sem anticoagulante, que originam amostras de

soro, tendem a tornar-se um pouco viscosas e perdem a sua fluidez, tornando a análise difícil (LUMEIJ; DEBRUIJE, 1985; LUMEIJ et al., 1990).

As amostras plasmáticas foram armazenadas sob congelamento e encaminhadas para mensuração da concentração das proteínas plasmáticas totais utilizando-se o método de biureto, e, para a diferenciação da albumina e das frações de globulinas, foi aplicada a técnica da eletroforese.

As determinações de quantidade de proteína total foram feitas através do método de biureto, utilizando-se o kit Proteínas Totais, Marca Labtest (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se 1,0mL de reagente biureto e 0,02mL da amostra-plasma. Misturou-se e incubou-se a amostra e o reagente por 10min a 37°C e posteriormente foi realizado o ensaio colorimétrico.

A eletroforese foi realizada pela técnica que emprega o gel de agarose como meio suporte. Este gel, após as aplicações de 10µL das amostras plasmáticas, foi embebido em uma solução tampão de tris veronal (pH 8,6). Em sequência, aplicou-se uma corrente elétrica de 90V ao meio suporte, por 20min, depois de submerso ao tampão.

Após a migração das proteínas através da rede do gel, sob ação da corrente elétrica, o gel foi secado, corado e escaneado através do Software para densitometria SDS-60[®], a fim de produzir o traçado em bandas, típico da eletroforese, produzindo um gráfico para leitura, com formato aproximado ao modelo da figura 6.

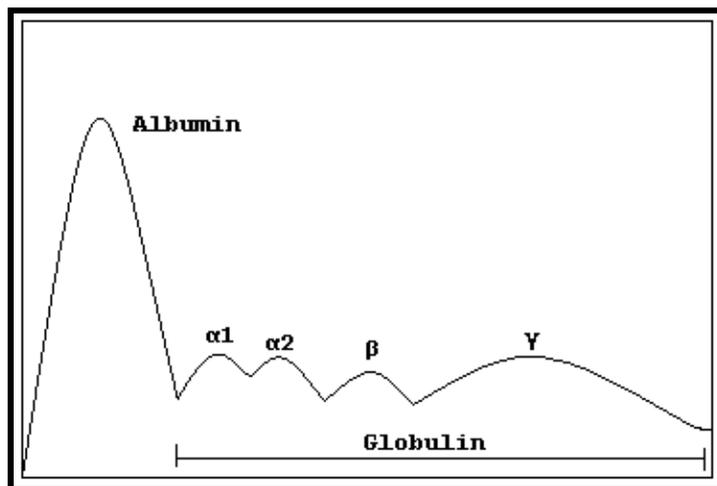


Figura 6 – Interpretação gráfica das bandas protéicas encontradas na eletroforese em gel de agar. (HERNANDEZ, 2009)

Para a análise dos dados, os animais foram agrupados em seis categorias de animais semelhantes entre si, com separação por idade e sexo. São eles: grupo 1 (animais fêmeas com menos de três meses), grupo 2 (animais machos com menos de 3 meses), grupo 3 (animais fêmeas com mais de três meses e não ativas reprodutivamente), grupo 4 (animais machos com mais de três meses e não ativos reprodutivamente), grupo 5 (fêmeas adultas ou ativas reprodutivamente) e grupo 6 (machos adultos ou ativos reprodutivamente). Além destes grupos de avestruzes, foram montados também dois grupos comparativos: grupo das emas adultas e grupo dos emus. O conjunto completo dos animais integrantes dos grupos estudados e suas procedências é apresentado na tabela 2.

Tabela 1 – Municípios de origem dos animais componentes dos grupos de idade e sexo

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
	fêmeas	machos	fêmeas	machos	fêmeas	machos
Júlio de Castilhos	-	-	-	-	5	5
Porto Alegre	-	-	-	-	7	6
Rio Grande	-	-	-	2	5	3
Santa Maria	-	-	3	5	5	2
Santiago	11	6	-	-	7	-
Total	11	6	3	7	29	16

No trabalho foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com número variável de repetições. Para a análise estatística foram utilizados os métodos da análise de variância, o teste F, teste de Tukey e estudos de contraste. O nível crítico de significância foi de 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas com o auxílio do Programa estatístico SAS, versão 9.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processamento das amostras, a realização dos exames e as análises dos dados obtidos, foi possível identificar os níveis de proteína total do plasma (PPT), a relação entre as quantidades de albumina e de globulinas (A/G), bem como os níveis de cada fração componente das proteínas plasmáticas, sendo elas albumina, alfa (α), beta (β) e gama (γ) globulinas, dos animais amostrados, representados nas tabelas 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 8, a seguir.

Os valores médios de proteínas totais e da relação entre albumina e globulinas dos avestruzes amostrados, obtidos pelos exames realizados são apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Valores médios de proteínas totais (PPT) em g/dL, e da relação albumina/globulina (A/G) dos grupos de avestruzes.

Grupo	PPT	A/G
1	2.23 ^a ± 0.23	0.72 ± 0.18
2	2.40 ^a ± 0.30	0.72 ± 0.12
3	3.67 ^b ± 0.42	0.73 ± 0.14
4	3.90 ^b ± 0.44	0.75 ± 0.15
5	4.11 ^b ± 0.65	0.87 ± 0.14
6	4.07 ^b ± 0.69	0.94 ± 0.25
X	3.39 ± 0.45	0.78 ± 0.16

* Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05; teste de Tukey).

Obtidos os valores médios destes parâmetros bioquímicos observou-se que os grupos 1 e 2 diferiram estatisticamente dos demais grupos, referindo-se aos valores de PPT ($p < 0,05$) e não diferiram entre si. Para os valores de A/G, não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Estes valores concordam, em parte, com PALOMEQUE et al. (1991) em estudo realizado com avestruzes do zoológico de Barcelona, na Espanha, onde encontraram uma média de 6.22 ± 0.92 g/dL de proteínas totais para animais juvenis e 3.87 ± 0.58 g/dL para animais adultos, sem ser feita distinção de sexo dos indivíduos analisados. Os níveis de proteínas totais dos adultos, neste caso, diferiram estatisticamente dos valores encontrados para os juvenis. Os valores encontrados para animais adultos são muito próximos em ambos os estudos.

Também KHAZRAIINIA et al. (2006), em pesquisa feita no Iran, encontraram níveis de PPT semelhantes para avestruzes, obtendo valores médios para os animais de 3.35 ± 0.61 g/dL. Sem distinção de sexo, para avestruzes com até 2 anos de idade, encontraram valores de 3.22 ± 0.66 g/dL de PPT e para os maiores de 2 anos, 2.86 ± 0.99 g/dL. Para as fêmeas, os valores foram de 3.38 ± 0.72 g/dL e para os machos, 3.39 ± 0.69 g/dL.

Observa-se que, ao contrário do presente estudo, foram obtidos por estes pesquisadores, valores superiores de proteínas totais nos animais mais jovens. Talvez esta diferença esteja

ocorrendo devido a diferentes dietas fornecidas para os animais em outras áreas de criação. Entretanto, os níveis nutricionais dos animais avaliados por PALOMEQUE et al. (1991) e KHAZRAIINIA et al. (2006), não foram relatados em seus trabalhos.

Os resultados deste estudo mostraram uma estrutura de frações protéicas não comumente relatada para os animais. Pela localização das bandas protéicas nos exames de eletroforese, foi possível concluir que das 72 avestruzes amostradas, 71 apresentavam as frações albumina, alfa-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina (tabelas 4 e 5 e figura 10). A maioria dos estudos de animais e os estudos em seres humanos apontam a presença de alfa1-globulina, alfa2-globulina e apenas uma beta-globulina.

POLAT et al. (2004) em experimento realizado com avestruzes fêmeas adultas na Turquia, encontraram entre as frações protéicas, albumina, alfa1-globulina, alfa2-globulina, beta-globulina e gama-globulina. KHAZRAIINIA et al. (2006) também encontraram estas frações para avestruzes no Iran, entretanto utilizaram fitas de acetato de celulose em vez de gel de agarose.

TATUM et al. (2000), em pesquisa com aves de rapina também apontaram a existência das duas frações de alfa-globulina e apenas uma fração beta-globulina nestas aves e CONRADO et al. (2007) encontraram a mesma configuração para emas.

Entretanto alguns estudos demonstram traçados diferentes, como os de HILL et al. (2007) em bezerras do estado do Paraná, onde não apontaram nenhuma fração protéica em duplicata, apresentando apenas uma alfa-globulina e uma beta-globulina. LANZAROT et al. (2005) também, em trabalho com uma espécie de cegonha (*Ciconia nigra*), não relatam a presença de duas frações alfa, sendo apenas alfa-globulina e beta-globulina.

Variações nestes perfis de frações são possíveis e estão de acordo com SWENSON (1996) e com NAOUM (1990), que admitem que entre as proteínas plasmáticas animais, têm sido identificadas albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ -globulinas.

Algumas diferenças de resultados podem estar ocorrendo por possíveis diferenças fisiológicas e nutricionais regionais entre os animais. Outra possível causa poderia ser o fato de muitas vezes os aparelhos de leitura dos géis para formulação dos gráficos (densitômetros) estarem calibrados para o uso na espécie humana ou em outros mamíferos e assim talvez induzirem a uma leitura de duas frações de alfa-globulina.

As localizações das bandas protéicas, obtidas pela eletroforese e interpretadas nos gráficos de muitos dos estudos que apresentam duas frações α e apenas uma fração β entre o grupo das globulinas, normalmente se encaixam no padrão de posicionamento já demonstrado no gráfico modelo da figura 4.

Nestes casos, as bandas identificadas como alfa1-globulina e alfa2-globulina encontram-se muito próximas à grande banda de albumina, e formam dois picos bem marcados, sendo α_1 quase adjacente à albumina.

Diferentemente, no presente estudo, observou-se que para 71 das 72 amostras examinadas não ocorreu a formação deste padrão, aparecendo o pico de albumina seguido pelas proteínas na região das alfa-globulinas apresentando-se excessivamente escassas e geralmente não formando picos bem definidos no gráfico. Os picos normalmente iniciaram na região das beta-globulinas, formando dois picos no gráfico (figura 5).

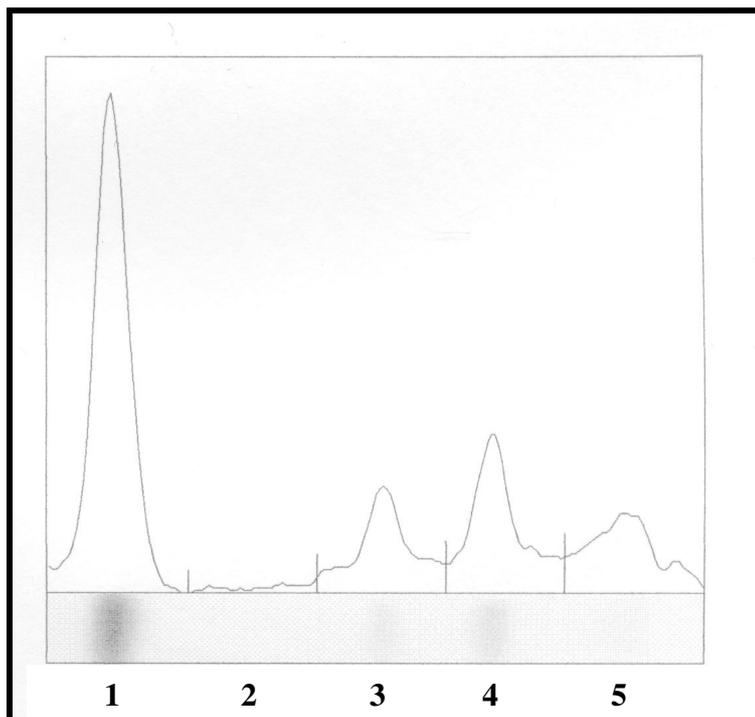


Figura 7 – Gráfico de um animal estudado, demonstrando as bandas encontradas (1-albumina, 2 – alfa-globulina, 3 – beta1-globulina, 4 – beta2-globulina e 5 – gama-globulina).

É possível observar a diferença existente entre o perfil protéico do presente trabalho e entre gráficos de estudos onde aparecem claramente as duas frações de alfa-globulina. Este é o caso do gráfico apresentado por PIRES et al. (2008), que trabalharam com tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) e encontraram as duas bandas de alfa-globulina e apenas uma banda de beta-globulina. Nota-se a presença das frações tanto pelos picos no gráfico como pela existência das bandas, visualizadas no fragmento de gel, como aparece na figura 8.

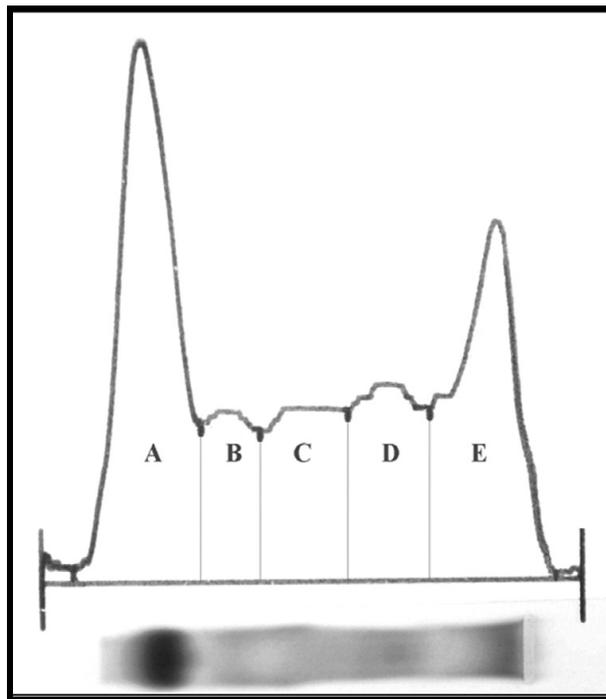


Figura 8 – Eletroforetograma das proteínas séricas de tartarugas cabeçudas (*C. caretta*).

A – albumina, B – alfa1-globulina,
C – alfa2-globulina, D – betaglobulina, e
E – gama globulina.

Fonte: PIRES et al., 2008.

O perfil encontrado no presente estudo, apresentando uma fração α e duas frações β , para avestruzes concorda, em parte, com os achados de GODOY et al. (2006) que encontraram, além da albumina, duas frações α , duas frações β e gama-globulina, em pesquisa feita a partir do sangue do cordão umbilical de cães nascidos em Jaboticabal, SP e está em conformidade com o que foi encontrado, para galinhas (*Gallus gallus domesticus*), por HASEGAWA et al. (2002). Estes por sua vez, em sua pesquisa com matrizes pesadas encontraram albumina, alfa-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina nos animais amostrados, sendo que alguns deles apresentaram também pré-albumina, que não foi encontrada para os avestruzes neste trabalho.

Os valores médios obtidos da diferenciação das frações protéicas para os grupos de avestruzes são mostrados em gramas por decilitro (g/dL) na tabela 4 e em porcentagem comparada ao nível de proteínas totais na tabela 4.

Tabela 3 – Valores médios das frações protéicas albumina, alfa-globulina, beta-globulina e gama-globulina, em g/dL dos grupos de avestruzes.

Grupo	Albumina	Alfa (α)	Beta 1 (β)	Beta 2 (β)	Gama (γ)
1	0.89 ^a ± 0.19	0.12 ± 0.06	0.33 ^{ab} ± 0.08	0.59 ^a ± 0.16	0.30 ± 0.12
2	1.00 ^a ± 0.15	0.17 ± 0.06	0.29 ^b ± 0.06	0.61 ^a ± 0.12	0.33 ± 0.09
3	1.54 ^b ± 0.32	0.11 ± 0.05	0.58 ^a ± 0.08	1.03 ^b ± 0.16	0.39 ± 0.03
4	1.65 ^b ± 0.22	0.11 ± 0.05	0.59 ^a ± 0.17	1.01 ^b ± 0.13	0.44 ± 0.10
5	1.91 ^b ± 0.35	0.15 ± 0.07	0.58 ^a ± 0.16	0.97 ^b ± 0.13	0.45 ± 0.15
6	1.93 ^b ± 0.41	0.12 ± 0.04	0.52 ^{ab} ± 0.26	1.03 ^b ± 0.26	0.42 ± 0.11

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$; teste de Tukey).

Pela análise estatística dos dados, para albumina, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os valores em g/dL dos grupos 1 e 2 contra os demais grupos. Para a fração alfa-globulina, em g/dL não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A fração beta1-globulina, por sua vez, apresentou diferença significativa ($p < 0.05$) em g/dL, do grupo 2 em relação aos grupos 3, 4 e 5 e na fração beta2-globulina, detectou-se diferença estatística ($p < 0.05$) dos grupos 1 e 2 em relação aos demais.

Tabela 4 – Valores das médias das porcentagens de cada fração protéica (albumina, alfa, beta e gama-globulinas), dentro do conjunto de proteínas totais, dos grupos de avestruzes.

Grupo	Albumina	Alfa (α)	Beta 1 (β)	Beta 2 (β)	Gama (γ)
1	40.37 \pm 6.16	5.64 ^{ab} \pm 2.53	14.87 \pm 3.98	24.52 \pm 3.05	12.52 \pm 3.93
2	41.75 \pm 4.10	6.88 ^a \pm 2.00	12.35 \pm 2.78	25.10 \pm 3.01	13.92 \pm 3.45
3	41.80 \pm 4.85	2.87 ^c \pm 1.08	16.03 \pm 2.80	28.30 \pm 4.92	10.80 \pm 0.66
4	42.59 \pm 5.05	2.93 ^c \pm 1.47	14.87 \pm 2.90	25.97 \pm 3.70	11.20 \pm 2.22
5	46.36 \pm 4.07	3.62 ^{bc} \pm 1.45	14.03 \pm 2.98	23.97 \pm 3.17	10.76 \pm 2.74
6	47.47 \pm 7.59	2.99 ^c \pm 1.16	12.38 \pm 3.87	25.12 \pm 3.61	10.52 \pm 2.73

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$; teste de Tukey).

Para a fração albumina, em termos de porcentagem em relação às demais proteínas plasmáticas, não houve diferença significativa entre os grupos. Dentro da fração alfa-globulina, foi encontrada diferença estatística ($p < 0,05$) em termos de porcentagem entre o grupo 1 e os grupos 3, 4 e 6 e também entre o grupo 2 e os grupos 3, 4, 5 e 6. Para as frações beta1-globulina e beta2-globulina não houve diferença entre os grupos, em termos de porcentagem.

Os valores médios para a fração gama-globulina, por sua vez, se mostraram muito semelhantes entre os grupos, não apresentando diferença estatística nem em g/dL e nem nas porcentagens de proteínas.

Nem todos os animais encontrados durante o estudo enquadraram-se no perfil relatado pelo trabalho. Um dos animais amostrados, como já foi mencionado, não apresentou o perfil de bandas protéicas como os demais avestruzes em geral. Este animal era um filhote (menos de 3 meses) macho, do município de Santiago e apresentou um traçado de bandas incomum ao estudo, podendo ter duas frações α e duas β nas globulinas.

5. CONCLUSÕES

A conclusão do trabalho nos permitiu traçar um perfil de proteínas plasmáticas para avestruzes provenientes de criatórios do Rio Grande do Sul, em três faixas etárias de animais, sendo filhotes, juvenis e adultos, com separação por sexo em ambos os grupos.

Nestes perfis, foi possível identificar os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), a relação entre as quantidades de albumina e globulinas (A/G) bem como diferenciar as frações de globulinas (α , β , γ).

Observou-se, pela técnica utilizada, a presença de um perfil de frações de globulinas, que foram agrupadas em α , β_1 , β_2 e γ .

Os níveis em g/dL de proteínas totais e de albumina foram significativamente menores nos grupos de filhotes em comparação com os demais, não havendo diferenças de valores, tanto para proteínas totais como para as frações protéicas, entre os sexos em nenhuma das faixas etárias.

REFERÊNCIAS

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute, Disponível em:
<http://www.who.int/salmsurv/activities/bulletin_board/en/attachment, Acesso em 10 jul. 2009.

CONRADO, A. C.; LOPES, S. T. A.; MARTINS, D. B., Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rhea americana*) de diferentes faixas etárias, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p.1033-1038, jul./ago. 2007.

GODOY, A. V. et al. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 2, p. 531-535, mar./abr. 2006.

HASEGAWA, M. Y. et al., Avaliação do Perfil Eletroforético das Proteínas Séricas em Matrizes Pesadas (*Gallus gallus domesticus*) da Linhagem Avian Farm, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 3, p. 203-207, set./dez. 2002.

HERNANDEZ, H. D. U., **Blog Temas de Bioquímica**, Málaga, 2009. Disponível em:<<http://temasdebioquimica.wordpress.com/category/proteinas/>>. Acesso em 10 jul. 2009.

HILL, J. A. G. et al., Proteína total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de campo largo, Paraná, **Revista Acadêmica de Curitiba**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 295-301, jul./set. 2007.

HRUBEC, T. C. et al. Plasma Versus Serum: Specific Differences in Biochemical Analyte Values, **Journal of Avian Medicine and Surgery**, v. 16, n. 2, p. 101-105, jun. 2002.

KANEKO J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS M. L., **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, p.117-138, 1997.

KHAZRAIINIA, P. et al. Serum biochemistry of ostrich (*Struthio camellus*) in Iran,

Comparative Clinical Pathology, Londres, v.15, p. 87-89, 2006

LANZAROT, M. P.; BARAHONA, M. V.; SAN ANDRÉS, M. I., Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*ciconia nigra*), **Journal of Wildlife Diseases**, Palo Alto, v. 41. n. 2, p. 379-386, 2005.

LUMEIJ, J. T.; DEBRUIJE, J. J.; KWANT, M. M. Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera, **Avian Pathology**, Cambridge, v.19, p.255–261, abr. 1990.

LUMEIJ, J. T.; DEBRUIJE, J. J. Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. **Avian Pathology**, Cambridge, v.14, p.441–444, jul. 1985.

MUSHI, E. Z., BINTA, M. G., CHABO, R. G., ISA, J. F. W., MODISA, L., Serum biochemical values of farmed ostrich (*Struthio camelus*) in Botswana. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 65, n. 3, p. 189-193, 1998.

MORGULIS M. S., Imunologia Aplicada, In: MACARI M., FURLAN R.L., GONZALES E., **Fisiologia Aviária – Aplicada a Frangos de Corte**. Jaboticabal, SP: Funep e Fapesp, p.231-245, 2002.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Santos,1990.

PALOMEQUE, J.; PINTO, D.; VISCOR, G, Hematologic and blood chemistry values of the masai ostrich (*Struthio camelus*), **Journal of Wildlife Diseases**, Palo Alto, v. 27, n. 1, p. 34-40, 1991.

PIRES, T. T.; ROSTAN, G.; BITTENCOURT, T. C. C.; et al., Eletroforese de proteínas séricas de tartarugas cabeçudas (*Caretta caretta*) de vida livre e mantidas em cativeiro no litoral norte da Bahia, **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 45, suplemento, p. 121-126, out. 2008.

POLAT, U.; CETIN, M.; AK, I.; BALCI, F., Detection of serum protein fractions and their concentrations in laying and non-laying ostriches (*Struthio camelus*) fed with different dietary protein levels, **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 155, n. 11, p. 570-574, 2004.

SWENSON, M. J. Propriedades Fisiológicas e Constituintes Químicos e Celulares do Sangue. In: SWENSON M.J., REECE W.O. DUKES. **Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 19-43, 1996.

TATUM, L. M.; ZAIAS, D. V. M. J.; MEALEY, B. K.; et al., Protein Electrophoresis as a Diagnostic and Prognostic in Raptor Medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, White Oak Road, v.31, n.4, p.497-502, 2000.

TREVELIN, S. C.; SILVA, V. M. S.; FEITOSA, F. L. F.; CIARLINI, P. C., Proteinograma de avestruzes (*struthio camelus*) neonatos e jovens criados na região de araçatuba. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, SP , v.24, n.2, p. 092-096, mai./ago.2008.

WARR G. W.; MAGOR K. E.; HIGGINS D. A., IgY: clues to the origins of modern antibodies,
Immunology Today, Londres, v.16, n.8, p. 392-8, ago. 1995.

4. CAPÍTULO 2

PERFIL PLASMÁTICO E DIFERENCIAÇÃO DE FRAÇÕES DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS EM EMAS (*Rhea americana*) NO RIO GRANDE DO SUL.

ELECTROPHORETIC PROFILE AND PROTEIN FRACTIONS DIFFERENTIATION OF RHEAS (*Rhea americana*) IN RIO GRANDE DO SUL

RESUMO

Os setores pecuários de diversos países vêm se diversificando a cada dia e a utilização de novas espécies animais, algumas vezes até mesmo de origem silvestre, torna-se algo relativamente comum. No Brasil pode-se citar a ema (*Rhea americana*) como uma espécie com certo destaque entre produtores, sendo amplamente criada. Entretanto, observa-se uma escassez de trabalhos científicos sobre o animal, sendo importante a ampliação das pesquisas sobre seus parâmetros fisiológicos normais. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi traçar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas totais de um grupo de emas (*R. americana*) criadas no estado do Rio Grande do Sul, bem como identificar as diferentes frações protéicas no plasma desses animais. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue de 9 emas de 2 criatórios do Rio Grande do Sul, das quais obteve-se plasma. Essas amostras passaram pela realização do método de biureto e pela eletroforese, para a quantificação, separação e identificação das proteínas. Foram encontrados e determinados os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT) e a relação entre albumina e globulinas (A/G). Foram encontradas médias de valores de 5.22 ± 0.66 g/dL de proteínas plasmáticas totais e 0.97 ± 0.24 para a relação entre a albumina e as globulinas, para o grupo de animais. Na diferenciação das frações, encontrou-se a presença de pré-albumina, albumina, uma fração alfa-globulina, duas frações beta-globulina, e uma fração gama-globulina, para o grupo.

Palavras chave: proteinograma, eletroforese, emas.

ABSTRACT

The livestock sectors of several countries have been diversifying every day and the use of new animal species, sometimes even of wild origin, is becoming relatively common. In Brazil one can cite the rhea (*Rhea americana*) as a species with a certain prominence between producers and being widely created. However, there is a shortage of scientific studies on the animal, which makes it important to expand research on their normal physiological parameters. Thus, the objective of this study was to determine the electrophoretic profile of total plasma proteins of a group of rheas (*R. americana*) created in the state of Rio Grande do Sul, as well as to identify the different protein fractions in the plasma of these animals. To this end, we collected blood samples from 9 rheas from 2 rhea farms in Rio Grande do Sul, from which plasma was obtained. These samples passed through the completion of the biuret method and by electrophoresis for the quantification, separation and identification of proteins. The levels of total plasma proteins (TPP) and the relationship between albumin and globulin (A / G) were found and determined. We found average values of 5.22 ± 0.66 g / dl of total plasma proteins and 0.97 ± 0.24 for the ratio of albumin and globulin, for the group of animals. In the differentiation of fractions, we found the presence of prealbumin, albumin, a globulin fraction of alpha-two globulin fractions, and a gamma globulin fraction, for the group.

Key Words: proteinogram, electroforesis, rheas

INTRODUÇÃO

As ratitas são aves corredoras com características anatômicas e fisiológicas diferenciadas das carenatas (aves voadoras), ou seja, não são capazes de voar, não possuem musculatura no peito para vôo e nem quilha sobre o osso esterno (SICK, 1997; PEREIRA et al, 2006). A criação destes animais, com destaque para o avestruz, a ema e o emu, surge como alternativa para a agropecuária. Estes animais utilizam alimentos de baixa qualidade, existentes em solos fracos, pois apresentam potencial para transformá-los em proteína animal de alto valor biológico (GIANNONI, 1998; COSTA et al., 2008).

As emas pertencem à família Rheidae e são endêmicas da região Neotropical. Possuem semelhanças morfológicas, genéticas e comportamentais com o avestruz, tendo um corpo ovóide, altura entre 1,34 a 1,80m, peso entre 26 e 52kg e penas em tonalidades cinzentas e negras (ALMEIDA, 2006).

A criação e a comercialização de carne de emas estão ainda em fase relativamente inicial, sendo que pouco se conhece sobre as doenças que afetam esta espécie em criações intensivas (PEREIRA, et al., 2008) e também pouco se sabe sobre parâmetros fisiológicos normais destas espécies.

Entre parâmetros importantes para a clínica, figura o perfil plasmático de proteínas, útil quando associado a quadros clínicos, auxiliando no diagnóstico, prognóstico e determinação do curso de situações clínicas comuns, como infecções, neoplasias, intoxicações, distúrbios comportamentais e doenças nutricionais (TATUM et al., 2000). Pode-se citar, também, a utilidade do conhecimento da relação albumina/globulina nas aves, que é indicador de alta significância clínica, na avaliação da resposta inflamatória em caso de enfermidade (KANEKO, 1997).

A albumina plasmática, o fibrinogênio, parte das globulinas e a protrombina são formados no fígado. Em outras espécies animais a síntese das proteínas plasmáticas mostra-se reduzida em alterações hepáticas graves ou dietas prolongadas, deficientes em proteínas (SWENSON, 1996). Possuem várias funções importantes no organismo e as alterações em seus níveis e características podem auxiliar nos diagnósticos.

Entre as proteínas plasmáticas, encontram-se as globulinas (α , β e γ) que possuem marcada importância. As γ -globulinas contêm os anticorpos também chamados imunoglobulinas. Essas são classificadas como IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. A IgG é, comumente, a mais abundante em animais normais, estando presente no sangue e tecidos. A IgE é produzida por animais com vários tipos de alergias. A IgA é encontrada nas secreções externas como a saliva e lágrimas, encontrando-se também no plasma. A IgM é o anticorpo natural que ocorre no sangue. A IgD está relacionada com o reconhecimento dos linfócitos B contra alguns antígenos e a indução dessas células para proliferar e formar clones (SWENSON, 1996). Nas aves em geral existe também a IgY, equivalente funcional de IgG, encontrada também em répteis e anfíbios, entretanto, muitos aspectos da sua biologia são ainda pouco elucidados (WARR et al., 1995).

Tendo em vista a escassez de maiores informações sobre os valores de referência para a avaliação das proteínas plasmáticas totais e das frações protéicas para espécies do grupo das ratitas, particularmente para as emas, este trabalho teve por objetivo relatar o perfil

eletroforético em um grupo de emas adultas, criadas em cativeiro no estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de sangue de 9 emas. Este grupo foi composto por 8 animais adultos (acima de 1 ano de vida) oriundos de um parque de visitas do município de Gravataí e 1 animal, também adulto de um criatório de Santa Maria.

As amostras foram coletadas por punção da veia braquial e, posteriormente, acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina. O sangue total foi submetido à centrifugação por 3 minutos a 3900xg, para a separação do plasma.

Nesse estudo optou-se pelo uso do plasma em vez do soro sanguíneo. Análises bioquímicas podem ser conduzidas usando o plasma ou soro sanguíneos, pois são similares. No entanto o plasma contém fatores coagulantes e anticoagulantes que não estão presentes no soro. Em medicina aviária, o plasma é frequentemente usado para análises bioquímicas porque é mais fácil de ser coletado do que o soro e propicia um volume maior de amostra (CLSI, 2009).

As amostras plasmáticas foram armazenadas sob congelamento e encaminhadas para mensuração da concentração das proteínas plasmáticas totais através do método de biureto, e, para a diferenciação da albumina e das frações de globulinas, foi aplicada a técnica da eletroforese.

Para a determinação pelo método de biureto, foi utilizado o kit Proteínas Totais, Marca Labtest (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se 1,0mL de reagente biureto e 0,02mL da amostra-plasma. Misturou-se e incubou-se a amostra e o reagente por 10min a 37°C e posteriormente foi realizado o ensaio colorimétrico.

A eletroforese foi realizada pela técnica que emprega o gel de agarose como meio suporte. Este gel, após as aplicações de 10µL das amostras plasmáticas, foi embebido em uma solução tampão de tris veronal (pH 8,6). Em sequência, aplicou-se uma corrente elétrica de 90V ao meio suporte, por 20min, depois de submerso ao tampão.

Após a migração das proteínas através da rede do gel, sob ação da corrente elétrica, cada gel foi secado, corado, escaneado e analisado através do Software para densitometria SDS-60[®],

a fim de produzir o traçado em bandas, típico da eletroforese, produzindo um gráfico para leitura.

No trabalho foi adotado o delineamento experimental inteiramente casualizado, com número variável de repetições. Para a análise estatística foram utilizados os métodos da análise de variância, o teste F e o teste de Tukey. O nível crítico de significância foi de 5% de probabilidade. As análises foram efetuadas com o auxílio do Programa estatístico SAS, versão 9.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o processamento das amostras, a realização dos exames e as análises dos dados, foi possível identificar os níveis de proteína total do plasma (PPT) e a relação entre as quantidades de albumina e globulinas (A/G) e obter seus valores médios. Para PPT a média foi de 5.22 ± 0.66 g/dL e para a relação A/G foi de 0.97 ± 0.24 .

Os níveis de PPT e A/G encontrados neste grupo foram próximos aos encontrados por CONRADO et al. (2007), que apresentaram valores médios de PPT de 4.45 ± 0.27 g/dL e $1,36 \pm 0,22$ para a relação entre albumina e globulinas para emas com de 1 ano de idade.

Através da técnica da eletroforese foi possível observar também as frações componentes das proteínas plasmáticas, divididas entre albumina e globulinas. Estas últimas foram agrupadas em uma fração alfa (α), duas frações beta (β) e uma fração gama (γ), nos animais amostrados. Os valores encontram-se na tabela 1.

Tabela 5 - Valores médios das frações protéicas (albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina), em g/dl e em porcentagem comparada ao total de proteínas plasmáticas (PPT), para o grupo de emas estudadas.

Unidade	Alb.	α	β 1	β 2	γ
g/dL	2.52 ± 0.42	0.17 ± 0.05	0.76 ± 0.14	0.84 ± 0.23	0.84 ± 0.28
%	48.46 ± 6.26	3.22 ± 0.92	14.68 ± 1.89	16.17 ± 4.48	15.89 ± 4.38

É interessante notar também que a fração pré-albumina, observada por CONRADO et al. (2007) para todas as emas de até 15 dias de vida e por HASEGAWA et al. (2002) em algumas galinhas (*Gallus gallus domesticus*) de seu estudo, não foi observada para as emas desta pesquisa. Apesar de ser relatada a ausência de explicação técnica e científica para essas observações (SWENSON, 1996), as emas deste estudo eram todas adultas, com mais de um ano de vida, sendo que esta fração já foi isolada e sequenciada em avestruzes, estando ligada à função da tireóide de aves ainda em crescimento (CHANG et al., 1999; CONRADO et al., 2007).

A média para a fração albumina também foi muito semelhante com a encontrada por CONRADO et al. (2007). As demais frações, no entanto, variaram bastante entre estudos, e ocorreu diferença entre as frações α e β , já que neste estudo foram determinadas uma fração alfa e duas frações beta para as globulinas, diferentemente de outros autores que encontraram duas frações α e uma β .

O perfil encontrado no presente estudo, apresentando uma fração α e duas frações β , concorda, entretanto, em parte, com os achados de GODOY et al. (2006) que encontraram, além da albumina, duas frações α , duas frações β e uma γ -globulina, em pesquisa feita a partir do sangue do cordão umbilical de cães nascidos em Jaboticabal, SP e está em conformidade com o que foi encontrado, para galinhas (*Gallus gallus domesticus*), por HASEGAWA et al. (2002). Estes por sua vez, em sua pesquisa com matrizes pesadas encontraram albumina, alfa-globulina, beta1-globulina, beta2-globulina e gama-globulina nos animais amostrados, sendo que alguns deles apresentaram também pré-albumina, que não foi encontrada para os avestruzes neste trabalho.

Entretanto, alguns estudos demonstram traçados diferentes, como os de HILL et al. (2007) em bezerras do estado do Paraná, onde não apontaram nenhuma fração protéica em duplicata, apresentando apenas uma alfa-globulina e uma beta-globulina. LANZAROT et al. (2005), em trabalho com uma espécie de cegonha (*Ciconia nigra*), não relatam a presença de duas frações alfa, sendo apenas alfa-globulina e beta-globulina. FONTEQUE et al. (2009), em trabalho realizado com cascavéis (*Crotalus durissus terrificus*), apesar de identificarem mais frações protéicas, agruparam as encontradas em 4 grandes bandas, albumina, α , β e γ -globulinas,

Variações nestes perfis de frações são possíveis e estão de acordo com SWENSON (1996) e com NAOUM (1990), que admitem que entre as proteínas plasmáticas animais, têm sido identificadas albumina, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e γ -globulinas.

Algumas diferenças de resultados podem estar ocorrendo por possíveis diferenças fisiológicas e nutricionais regionais entre os animais. Outra possível causa poderia ser o fato de muitas vezes os aparelhos de leitura dos géis para formulação dos gráficos (densitômetros) estarem calibrados para o uso na espécie humana ou em outros mamíferos e assim talvez induzirem a uma leitura de duas frações de alfa-globulina.

CONCLUSÃO

Através do trabalho foi traçado perfis de proteínas plasmáticas para um grupo de emas adultas do Rio Grande do Sul.

Nestes perfis, foi possível identificar os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), a relação entre as quantidades de albumina e globulinas (A/G) bem como diferenciar agrupamentos de frações de globulinas (α , β , γ).

Observou-se, pela técnica utilizada, a presença das globulinas, que foram agrupadas em quatro frações distintas α , β_1 , β_2 e γ .

Observou-se também a ausência da fração pré-albumina no grupo estudado, fração esta que já foi observada em outras aves e também em emas por outros autores.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. A., Strutioniformes (ema, avestruz) in cap. 11 p. 136-157. In: CUBAS, Z.S.; SILVA, J.C.R.; CATÃO-DIAS, J.L., **Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária**, São Paulo: Roca, p.136-157, 2006.

CHANG L.; MUNRO S. L.; RICHARDSON S. J.; SCHREIBER G., Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.534-542, jan. 1999.

CONRADO, A. C.; LOPES, S. T. A.; MARTINS, D. B., Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rhea americana*) de diferentes faixas etárias, **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n. 4, p.1033-1038, jul./ago. 2007.

COSTA D. P. S.; ROMANELLI P. F.; TRABUCO E., Aproveitamento de vísceras não comestíveis de aves para elaboração de farinha de carne, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v. 28, n. 3, abr. 2008.

FONTEQUE J. H, KOHAYAGAWA A, TAKAHIRA R K, BIANCHI E. H., CHERUBINI A. L., PICCININ A., BRUDER E. M, RAMOS P. R. R, Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.29, n.6, p.457-460, jun. 2009.

GIANNONI, M. L. Viabilidade da exploração de ratitas em São Paulo. **Biológico**, São Paulo, v. 1, n. 2, p. 91-96, jul./dez. 1998.

GODOY, A.V.; SANTANA, A. E.; NAKAGE, A.P.M.; et al. Perfil eletroforético de proteínas séricas do sangue do cordão umbilical de cães. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.2, p.531-535, mar./abr. 2006.

HASEGAWA, M.Y.; FONTEQUE, J.H.; KOHAYAGAWA, A., et al., Avaliação do Perfil Eletroforético das Proteínas Séricas em Matrizes Pesadas (*Gallus gallus domesticus*) da Linhagem Avian Farm, **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 4, n. 3, p. 203-207, set./dez 2002.

HILL, J.A.G.; COSTA, D.W.; CASTRO, M.E.F. et al., Proteína total, proteinograma eletroforético e gamaglutamiltransferase de bezerras com 30 horas de vida no município de campo largo, Paraná, **Revista Acadêmica de Curitiba**, Curitiba, v. 5, n. 3, p. 295-301, jul./set, 2007.

KANEKO J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, San Diego: Academic Press, p.117-138, 1997.

LANZAROT, M.P.; BARAHONA, M.V.; SAN ANDRÉS, M.I., Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*ciconia nigra*), **Journal of Wildlife Diseases**, Palo Alto, v. 41. n. 2, p. 379-386, 2005.

NAOUM, P.C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2 ed. São Paulo: Santos,1990.

PEREIRA A. V.; ROMANELLI P. F; SCRIBONI A. B; ORLANDINI F. P., Rendimentos do abate e composição da carne de ema (*Rhea americana*), **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, jul. 2006.

SICK, H. Ordem Rheiformes – emas: família Rheidae. In: SICK, H. (Ed.). **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, p. 168-171, 1997.

SWENSON, M. J. Propriedades Fisiológicas e Constituintes Químicos e Celulares do Sangue. In: SWENSON M.J., REECE W.O. DUKES. **Fisiologia dos Animais Domésticos**, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, p. 19-43, 1996.

TATUM, L. M. et al., Protein Electrophoresis as a Diagnostic and Prognostic in Raptor Medicine. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, White Oak Road, v.31, n.4, p.497-502, 2000.

WARR G. W.; MAGOR K. E.; HIGGINS D. A., IgY: clues to the origins of modern antibodies, **Immunology Today**, Londres, v.16, n.8, p. 392-8, ago. 1995.

5. CAPÍTULO 3

Perfil eletroforético e diferenciação de frações protéicas de emus (*Dromaius novaehollandiae*) criados em cativeiro

Electrophoretic profile and protein fractions differentiation of emus (*Dromaius novaehollandiae*) bred in captivity

Luciano de Oliveira Battisti^I Larissa Quinto Pereira^I Cybele Esteves Almeida^{II} Maristela Lovato^{I*}

NOTA -

RESUMO

Emus são encontrados em quase todas as regiões da Austrália e tem sido criados em cativeiro em vários outros países. No estado do Rio Grande do Sul, estima-se que existam seis exemplares. As proteínas plasmáticas são utilizadas como auxiliares no diagnóstico clínico das enfermidades. O objetivo deste trabalho foi identificar o perfil eletroforético das proteínas plasmáticas e diferenciar suas frações protéicas. Foram utilizadas amostras de plasma coletadas de um casal, processadas pela técnica do biureto e eletroforese em gel de agarose. Foram encontrados valores de 5,30 g/dL e 4,10 g/dL de proteínas plasmáticas totais e 0,67 e 0,81 para a relação entre a albumina e as globulinas, para a fêmea e o macho respectivamente. Na diferenciação das frações, encontrou-se a presença de pré-albumina, albumina, uma fração alfa-globulina, duas frações beta-globulina, e uma fração gama-globulina, para ambos os animais.

Palavras-chave: proteínas plasmáticas, ratitas, *Dromaius novaehollandiae*.

ABSTRACT

Emus are found in almost all regions of Australia and have been bred in captivity in several other countries. In the state of Rio Grande do Sul, it is estimated that there are six birds. Plasma proteins are used as aids in clinical diagnosis of diseases. The objective of this study was to identify the electrophoretic profile of plasma proteins and differentiate the protein fractions of emus. Samples of plasma collected from a couple, processed by the biuret technique and polyacrylamide gel electrophoresis. Found values of 5.30 g/dL and 4.10 g/dL of total plasma proteins and 0.67 and 0.81 for the relationship between albumin and globulins, for the female and male respectively. At the differentiation of fractions, we found the presence of prealbumin, albumin, one alpha-globulin, two beta-globulin fractions and one gamma globulin fraction, for both animals.

Key words: plasmatic proteins, ratites, *Dromaius novaehollandiae*.

Emus são encontrados em quase todas as regiões semi-áridas da Austrália, excluindo os desertos. Eles estão muito reduzidos em número e as subespécies que viviam na Tasmânia, Ilhas Kangaroo e no Estreito de Bass estão extintas. Esses animais começaram a ser criados fora da Austrália e em 1989 foi fundada a AEA (American Emu Association), nos Estados Unidos (DRENOWATZ et al., 1995). No estado do Rio Grande do Sul estima-se que existam em cativeiro seis exemplares (dados não publicados). Entre as aves, somente os psitacídeos e as aves de rapina possuem padrões eletroforéticos definidos, essas informações em ratitas são escassas e necessitam de estudos (GARCÍA-MONTIJANO, 2002; CONRADO et al., 2007).

O perfil eletroforético das proteínas plasmáticas sozinho, não fornece informações específicas, como o diagnóstico de uma determinada doença, mas os resultados da eletroforese quando devidamente interpretados, podem ser úteis como prognóstico e diagnóstico auxiliar na avaliação clínica (CONRADO et al., 2007; FONTEQUE et al., 2009).

Devido à ausência de informações sobre valores de referência de proteínas plasmáticas e frações protéicas este trabalho teve por objetivo relatar o perfil eletroforético em dois exemplares adultos de emu criados em cativeiro, representando 33% da população existente no estado.

Foram coletadas amostras sanguíneas, por punção da veia metatársica medial, de 2 emus (*Dromaius novaehollandiae*), sendo um macho e uma fêmea adultos. As amostras foram acondicionadas em tubos com anticoagulante heparina. Esse material foi obtido de emus em um parque zoológico localizado no município de Gravataí, Rio Grande do Sul. O sangue total foi submetido à centrifugação por 3 minutos a 3900xg, para a separação do plasma. As amostras plasmáticas foram armazenadas a -20°C e encaminhadas para mensuração da concentração das proteínas plasmáticas totais utilizando-se o método de biureto, e, para a diferenciação da albumina e das frações de globulinas, foi aplicada a técnica da eletroforese.

A determinação da quantidade de proteínas totais através do método de biureto foi realizada por meio do kit proteínas totais (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, MG, Brasil), as amostras foram processadas de acordo com as instruções do fabricante. Utilizou-se 1,0mL de reagente biureto e 0,02mL da amostra-plasma. Misturou-se e incubou-se a amostra e o reagente por 10min a 37°C e posteriormente foi realizado o ensaio colorimétrico. A eletroforese foi realizada pela técnica que emprega o gel de agarose como meio suporte. Este gel, após as aplicações de 10µL das amostras plasmáticas, foi embebido em uma solução tampão de tris veronal (pH 8,6). Em sequência, aplicou-se uma corrente elétrica de 90V ao meio suporte, por

20min, depois de submerso ao tampão. Após a migração das proteínas através da rede do gel, o gel foi secado, corado, escaneado e analisado através do software para densitometria (SDS-60).

Os valores de proteínas plasmáticas totais e frações protéicas estão representados na tabela 1. Os valores médios de proteínas plasmáticas totais para fêmeas adultas encontrados na literatura foram de 4,8g/dL variando de 3,1 a 6,5g/dL e para machos de 4,6g/dL variando de 3,6 a 5,7g/dL (TEARE, 2002). Os resultados encontrados nesse trabalho foram semelhantes, sendo observada também a variação existente entre sexos.

As proteínas observadas foram agrupadas em seis frações (Figura 1a e 1b) pré-albumina, albumina, α , β 1, β 2, γ . A fração pré-albumina encontrada nos emus foi também descrita em emas, cegonhas, galinhas e aves de rapina (MONTESINOS et al., 1997; GARCÍA-MONTIJANO et al., 2002; HASEGAWA et al., 2002; LANZAROT et al., 2005; CONRADO et al., 2007), essa fração também isolada em avestruzes, acredita-se estar ligada à função da tireóide de aves em crescimento (CHANG et al., 1999)

Diferentemente de outros autores (MONTESINOS et al., 1997; GARCÍA-MONTIJANO et al., 2002; POLAT et al., 2004; LANZAROT et al., 2005; CONRADO et al., 2007) que descreveram duas frações α e uma β -globulina, nesse trabalho foram encontradas uma fração de α -globulina e duas frações das β -globulinas, o mesmo foi descrito por HASEGAWA (2002) em galinhas de postura. Atualmente valores bioquímicos em diferentes espécies de aves têm sido descritos (QUINTAVALLA et al., 2001; VERSTAPPEN et al., 2002; BOUDA et al., 2004; MIRANDA et al, 2008), mas a determinação do perfil eletroforético e o fracionamento das globulinas ainda é escasso

Devido a pouca literatura disponível, sugere-se que novos perfis eletroforéticos de proteínas sejam realizados nessa espécie, visto que a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais e das principais frações protéicas em animais saudáveis, além da

determinação dos valores de referência, também auxiliam o clínico em diagnósticos e no acompanhamento do estado sanitário das aves mantidas em cativeiro.

AGRADECIMENTO (S)

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Bolsa de Mestrado do autor L. Q. Pereira.

REFERÊNCIAS

- BOUDA, J. et al. Valores bioquímicos selectos em plasma sanguineo de avestruces de diferentes edades y sexo. **Veterinária México**, v.35, n.1, p.45-54, 2004.
- CHANG, L. et al. Evolution of thyroid hormone binding by transthyretins in birds and mammals. **European Journal of Biochemistry**, v.259, p.534-542, 1999.
- CONRADO, A. C. et al. Eletroforese das proteínas plasmáticas em emas (*Rhea americana*) de diferentes faixas etárias. **Ciência Rural**, v.37, n.4, p.1033-1038, 2007.
- DRENOWATZ, C. et al. History and geography. In: _____(Ed) **The ratite encyclopedia**. San Antonio: Ratite Record, 1995, p.3-30.
- FONTEQUE, J. H. et al. Perfil eletroforético das proteínas séricas de serpentes *Crotalus durissus terrificus* (cascavel) criadas em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.6, p.457-460, 2009.
- GARCÍA-MONTIJANO, M. et al. Blood chemistry, protein electrophoresis, and hematologic values of captive spanish imperial eagles (*Aquila adalbert*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.33, n.2, p.112-117, 2002.

HASEGAWA, M.Y. et al. Avaliação do perfil eletroforético das proteínas séricas em matrizes pesadas (*Gallus Gallus Domesticus*) da linhagem Avian Farm. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.4, n.3, p.203-207, 2002.

LANZAROT, M.P. et al. Hematologic, protein electrophoresis, biochemistry, and cholinesterase values of free-living black stork nestlings (*Ciconia nigra*). **Journal of Wildlife Diseases**, v.41, n.2, p.379-386, 2005.

MIRANDA, R. L. et al. Serum biochemistry of 4-day-old ostriches (*Struthio camelus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.28, n.9, p.423-426, 2008.

MONTESINOS, A. et al. Hematological and plasma biochemical reference intervals in young white storks. **Journal of Wildlife Diseases**, v.33, p.405-412, 1997.

POLAT, U. et al. Reference serum protein and lipoprotein fractions of ostriches (*Struthio camelus*) in Turkey. **Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 1, p. 77-79, 2004.

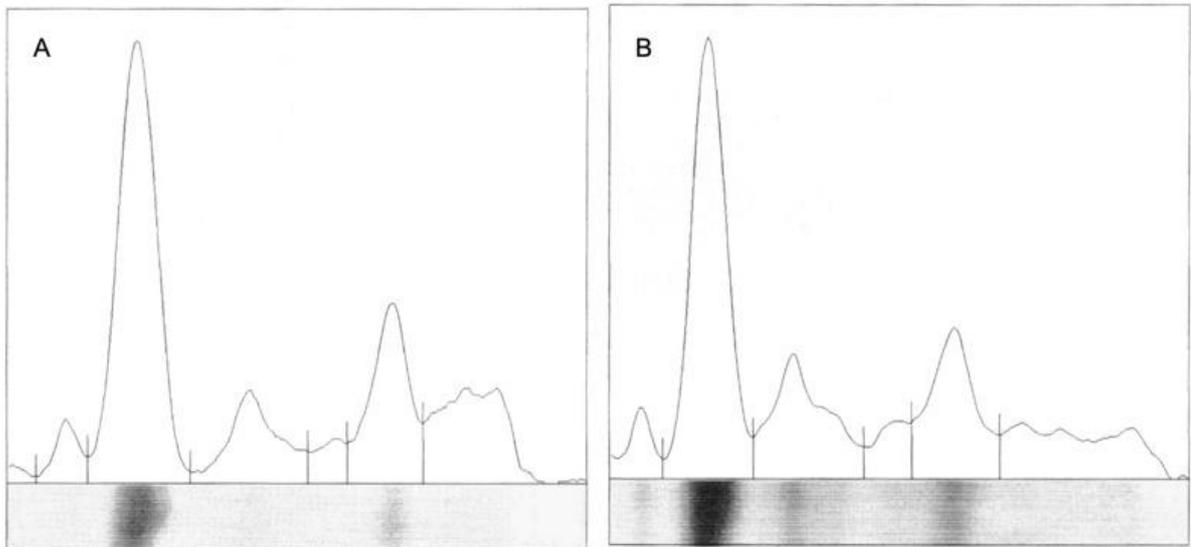
QUINTAVALLA, F. et al. Blood biochemical baseline values in the ostrich (*Struthio camelus*). **Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria**, v. 21, p. 61-71, 2001. Disponível em: < <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/2001/quintavalla.pdf> >. Acesso em: 20 ago. 2009.

TEARE, A. Physiological Data Reference Values. Apple Valley, MN: **International Species Information System (ISIS)**, CD-ROM, 2002.

VERSTAPPEN, F. A. L. M. et al. Plasma chemistry reference values in ostriches. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 1, p. 154-159, 2002.

Tabela 6 - Valores da concentração de proteínas plasmáticas totais, pré-albumina, albumina, alfa-globulina, beta-globulina, gama-globulina e relação albumina/globulina em emus, fêmea (F) e macho (M).

Grupo	Unidades	PPT	A/G	Pré-alb.	Albumina	α	β_1	β_2	γ
Emu (F)	(g/dL)	5,30	0,67	0,24	2,13	0,91	0,28	0,92	0,82
	(%)				40,2	17,1	5,2	17,4	15,5
Emu (M)	(g/dL)	4,10	0,81	0,17	1,83	0,49	0,14	0,73	0,71
	(%)				44,7	11,9	3,4	17,8	17,3



Legenda

Figura 9 – Perfil eletroforético e frações proteicas pré-albumina, albumina, α , β 1, β 2, γ no macho (a) e na fêmea (b) de emu.

6. CONCLUSÃO

A realização destes trabalhos nos permitiu traçar perfis de proteínas plasmáticas para grupos de ratitas provenientes de criatórios do Rio Grande do Sul, sendo avestruzes, emas e emus.

Nestes perfis, identificou-se os níveis de proteínas plasmáticas totais (PPT), a relação entre as quantidades de albumina e globulinas (A/G) bem como diferenciar as frações de globulinas (α , β , γ).

Observou-se que, nos grupos amostrados, para as três espécies, foram encontradas, compondo o grupo das globulinas, as frações alfa (α) beta1 (β_1), beta2 (β_2) e gama (γ).

Houve algumas diferenças de frações protéicas e valores encontrados neste estudo em comparação com outros autores. Dessa forma, sugere-se que novos perfis eletroforéticos de proteínas sejam realizados nessas espécies, para aprimorar o conhecimento já existente, visto que a determinação da concentração das proteínas plasmáticas totais e das principais frações protéicas em animais saudáveis auxiliam muito o clínico em diagnósticos e no acompanhamento do estado sanitário das aves mantidas em cativeiro.

7. REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**, 3. ed, Porto Alegre: Artes Médicas, 1997, p.1294.

ALMEIDA, M. A., Strutioniformes (ema, avestruz) In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L., **Tratado de animais selvagens: medicina veterinária**, São Paulo: Roca, 2006. cap. 11, p.136-157.

BRASIL; Portaria N° 36, de 15 de março de 2002. Ministério do Meio Ambiente, Dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Diário Oficial da União** [da República Federativa do Brasil], Brasília, de 15 de março de 2002.

CAMPBELL, T. W.; COLES, E. H., Avian clinical pathology. In: COLES, E.H., **Veterinary clinical pathology**. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.279-301.

CAMPBELL, T. W.; DEIN, F. J., Avian hematology. The basics, **Veterinary clinics of north american: small animal practice**, Pennsylvania, v. 14, n. 2, p. 223-48, Mar./Apr. 1984.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**, São Paulo: Edgard Blücher, 1998. p.28-29.

GARCIA NETO, M.. Nutrição de Avestruzes. In: SEMINÁRIO PAULISTA DE ESTRUTHIOCULTURA, 1.; ENCONTRO ABRE DE PESQUISAS E ESTUDOS DIRECIONADOS A ESTRUTHIOCULTURA, 1., 2004, São Paulo. **Anais eletrônicos...** São Paulo: Unesp. Disponível em: <http://www.foa.unesp.br/pesquisa/centros_e_nucleos/zootecnia/informacoes_tecnicas/estruthiocultura/Revisao%20nutricao%20avestruz%20ostrich%20nutriton.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2009.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M., Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **Journal of biological chemistry**, Maryland, v. 177: p. 751-66, Feb. 1949.

HUCHZERMAYER, F. W., **doenças de avestruzes e outras ratitas** 1. ed. Jaboticabal: Unesp, 2000. 392 p.

KANEKO J. J.; HARVEY J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**, San Diego: Academic Press, 1997. p.117-138.

KERR M. G., **Exames laboratoriais em medicina veterinária** 2. ed., São Paulo: Roca, 2003. p.87-94.

LEHNINGER, N. D.; COX, M.M., **Princípios de bioquímica**, 4. ed. São Paulo: Savier, 2002. 1202 p.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO, F. R.; SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**, Campo Grande: Embrapa, 2001. p. 307.

MORGULIS M. S., Imunologia Aplicada, In: MACARI, M., FURLAN, R. L., GONZALES E. **Fisiologia aviária – aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/FAPESP, 2002. p.231-245.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. 2. ed. São Paulo: Santos,1990.

PORTELA, B. P. O avestruz no mundo e no Brasil, **Anuário da estruthiocultura brasileira**, São Paulo, p. 7-35, 2005/2006.

RUPLEY A. E., **Manual de clínica aviária**, São Paulo: Roca, 1999. p. 393.

SILVA, D. G. K. C.; TEODORO, G. M.; DE SENA, L. V., Perfil Eletroforético de Proteínas Plasmáticas: Estudo em Crianças Atendidas no Hospital de Pediatria – Hosped / UFRN da Cidade de Natal-RN. **Revista brasileira de análises clínicas**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 4, p .239-242, jul./set. 2005.

SCROFERNEKER, M. L.; POHLMANN, P. R., **Imunologia básica e aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1998. p. 63-80.

STURKIE, P. D., **Avian physiology**. 4th ed., New York: Springer-Verlag, 1986. p. 337-339.

SWENSON, M. J., Propriedades Fisiológicas e Constituintes Químicos e Celulares do Sangue. In: SWENSON M. J.; REECE W. O. **DUKES'**: Fisiologia dos Animais Domésticos, Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1996. p. 19-43.

TATUM, L. M. et al., Protein Electrophoresis as a Diagnostic and Prognostic in Raptor Medicine. **Journal of zoo and wildlife medicine**, White Oak Road, v. 31, n. 4, p. 497-502, 2000.

WARR G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS D. A., IgY: clues to the origins of modern antibodies, **Immunology today**, Londres, v. 16, n. 8, p. 392-8, Aug. 1995.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, nov./dez. 1998.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A – Eletroforetograma obtido de uma das amostras de plasma de avestruz.**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA**

Eletroforese de Proteínas

Data da análise: 16/06/2009

Paciente: AVESTRUZ 68

Idade: ADULTA

Sexo: F

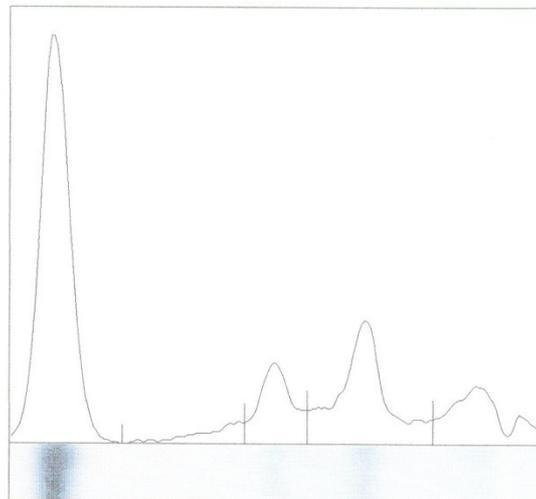
Número do paciente: TAMBO (3)

Frações	%	g/dL
Albumina	50.1	2.00
Alfa 1	4.1	0.16
Beta	10.9	0.44
Beta	22.2 (+)*	0.89
Gama	12.7	0.51

Proteínas totais: 4.00 g/dL

A/G: 1.00

* Nota: (+) valores acima da normalidade
(-) valores abaixo da normalidade



APÊNDICE B – Dados dos exames de proteínas das avestruzes.

Grupo	Animal	PPT	A/G	Alb %	Alb g/dL	Alfa %	Alfa g/dL	Beta1 %	Beta1 g/dL	Beta 2 %	Beta2 g/dL	Gama %	Gama g/dL
1	1	2.40	0.78	43.9	1.05	2.2	0.05	12.06	0.30	28.4	0.68	11.8	0.28
1	2	2.20	.	40.4	0.89	2.3	0.05	15.6	0.34	26.3	0.58	14.3	0.31
1	3	.	.	31.5	0.57	3.6	0.06	.	.	21.7	0.98	10.8	0.49
1	4	2.40	0.72	42.0	1.01	9.0	0.22	18.3	0.44	19.6	0.47	10.1	0.24
1	5	2.00	0.66	39.7	0.79	5.0	0.10	21.0	0.42	23.5	0.47	10.5	0.21
1	6	2.40	0.72	41.7	1.00	6.2	0.15	15.0	0.36	25.0	0.60	11.3	0.27
1	7	2.20	0.71	41.5	0.91	9.2	0.20	18.3	0.40	21.6	0.48	8.8	0.19
1	8	2.40	1.09	52.2	1.25	5.3	0.13	7.8	0.19	26.2	0.63	8.5	0.20
1	9	1.90	0.70	41.3	0.78	8.5	0.16	11.2	0.21	23.9	0.45	15.1	0.29
1	10	2.50	0.40	28.5	0.71	6.7	0.17	12.5	0.31	29.9	0.75	22.4	0.56
1	11	1.90	0.71	41.4	0.79	4.0	0.08	16.9	0.32	23.6	0.45	14.1	0.27
2	12	2.50	0.64	39.2	0.98	7.5	0.19	12.7	0.32	25.6	0.64	15.0	0.38
2	13	2.60	0.54	35.1	0.91	9.1	0.24	9.0	0.23	28.3	0.74	18.5	0.48
2	14	1.90	0.80	44.3	0.84	3.3	0.06	16.7	0.32	20.4	0.39	15.3	0.29
2	15	2.20	0.74	42.6	0.94	7.4	0.16	9.7	0.21	25.3	0.56	15.0	0.33
2	16	2.70	0.88	46.8	1.26	6.1	0.16	13.5	0.36	23.0	0.62	10.6	0.29
2	17	2.50	0.74	42.5	1.06	7.9	0.20	12.5	0.31	28.0	0.70	9.1	0.23
3	18	3.80	0.86	46.2	1.76	2.4	0.09	17.7	0.67	22.8	0.87	10.9	0.41
3	19	4.00	0.74	42.6	1.70	4.1	0.16	12.8	0.51	29.8	1.19	10.1	0.40
3	20	3.20	0.58	36.6	1.17	2.1	0.07	17.6	0.56	32.3	1.03	11.4	0.36
4	21	3.90	0.59	37.0	1.44	3.9	0.15	14.7	0.57	25.0	0.98	9.9	0.39
4	22	4.70	0.56	35.9	1.69	3.5	0.16	19.3	0.91	24.4	1.15	12.0	0.56
4	23	3.80	0.89	47.2	1.79	2.0	0.08	13.8	0.52	28.3	1.08	8.7	0.33
4	24	3.20	0.66	39.8	1.27	5.4	0.17	11.8	0.38	31.7	1.01	10.6	0.34
4	25	3.90	0.79	44.0	1.72	1.5	0.06	13.3	0.52	25.7	1.00	15.5	0.60
4	26	3.80	0.95	48.7	1.85	1.3	0.05	18.5	0.70	19.7	0.75	11.8	0.45
4	27	4.00	0.83	45.5	1.82	2.9	0.12	12.7	0.51	27.0	1.08	9.9	0.40
5	28	3.80	0.60	37.6	1.43	5.2	0.20	14.0	0.53	26.2	1.00	10.2	0.39
5	29	3.60	0.71	41.4	1.49	4.2	0.15	16.9	0.61	19.7	0.71	12.0	0.43
5	30	4.90	0.73	42.3	2.07	5.9	0.29	14.7	0.72	23.2	1.14	10.4	0.51
5	31	4.00	0.86	46.2	1.85	5.2	0.21	10.8	0.43	18.3	0.73	15.5	0.62
5	32	4.50	0.62	38.3	1.72	2.8	0.13	20.0	0.90	25.6	1.15	12.1	0.54
5	33	4.80	0.97	49.2	2.36	1.2	0.06	14.6	0.70	23.0	1.10	9.4	0.45
5	34	4.50	0.91	47.6	2.14	4.7	0.21	12.2	0.55	22.0	0.99	11.0	0.50
5	35	5.00	0.93	48.1	2.40	4.1	0.21	16.6	0.83	21.5	1.08	8.2	0.41
5	36	4.20	0.80	44.3	1.86	1.7	0.07	18.4	0.77	22.8	0.96	10.1	0.42
5	37	3.80	0.82	45.0	1.71	3.0	0.11	17.2	0.65	25.4	0.97	8.6	0.33
5	38	4.40	0.96	48.9	2.15	5.5	0.24	10.2	0.45	24.0	1.06	9.1	0.40
5	39	4.30	1.05	51.3	2.21	4.7	0.20	12.7	0.55	22.2	0.95	8.6	0.37
5	40	4.30	0.85	45.8	1.97	2.7	0.12	20.0	0.86	22.7	0.98	8.2	0.35
5	41	4.50	0.87	46.5	2.09	5.1	0.23	14.6	0.66	21.7	0.98	10.8	0.49
5	42	5.40	0.95	48.8	2.64	2.1	0.11	14.5	0.78	19.5	1.05	15.1	0.82
5	43	3.30	0.90	47.5	1.57	3.0	0.10	11.7	0.39	28.8	0.95	9.0	0.30
5	44	4.00	1.00	50.1	2.00	4.1	0.16	10.9	0.44	22.2	0.89	12.7	0.51
5	45	4.00	1.06	51.4	2.06	3.1	0.12	9.6	0.38	25.3	1.01	10.6	0.42
5	46	3.60	0.86	46.3	1.67	2.7	0.10	12.0	0.43	27.0	0.97	12.0	0.43
5	47	2.80	0.81	44.6	1.25	2.1	0.06	15.9	0.45	26.2	0.73	11.2	0.31
5	48	2.80	0.82	45.2	1.27	4.7	0.13	13.0	0.36	29.5	0.83	7.6	0.21
5	49	3.80	0.95	48.8	1.85	2.4	0.09	16.6	0.63	22.8	0.87	9.4	0.36
5	50	3.30	1.17	53.9	1.78	2.0	0.07	10.7	0.35	28.2	0.93	5.2	0.17

5	51	3.10	0.85	46.0	1.43	1.8	0.06	12.6	0.39	29.9	0.93	9.7	0.30
5	52	4.80	1.04	51.0	2.45	2.5	0.12	10.1	0.48	20.8	1.00	15.6	0.75
5	53	4.60	0.70	41.2	1.90	6.4	0.29	15.3	0.70	19.9	0.92	17.2	0.79
5	54	4.10	0.70	41.2	1.69	5.7	0.23	14.9	0.61	24.0	0.98	14.2	0.58
5	55	4.60	0.78	43.7	2.01	3.2	0.15	16.2	0.75	29.0	1.33	7.9	0.36
5	56	4.30	1.10	52.3	2.25	3.3	0.14	10.0	0.43	23.8	1.02	10.6	0.46
6	57	3.10	0.72	41.7	1.29	4.2	0.13	11.9	0.37	25.7	0.80	10.1	0.31
6	58	4.50	0.69	40.7	1.83	4.8	0.22	12.3	0.55	26.5	1.19	9.2	0.41
6	59	3.30	0.72	41	1.38	4.6	0.15	13.7	0.45	25.2	0.83	8.8	0.29
6	60	5.60	0.38	27.6	1.55	1.7	0.10	26.0	1.46	29.3	1.64	11.5	0.64
6	61	3.70	1.33	57.0	2.11	3.8	0.14	12.1	0.45	18.5	0.68	7.8	0.29
6	62	3.50	0.80	44.5	1.56	2.6	0.09	10.2	0.36	33.1	1.16	9.6	0.34
6	63	4.20	1.07	51.6	2.17	1.9	0.08	12.3	0.52	23.7	1.00	10.5	0.44
6	64	4.40	1.12	52.9	2.33	2.8	0.12	10.5	0.46	24.9	1.10	8.9	0.39
6	65	3.60	1.23	55.1	1.98	1.3	0.05	14.4	0.52	18.0	0.65	11.2	0.40
6	66	4.50	1.21	54.8	2.47	2.0	0.09	9.6	0.43	26.6	1.20	7.0	0.32
6	67	4.30	0.90	47.4	2.04	4.4	0.19	11.4	0.49	25.8	1.11	11.0	0.47
6	68	3.30	0.95	48.8	1.61	2.9	0.10	11.9	0.39	22.9	0.76	13.5	0.45
6	69	5.00	1.11	52.6	2.63	1.6	0.08	11.0	0.55	27.3	1.36	7.5	0.38
6	70	4.60	1.09	52.1	2.40	2.7	0.12	9.8	0.45	25.1	1.15	10.3	0.47
6	71	4.10	0.94	48.5	1.99	2.5	0.10	9.9	0.41	25.7	1.05	13.4	0.55
6	72	3.50	0.76	43.2	1.51	4.1	0.14	11.1	0.39	23.6	0.83	18.0	0.63

APÊNDICE C – Dados dos exames de proteínas das emas

Animal	PPT	A/G	Alb %	Alb g/dL	Alfa %	Alfa g/dL	Beta1 %	Beta1 g/dL	Beta2 %	Beta2 g/dL	Gama %	Gama g/dL
1	5.80	0.96	49.0	2.84	2.2	0.13	15.3	0.89	15.2	0.88	17.0	0.99
2	4.90	0.76	43.3	2.12	4.6	0.23	15.7	0.77	14.0	0.69	20.7	1.01
3	5.70	1.29	56.4	3.21	4.1	0.23	10.0	0.57	13.0	0.74	15.1	0.86
4	5.90	0.72	41.7	2.46	2.8	0.17	15.9	0.94	17.6	1.04	19.8	1.17
5	4.20	0.99	49.8	2.09	3.5	0.15	15.3	0.64	13.4	0.56	16.0	0.67
6	5.80	0.78	43.7	2.53	4.3	0.25	15.2	0.88	16.9	0.98	17.8	1.03
7	4.30	1.32	56.9	2.45	2.2	0.09	13.7	0.59	19.5	0.84	6.2	0.27
8	4.90	0.70	41.3	2.02	2.6	0.13	16.2	0.79	25.6	1.25	12.5	0.61
9	5.50	1.17	54.0	2.97	2.7	0.15	14.8	0.81	10.3	0.57	17.9	0.98