

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

**PROTEINOGRAMA DE BÚFALOS DE DIFERENTES
FAIXAS ETÁRIAS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO
GRANDE DO SUL**

**MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO RESIDÊNCIA
MÉDICO-VETERINÁRIA**

RAQUELI TERESINHA FRANÇA

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

PROTEINOGRAMA DE BÚFALOS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

por

Raqueli Teresinha França

Monografia apresentada ao Curso de Especialização Residência Médico-Veterinária do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Patologia Clínica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Especialista em Patologia Clínica Veterinária**

Orientadora: Prof^a. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2010

F814p França, Raqueli Teresinha, 1985-
Proteinograma de búfalos de diferentes faixas etárias na região central do Rio Grande do Sul / Raqueli Teresinha França. - 2010. 35 f. ; il.

Monografia (especialização) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, 2010.
“Orientadora: Profª. Sonia Terezinha dos Anjos Lopes”

1. Medicina veterinária 2. Bubalinos 3. Eletroforese de proteínas 4. Idade I. Lopes, Sonia Terezinha dos Anjos II. Título

CDU: 619:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada por
Patrícia da Rosa Corrêa – CRB 10/1652
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

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

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Monografia de Residência Médico-Veterinária

**PROTEINOGRAMA DE BÚFALOS DE DIFERENTES FAIXAS
ETÁRIAS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**

elaborada por
Raquel Teresinha França

como requisito parcial para obtenção do grau de
Especialista em Patologia Clínica Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Sonia Terezinha Dos Anjos Lopes, Dra.
(Presidente/Orientadora)

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dra. (UFSM)

Márcio Machado Costa, Msc. (UFSM)

Santa Maria, 11 de junho de 2010.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, pela oportunidade, confiança, incentivo e pelos ensinamentos. Serei sempre grata.

Ao meu noivo Conrado, por todo apoio carinho e principalmente, pela paciência.

Aos meus pais por terem me proporcionado a graduação, que me abriu as portas para a realização da residência.

A Professora Cinthia, pelo incentivo, ensinamentos e ajuda.

A toda a equipe do LACVET – UFSM, em especial a Danieli e ao Márcio, pela grande ajuda e dedicação concedida nesses dois anos.

A minha companheira de rotina Marci, pela ajuda e alegria que trouxe para o LACVET, muito obrigada.

RESUMO

Monografia de Residência Médico-Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

PROTEINOGRAMA DE BÚFALOS DE DIFERENTES FAIXAS ETÁRIAS NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: RAQUELI TERESINHA FRANÇA
ORIENTADORA: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 11 de junho de 2010.

A Bubalinocultura é uma atividade em expansão no Brasil. As alterações encontradas no proteinograma nem sempre estão associadas com processos patológicos, variações fisiológicas são constantes. Assim, faz-se necessário o conhecimento sobre o proteinograma de búfalos saudáveis de diferentes idades, para posterior comparação com possíveis processos patológicos que estes animais possam desenvolver durante sua vida. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da faixa etária sobre o proteinograma em búfalos hígdidos com seis, doze e vinte e quatro meses de idade. Foram utilizados 45 búfalos mestiços, criados em sistema extensivo. Os bubalinos foram divididos em três grupos de acordo com a idade, de ambos os sexos, sendo: grupo 1 (G1) - animais com seis meses de idade (n=15); grupo 2 (G2) - animais com doze meses de idade (n=16) e grupo 3 (G3) - animais com vinte e quatro meses de idade (n=14). Diferença estatística ($p < 0,05$) foi observada nas proteínas totais séricas e diferença altamente significativa ($p < 0,01$) foi observada entre as frações betaglobulina, gamaglobulina, bem como na relação albumina:globulina. Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que, com exceção da fração albumina e alfa globulina, todos os demais componentes do proteinograma apresentaram influência da faixa etária.

Palavras-chave: Eletroforese de proteínas; idade; bubalinos.

ABSTRACT

Monograph of Specialization-Veterinary Medicine Residents
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

PROTEINOGRAM OF DIFFERENT AGES BUFFALOES IN CENTRAL REGION OF THE RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: RAQUELI TERESINHA FRANÇA
ADVISOR: SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Date and place of defense: Santa Maria, June 11, 2010.

The buffalo culture is an activity in expansion in Brazil. The changes found in proteinogram are not always associated with pathological processes, physiological variations are constant. Thus, it is necessary to know about the proteinogram of healthy buffaloes of different ages, for an after comparison with possible pathological processes that these animals can develop during their lifetime. The aim of this research was to evaluate the age influence on the proteinogram in buffaloes with six, twelve and twenty-four months. It was used 45 crossbred buffaloes, reared under extensive system. The buffaloes were divided into three groups according to their age, of both sexes, as follows: group 1 (G1) - six months old animals (n = 15), group 2 (G2) - twelve months old animals (n = 16) and group 3 (G3) - twenty-four months old animals (n = 14). Statistical difference ($p < 0.05$) was observed in serum total protein and highly significant difference ($p < 0.01$) were observed between the beta globulin fraction, gamma globulin, as well as in the albumin:globulin relation. The results of this study have revealed that, except for albumin and alpha globulin fraction, all other components of the protein showed the influence of age

Keywords: protein electrophoresis; age; buffaloes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Rebanho de bubalinos, animais de seis meses de idade com suas mães, Venâncio Aires – RS.....	12
Figura 2. Proteinograma de búfalos de diferentes faixas etárias. (A) Animais com seis meses, (B) animais de doze meses e (C) animais com vinte e quatro meses de idade. Presença de quatro frações roteícas: Albumina (Alb), alfa globulina (α), beta globulina (β) e gama globulina (γ).....	14
Figura 3. Sistema de eletroforese para fracionamento de proteínas. (A) Fonte e (B) cuba.....	19
Figura 4. Proteínas separadas em bandas eletroforéticas por meio de fitas de acetato de celulose e coradas com corante Ponceau.....	19

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1. Bubalinos	11
2.2. Proteínas Totais	12
2.2.1 Frações.....	16
2.3. Eletroforese de proteínas	17
3. MANUSCRITO	20
3.1. Influência da faixa etária no proteinograma de búfalos (<i>Bubalus bubalis</i>)	20
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	22
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	25
Discussão.....	26
Conclusão.....	28
Fontes de aquisição.....	28
Referências Bibliográficas.....	29
4. CONCLUSÃO	33
5. REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um ruminante oriundo da Ásia que, na atualidade, está presente na Europa, Austrália, África e América. No Brasil, o rebanho oficial de búfalos é de três milhões de animais, distribuídos em diversos estados brasileiros (BORGHESE & MAZZI, 2005). O produto de sua criação representa uma importante fonte de proteína de origem animal, além de o bubalino ser definido como um animal de múltiplo propósito, devido a sua capacidade de produzir trabalho, carne e leite. Os búfalos possuem alta resistência a enfermidades, habilidade de sobreviver em climas com alta umidade, elevada temperatura e com fonte de alimento de baixa qualidade (FERNÁNDEZ et al., 2005; RAMÍREZ-IGLESIA et al., 2007).

As proteínas desempenham um papel integral em numerosos processos fisiológicos, sendo importantes não apenas para manter a integridade estrutural da maioria dos tecidos do corpo, mas também para regular muitas das reações bioquímicas do organismo. Essas também atuam como tampões para a manutenção do equilíbrio ácido-básico, transportadoras de constituintes sanguíneos e outras substâncias (ECKERSALL, 2008). A interpretação dos constituintes bioquímicos do sangue é dependente dos valores de referência em espécies distintas. Por exemplo, em humanos, ovinos, caprinos, coelhos, cães e cobaias, a albumina predomina sobre as globulinas, enquanto que em equinos e bovinos, a relação entre a albumina e globulinas é quase igual, ou as globulinas tendem a predominar. Além das características descritas para cada espécie, existem evidências de que alguns fatores fisiológicos podem influenciar na concentração de proteínas como: idade, peso corporal, hormônios, prenhes, lactação, puerpério, estro, temperatura e estado nutricional do animal (BATAVANI et al., 2006).

A albumina é sintetizada no fígado e é a principal responsável pela pressão oncótica. Diferentes proteínas compõem a fração das globulinas, a maior parte dessa parcela é composta pelas imunoglobulinas, que são sintetizadas pelos linfócitos B. Muitas das informações sobre a resposta do organismo às doenças podem ser obtidas através da mensuração da proteína total e suas frações albumina e globulinas (RUSSEL & ROUSSEL, 2007; ECKERSALL, 2008).

Considerando-se que a bubalinocultura é uma atividade em expansão, em especial na região sul do país (DAMÉ & SILVA, 2003), faz-se necessário o conhecimento sobre o perfil

eletroforético de proteínas de búfalos saudáveis de diferentes idades, para posterior comparação com possíveis processos patológicos que estes animais possam desenvolver durante sua vida. Como são escassos os estudos sobre o proteinograma de búfalos criados em sistema extensivo na região central do Rio Grande do Sul (RS) este trabalho propõem-se avaliar a influência da idade sobre o proteinograma de búfalos hígidos com seis, doze e vinte e quatro meses de idade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bubalinos

A população de búfalos no mundo é cerca de 168 milhões de cabeças: 161 milhões podem ser encontrados na Ásia, 3,7 milhões estão na África, 3,3 milhões na América do Sul, 500 mil na Europa e 40 mil na Austrália. No Brasil, os primeiros bubalinos chegaram juntamente com os zebuínos oriundos da Índia, entre os anos de 1940 e 1960 encontrando condições ideais de vida como pastagens, espaço, água e temperatura adequada. No ano de 1970, os produtores começaram utilizar os bubalinos profissionalmente, para produção de leite e carne. Concomitantemente, iniciaram-se as pesquisas em relação à nutrição e reprodução destes animais. As pesquisas com búfalos no extremo sul do país tiveram início em 1981 (DAMÉ & SILVA, 2003; BORGHESE & MAZZI, 2005). Contudo, em alguns países esses animais ainda são vistos como exóticos e seu potencial produtivo é limitado (FERNÁNDEZ et al., 2005).

Apesar dos bubalinos terem sua origem no continente asiático, esses adaptaram-se às mais diversas condições climáticas, sendo considerados como uma alternativa pecuária viável para manter o homem no campo. A bubalinocultura vem tendo um crescimento expressivo no país. As raças de bubalinos criados no estado do RS são Murrah, Mediterrâneo e Jafarabadi. No RS, são cada vez mais evidentes as demandas por informações técnicas que permitam o desenvolvimento de sistemas de produção sustentáveis (Figura 1) (DAMÉ & SILVA, 2003).



Figura 1- Rebanho de bubalinos, animais de seis meses de idade com suas mães, Venâncio Aires - RS.

2.2 Proteínas totais

A avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro é parte integrante dos exames hematológicos e bioquímicos em animais. As alterações na concentração de proteínas, algumas vezes são as principais anormalidades laboratoriais encontradas em algumas doenças. A avaliação do teor plasmático ou sérico de proteínas pode ser útil para limitar a lista de doenças a ser investigada (LASSEN, 2007).

As funções das proteínas no organismo são inúmeras, dentre essas podem ser citadas: coagulação (fibrinogênio), defesa do organismo contra agentes patogênicos (imunoglobulinas e complemento), transporte de metabólitos (transferrina e albumina), regulação do metabolismo celular (hormônios), prevenção de proteólise (alfa₁- antitripsina), manutenção do balanço nutricional e da pressão osmótica (albumina) (ECKERSALL, 2008).

O sangue é formado por um grande volume de matriz fluida, sendo denominada de plasma. Se ocorrer a coagulação do sangue e esse, for centrifugado, a fibrina e outros fatores

plasmáticos de coagulação ficarão no fundo do tubo de ensaio juntamente com a parte celular. A porção líquida remanescente é denominada de soro, onde se encontram a maioria das proteínas exceto o fibrinogênio (STEPHENSON, 2004).

Com exceção das imunoglobulinas que são produzidas pelos linfócitos B do baço, linfonodos e medula óssea após estímulo devido à presença de patógenos presentes na circulação ou nos tecidos, a maior parte das proteínas é produzida pelos hepatócitos e o controle de sua secreção é exercido por diferentes mecanismos. A secreção da albumina, por exemplo, depende da diminuição da pressão osmótica. Contudo, esse mecanismo também pode ser afetado por alterações patológicas durante processos infecciosos ou inflamatórios (ECKERSALL, 2008). Outro mecanismo envolvido na produção e secreção de proteínas está relacionado com a liberação de citocinas, devido à inflamação local ou sistêmica. As principais citocinas responsáveis pelo aumento na síntese e secreção de proteínas de fase aguda são o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1 (IL-1) e a interleucina 6 (IL-6) (ECKERSALL, 2008). As proteínas de fase aguda são produzidas após a liberação dessas citocinas que estimulam a sua produção. As proteínas de fase aguda são divididas em proteínas de fase aguda positiva e negativa, que aumentam ou diminuem respectivamente em resposta ao desafio. As proteínas de fase aguda negativa são constituídas, principalmente pela albumina e transferrina. Dentre as proteínas de fase aguda positiva estão a proteína C-reativa, o soro amilóide A, a haptoglobina, a ceruloplasmina, o fibrinogênio e a alfa-1 glicoproteína ácida. Essas glicoproteínas são sintetizadas principalmente pelos hepatócitos em resposta a estimulação por citocinas pró-inflamatórias e são liberadas na corrente sanguínea (MURATA et al., 2003). No entanto, tecidos extra-hepáticos como intestino, pulmão e tecido adiposo têm a capacidade de sintetizar algumas das proteínas (ECKERSALL, 2008). A glândula mamária de vacas por exemplo, também é capaz de produzir soro amilóide A em resposta à mastite (PETERSEN et al., 2004).

As alterações que ocorrem nas diferentes frações das proteínas nem sempre são suficientes para causar variações na concentração da proteína total. É importante levar em consideração as diferentes fases da vida do animal e os processos patológicos que esses podem passar no momento de sua avaliação (BATAVANI et al., 2006; LASSEN, 2007; PICCIONE et al., 2009).

Aumento ou diminuição da concentração de proteína total são anormalidades laboratoriais comumente detectadas em animais. As alterações observadas geralmente estão associadas a anormalidades na albumina e/ou globulinas. A interpretação das mudanças nos níveis de proteínas depende da identificação da fração envolvida (Figura 2). A diminuição na

concentração de proteínas pode decorrer da diminuição de albumina (hipoalbuminemia), globulina (hipoglobulinemia) ou de ambas. As causas que podem levar a diminuição da proteína total com diminuição da albumina e das globulinas são: hidratação excessiva, hemorragia, enteropatia, dermatites exudativas, queimaduras graves e derrames (LASSEN, 2007).

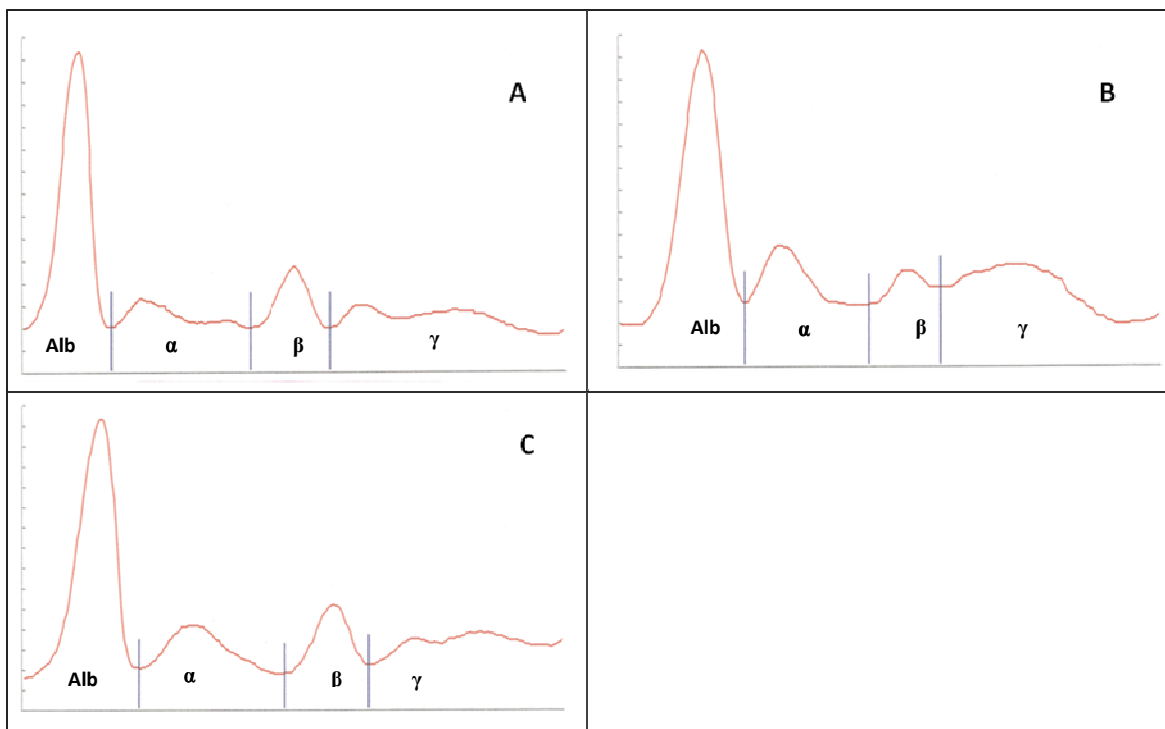


Figura 2. Proteinograma de búfalos de diferentes faixas etárias. (A) Animais com seis meses, (B) animais de doze meses e (C) animais com vinte e quatro meses de idade. Presença de quatro frações protéicas: Albumina (Alb), alfa globulina (α), beta globulina (β) e gama globulina (γ).

Comumente, a hipoalbuminemia pode não estar acompanhada de hipoglobulinemia, pois essa diminuição pode estar relacionada com diminuição da sua produção ou perda da albumina. Na diminuição também pode estar associada com insuficiência hepática, inanição, parasitismo gastrointestinal, má absorção intestinal, insuficiência pancreática exócrina e doenças glomerulares. A hipoglobulinemia, na ausência de hipoalbuminemia quase sempre se deve à menor concentração de betaglobulina ou gamaglobulina, pois o menor teor de alfa globulina exclusivamente, não resulta em diminuição de globulinas. Tais alterações podem ser observadas quando ocorre falha na transferência de imunidade passiva e imunodeficiência (LASSEN, 2007).

As causas de elevação na concentração de proteína total podem derivar do aumento da concentração de albumina (hiperalbunemia) e/ou globulinas (hiperglobulinemia). A hiperalbunemia pode ser observada apenas em casos de desidratação, onde pode-se observar elevação na albumina e nas globulinas. Já a hiperglobulinemia, como parâmetro de diagnóstico depende do tipo de globulina que está aumentada. Aumento na concentração da alfa₂-globulina pode ser observado em casos de inflamação aguda. Nesses casos, nota-se elevação nas concentrações de proteínas presentes nesta fração como ceruloplasmina, haptoglobina e alfa₂-macroglobulina. Elevação na fração beta globulina pode ser observada em doença inflamatória aguda, síndrome nefrótica e doença hepática ativa e resposta imune. Nessa fração, estão presentes proteínas como a proteína C-reativa, complemento e ferritina (LASSEN, 2007).

A fração gamaglobulina inclui a maior parte das imunoglobulinas. O aumento da gamaglobulina é denominado gamopatia sendo esta é classificada em gamopatia monoclonal ou policlonal, com base na largura do pico da fração gamaglobulina (LASSEN, 2007). As gamopatias policlonais representam aumento no teor de imunoglobulinas produzidas por uma população heterogênea de linfócitos B e/ou de plasmócitos. Essa elevação deve-se à estimulação antigênica crônica em casos de doenças infecciosas, doenças hepáticas e imunomediadas. Já nos casos de gamopatia monoclonal, ocorre a produção de imunoglobulinas por um único clone de linfócitos B e/ou de plasmócitos. Geralmente, esse tipo de gamopatia é acompanhada de hipoalbuminemia, entretanto, esse mecanismo permanece obscuro. Nas patologias relacionadas com esta gamopatia, nem sempre observa-se alteração na fração gama. A seguir, algumas patologias que podem apresentar gamopatia monoclonal: mieloma múltiplo, plasmocitoma extramedular, linfoma e leucemia, piodermite crônica, leishmaniose visceral e estomatite linfoplasmocítica e gamopatia idiopática (LASSEN, 2007).

As alterações encontradas no proteinograma nem sempre estão associadas com processos patológicos, uma vez que variações fisiológicas em um indivíduo são relativamente constantes em um determinado período de tempo. A interpretação deve sempre ser realizada após exame minucioso do animal. Na avaliação das proteínas totais deve-se levar em consideração a idade do animal, uma vez que, ao nascimento, a concentração das proteínas é baixa, por causa da mínima quantidade de imunoglobulinas presente no sangue dos recém nascidos. Após o nascimento, com a ingestão de colostro, ocorre aumento gradual da concentração de imunoglobulinas de origem materna. As imunoglobulinas maternas reduzem após algum tempo, devido sua renovação. Com o avanço da idade, aumenta a concentração de

proteína total com um pequeno decréscimo na albumina e progressivo aumento nas globulinas (LEAL et al., 2003; ECKERSALL, 2008).

A gestação influencia nas diferentes frações protéicas. Em gestantes, ocorre diminuição na concentração de proteína no sangue, devido o decréscimo da albumina, embora ocorra um leve aumento nas globulinas (ECKERSALL, 2008). Alguns hormônios também influenciam na concentração de proteínas totais. A testosterona, o estrógeno e os hormônios do crescimento promovem um aumento das proteínas totais devido ao seu efeito anabólico. Entretanto, outros hormônios como a tiroxina e o cortisol tendem a diminuir a concentração das proteínas totais devido ao efeito catabólico que esses causam (ECKERSALL, 2008).

2.2.1 Frações

De modo geral, a eletroforese, através da técnica de acetato de celulose, separa as proteínas séricas em quatro frações: albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina (WERNER e TURNWALD, 1999).

A pré-albumina é encontrada em aves e sua posição no fracionamento eletroforético antecede a albumina. Sua função está diretamente ligada ao transporte de tiroxina (ECKERSALL, 2008).

A albumina é a principal fonte de proteína encontrada no soro e constitui 35% a 50% das proteínas. É responsável pela manutenção da pressão coloidosmótica e é uma proteína carreadora. Ela é a banda mais proeminente no traçado eletroforético, possuindo migração anodal. A albumina é sintetizada no citoplasma dos hepatócitos e sua síntese é controlada pela pressão osmótica. Apenas 30% a 40% da albumina encontra-se no sangue, o restante, está no espaço intersticial (ECKERSALL, 2008). A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa, sua concentração diminui gradualmente durante doenças infecciosas e inflamatórias, devido à liberação de interleucinas IL-1, IL-6 e fator TNF- α , que são citocinas responsáveis pela produção e secreção de proteínas de fase aguda (PETERSEN, 2004; ECKERSALL, 2008).

A fração alfa globulina (alfa₁ e alfa₂) é composta por globulina transportadora de tiroxina, alfa₁-fetoproteína, alfa₁-inibidora de protease, alfa₁-glicoproteína ácida, alfa₁-antitrombina III, alfa₁-lipoproteína, alfa₂-lipoproteína, alfa₂- macroglobulina, ceruloplasmina, haptoglobina e proteína C (ECKERSALL, 2008). A fração beta globulina (beta₁ e beta₂) é constituída pela beta₂-lipoproteína, transferrina, ferritina, hemopexina, complemento C3,

proteína C-reativa, complemento C4, plasminogênio e o fibrinogênio quando o plasma é utilizado (ECKERSALL, 2008). Moléculas de IgM e IgA, podem migrar para a fração betaglobulina durante o fracionamento eletroforético (LASSEN, 2007).

A fração gamaglobulina (gama₁ e gama₂) é composta pela imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina E (IgE), e imunoglobulina M (IgM) (ECKERSALL, 2008). A imunoglobulina D (IgD), é uma imunoglobulina raramente encontrada nos fluidos corpóreos e pode não ser encontrada em todos os mamíferos (TIZARD, 2002). A IgG é a imunoglobulina presente em maior concentração no soro é a principal responsável por mediar a defesa por anticorpos. Por ser a menor molécula de imunoglobulina, ela possui facilidade para ultrapassar os vasos e chegar nos tecidos inflamados. Ela atua na defesa dos fluidos teciduais e nas superfícies corpóreas, se ligando a antígenos estranhos. A IgM é a segunda maior em concentração no soro e por ser uma molécula grande, esta permanece na corrente sanguínea. É a principal classe de imunoglobulina produzida na resposta imune primária. A IgA é a principal imunoglobulina presente nos não ruminantes, sua função principal é impedir a aderência de antígenos às superfícies corpóreas. A IgE é encontrada em concentração extremamente baixa no soro, ela media as reações de hipersensibilidade do tipo I e é responsável em grande parte na imunidade contra parasitas (TIZARD, 2002).

2.3 Eletroforese de proteínas

O princípio da eletroforese é baseado no movimento de moléculas de proteínas através de uma solução sob influência de um campo elétrico. A migração das proteínas depende de seu tamanho, carga elétrica, composição iônica do tampão e força do campo elétrico. Moléculas com carga negativa avançam em direção ao ânodo (eletrodo positivo), quando uma corrente elétrica é transmitida através da solução. Já moléculas com carga positiva migram em direção ao cátodo (eletrodo negativo) (ECKERSALL, 2008).

A utilização do soro é preferível em relação ao plasma, uma vez que o soro não contém o fibrinogênio (LASSEN & WEISER, 2007). A metodologia descrita por Tiselius, em 1937, sofreu inúmeras modificações com o passar dos anos. A maioria dos métodos utilizados para eletroforese necessita inicialmente da determinação da proteína sérica total. Diferentes metodologias podem ser utilizadas para a determinação das proteínas totais séricas, como por

exemplo: reação de biureto, refratometria, precipitação e química sensível. O método da reação de biureto é altamente preciso para a determinação das proteínas em amostras de soro que possuem concentração entre 1-10g/dL de proteína, sendo pouco sensível para a determinação das amostras em líquidos de cavidades corporais, onde a concentração é menor, por exemplo, no líquido cefalorraquidiano (ECKERSALL, 2008). De forma mais simples, a fração globulina pode ser estimada se a proteína total e a concentração de albumina forem conhecidas. A concentração de globulina é a diferença entre as concentrações de proteína total e albumina (LASSEN, 2007).

A principal diferença entre os métodos de fracionamento de proteínas é o material utilizado como suporte (ECKERSALL, 2008). O número de frações obtidas através da técnica de eletroforese varia em função da espécie e do tipo de suporte utilizado, uma vez que as frações albumina, alfa, beta e gamaglobulinas podem ser obtidas em amostras de todas as espécies e em todos os tipos de suporte (LASSEN & WEISER, 2007). Dentre os meios disponíveis para o fracionamento de proteínas nos laboratórios clínicos, pode-se citar eletroforese em acetato de celulose e em agarose. A eletroforese em agarose apresenta melhores resultados, entretanto, possui custo elevado e complexidade de preparação. Já, em acetato de celulose a técnica é mais acessível e possui maior facilidade operacional. Ambos os meios permitem que as proteínas com peso molecular acima de 10^6 daltons se movam livremente de acordo com sua carga elétrica. Num processo eletroforético, nem sempre o tempo de corrida, descrito na técnica original, é suficiente para um fracionamento eficaz. Nesse caso, o alongamento da corrida deve ser feito gradualmente (NAOUM, 1999).

Para a realização do fracionamento eletroforético, uma pequena quantidade de soro é colocada em um local específico na matriz de separação. As matrizes de acetato de celulose apresentam-se na forma de folhas ou lâminas, as quais são colocadas em uma solução tampão antes do uso. O tampão estabelece o pH no qual ocorre o processo. Na cuba de eletroforese, as duas extremidades da matriz de separação devem estar em contato com a solução tampão em compartimentos adjacentes (Figura 3). No compartimento de uma das extremidades, há um cátodo (carga negativa) e na outra um ânodo (carga positiva). Em geral, a amostra de soro é aplicada na extremidade próxima ao cátodo, porque a maior parte das proteínas tem carga negativa e migra em direção ao ânodo. Quando se aplica uma corrente elétrica a esse sistema, as proteínas migram em direção ao ânodo ou ao cátodo (NAOUM, 1999; LASSEN & WEISER, 2007).

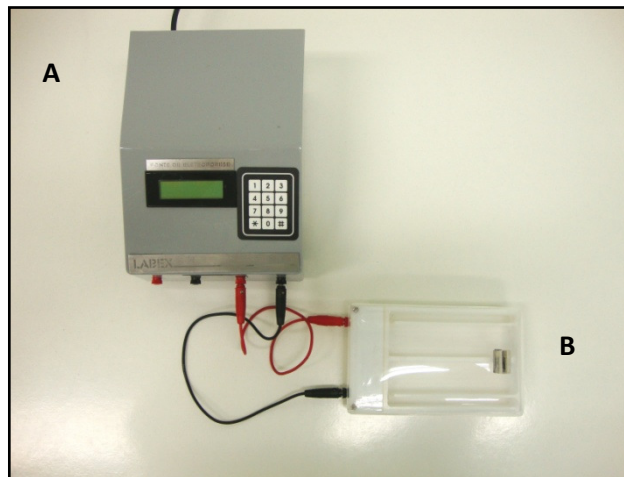


Figura 3. Sistema de eletroforese para fracionamento de proteínas. (A) Fonte e (B) cuba.

Após o fracionamento eletroforético, as frações protéicas são identificadas através do auxílio de uma coloração. Diferentes tipos de corantes podem ser empregados para a coloração das fitas, como o Ponceau, o negro de amido, o azul de bromofenol e o azul brilhante de Coomassie (Figura 4). Por meio da densitometria, é possível determinar quantitativamente as frações através de um traçado gráfico das proteínas e o cálculo das respectivas percentagens, tendo conhecimento prévio da concentração da proteína total sérica, o valor absoluto é calculado por um microprocessador instalado no aparelho (LASSEN & WEISER, 2007).

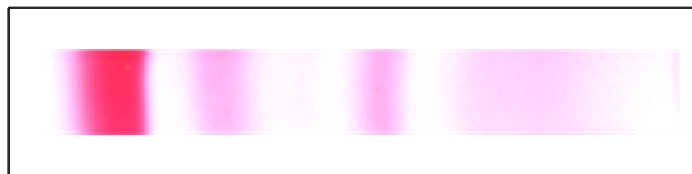


Figura 4. Proteínas separadas em bandas eletroforéticas, por meio de fitas de acetato de celulose e coradas com corante Ponceau.

Dessa forma, o método de eletroforese é considerado padrão para o fracionamento de proteínas, sendo considerado um exame auxiliar, importante na bioquímica clínica, representando um dos métodos mais confiáveis de identificação das proteínas sanguíneas (ECKERSALL, 2008).

3. MANUSCRITO

Os resultados do trabalho desenvolvido durante o período de Residência Médico-Veterinária serão apresentados na forma de um artigo, seguindo as normas da Revista Ciência Rural, para a qual será submetido.

3.1 Influência da faixa etária no proteinograma de búfalos (*Bubalus bubalis*)

Autores: Raqueli Teresinha França, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes, Márcio Machado Costa, Danieli Brolo Martins, Guilherme Lopes Dornelles, Francine Chimelo Paim.

Influência da faixa etária no proteinograma de búfalos (*Bubalus bubalis*)

Influence of age on the proteinogram of buffalo (*Bubalus bubalis*)

Raquel Teresinha França^{I*}, Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^{II}, Márcio Machado Costa^I, Danieli Brolo Martins^I, Guilherme Lopes Dornelles^I, Francine Chimelo Paim^I

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar o proteinograma de búfalos de diferentes faixas etárias criados em sistema extensivo na região central do Rio Grande do Sul. Utilizaram-se 45 búfalos, separados em três grupos: grupo 1 (n=15), animais com seis meses de idade; grupo 2 (n=16), animais com doze meses de idade e grupo 3 (n=14), animais com vinte e quatro meses de idade. Verificou-se diferenças significativas entre os grupos nas seguintes frações protéicas: proteína total sérica; betaglobulina; gamaglobulina e na relação albumina:globulinas. Os resultados encontrados indicam que existem variações conforme a idade do animal. Anormalidades encontradas no proteinograma, muitas vezes, não estão relacionadas com condições de doença, mas sim, com variações fisiológicas que são relativamente constantes. Dessa forma, é necessário que os médicos veterinários tenham conhecimento sobre a influência da faixa etária nos animais que estão trabalhando.

Palavras-chave: eletroforese, proteínas, bubalinos, idade.

^I Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, Brasil. E-mail: raquelifranca@yahoo.com.br. *Autor para correspondência.

^{II} Departamento de Clínica de Pequenos Animais (UFSM), RS, Brasil.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the proteinogram of buffaloes of different ages reared in extensive systems in Rio Grande do Sul, 45 buffaloes were used, divided into three groups: group 1 (n = 15), six months old animals; group 2 (n = 16), twelve months old animals and group 3 (n = 14), twenty-four months old animals. Significant differences were verified between groups in the following protein fractions: total serum protein, beta globulin, gamma globulin and albumin: globulin. The results indicate that there are some variations according to the analyzed age. Abnormalities found in the protein profile, sometimes, are not related to disease conditions, but with physiological variations that are relatively constant. Thus, it is necessary that the veterinarians know about the age influence in animals that are working.

Key words: electrophoresis, protein, buffaloes, age.

INTRODUÇÃO

O búfalo (*Bubalus bubalis*) é um ruminante oriundo da Ásia que, na atualidade, está presente na Europa, Austrália, África e América. No Brasil, o rebanho oficial de búfalos é de três milhões, distribuídos em diversos estados brasileiros (BORGHESE & MAZZI, 2005). Pode ser considerado um animal de múltiplo propósito, devido a sua capacidade de produzir carne, leite e trabalho. Esse animais possuem alta resistência às enfermidades e habilidade de adaptar-se em diferentes condições climáticas (FERNÁNDEZ et al., 2005). O rebanho brasileiro vem crescendo significativamente. Por tudo isto, é de suma importância o conhecimento das respostas fisiológicas para que se possa reconhecer as alterações patológicas.

A interpretação dos constituintes bioquímicos dos animais é dependente da disponibilidade do conhecimento das variações existentes nas diferentes espécies

(BATAVANI et al., 2006). O proteinograma é um exame auxiliar importante na bioquímica clínica e representa um dos métodos mais confiáveis de identificação das proteínas sanguíneas (FAGLIARI & SILVA, 2002). As técnicas de eletroforese mais utilizadas em medicina veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose, filmes de agarose e gel de poliacrilamida. (FAGLIARI et al., 2006; ECKERSALL, 2008).

Muitas vezes, anormalidades encontradas no proteinograma, não estão relacionadas com condições de doença, mas sim, com variações fisiológicas e individuais que são relativamente constantes. Fatores como idade, estágios de desenvolvimento, raça, hormônios, prenhes, lactação, nutrição, estresse e perda de líquido estão diretamente ligados às alterações no proteinograma. Dentro das globulinas, existem inúmeras proteínas de fase aguda que estão relacionadas a diversos processos que ocorrem no organismo dos animais. Assim, o conhecimento das proteínas que compõem essas frações é de fundamental importância para a compreensão de alguns processos patológicos e fisiológicos que ocorrem no organismo (MURATA et al., 2003; ECKERSALL, 2008).

Hoje em dia, a bubalinocultura é uma atividade em expansão no continente americano. Um dos motivos para a ocorrência deste fato é a capacidade que esses animais possuem de converter fibra em energia (BORGHESE & MAZZI, 2005). Assim, faz-se necessário o conhecimento sobre o proteinograma de búfalos saudáveis de diferentes idades, para posterior comparação com possíveis processos patológicos que esses animais possam desenvolver durante sua vida. Como são escassos os estudos sobre proteinograma de búfalos criados em sistema extensivo no Brasil, este trabalho tem como objetivo avaliar a influência da faixa etária sobre o proteinograma em búfalos hígdos com seis, doze e vinte e quatro meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 45 búfalos mestiços, criados em sistema extensivo na região central do Rio Grande do Sul. Exames clínicos foram realizados previamente a coleta a fim de se constatar a higidez dos animais. Os bubalinos foram divididos em três grupos de acordo com a idade, de ambos os sexos, sendo: grupo 1 (G1) animais com seis meses de idade (n=15); grupo 2 (G2) animais com doze meses de idade (n=16) e grupo 3 (G3) animais com vinte e quatro meses de idade (n=14).

De cada animal, foram coletados 10 mL de sangue por punção da jugular, com tubo a vácuo, sem anticoagulante, para determinação da proteína total sérica e da eletroforese de proteínas. As amostras foram armazenadas em caixa térmica e imediatamente encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Universidade Federal de Santa Maria (LACVET-UFSM). Para promover a separação do soro, o sangue foi centrifugado a 3.000r.p.m., por 10 minutos, acondicionado em microtubo plástico e congelado em -20°C para posterior processamento.

A proteína total sérica foi determinada pelo método de biureto utilizando-se reagente comercial Labtest®, e as análises realizadas em espectrofotômetro semi-automático BioPlus® (Bio-2000®), de acordo com as instruções do fabricante. O fracionamento das proteínas séricas foi realizado através da eletroforese, utilizando-se fitas de acetato de celulose Celugell (Labex®) e cuba horizontal (Labex®), com solução tampão tris-glicina pH 8,6 (Labex®). As amostras foram aplicadas sobre a fita e, após o fechamento da cuba, foi aplicada voltagem constante de 200 volts por 15 minutos.

Após a realização da corrida eletroforética, as fitas foram retiradas da cuba e colocadas no corante Ponceau por 15 minutos. A descoloração das fitas foi realizada através de um decolorante composto por ácido acético (5%), até que as mesmas ficassem completamente claras. Após a descoloração, as fitas foram mergulhadas em metanol por 30 segundos, para a fixação do material. Por fim, as fitas foram mergulhadas no transparentizador por 1 minuto,

distendidas sobre uma lâmina de vidro e colocadas em estufa pré-aquecida (60°C) até ficarem transparentes (NAOUM, 1999). A leitura das bandas foi realizada pelo sistema Denscan, por meio do escaneamento da fita.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e esses apresentaram distribuição normal. Desse modo, foi realizada a análise de variância (ANOVA), seguida de comparação de médias pelo teste de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes com uma probabilidade (p) menor que 5%.

RESULTADOS

Neste estudo, a eletroforese das proteínas séricas realizada em fitas de acetato de celulose resultou na separação de quatro bandas distintas: albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina (Figura 1). Os resultados encontrados no proteinograma sérico de búfalos de diferentes faixas etárias estão apresentados na Figura 2.

Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada nas proteínas totais séricas e diferença altamente significativa ($p < 0,01$) foram observadas entre as frações beta globulina, gama globulina, bem como na relação albumina:globulina. Foram observados valores estatisticamente superiores para a proteína total sérica nos animais pertencentes ao G3 em relação ao G1 e G2. A fração beta globulina apresentou valores superiores nos animais pertencentes ao G1 e G3 em relação ao G2. A gama globulina apresentou valores inferiores nos animais do G1 em relação ao G2 e G3. A relação albumina:globulina foi superior nos animais pertencentes ao G1 em relação ao G2 e G3. Nos demais parâmetros analisados, não foi observada diferença estatística entre os grupos.

DISCUSSÃO

A idade é uma consideração importante na interpretação das proteínas séricas. A maioria dos valores observados nos animais jovens difere dos animais adultos porque estes parâmetros mudam com o avanço da idade (PICCIONE et al., 2009). Satija et al. (1979) conseguiram obter o fracionamento protéico utilizando papel de eletroforese em bovinos e bubalinos. Saleh et al. (2008), avaliando o proteinograma sérico de bubalinos utilizaram fitas de acetato de celulose e também observaram o mesmo fracionamento, constituindo de quatro frações (albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina). O presente estudo está de acordo com ambas as pesquisas.

Batavani et al. (2006) citam que em algumas espécies como humanos, ovinos, caprinos e cobaias, a albumina predomina sobre as globulinas. Já para equinos e bovinos, a relação albumina:globulinas é quase igual, ou as globulinas tendem a predominar. Contudo, neste trabalho, pode-se observar que em bubalinos, as globulinas predominaram sobre a albumina (Figura 2F).

Com o avanço da idade, ocorre aumento significativo na proteína total sérica (ECKERSALL, 2008), o que pôde ser verificado nesta pesquisa. Nos animais do G3, foi observado aumento na concentração de proteína total sérica com diferença significativa em relação aos animais do G1 e G2 (Figura 2A). Assim, pode-se atribuir o aumento na concentração de proteína total sérica ao aumento da fração gama globulina. Piccione et al. (2009) citam que em bezerros neonatos, as variações observadas em algumas frações não foram suficientes para alterar a concentração de proteínas. Contudo, em estudo realizado por Batavani et al. (2006), que avaliaram ovelhas gestantes, observou-se que a concentração de proteína total sérica diminuiu com a proximidade do parto, indicando, com isso, a importância da avaliação das proteínas totais séricas nas diferentes fases da vida nas distintas espécies. Eckersall (2008) cita que, com o avanço da idade, a proteína total sérica tende a aumentar,

resultando em pequeno decréscimo na albumina, com aumento progressivo nas globulinas. Contudo, neste estudo não foi observada diferença estatisticamente significativa na albumina entre os grupos. Embora nos animais desse estudo tenha sido observada uma tendência ao decréscimo na concentração da albumina nos grupos G2 e G3 (Figura 2B).

Dentre as proteínas que compõe a fração alfa globulina podem ser citadas: alfa₁-glicoproteína ácida, soro amilóide A, haptoglobina, ceruloplasmina e alfa₂-macroglobulina (ECKERSALL, 2008). Essas proteínas são consideradas de fase aguda positiva e sua concentração aumenta rapidamente em resposta a estimulação antigênica e traumática em bovinos (MURATA et al., 2004). Em estudo realizado por Saleh et al. (2008) foi observado uma elevação dessa fração em resposta a estimulação antigênica em búfalos, semelhante a encontrada em bovinos. Entretanto, nesse estudo não foi observada diferença estatística nos diferentes grupos avaliados, indicando não haver influência da faixa etária nessa fração (Figura 2C).

As proteínas que compõe a fração beta globulina são: lipoproteína, transferrina, ferritina, hemopexina, complemento C3, proteína C-reativa, complemento C4, plasminogênio e fibrinogênio (ECKERSALL, 2008). Batavani, et al. (2006) observaram diminuição na fração beta em ovelhas no final da gestação. Piccione et al. (2009) não observaram variação nessa fração em bezerros neonatos. Em estudo realizado por Leal et al. (2003), foi observada variação na fração beta globulina em bezerros da raça holandesa avaliados durante o nascimento até os 30 dias de vida. Variação semelhante foi observada nessa fração nos bubalinos deste estudo (Figura 2D).

As proteínas que compõe a fração gama globulina são as imunoglobulinas IgG, IgA, IgE e IgM. Neste estudo, pode-se observar elevação na concentração de gama globulina nos animais do G2 e G3 em relação ao G1 (Figura 2E). Eckersall (2008) reporta que em potros do nascimento aos doze meses de idade, ocorre um aumento gradual nas imunoglobulinas.

Alterações semelhantes foram observadas nos animais deste estudo, com um aumento na fração gamaglobulina no G2 e posterior estabilização dessa fração no G3. Em geral, com a mudança de faixa etária ocorre um aumento na concentração de gamaglobulina, devido à maior exposição do organismo a patógenos como bactérias, vírus, fungos e parasitas (ECKERSALL, 2008).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem afirmar que, com exceção da fração albumina e alfa globulina, todos os demais componentes do proteinograma apresentaram influência da faixa etária.

FONTES DE AQUISIÇÃO

Bio 2000® – Bioplus Produtos para Laboratórios Ltda. Estrada Dr. Cícero Borges de Moraes, 1.70106407-000. Barueri – SP.

Labtest® – Labtest Diagnóstica S/A. Rua Paulo Ferreira Costa, 600. Vista Alegre, Lagoa Santos – MG.

Labex® – Labex S/A Indústria e Comércio. Rua V-8, s/n qd 10 lt 1, Aparecida de Goiânia – GO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATAVANI, et al. Concentrations of serum total protein and protein fractions during diestrus and pregnancy in Makuii ewes. **Comparative Clinical Pathology**, v.15, p.227-230, 2006.
- BORGHESE, A. & MAZZI, M. Buffalo Population and Strategies in the World. In: BORGHESE, A. **Buffalo Production and Research**. Rome, FAO, 2005. Cap.1, p.1-43.
- ECKERSALL, P.D. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6. ed. California: Elsevier, 2008. Cap.5, p. 117-156.
- FAGLIARI, J. J. et al. Proteinograma sérico de bezerras recém-nascidos da raça Holandesa obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.450-453, 2006.
- FAGLIARI J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte**, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.
- FERNÁNDEZ, A. H. et al. Determinación de valores de referencia hematológicos em búfalas (*Bubalus bubalis*) parto y postparto em uma unidade de producción em El sur Del lago de Maracaíbo, Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 15, p.119-124, 2005.
- LEAL, M. L. R. et al. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.40, p. 138-145, 2003.
- MURATA, H. et al. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 28-40, 2004.
- NAOUM, P. C. Proteínas plasmáticas. In: NAUM, P.C. Eletroforese – técnicas e diagnóstico. 2.ed. São Paulo: Santos, 1999. Cap. 2, p. 13-38.

PICCIONE, G. et al. Influence of age on profile of serum proteins in the calf. **Acta Veterinaria(Beograd)**,v.59,n.4,p.413-422,2009.

SALEH, et al. Comparison of blood serum proteins in water buffaloes with traumatic reticuloperitonitis and sequellae. **Research in Veterinary Science**, v.85, p.208-213, 2008.

SATIJA, et al. Electrophoresis of buffalo (*Bos Bubalis*) serum proteins including immunoglobulins. **Infection and immunity**, v.24, p. 567-570, 1979.

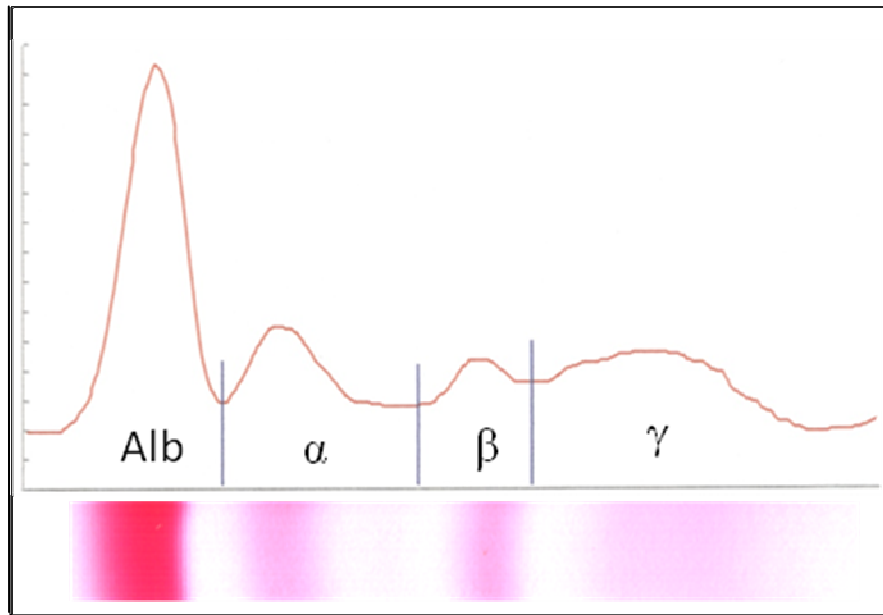


Figura 1. Traçado eletroforético de um animal com doze meses de idade, demonstrando o fracionamento protéico em quatro frações: albumina (Alb); alfa globulina (α); beta globulina (β); e gama globulina (γ).

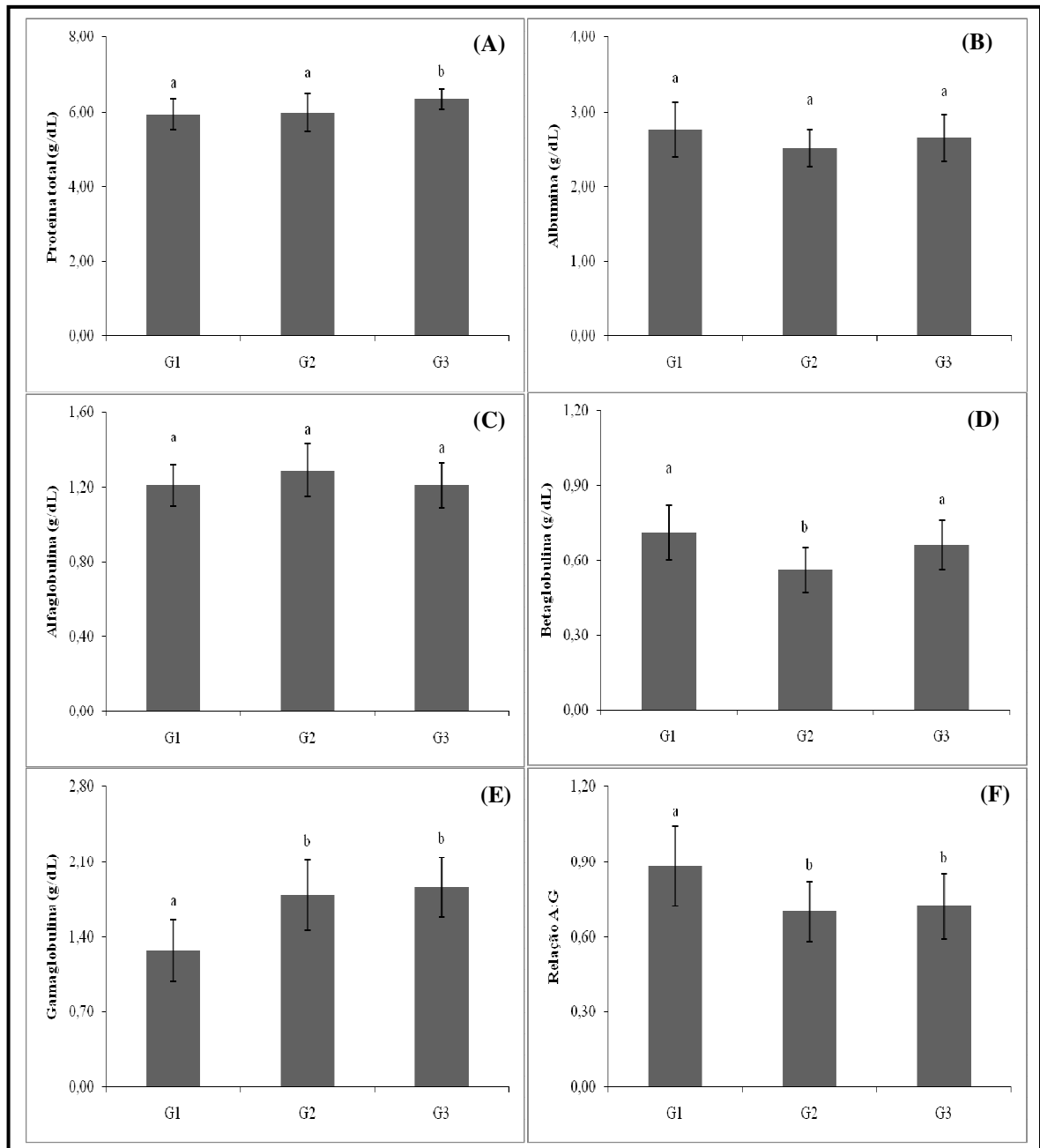


Figura 2. Influência da faixa etária na proteína total sérica (A), albumina (B), alfaglobulina (C), betaglobulina (D), gamaglobulina (D) e na relação albumina:globulina de búfalos com seis meses (G1), doze meses (G2) e vinte e quatro meses (G3). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos, com probabilidade menor que 5% (ANOVA, teste de Tukey).

4. CONCLUSÃO

Atualmente a bubalinocultura é uma atividade em expansão, em especial na região sul do Brasil. Cada vez mais, torna-se necessário o conhecimento de testes que possam auxiliar os médicos veterinários nas patologias que afetam esses animais. As alterações encontradas no proteinograma nem sempre estão associadas com processos patológicos, variações fisiológicas são constantes. Assim, com este trabalho, pôde-se verificar que diferença na faixa etária promove mudança na proteína total sérica, na betaglobulina, na gamaglobulina e na relação albumina:globulina de bubalinos.

5. REFERÊNCIAS

BATAVANI, et al. Concentrations of serum total protein and protein fractions during diestrus and pregnancy in Makuii ewes. **Comparative Clinical Pathology**, v. 15, p. 227- 230, 2006.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. Buffalo Population and Strategies in the World. In: BORGHESE, A. **Buffalo Production and Research-FAO**. Rome, 2005, p. 1-40. Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/010/ah847e/ah847e00.htm>>. Acesso em: 02 abr. 2010.

DAMÉ, M. C. F; SILVA, W. P. Observações preliminares sobre a Produção de Leite Bupalino no Rio Grande do Sul. Pelotas: **Embrapa**, 2003. Disponível em: <<http://www.ascribu.com.br/artigos/embrapa.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2010.

ECKERSALL, P. D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6.ed. San Diego: Academic Press, 2008. Cap. 5, p. 117-148.

FERNÁNDEZ, A. H. et al. Determinación de valores de referencia hematológicos em búfalas (*Bubalus bubalis*) parto y postparto em uma unidade de producción em El sur Del lago de Maracaíbo, Venezuela. **Revista Científica FCV-LUZ**, v. 15, p. 119-124, 2005.

LASSEN, E. D.; WEISER, G. Tecnologia laboratorial em medicina veterinária. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 1, p. 3-36.

LASSEN, E. D. Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sangüíneo. In: THRALL, M.A. et al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. Cap. 26, p. 376-387.

LEAL, M. L. R. et al. Proteinograma sérico de bezerras sadias, da raça holandesa, no primeiro mês pós-nascimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 138-145, 2003.

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

NAOUM, P. C. Proteínas plasmáticas. In: NAOUM, P.C. **Eletroforese – técnicas e diagnóstico**. 2. ed. São Paulo: Santos, 1999. Cap. 2, p. 13-38.

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

PICCIONE, G. et al. Influence of age on profile of serum proteins in the calf. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 59, n. 4, p. 413-422, 2009.

RAMÍREZ-IGLESIA, L. N. et al. Hematología em Búfalas Lecheras Mestizas (*Bubalus Bubalis*) y sus crias en un Rebaño Ubicado en uma zona de Bosque seco tropical. **Mundo Pecuario**, v. 3, p. 90 -95, 2007.

RUSSEL, K. E.; ROUSSEL, A. J. Evaluation of the Ruminant Serum Chemistry Profile. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v. 23, p. 403-426, 2007.

STEPHENSON, R. B. Visão geral da função cardiovascular. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3. ed. 2004. Cap. 17, p. 117 -130.

TIZARD, I. R. Anticorpos: Formas solúveis de BCR. In: _____ **Imunologia Veterinária. Uma Introdução**. São Paulo: Roca, 6 ed. 2002. Cap. 13, p. 154-164.

WERNER, L. L.; TURNWALD, G. H. Immunologic and plasma protein disorders. In: WILLARD, M. D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. 3. ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1999. Cap. 12, p. 248-264.