JOÃO PAULO ELSÉN SAUT

**Influência do puerpério e da retenção dos anexos
fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça
Holandesa, criadas no Estado de São Paulo**

São Paulo
2008

JOÃO PAULO ELSEN SAUT

**Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no
proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa,
criadas no Estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Clínica Médica

Área de concentração:

Clínica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1964
FMVZ

Saut, João Paulo Elsen

Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo / João Paulo Elsen Saut. – São Paulo: J. P. E. Saut, 2008.
116 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Clínica Médica.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Junior.

1. Proteinograma. 2. Proteínas. 3. Bovinos. 4. Puerpério. 5. Retenção dos anexos fetais. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa", protocolado sob o nº993/2006, utilizando 30 (trinta) bovinos, sob a responsabilidade da Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Influence of puerperium and retained fetal membranes on the serum proteins of Holstein cows", protocol number 993/2006, utilizing 30 (thirty) bovines, under the responsibility of Prof. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 18 de outubro de 2006

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SAUT, João Paulo Elsen

Título: Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradecer é reconhecer que alguém, em determinado instante da vida, foi essencial para que algo se concretizasse.

A Deus por me abençoar em todos os momentos.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos, pelo amor e dedicação.

A Betina Metzger, uma mulher linda e que faz com que os dias nunca sejam os mesmos ao seu lado, sempre com um dom especial de alegrar e tornar tudo possível.

Ao Dr. Eduardo Harry Birgel Junior, por ser grande educador, amigo e orientador da residência, mestrado e doutorado.

Ao Dr. Jurandir Fagliari e toda sua equipe de trabalho, um grupo forte, competente e dinâmico.

Aos companheiros e amigos Alexandre e Ewaldo que sempre estiveram presentes e dispostos a ajudar em qualquer momento.

A minhas grandes amigas Samantha, Clara e Carolina por todos os conselhos, orientações e ajudas a qualquer hora.

A Flavia Maluf que sempre me ajudou a crescer e mostrar o caminho certo.

Aos professores do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por participar de forma determinante em minha formação profissional e pessoal.

Ao Dr. Larsson por sua autoridade, liderança e inteligência sempre muito bem administradas e com muita responsabilidade.

A Adelaide que sempre está disposta a ouvir, dar conselhos e ajudar os seus amigos e pós-graduandos.

Ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP do Campus de Pirassununga e todos os seus funcionários, ótimos profissionais e amigos.

Ao Dr. Ubiraem Mário Schalch, por ter sido supervisor no estágio curricular, um grande amigo e profissional de enorme coração.

Aos grandes amigos Barreto, Humberto, Carlos Eduardo, Rodrigo, Mateus, Flávio que estiveram sempre presentes e apenas deixaram boas lembranças durante esse doutorado.

As grandes e fiéis amigas, ilustres profissionais, Eliza, Raquel e Mariana.

Aos pós-graduandos Fabio, Regiane, Daniela, Bruno, Cristiane, Mônica, Andréa, Ana Paula, Marcelo, Fernanda, Ana Guiomar, Tio Chico, Huber, Fernando, Patrícia, Frederico, Cristiane pelo agradável convívio durante esses anos.

Ao time de Handebol da veterinária, um grupo que se mantém unido pela amizade, alegria e prazer de jogar.

Aos diversos colegas que ajudaram na confecção desta dissertação de maneira incisiva.

Aos funcionários da Clínica de Bovinos: Edson, Elias, Francisco e Luiz; da secretaria do Departamento: Cida.

As técnicas dos laboratórios de pesquisa e de rotina do Departamento de Clínica Médica que sempre estão dispostas a ajudar e que são as grandes responsáveis por tornar os seus laboratórios um ambiente agradável de trabalho.

Aos funcionários da biblioteca que sempre foram prestativos e atenciosos.

A todos os proprietários das Fazendas que cederam o espaço e animais para a confecção da dissertação.

À Universidade Estadual de Londrina que sempre apoiou e incentivou nesse período entre Universidade e Doutorado.

Ao CNPQ e FAPESP que financiaram o projeto de pesquisa e a bolsa de doutorando

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho original”*

(Albert Einstein)

RESUMO

SAUT, J. P. E. **Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo.** [Influence of puerperium and retained fetal membranes on the proteinogram of Holstein cows raised in the State of São Paulo]. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Com o objetivo de avaliar a influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, foram colhidas 291 amostras de sangue de vacas nos primeiros 90 dias após o parto. Para estudo do puerpério fisiológico, foram colhidas amostras de sangue de 162 fêmeas bovinas clinicamente sadias, divididas em 9 grupos experimentais, 0 –| 1º dia; 1º –| 2º dia; 2º –| 4º dia; 4º –| 6º dia; 6º –| 8º dia; 8º –| 15º dia; 15º –| 30º dia; 30º –| 60º dia; e, 60º –| 90º dia pós-parto. Para avaliar a influência da retenção dos anexos fetais, foram colhidas 129 amostras de soro sanguíneo de vacas da raça Holandesa que retiveram os anexos fetais, divididas em 8 grupos experimentais, 1º –| 2º dia; 2º –| 4º dia; 4º –| 6º dia; 6º –| 8º dia; 8º –| 15º dia; 15º –| 30º dia; 30º –| 60º dia; e, 60º –| 90º dia pós-parto. Os teores séricos de proteínas totais foram determinados pela técnica de Biureto e o fracionamento das proteínas foi realizado por eletroforese em fita de acetato de celulose e eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Os resultados permitem concluir que ocorreu um aumento significativo das proteínas de fase aguda tanto nos animais com puerpério fisiológico quanto nos animais com retenção dos anexos fetais. As proteínas haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida responderam ao estímulo do parto e à contaminação bacteriana pós-parto nos animais com puerpério fisiológico; e nos animais com retenção dos anexos fetais, responderam de forma significativa ao estímulo da contaminação bacteriana pós-parto e da retenção dos anexos fetais prolongando o tempo de resposta das proteínas. A glicoproteína ácida representou mais evidentemente o quadro de inflamação aguda induzida pela retenção dos anexos fetais. Nos animais com retenção dos anexos fetais, a proteína albumina comportou-se como proteína de fase aguda negativa, provavelmente pela interferência de vários fatores, como distúrbios hepáticos ou metabólicos; desvio de

sua síntese hepática para a produção de outras proteínas; e inflamação, infecção e absorção de toxinas bacterianas. A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, com tampão de aplicação com agente redutor, não é indicada para o estudo do comportamento das proteínas albumina e imunoglobulinas. Pela técnica de eletroforese em fita de acetato de celulose demonstrou-se que o puerpério não alterou de forma significativa a concentração de albumina, mas alterou significativamente as frações alfa, beta e gamaglobulinas.

Palavras-chave: Proteinograma. Proteínas. Bovinos. Puerpério. Retenção dos anexos fetais

ABSTRACT

SAUT, J. P. E. **Influence of puerperium and retained fetal membranes on the proteinogram of Holstein cows raised in the State of São Paulo.** [Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo]. 2008. 116 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The aim of this study was to evaluate the influence of the puerperal period and retained fetal membranes on the proteinogram of Holstein cows. Two hundred ninety one blood samples were collected from cows through ninety days postpartum. In order to study the physiologic puerperium, blood samples from one hundred two clinically animals, divided in 9 experimental groups, following the chronogram, 0 –| 1° day; 1° –| 2° day; 2° –| 4° day; 4° –| 6° day; 6° –| 8° day; 8° –| 15° day; 15° –| 30° day; 30° –| 60° day; and, 60° –| 90° day postpartum were analyzed. To evaluate the fetal membranes retention influence, one hundred twenty nine blood samples from Holstein cows with this clinical condition, in moments 1° –| 2° day; 2° –| 4° day; 4° –| 6° day; 6° –| 8° day; 8° –| 15° day; 15° –| 30° day; 30° –| 60° day; and, 60° –| 90° day postpartum were also analyzed and divided in 8 experimental groups. Total proteins concentration was determined by the Biuret method and protein electrophoresis were performed in acetate cellulose and in sodium dodecyl sulfate polyacrilamide gel (SDS-PAGE). The results showed a significant elevation in acute phase proteins in both conditions, physiologic puerperium and retained fetal membranes. Haptoglobin, ceruloplasmin and acid glycoprotein were increased in the partum stimuli and postpartum bacterial contamination in animals with physiologic puerperium. In the retained fetal membranes animals, those proteins significantly responded to the postpartum bacterial contamination stimuli and retained fetal membranes, rising the proteins response time. The acid glycoprotein concentration evidenced an acute inflammation induced by retained fetal membranes. In the animals with this condition, albumin behaved as negative acute phase protein, probably by several factors like hepatic or metabolic disturbance, deviation of the hepatic synthesis secondary to other proteins production, and bacterial toxins absorption, inflammation and infection. Sodium dodecyl sulfate polyacrilamide 10% gel (SDS-PAGE) electrophoresis with

reducing sample application buffer, is not indicated for albumin and immunoglobulins behavior study. Acetate cellulose electrophoresis showed that physiologic puerperium did not influenced albumin concentration, but significantly did with alfa, beta and gammaglobulins.

Key words: Proteinogram. Proteins. Bovine. Puerperium. Retained fetal membranes.

LISTA DE QUADROS

- Quadro 3.1** - Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência da retenção dos anexos fetais sobre os constituintes do hemograma de vacas da raça Holandesa - São Paulo – 2003..... 46
- Quadro 3.2** - Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência da retenção dos anexos fetais sobre os constituintes do hemograma de vacas da raça Holandesa - São Paulo – 2003..... 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	- Valores de referência do proteinograma de bovinos criados no Estado de São Paulo.....	33
Tabela 2.2	- Taxa de detecção de haptoglobina, proteína sérica e α_1 -glicoproteína sérica em vacas no periparto.....	36
Tabela 2.3	- Valores do proteinograma do soro sangüíneo de vacas da raça Holandesa no momento do parto, puerpério (9 e 30 dias) e pós-parto (180 dias).....	38
Tabela 2.4	- Teores séricos médios e desvio-padrão dos constituintes do proteinograma, no terço final de gestação e momento do parto, de bovinos da raça Holandesa, criados no Estado de São Paulo.....	39
Tabela 2.5	- Teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação Albumina/globulinas de vacas com (RAF) e sem (NRAF) retenção dos anexos fetais, colhidos nos momentos -15, -5, 0, +3 e +5 dias pós-parto.....	43
Tabela 4.1	- Influência do puerpério nos teores séricos de proteína total de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	55
Tabela 4.2	- Influência do puerpério nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008....	57
Tabela 4.3	- Influência do puerpério nos teores séricos de α -globulina (obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	58
Tabela 4.4	- Influência do puerpério nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008....	60
Tabela 4.5	- Influência do puerpério nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008....	61
Tabela 4.6	- Influência do puerpério na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	62

Tabela 4.7 -	Influência do puerpério nos teores séricos de imunoglobulinas (Ig cadeia leve e Ig cadeia pesada) e hemopexina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	68
Tabela 4.8 -	Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	71
Tabela 4.9 -	Influência do puerpério nos teores séricos das frações protéicas não identificadas (pesos moleculares de 187 KDa, 163 KDa, 144 KDa, 133 KDa, 107 KDa, 95 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 34 KDa, 33 KDa, 31 KDa, 25 KDa, 23 KDa) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	77
Tabela 4.10 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de proteína total de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	80
Tabela 4.11 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	83
Tabela 4.12 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	85
Tabela 4.13 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	86
Tabela 4.14 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	89
Tabela 4.15 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	90
Tabela 4.16 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das imunoglobulinas (Ig cadeia leve e Ig cadeia pesada) e hemopexina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	94

Tabela 4.17 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	97
Tabela 4.18 -	Influência do puerpério e da fase pós-puerperal nos teores séricos das frações protéicas não identificadas (pesos moleculares de 187 KDa, 163 KDa, 144 KDa, 133 KDa, 107 KDa, 95 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 34 KDa, 33 KDa, 31 KDa, 25 KDa, 23 KDa) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	-	Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando marcador padrão de pesos moleculares da marca Invitrogen, com bandas entre 10 kDa e 220 kDa.....	51
Figura 3.2	-	Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%.....	52
Figura 4.1	-	Influência do puerpério nos teores séricos de proteína total de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	55
Figura 4.2	-	Influência do puerpério nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	57
Figura 4.3	-	Influência do puerpério nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	58
Figura 4.4	-	Influência do puerpério nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	60
Figura 4.5	-	Influência do puerpério nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	61
Figura 4.6	-	Influência do puerpério nos teores séricos da relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	63
Figura 4.7	-	Influência do puerpério nos teores séricos das imunoglobulinas de cadeia pesada (53 KDa) e cadeia leve (28 KDa) (obtidos pela técnica de eletroforese gel de poliacrilamida SDS PAGE) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	65
Figura 4.8	-	Teores séricos de albumina avaliados através da eletroforese em fita de acetato de celulose e em gel de poliacrilamida, segundo a influência do puerpério em vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	66

Figura 4.9 -	Influência do puerpério nos teores séricos de transferrina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	70
Figura 4.10 -	Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	76
Figura 4.11 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de proteína total de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	80
Figura 4.12 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	83
Figura 4.13 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	85
Figura 4.14 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	86
Figura 4.15 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	89
Figura 4.16 -	Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.....	90
Figura 4.17 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das imunoglobulinas de cadeia pesada e imunoglobulinas de cadeia leve de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	92
Figura 4.18 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	93
Figura 4.19 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de transferrina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	96

Figura 4.20 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de ceruloplasmina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	100
Figura 4.21 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de haptoglobina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	101
Figura 4.22 -	Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de ceruloplasmina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.....	103

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE PUERPÉRIO E RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS.....	25
2.2	PROTEINOGRAMA.....	29
2.2.1	Proteínas	29
2.2.2	Eletroforese	30
2.2.3	Eletroforese em fita de acetato de celulose e frações protéicas identificáveis	31
2.2.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e frações protéicas identificáveis	34
2.3	INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO NO PROTEINOGRAMA.....	37
2.4	INFLUÊNCIA DA RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS NO PROTEINOGRAMA.....	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1	CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	46
3.2	COLHEITA DAS AMOSTRAS.....	48
3.3	TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO PROTEINOGRAMA.....	48
3.3.1	Determinação dos teores séricos de proteína total	48
3.3.2	Fracionamento eletroforético das proteínas séricas	49
3.3.2.1	Fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em fita de celulose	49
3.3.2.2	Fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida.....	50
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54

4.1	INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO NO PROTEINOGRAMA DE FÊMEAS BOVINAS CLINICAMENTE SADIAS DA RAÇA HOLANDESA.....	54
4.1.1	Influência do puerpério no proteinograma obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose.....	54
4.1.2	Influência do puerpério no proteinograma obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	64
4.2	INFLUÊNCIA DA RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS NO PROTEINOGRAMA DE FÊMEAS BOVINAS DA RAÇA HOLANDESA.....	79
4.2.1	Influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas, obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose.....	79
4.2.2	Influência da retenção anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas, obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE).....	91
5	CONCLUSÕES.....	108
	REFERÊNCIAS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Na clínica buiátrica, o diagnóstico exato e precoce das enfermidades por meio do exame clínico, da utilização de técnicas diagnósticas eficazes, assim como pela interpretação correta de exames laboratoriais é considerado imprescindível para que a produtividade animal seja mantida, sendo fundamental, na patologia clínica veterinária, o conhecimento dos valores de referência bem como dos diversos fatores de variabilidade para que os resultados obtidos possam ser corretamente interpretados.

O estudo da influência do puerpério nesses parâmetros, assim como o conhecimento de valores de referência específicos de diversos exames laboratoriais nessa fase da vida reprodutiva dos bovinos é de fundamental importância na Buiatria, pois diversas enfermidades que acometem os bovinos são diagnosticadas nos primeiros 60 dias após a parição.

Pesquisas recentes desenvolvidas no Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes (CPDER), do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP, demonstraram a significativa influência do puerpério no leucograma de bovinos e, diante da magnitude dessas modificações, Saut (2004) e Saut e Birgel Junior (2006) recomendaram a adoção de valores de referência específicos para o quadro leucocitário nos primeiros sete dias de puerpério. Observaram que, em amostras colhidas com menos de 24 horas após o parto, o quadro leucocitário era caracterizado por leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo, associado a linfocitose e eosinopenia absoluta. Durante o evoluir da primeira semana após o parto, ocorria diminuição gradual do número de leucócitos, devido à diminuição do número absoluto de neutrófilos e linfócitos, sendo que, exceção feita ao número absoluto de eosinófilos, nas amostras colhidas entre 6 e 8 dias após o parto, os valores dessas variáveis retornavam aos patamares observados nos animais fora do puerpério.

Afora as enfermidades relacionadas à glândula mamária, ao aparelho locomotor ou digestivo bem como os frequentes distúrbios metabólicos, são merecedores de especial destaque as doenças que acometem o aparelho genital das fêmeas durante o puerpério.

Dentre esses distúrbios reprodutivos destaca-se a retenção dos anexos fetais, enfermidade comum no pós-parto dos bovinos. Esta enfermidade apresenta incidência, em rebanhos bovinos livre de brucelose, que podem variar entre 3 e 12% (SMITH, 1993). Na Holanda, Joosten, Stelwagen e Dijkhuizen (1988), em estudo desenvolvido entre 1975 e 1984, no qual foram avaliados o puerpério de 369.288 vacas, descreveram que em 5,2% dos animais com parto eutócico diagnosticou-se retenção dos anexos fetais e, em 1,4% das vacas com parto distócico apresentaram retenção dos anexos fetais. Enquanto, Fernandes, Costa e Viana (2001) após acompanharem o puerpério de 1875 vacas leiteiras criadas no sul de Minas Gerais, verificaram que sua incidência era de 10,54%, em propriedades leiteiras no sul de Minas Gerais.

A retenção dos anexos fetais é responsável por grande perda econômica (MULEI; MUTIGA; GITAU, 1993). Os animais acometidos apresentam diminuição da performance reprodutiva, pois se observa maior incidência de infecção uterina 30 dias pós-parto, maior intervalo entre parto e primeiro cio, maior número de serviço/concepção e maior intervalo entre partos (FERNANDES et al., 2001). Além disso, vacas com retenção dos anexos fetais têm níveis significativamente mais baixos de imunoglobulinas no colostro (LONA; ROMERO, 2001) e, aumentam o risco de distúrbios metabólicos como a cetose (CURTIS et al., 1985).

Em relação à influência dos anexos fetais sobre os constituintes do hemograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, a análise da pesquisa desenvolvida por Saut (2004) permitiu afirmar que o quadro leucocitário de vacas com retenção dos anexos fetais era caracterizado por leucopenia por neutropenia com desvio à esquerda degenerativo e eosinopenia. Sob o ponto de vista hematológico, essa condição patológica foi responsável por graves alterações no leucograma e demonstrou-se que a medula não conseguia responder de forma satisfatória aos estímulos do processo de doença e /ou toxiinfecioso instalado. A partir do 10º dia após o parto, o leucograma deixava de sofrer influência da retenção dos anexos fetais.

Além das modificações no leucograma, a importância do proteinograma sérico no monitoramento de várias enfermidades infecciosas e /ou na identificação de focos infecciosos foi destacada por Fagliari e Silva (2002) que relacionaram as

modificações que ocorrem no sítio inflamatório com a liberação de citocinas e síntese de proteínas de fase aguda.

O fracionamento eletroforético das proteínas sangüíneas representa um dos mais confiáveis métodos para a sua identificação, sendo que as técnicas de eletroforese mais utilizadas em medicina veterinária têm como matrizes fitas de acetato de celulose ou filmes de agarose. Apesar de serem utilizadas na rotina clínica, essas técnicas de eletroforese, segundo Fagliari e Silva (2002) apresentam valor limitado, pois permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas. Como alternativa esses autores (FAGLIARI; SILVA, 2002) recomendam a utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), pois possibilita a visualização de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares que variam entre 24.000 a 340.000 daltons. Por meio desta técnica é possível a quantificação de diversas proteínas de fase aguda (fibrinogênio, ceruloplasmina, proteína C-reativa, antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida), permitindo o reconhecimento precoce de processo inflamatórios (HORADAGODA et al., 1999).

Produzidas pelos hepatócitos em resposta a danos teciduais e/ou processos inflamatórios, a dosagem de proteínas de fase aguda tem sido utilizada para avaliar o processo de involução uterina (SHELDON, 2004), sendo que a ocorrência de endometrites poderia estimular a síntese de determinadas proteínas de fase aguda como o fibrinogênio, ceruloplasmina, proteína C-reativa, antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida (ALSEMGEEST et al., 1993; REGASSA; NOAKES, 1999).

A inexistência de pesquisas brasileiras preocupadas com a avaliação da influência do puerpério no proteinograma dos bovinos, bem como inexistência referências a pesquisas que tenham estudado o fracionamento das proteínas séricas utilizando a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) motivaram a elaboração da presente pesquisa, no qual objetiva-se avaliar a influência do puerpério no proteinograma de bovinos da raça Holandesa, no período compreendido entre a parição até 90 dias pós-parto, bem como estudar a influência da retenção dos anexos fetais, utilizando-se para a determinação do proteinograma a seguinte metodologia:

- a) determinação das proteínas totais pela técnica do biureto;
- b) fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em fita de acetato de celulose para determinação das seguintes frações protéicas: albumina, alfa globulina, beta globulina e gamma globulina;
- c) fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE PUERPÉRIO E RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS

Considera-se como parto eutócico, fisiológico ou normal o momento final da gestação fisiológica, quando, pelo nascimento do produto, há separação orgânica maternal e do feto gerado. Nestas condições, há dilatação da via fetal e o nascimento transcorre sem transtornos e riscos de vida ou ferimentos para mãe e para o produto concebido. Nas fêmeas bovinas, as membranas fetais são eliminadas fisiologicamente até 12 horas após o parto. A retenção das mesmas por período mais prolongado deve ser considerada como patológica (GRUNERT; BIRGEL, 1982).

A fertilidade após a parição na vaca leiteira é considerada o principal foco econômico em propriedades produtoras de leite, sendo que qualquer desvio ou prolongamento desta fase resulta em perdas econômicas progressivas (PATEL et al., 2006). O período imediatamente após o parto é de suma importância na vida reprodutiva da vaca. Uma involução uterina normal e o restabelecimento da função ovariana no pós-parto são cruciais para que se obtenha curto intervalo entre parto e nova concepção, condição necessária para otimização da produção de leite e bezerras (DOHMEN et al., 2000).

O Puerpério é definido como o período compreendido entre o parto e a completa involução uterina, aproximadamente, 40 dias pós-parto. Após a parição e subsequente gestação, quatro eventos devem ocorrer concomitantemente: a) involução uterina, b) regeneração do endométrio, c) retorno à ciclicidade ovariana e, d) eliminação da contaminação bacteriana (SHELDON, 2004).

Fatores que possam atrasar a involução uterina devem ser considerados importantes causas de futura infertilidade, tais como distocia, hipocalcemia, retenção dos anexos fetais, metrite e endometrite (FONSECA et al., 1983).

O útero é estéril durante a gestação, mas durante ou rapidamente após o parto, quando há relaxamento da vulva e dilatação da cérvix, microorganismos do meio ambiente, pele e fezes contaminam o lumen uterino. As barreiras anatômicas contra uma contaminação bacteriana no útero estão abertas durante o parto e permanecem dilatadas por alguns dias (SHELDON, 2004; SHELDON; DOBSON, 2004). A contaminação bacteriana, em bovinos no pós-parto, é uma situação dinâmica, com mudanças nas populações de bactérias, espontâneas recontaminações durante as primeiras semanas pós-parto (GRIFFIN; HARTIGAN; NUNN, 1974).

O ambiente uterino suporta o crescimento de uma variedade de bactérias anaeróbicas e aeróbicas. (SHELDON, 2004). Após o parto, *Escherichia coli* é o patógeno mais abundante no útero de bovinos (SHELDON et al., 2002). A determinação de quais bactérias isoladas são contaminantes oportunistas do trato genital e quais são potenciais patógenos, associados com infecção, variam muito com os diferentes trabalhos. A contaminação bacteriana uterina, qualitativa e quantitativamente, sem dúvida, é dependente da relação entre as populações de bactérias e os mecanismos de defesa, incluindo a resposta imune (SHELDON et al., 2001; SHELDON, 2004; SHELDON; DOBSON, 2004).

Com o passar das semanas ocorre uma diminuição do percentual de infecção uterina, ou seja, com a evolução do puerpério verifica-se a cura de boa parte dessas infecções (GRUNERT et al., 2005). Griffin, Hartigan e Nunn (1974) demonstraram em sua pesquisa que a proporção de animais com isolamento bacteriano uterino positivo declinava de 93% aos 15 dias pós-parto para 78% entre 16 e 30 dias, 50% entre 31 e 45 dias e 9% entre 46 e 60 dias pós-parto. Outros trabalhos confirmam esta eliminação progressiva de bactérias do útero, durante o período pós-parto (ELLIOT et al., 1968; SHELDON et al., 2002).

O sistema imune dos bovinos pode ser dividido em: sistema imune inato e adaptativo ou adquirido. O sistema imune inato é o principal responsável pela eliminação da contaminação bacteriana uterina no pós-parto. Ele consiste de uma série de barreiras anatômicas, fisiológicas, fagocíticas e inflamatórias (SHELDON, 2004; SHELDON; DOBSON, 2004).

A vulva, vestíbulo, vagina e cérvix atuam como barreiras físicas; as barreiras fisiológicas incluem a secreção de mucos vaginais e cervicais, principalmente

durante o estro. A principal barreira fagocítica são os neutrófilos em resposta aos desafios das bactérias, e as barreiras inflamatórias incluem moléculas de defesa inespecíficas como a lactoferrina e proteínas de fase aguda. (GRIFFIN; HARTIGAN; NUNN, 1974; SHELDON et al., 2002)

Os neutrófilos são as principais células presentes no interior do útero contra bactérias. Os neutrófilos migram do sangue para o lúmen uterino, regulados por citocinas sintetizadas no local da infecção, no entanto, a capacidade funcional dos neutrófilos está reduzida no pós-parto, embora ainda não estejam muito definidas as causas dessa supressão. (BAGGIOLINI, 1998 apud SHELDON; DOBSON, 2004).

No pós-parto dos bovinos, vacas que retêm os anexos fetais têm seis vezes mais chance de desenvolverem infecções uterinas do que vacas sem retenção (SMITH; RISCO, 2005). A retenção dos anexos fetais é importante fator de risco para instalação de infecções uterinas, pois atrasa a involução uterina, a eliminação do lóquio, causa lesões teciduais, inibe funções de neutrófilos, além da presença de grande quantidade de tecidos necróticos no interior do útero criar ambiente ideal para o crescimento bacteriano (LEBLANC et al., 2002). Dohmen et al. (2000) confirmaram que vacas com retenção dos anexos fetais, imediatamente após o parto, são mais freqüentemente infectadas com diversas bactérias como *E. coli*, *Clostridium spp* e *G- anaeróbias* em relação a vacas com parto fisiológico.

A expulsão normal dos anexos fetais envolve três componentes que agem simultaneamente: a) maturação da placenta associada com mudanças endócrinas no final de gestação e próximas do parto, b) exsanguinação do lado fetal da placenta, com colapso dos vilos e separação das criptas; e, c) contrações uterinas (SHELDON, 2004). Gunnink (1984) propôs uma intrigante teoria que após o parto, quando o suprimento sangüíneo da placenta encerrasse, a placenta se tornaria um “corpo estranho”. Sugeriu que o sistema imune maternal deveria reconhecer como “corpo estranho” e iniciar um processo de expulsão.

Na literatura consultada há diversos trabalhos que associam a diminuição da atividade dos neutrófilos, no periparto, com subsequente retenção dos anexos fetais (GUNNINK, 1984; HOEDEMAKER et al., 1992; KIMURA et al., 2002) Estes autores sugerem que a diminuição no número de leucócitos nos cotilédones no parto, aliado a uma diminuição da atividade de quimiotaxia, demonstram fortemente ser a causa da retenção dos anexos fetais. A pesquisa de Cai et al. (1994) corrobora com os

autores, pois observaram a diminuição na capacidade de quimiotaxia dos neutrófilos no pós-parto, em vacas com complexo retenção dos anexos fetais e metrite, especialmente na primeira semana pós-parto, sugerindo ser o parto o fator responsável por estas alterações funcionais.

Madsen, Weber e Burton (2002) revelaram que genes reguladores de funções básicas dos neutrófilos podem estar deprimidos devido ao parto, possivelmente devido à influência do hormônio esteróide. Segundo Gilbert et al. (1993), esta deficiência na função dos neutrófilos, no periparto de vacas, irá interferir na susceptibilidade de infecções bacterianas durante este período. Além disso, demonstraram que vacas com quatro ou mais lactações sofrem mais profundamente a deficiência da função dos neutrófilos do que vacas com menos lactações.

Confirmando o trabalho de Gilbert et al. (1993), Gröhn et al. (1990) e Schukken, Erb e Smith (1988) observaram aumento do número de retenção dos anexos fetais em vacas com maior número de partos e Curtis et al. (1985) observaram esse aumento em vacas mais velhas.

Segundo Joosten e Hensen (1992), diversos são os fatores de risco considerados na retenção dos anexos fetais, entre eles, aborto, natimorto, distocia, parto gemelar, gestações curtas, baixo peso do bezerro ao nascimento, raça, rebanho, ano e estação, estresse, deficiência nutricional e alterações nos níveis hormonais.

2.2 PROTEINOGRAMA

Este sub-capítulo será dividido em três partes: proteínas, influência do puerpério no proteinograma e influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma.

2.2.1 Proteínas

Proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Apresentam-se em diversos tipos, desde peptídeos de tamanho relativamente pequeno até enormes polímeros. Proteínas exibem diversas funções biológicas e são responsáveis pela expressão genética (NELSON; COX, 2000).

As proteínas são classificadas de acordo com suas formas e composição (classificação estrutural), podendo apresentar: estrutura primária, que são aminoácidos estruturais com cadeia polipeptídica simples; estrutura secundária, as quais apresentam cadeia de estrutura helicoidal; estrutura terciária, dobramento da hélice em diferentes formas (tridimensional), como globular (mioglobina), linear (fibrinogênio) e, finalmente, estrutura quaternária, que são combinações de dois ou mais monômeros. Estas são classificadas de acordo com sua composição química podendo ser: proteínas simples, contendo elementos básicos de aminoácidos, carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, ou proteínas conjugadas, essas apresentam elementos, grupos prostéticos, ou outros componentes (KANEKO, 1997).

Após absorção dos aminoácidos, provenientes da dieta, eles são transportados através do sangue para o fígado, sistema retículo endotelial e todas as outras células do corpo onde ocorre síntese de proteínas. As proteínas do plasma

são sintetizadas principalmente no fígado. O segundo maior local é o sistema retículo endotelial. (KANEKO, 1997; NAOUM, 1999).

Segundo Jain (1993), o grupo de proteínas plasmáticas engloba diversas moléculas de diferentes características e funções, porém, exerce importante papel nos mecanismos de regulação plasmática e transporte de fluidos intra e extracelular.

A concentração das proteínas plasmáticas está na dependência do balanço hormonal, estado nutricional, balanço hídrico e outros fatores que estão envolvidos em condições de saúde. A meia-vida de uma proteína plasmática correlaciona-se com a espécie animal em questão. Os estados fisiológicos de prenhez, parição e lactação alteram as concentrações de proteínas plasmáticas (JAIN, 1993).

2.2.2 Eletroforese

O termo eletroforese foi criado por Michaelis, em 1909, para descrever a migração de colóides sob a influência de um campo elétrico (ALFENAS, 1998). O fracionamento eletroforético das proteínas sangüíneas representa um dos mais confiáveis métodos para a sua identificação, sendo que as técnicas de eletroforese mais utilizadas em laboratórios clínicos têm como matrizes fitas de acetato de celulose ou filmes de agarose (NAOUM, 1999; FAGLIARI; SILVA, 2002). Essas técnicas, segundo Fagliari e Silva (2002) apresentam valor limitado, pois permitem o fracionamento de apenas cinco a sete grupos de proteínas.

2.2.3 Eletroforese em fita de acetato de celulose e frações protéicas identificáveis

A técnica de eletroforese em fita de acetato de celulose fraciona proteínas, com diferentes pesos moleculares, classificando-as em albumina, alfa-globulinas, beta-globulinas e gama-globulinas (NAOUM, 1999).

A albumina é a proteína plasmática mais abundante e assume fundamental importância na manutenção da pressão oncótica do fluido intravascular e nos processos de transporte de substâncias. A sua síntese no fígado está relacionada a padrões hormonais, estado nutricional, condições hepáticas gerais, estresse e concentrações extravasculares (JAIN, 1993).

A albumina é considerada uma proteína de fase aguda negativa. Ela participa da resposta de fase aguda, sendo considerada uma proteína de fase aguda negativa, ou seja, ocorre um desvio em sua síntese quando o fígado é requisitado para a produção de outras proteínas, tais como as proteínas de fase aguda, requeridas para combater danos teciduais (ECKERSALL; CONNER, 1988; JAIN, 1993; KANEKO et al., 1997).

Afora essa situação, a sua diminuição no plasma também pode estar relacionada a um defeito de sua síntese hepática (nas hepatopatias graves crônicas), perdas renais, intestinais e cutâneas. Também se observa a diminuição por aumento da permeabilidade capilar, em condições de subnutrição, má absorção e caquexia neoplásica (NAOUM, 1999). Souza (2005) relatou diminuição dos teores séricos de albumina em bovinos com endometrites ou retenções dos anexos fetais. Em humanos a concentração de albumina diminui no pós-parto fisiológico (ALSEMGEEST et al., 1993). Apesar de vários fatores terem influência no metabolismo da albumina, a hipoalbuminemia é freqüentemente uma evidência tardia, especialmente nas hepatopatias (NAOUM, 1999).

As proteínas que migram para fração alfa₁-globulina, na eletroforese em fita de acetato de celulose, incluem as proteínas de fase aguda (α_1 -antitripsina, α_1 -glicoproteína ácida, amilóide sérica A, haptoglobina, ceruloplasmina, α_2 -macroglobulinas), lipoproteínas de alta-densidade e α_1 -fetoproteína (THOMAS,

2006). Como as proteínas de fase aguda estão, em sua grande maioria, distribuídas na fração alfa-globulina, portanto, níveis elevados de alfa-globulina designam a presença de resposta inflamatória aguda (KANEKO et al., 1997).

No traçado eletroforético, usando a eletroforese em fita de acetato de celulose, as proteínas que migram na fração betaglobulina incluem proteínas de fase aguda (proteína C-reativa, ferritina, fibrinogênio, transferrina), lipoproteínas de baixa densidade, transferrina e algumas imunoglobulinas (NAOUM, 1999; THOMAS, 2006).

A transferrina é uma glicoproteína plasmática responsável pelo transporte de ferro na circulação, tem atividade antibacteriana e antiviral. Ela apresenta uma meia-vida de oito a dez dias. A transferrina é classificada, assim como a albumina, como proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de condição inflamatória (KANEKO et al., 1997; THOMAS, 2006). Em humanos, há uma recente hipótese de que a resposta de fase aguda tem efeito mais importante do que fatores nutricionais na concentração de transferrina, albumina e outras proteínas de fase aguda negativa (CERÓN; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Os seus níveis diminuem em bovinos com doenças inflamatórias crônicas, porém em bovinos com infecções agudas, cetose ou após administração de endotoxinas os teores séricos permanecem normais (THOMAS, 2006).

As imunoglobulinas são glicoproteínas presentes no soro, fluidos teciduais e algumas localizadas nas superfícies das células B onde funcionam como receptores, enquanto outras estão livres no sangue e na linfa (KANEKO et al., 1997).

A interpretação da zona das gamaglobulinas se refere, principalmente, às modificações da Imunoglobulina G (NAOUM, 1999). As imunoglobulinas G são as principais imunoglobulinas encontradas no sangue e são responsáveis pela imunidade humoral do organismo. Elas apresentam diversas atividades biológicas, incluindo opsonização, aglutinação e fixação de complemento (JAIN, 1993).

A imunoglobulina A está presente nas secreções externas (lágrima, saliva, sistema respiratório e gastrointestinal), sendo importantes para defesa local e proteção de várias superfícies do corpo contra invasão bacteriana e viral (JAIN, 1993)

Segundo Sevelius e Anderson (1995), a avaliação das proteínas séricas por eletroforese é importante ferramenta que auxilia no diagnóstico e/ou prognóstico para inferir sobre o funcionamento normal do fígado. Enfatiza na possibilidade, em determinadas circunstâncias, de que a proteína total possa estar normal, pois os níveis aumentados de gama-globulina podem mascarar valores reduzidos de albumina ou alfa-globulinas. Dessa forma, o fracionamento de proteínas séricas por eletroforese é o recurso apropriado para avaliação do perfil protéico.

Para a correta interpretação dos resultados do proteinograma dos bovinos, foram desenvolvidas, nas últimas décadas, pesquisas visando o estabelecimento dos valores de referência do proteinograma que se adequassem às condições brasileiras (VOGEL et al., 1957; BIRGEL et al., 1964; OLIVEIRA; VOGEL, 1984; FAGLIARI et al., 1991; BARROS FILHO, 1995; SOUZA, 1997; SOUZA et al., 2004).

Na tabela 2.1 estão apresentados resultados de linhas de pesquisa desenvolvidos no Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo com o intuito do estabelecimento dos valores de referência do proteinograma de bovinos das raças Jersey, Nelore, Gir, Holandesa e seus cruzamentos.

Tabela 2.1 - Valores de referência do proteinograma de bovinos criados no Estado de São Paulo

Autor	Barros Filho (1995)	Souza (1997)	Souza (1997)	Souza et al. (2004)	Souza et al. (2004)
Raça	Nelore	Gir	Girolanda	Holandesa	Jersey
N	210	131	131	67	67
Proteína Total (g/dL)	6,79 ± 0,66	7,02 ± 0,08	7,38 ± 0,07	6,82 ± 0,97	6,37 ± 0,90
Albumina (g/dL)	3,11 ± 0,51	3,25 ± 0,05	3,27 ± 0,03	2,85 ± 0,50	2,74 ± 0,52
Alfa-globulina (g/dL)	0,87 ± 0,23	0,99 ± 0,02	0,95 ± 0,01	1,00 ± 0,16	0,89 ± 0,14
Beta-globulina (g/dL)	1,02 ± 0,22	0,86 ± 0,01	0,88 ± 0,01	0,76 ± 0,15	0,71 ± 0,14
Gama-globulina (g/dL)	1,79 ± 0,58	1,92 ± 0,05	2,28 ± 0,05	2,20 ± 0,45	2,03 ± 0,38

Fonte dos dados brutos: Barros Filho (1995), Souza (1997) e Souza et al. (2004)

Devido à limitação da técnica de eletroforese em fita de acetato de celulose, no fracionamento de poucos grupos de proteínas, Fagliari e Silva (2002) recomendam a utilização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

2.2.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e frações protéicas identificáveis

Por meio desta técnica, é possível a quantificação de diversas proteínas de fase aguda de interesse na medicina veterinária (fibrinogênio, ceruloplasmina, proteína C-reativa, antitripsina, haptoglobina e glicoproteína ácida) (FAGLIARI; SILVA, 2002).

Estas proteínas de fase aguda participam da reação de resposta de fase aguda do animal. A resposta de fase aguda é considerada um processo dinâmico envolvendo alterações sistêmicas e metabólicas, a qual promove imediato mecanismo de defesa inespecífico, antes da ativação de uma imunidade específica. Ela é induzida por hormônios protéicos, denominados citocinas, que agem como mensageiros entre o local de injúria e os hepatócitos, onde são sintetizadas as proteínas de fase aguda (PETERSEN; NIELSEN; HEEGAARD, 2004).

As proteínas de fase aguda classificam-se em positivas e negativas. As proteínas positivas são as que se elevam imediatamente após a instalação de um processo infeccioso (GODSON et al., 1996), neste grupo estão a proteína C-reativa, haptoglobina, fibrinogênio, ceruloplasmina, α_1 -glicoproteína ácida, α_1 -antitripsina, entre outras (TAKIGUCHI et al., 1990; EDINGHER et al., 1992). As proteínas pré-albumina, transferrina e albumina, cujos valores séricos tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias, são consideradas proteínas de fase aguda negativa (HEINRICH; CASTELL; ANDUS, 1990; GRUYS et al., 1994; SINGH; PACHAURI, 2002).

As proteínas de fase aguda são encontradas no soro em altas concentrações durante a instalação do processo inflamatório (SKINNER; BROWN; ROBERTS, 1991; ALSEMGEEST et al., 1994; CONNER et al., 1998), podendo ser avaliadas em

situações clínicas, pois se acredita que sejam melhores indicadores da resposta sistêmica ao processo inflamatório ou infeccioso do que outras variáveis, tais como febre, aumento no tempo de sedimentação de eritrócitos e leucocitose associada à neutrofilia (JAIN, 1989; SKINNER; ROBERTS, 1994; HORADAGODA et al., 1999).

A aplicabilidade em mensurar proteínas de fase aguda se justifica pela resposta, que ocorre dentro de poucas horas após o estímulo, podendo ser utilizada a fim de prover informações úteis quanto ao diagnóstico e prognóstico do animal (PFEFFER; ROGERS, 1989).

A Haptoglobina é uma glicoproteína pertencente ao grupo das α_2 -globulinas plasmáticas, sintetizada no fígado, e considerada a principal proteína de fase aguda em ruminantes (KENT, 1992). Ela apresenta diversas funções, mas a principal é de prevenir a perda de ferro, através da formação de complexos estáveis com a hemoglobina livre no sangue. Acredita-se que desta forma tenha um efeito bacteriostático, pois diminui a disponibilidade de ferro para o crescimento bacteriano. Em bovinos, tem sido proposto seu envolvimento na regulação do metabolismo lipídico e como imunomodulador (PETERSEN et al., 2004).

A ausência de haptoglobina no plasma de bovinos saudáveis pode ser considerada normal, pois Minoccheri (1965) em sua pesquisa encontrou a presença da proteína em apenas 11 das 106 amostras de sangue analisadas e, Spooner e Miller (1971) encontraram apenas em 6 de 1000 amostras de sangue submetidas à dosagem de haptoglobina. Esta informação pode ser confirmada por Uchida, Katoh e Takahashi (1993), ao avaliarem a detecção sérica de haptoglobina no periparto de 42 vacas Holandesas com parto eutócico (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Taxa de detecção de haptoglobina, proteína sérica e α_1 -glicoproteína sérica em vacas no periparto

Dias do parto	Taxa detecção de Haptoglobina (%)	Proteína total (g/dL)	α_1 -glicoproteína sérica (μ g/ml)
	n=42	n=33	n=8
-44 a -30	0/42 (0%)	7,22 $\pm$ 0,7	386 $\pm$ 458
-21 a -9	4/42 (10%)	7,26 $\pm$ 0,83	485 $\pm$ 271
0 a 1	31/42 (74%)	7,1 $\pm$ 0,82	397 $\pm$ 150
7 a 14	9/42 (21%)	7,52 $\pm$ 0,75	464 $\pm$ 326
28 a 35	2/42 (5%)	7,93 $\pm$ 0,57	333 $\pm$ 178

Fonte dos dados brutos: Uchida, Katoh e Takahashi (1993)

A haptoglobina aumenta seus valores plasmáticos nos primeiros dias após injúria tecidual ou infecção (SKINNER; BROWN; ROBERTS, 1991). Ela está sendo utilizada como teste seletivo em bovinos, para indicar a presença de resposta de fase aguda em infecções bacterianas e diferenciando-a de infecções virais e parasitológicas (SKINNER; BROWN; ROBERTS, 1991). A dosagem de haptoglobina e amilóide sérica A pode ser útil para diferenciar entre enfermidades inflamatórias agudas e crônicas, em especial a relação haptoglobina / amilóide sérica (ALSEMGEEST et al., 1994).

Além disso, Yoshino et al. (1992), Uchida, Katoh e Takahashi (1993) descreveram que a haptoglobina pode ser utilizada como uma proteína indicadora de lipidose hepática no pós-parto de bovinos.

Outra importante proteína de fase aguda nos bovinos é a ceruloplasmina que, no fracionamento de proteínas séricas por eletroforese, encontra-se na região das α_1 -globulinas. A concentração plasmática desta proteína aumenta nos processos inflamatórios, infecciosos, virais e parasitários; enquanto o decréscimo é observado ao nascimento, desnutrição, deficiência na absorção de nutrientes, nefrose e moléstias hepáticas associadas à intoxicação por cobre (JAIN, 1993).

A ceruloplasmina está envolvida em diversas funções: transferência de cobre às células para a síntese da citocromo oxidase; metabolismo intermediário do ferro; como antioxidante; principal inibidor extracelular da auto-oxidação de lipídios plasmáticos (ECKERSALL; CONNER, 1988).

Outra proteína de fase aguda descrita nos bovinos é a α_1 -glicoproteína ácida, que ainda não tem sua função muito bem elucidada, porém tem sido reportada na

supressão da blastogênese dos linfócitos em bovinos (HIRVONEN et al., 1999). A concentração sérica de glicoproteína ácida altera-se significativamente após um processo inflamatório (CONNER et al., 1989), sendo relatado um significativo aumento nos seus valores em quadros de broncopneumonia induzidos em bezerros inoculados com *Mannheimia haemolytica* (FAGLIARI et al., 2003) e de mastite em novilhas gestantes (HIRVONEN et al., 1996).

2.3 INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO NO PROTEINOGRAMA

Diversos autores preocuparam-se em pesquisar a fase puerperal dos bovinos, devido à sua grande importância econômica dentro de uma propriedade leiteira, porém a maioria das pesquisas que serão apresentadas, não tiveram como foco principal a influência do puerpério no proteinograma.

Em uma pesquisa brasileira que avaliou a cinética das proteínas séricas de vacas da raça Holandesa no decorrer da gestação, verificou-se que ocorre diminuição dos níveis séricos de proteína total e da fração gamaglobulina, associado ao aumento significativo da fração albumina e, conseqüentemente, aumento da relação albumina/globulinas (D'ANGELINO et al., 1975).

Moraes et al. (1997) trabalhando com 81 vacas da raça Holandesa, no periparto, constatou que os menores valores de imunoglobulinas séricas foram obtidos no período compreendido entre 14 dias pré-parto até os sete dias pós-parto, indicando ter havido migração de imunoglobulinas da corrente sangüínea para a glândula mamária. Feitosa et al. (2001) ao realizarem o proteinograma sérico de bezerros da raça Holandesa comprovaram que a transferência de imunidade nos primeiros momentos de vida do bezerro deve-se, quase que exclusivamente, à absorção de imunoglobulinas presentes no colostro.

Fagliari et al. (1998), colheram amostras de vacas no puerpério e verificaram que os valores de proteína total no parto variaram significativamente em relação às amostras colhidas 30 pós-parto (parto - $7,46 \pm 0,82$ g/dL; 15 dias - $7,86 \pm 0,87$ g/dL e 30 dias - $8,05 \pm 0,92$ g/dL). Em relação à albumina, os valores não variaram

significativamente do parto até 30 dias após o parto (parto - $3,28 \pm 0,40$ g/dL; 15 dias - $3,47 \pm 0,49$ g/dL e 30 dias - $3,39 \pm 0,44$ g/dL).

Verificou-se que no momento do parto há diminuição dos teores de proteínas totais, albumina e da fração betaglobulina, associada a discreto aumento da concentração das frações alfa e gamaglobulinas em relação aos valores observados no final da gestação e durante o puerpério. A partir da parição, tanto a albumina como as demais frações protéicas elevaram-se, com ligeiras oscilações entre elas nos períodos subseqüentes (FEITOSA; BIRGEL, 2000).

Tabela 2.3 - Valores do proteinograma do soro sangüíneo de vacas da raça Holandesa no momento do parto, puerpério (9 e 30 dias) e pós-parto (180 dias)

	Momento do parto	Puerpério		Pós-parto
		9 dias	30 dias	180 dias
PT (g/dl)	6,81± 0,84	7,63 ± 0,77	7,84 ± 0,66	8,12 ± 0,48
Albumina (g/dl)	3,19 ± 0,29	3,67 ± 0,48	3,31 ± 0,42	3,41 ± 0,34
Alfa-globulina (g/dl)	0,95 ± 0,15	1,04 ± 0,19	1,05 ± 0,22	1,01 ± 0,22
Beta-globulina (g/dl)	0,68 ± 0,14	0,70 ± 0,14	0,79 ± 0,17	0,96 ± 0,15
Gama-globulina (g/dl)	1,98 ± 0,60	2,22 ± 0,52	2,69 ± 0,67	2,74 ± 0,57

Fonte dos dados brutos: Feitosa e Birgel (2000)

Os resultados obtidos por Birgel Junior et al. (2003) demonstraram influência significativa da gestação e do puerpério sobre o proteinograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa, pois no terço final da gestação houve diminuição dos teores séricos das proteínas totais decorrente, principalmente, da redução dos valores da fração gamaglobulina, sendo as alterações do proteinograma, observadas no puerpério recente, caracterizadas por hipoalbuminemia e diminuição dos valores da relação albumina-globulinas (Tabela 2.4).

Tabela 2.4 - Teores séricos médios e desvio-padrão dos constituintes do proteinograma, no terço final de gestação e momento do parto, de bovinos da raça Holandesa, criados no Estado de São Paulo

	Terço final de gestação	Puerpério recente
PT (g/dl)	6,77 ± 0,78	7,35 ± 0,48
Albumina (g/dl)	2,89 ± 0,44	2,61 ± 0,30
Alfa-globulina (g/dl)	0,93 ± 0,25	1,09 ± 0,26
Beta-globulina (g/dl)	0,88 ± 0,13	0,93 ± 0,13
Gama-globulina (g/dl)	2,09 ± 0,52	2,71 ± 0,39
Relação albumina/globulinas	0,77 ± 0,22	0,56 ± 0,09

Fonte dos dados brutos: Birgel Junior et al. (2003)

Birgel Junior et al. (2003) alertam ao fato de que a relação albumina-globulinas, no puerpério recente, está próxima do limite de quadros caracterizados por insuficiência hepática, onde, além de hiperproteinemia associado a hipoalbuminemia e hiperglobulinemia, a relação albumina-globulinas está diminuída (valores menores do que 0,5).

A escassa literatura brasileira sobre o assunto torna obrigatório que se recorra a publicações em periódicos estrangeiros, aonde foram encontradas as pesquisas de Larson e Kendal (1957) que, trabalhando com vacas gestantes da raça Holandesa, observaram que as proteínas séricas alcançaram seus maiores valores por volta de quatro semanas antes do parto, decrescendo, a seguir, para atingirem os valores mínimos no dia do parto, conseqüência, principalmente, das frações betaglobulina e gamaglobulina.

Karsai e Schäfer (1984) demonstraram haver na fase do periparto uma diminuição dos valores de albumina, observados entre a 6ª e 4ª semana antes do parto e os valores em amostras colhidas entre o 1º e 5º dia do puerpério.

Uchida, Katoh e Takahashi (1993) dosaram os teores séricos de proteína total no periparto de 42 vacas Holandesas com partos eutócicos e não observaram diferença significativa entre os cinco momentos avaliados (Tabela 2.2).

Kumar et al. (2001) relataram os valores plasmáticos de proteína total, albumina e globulina, em vacas no estágio final de lactação, 1ª semana e 2 meses pós-parto. Os valores médios para proteína total foram, respectivamente, 10,33 g/dL, 9,35 g/dL e 8,64 g/dL. Os teores de albumina foram 4,06 g/dL, 3,18 g/dL e 4,06 g/dL, respectivamente. Os teores de globulinas foram 5,66 g/dL, 5,40 g/dL e 3,69 g/dL, respectivamente.

Nath et al. (2005) associaram o aumento na concentração de proteína total na fase final de gestação à síntese da fração globulina, essencial para a síntese de colostro. E a abrupta diminuição da concentração de proteína total, no dia do parto, devido à transferência de globulinas para a glândula mamária na vaca.

Em humanos o período gestacional não modifica a maioria das proteínas de fase aguda, porém o parto induz a resposta destas proteínas. É importante destacar que as proteínas apresentam comportamentos distintos nos diversos estímulos, de acordo com cada espécie (ALSEMGEEST et al., 1993).

Em ovinos Regassa e Noakes (1999) sugeriram que a síntese e lançamento de proteínas de fase aguda são conseqüências normais da involução uterina, degeneração endometrial e remodelamento tecidual.

No momento do parto o aumento da concentração sérica de cortisol pode influenciar a concentração de proteínas de fase aguda como a haptoglobina (UCHIDA; KATOH; TAKAHASHI, 1993), apesar de Alsemgeest et al. (1993) verificarem aumento de amilóide sérica A no pós-parto independente de aumento significativo de cortisol.

Alsemgeest et al. (1993) ao trabalharem com vacas no período do pré e pós-parto, verificaram que a concentração de amilóide sérica A aumentou a partir das primeiras 24 horas pós-parto, provavelmente, devido aos danos teciduais decorrentes da passagem do feto pelo canal cervical e a expulsão dos anexos fetais. Além dos danos teciduais, a produção de proteínas de fase aguda poderia ser influenciada por prostaglandina e cortisol.

A presença de infecções bacterianas uterinas, no pós-parto, pode estimular a síntese de determinadas proteínas de fase aguda de interesse veterinário como o fibrinogênio, a ceruloplasmina, a proteína C-reativa, a antitripsina, a haptoglobina e a glicoproteína ácida (ALSEMGEEST et al., 1993; REGASSA; NOAKES, 1999).

É importante levar em consideração que a instalação de um processo infeccioso, após a parição, quando o útero está exposto à contaminação bacteriana,

é dependente da relação entre as populações de bactérias e os mecanismos de defesa (SHELDON et al., 2001; SHELDON, 2004; SHELDON; DOBSON, 2004). Este fato pode levar há uma grande amplitude na variação da concentração sérica e comportamento das proteínas de fase aguda (SMITH et al., 1998 a,b;). SHELDON et al. (2001) trabalhando com vacas Holandesas com parto e puerpério fisiológicos, descreveram diferenças significativas nas concentrações plasmáticas das proteínas de fase aguda (α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina) de acordo com os graus de contaminação bacteriana uterina.

Além da relação citada acima, outros fatores podem influenciar na concentração das proteínas de fase aguda: o grau de inflamação associado; início do tratamento; tempo e drogas utilizadas na terapia; cuidados de colheita e estocagem das amostras; e, técnica laboratorial utilizada (SMITH et al., 1998a).

Skinner, Brown e Roberts (1991) verificaram que a parição não influenciou na concentração de haptoglobina, sendo o aumento ocorrido nesta fase resultado de possível infecção, ao invés do trauma decorrido da parição. Concluíram que a determinação desta proteína poderia auxiliar na interpretação da integridade do útero no pós-parto. Também que a mensuração de haptoglobina poderia diferenciar desvios na homeostase protéica de processos infecciosos, em animais que apresentam baixos valores da relação albumina/globulinas.

Segundo Sheldon et al. (2001), as concentrações de α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina diminuíram com a involução uterina em vacas com parto e puerpério fisiológicos. Porém, enfocaram no fato de que a relação entre a resposta das proteínas de fase aguda e o escore de crescimento de bactérias no útero independe do dia de colheita das amostras e involução uterina. As concentrações de α_1 -glicoproteína ácida, haptoglobina e ceruloplasmina retornaram aos valores basais nos dias 21, 14 e 18, respectivamente.

Em vacas leiteiras com metrite puerperal tóxica, a mensuração de haptoglobina pode determinar a severidade da infecção, além de verificar a eficiência da terapia antimicrobiana. O sucesso no tratamento antimicrobiano, para ser considerado efetivo, deve resultar em redução de bactérias intra-uterinas, concomitante a diminuição de leucócitos, inflamação, redução da produção de citocinas e, finalmente, baixas concentrações de haptoglobina (SMITH et al., 1998a, b).

No entanto, outros autores reportaram que a concentração de haptoglobina permanece baixa em metrites agudas pós-parto diagnosticadas entre 4 e 11 dias pós-parto. Altas concentrações de haptoglobina são vistas apenas em casos de metrites agudas severas e, conseqüentemente, com mau prognóstico em relação à futuras concepções. Eles sugerem que o aumento significativo de haptoglobina, provavelmente, reflita processos inflamatórios que não estão restritos apenas ao endotélio (HIRVONEN et al., 1999).

Para a α_1 -glicoproteína ácida, a média dos valores desta proteína foi significativamente maior em vacas com metrite aguda, do que para as vacas controle na primeira semana pós-parto. Estes valores permaneceram aumentados por muitas semanas e não se conseguiu correlacionar com a severidade da doença (HIRVONEN et al., 1999).

2.4 INFLUÊNCIA DA RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS NO PROTEINOGRAMA

Em relação às alterações no proteinograma ocorridas em animais com retenção dos anexos fetais, Chassagne e Barnouin (1992) reportaram que os teores plasmáticos de proteína total para vacas com retenção dos anexos fetais, no dia do parto, eram iguais a $8,57 \pm 1,37$ g/dL, e para vacas com parto fisiológico iguais a $7,65 \pm 1,21$ g/dL. Devido ao fato dos teores plasmáticos de albumina serem similares nos animais com e sem retenção dos anexos fetais, Chassagne e Barnouin (1992) implicaram o aumento de proteína total com a possibilidade de estar ocorrendo um distúrbio inflamatório no parto com subsequente retenção dos anexos fetais.

Wagner (1989) e Chassagne e Barnouin (1992) relataram a importância da albumina no estudo da retenção dos anexos fetais, tal como a de ligar-se ao cálcio, transportar hormônios e ácidos graxos poliinsaturados.

Na única referência brasileira sobre a influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma, Gonçalves e Kozicki (1997) evidenciaram que, no puerpério de vacas leiteiras com retenção dos anexos fetais, há excessivo gasto de proteínas, reduzindo os níveis séricos de $7,0 \pm 1,1$ g/dL no dia do parto para $5,8 \pm 1,0$ g/dL e

6,5 ± 1,0 g/dL, no 3º e 5º dias após a parição, respectivamente. Este fato pode ser confirmado pelo aumento dos níveis séricos de uréia, entre o 5º dia antes e o 5º dia após o parto, sobretudo nos animais com retenção dos anexos fetais, que atingiram valores quatro vezes maiores que os observados em animais com puerpério fisiológico (Tabela 2.5).

Gonçalves e Kozicki (1997) descrevem como fato relevante o fato de a relação albumina/globulinas decrescer de 1,3 para 0,3, revelando aumento produtivo de globulinas e, conseqüentemente, de anticorpos nos animais sem retenção dos anexos fetais. Nos animais com retenção dos anexos fetais houve resposta inversa, somente no 5º dia assemelhou-se aos animais sem retenção, reagindo à endometrite.

Gonçalves e Kozicki (1997) concluíram que as taxas de alfa, beta e gamaglobulinas elevaram-se somente no 3º e 5º dias após o parto nas vacas com retenção dos anexos fetais, enquanto nas vacas sem retenção foram verificados níveis elevados de gama-globulina no período pré-parto, sugerindo maior capacidade de reação orgânica.

Tabela 2.5 - Teores séricos de proteína total (g/dL), albumina (g/dL) e relação Albumina/globulinas de vacas com (RAF) e sem (NRAF) retenção dos anexos fetais, colhidos nos momentos -15, -5, 0, +3 e +5 dias pós-parto

		Dias				
	Grupos	-15	-5	parto	3	5
Proteína total (g/dL)	NRAF	6,7 ± 1,0	6,8 ± 0,8	6,9 ± 0,9	6,7 ± 1,0	6,8 ± 1,2
	RAF	7,1 ± 0,7	7,3 ± 1,2	7,0 ± 1,1	5,8 ± 1,0	6,5 ± 1,0
Albumina (g/dL)	NRAF	4,8 ± 0,6	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,7	4,0 ± 0,8	3,7 ± 0,8
	RAF	4,8 ± 0,5	4,9 ± 0,6	4,5 ± 0,7	4,1 ± 0,7	3,8 ± 0,9
Relação Albumina/Globulina	NRAF	1,3	1,3	...	0,3	0,3
	RAF	0,8	0,8	1,46	1,0	0,3

Fonte dos dados brutos: Gonçalves e Kozicki (1997)

Mulei, Mutiga e Gitau (1993) trabalhando com vacas no 3º e 4º dias pós-parto, não observaram diferença significativa na proteína plasmática total de vacas sem retenção dos anexos fetais (10) de vacas com retenção dos anexos fetais (41). Os valores médios foram de 8,1 g/dl para os animais sadios e 7,9 g/dl para os animais com retenção dos anexos fetais.

Srinivas et al. (1999) observaram que os teores séricos de proteína total eram significativamente maiores nos animais com puerpério fisiológico ($7,7 \pm 0,22$ g/dL) quando comparado aos animais com retenção dos anexos fetais ($6,78 \pm 0,28$ g/dL, no primeiro dia pós-parto. Correlacionaram ao fato dos animais com retenção dos anexos fetais apresentarem menor escore corporal.

A retenção dos anexos fetais é freqüentemente acompanhada de inflamação, a qual induz a uma reação de resposta fase aguda e, conseqüentemente, o aumento na concentração de determinadas proteínas de fase aguda. Porém, Alsemgeest et al. (1993) discordam, em relação à amilóide sérica A, pois a resposta desta proteína ocorreu antes da possibilidade da inflamação ser devido à retenção dos anexos fetais.

Skinner, Brown e Roberts (1991) verificaram aumento significativo de haptoglobina em animais com retenção dos anexos fetais entre 3 e 5 dias pós-parto, e responsabilizaram a infecção causada pela retenção dos anexos fetais pelo aumento da concentração sérica de haptoglobina, visto que em animais com parto eutócico não apresentaram aumento de haptoglobina.

Hirvonen et al. (1999) dosaram α_1 -glicoproteína ácida de 19 vacas Holandesas no pós-parto, com diagnóstico de metrite aguda, entre 4 e 11 dias. Verificaram que as maiores concentrações desta proteína foram detectadas em vacas com retenção dos anexos fetais e/ou distocia. As vacas que apresentaram retenção dos anexos fetais (5/19) demonstraram uma tendência de queda linear na concentração plasmática de α_1 -glicoproteína ácida no decorrer do puerpério.

Em uma única pesquisa encontrada na literatura, em que foi realizado o proteinograma sérico através da técnica de poliacrilamida (SDS-PAGE), Cairoli et al. (2006) dosaram proteínas de fase aguda no periparto de novilhas da raça Holandesa. Os resultados encontrados demonstraram aumento significativo dos teores séricos de α_1 glicoproteína ácida e haptoglobina no pós-parto de vacas com

endometrite, sendo que os valores de α_1 -glicoproteína ácida permaneceram aumentados durante 2 semanas pós-parto.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTITUIÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Com a finalidade de avaliar a influência do puerpério bem como estudar a influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma foram realizados dois experimentos, para os quais foram colhidas 291 amostras de soro sangüíneo de fêmeas bovinas da raça Holandesa, provenientes de propriedades leiteiras do tipo A, livres de brucelose e tuberculose.

O primeiro experimento foi delineado com intuito de avaliar a influência do puerpério no proteinograma, sendo colhidas 162 amostras de soro sangüíneo de vacas consideradas clinicamente sadias, isto é, que durante a evolução do puerpério e na fase pós-puerperal não apresentaram qualquer enfermidade. As amostras foram divididas em nove grupos experimentais conforme apresentado no quadro 3.1.

Grupos	Momento da colheita das amostras	Número de animais
A	0 – 1º dia do puerpério (0 – 24 horas pós-parto)	17
B	1º – 2º dia do puerpério (24 – 48 horas pós-parto)	23
C	2º – 4º dia do puerpério (48 – 96 horas pós-parto)	20
D	4º – 6º dia do puerpério (96 – 144 horas pós-parto)	16
E	6º – 8º dia do puerpério (144 – 192 horas pós-parto)	16
F	8º – 15º dia do puerpério (192 – 360 horas pós-parto)	18
G	15º – 30º dia do puerpério (360 – 720 horas pós-parto)	17
H	30º – 60º dia após o parto (720 – 1440 horas pós-parto)	18
I	60º – 90º dia após o parto (1440 – 2160 horas pós-parto)	17

Quadro 3.1 –Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência do puerpério no proteinograma de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

O segundo experimento foi delineado com intuito de avaliar a influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma, sendo colhidas 129 amostras de soro sangüíneo de vacas da raça Holandesa, que retiveram os anexos fetais por mais de 12 horas na evolução do puerpério. Para possibilitar esta avaliação, os resultados dos animais que tiveram retenção dos anexos fetais serão comparados com os resultados obtidos em 145 amostras de soro sangüíneo de vacas da raça Holandesa consideradas clinicamente sadias, isto é, que durante a evolução do puerpério e na fase pós-puerperal não apresentaram qualquer enfermidade. Todos os animais utilizados neste segundo experimento serão provenientes de propriedades livres de brucelose e tuberculose, sendo as amostras divididas em oito grupos experimentais conforme apresentado no quadro 3.3.

Grupos	Momento de colheita das amostras	animais sadios	Animais com retenção dos anexos fetais
A	1º – 2º dia do puerpério (24 – 48 horas pós-parto)	23	10
B	2º – 4º dia do puerpério (48 – 96 horas pós-parto)	20	18
C	4º – 6º dia do puerpério (96 – 144 horas pós-parto)	16	12
D	6º – 8º dia do puerpério (144 – 192 horas pós-parto)	16	16
E	8º – 15º dia do puerpério (192 – 360 horas pós-parto)	18	20
F	15º – 30º dia do puerpério (360 – 720 horas pós-parto)	17	18
G	30º – 60º dia após o parto (720 – 1440 horas pós-parto)	18	19
H	60º – 90º dia após o parto (1440 – 2160 horas pós-parto)	17	16

Quadro 3.3 – Constituição dos grupos experimentais para avaliação da influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

3.2 COLHEITA DAS AMOSTRAS

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia jugular externa, sem garroteamento excessivo do vaso, utilizando-se o Sistema Vacutainer, em tubos de vidro siliconizados sem anticoagulante, providos de tampa de borracha e com vácuo suficiente para aspirar 10 ml de sangue.

Após colhidas, as amostras de sangue foram mantidas em temperatura ambiente e transportadas para o Laboratório do Centro de Pesquisa e Diagnóstico de Enfermidades de Ruminantes, do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. Neste laboratório, as amostras foram centrifugadas com força real de centrifugação igual a 1000g, por 15 minutos, para a ocorrência de uma adequada sinérese do coágulo. Em seguida, o soro sangüíneo foi separado, por aspiração, utilizando-se pipetas Pasteur, em 3 alíquotas, acondicionadas em tubos plásticos com capacidade para 3ml, providos de tampas e conservadas em freezer a menos 20°C até a realização das provas.

3.3 TÉCNICAS PARA A DETERMINAÇÃO DO PROTEINOGRAMA

3.3.1 Determinação dos teores séricos de proteína total

A determinação dos teores séricos de proteína total foi feita pelo método do biureto, de acordo com a técnica preconizada por Gornall et al. (1949) e modificada por Strufaldi (1987), com leitura da coloração da reação obtida em Espectrofotômetro, utilizando-se comprimento de onda de 550 nm. O princípio desta técnica baseia-se na reação entre os tripeptídeos, polipeptídeos e proteínas existentes no soro sangüíneo com íons de cobre presentes no reativo de biureto, em meio alcalino, formando um complexo de coloração violeta, cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de proteína presente na amostra.

3.3.2 Fracionamento eletroforético das proteínas séricas

3.3.2.1 Fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em fita acetato de celulose

A migração eletroforética para a separação das frações protéicas do soro sangüíneo foi realizada em fitas de celulose, mantidas em solução tampão barbital com pH 8,6 e força iônica correspondente a 0,05, conforme a técnica descrita por Friedman (1961) e Kremers et al. (1967), com as modificações detalhadas a seguir.

A corrida da eletroforese, com a aplicação da amostra do soro sangüíneo na fita de acetato de celulose na região do cátodo foi realizada durante 30 minutos, em uma cuba contendo o tampão, aplicando-se uma voltagem de 200 V, procedendo-se a corrida da região do cátodo para a região do ânodo.

Após a separação das frações protéicas, as fitas foram coradas com o corante de Ponceau-S (0,2% em ácido Tricloroacético a 3%) durante 15 minutos, para ser então lavadas com ácido acético a 5% e, posteriormente, desidratadas por imersão em metanol puro para análise, durante 5 minutos. Feito isso, procedeu-se a diafanização das tiras durante 3 minutos, em uma solução contendo 68 ml de metanol, 30 ml de ácido acético glacial e 2 ml de glicerina. As tiras, a seguir, foram estendidas sobre placas de vidro e mantidas em uma estufa a 88°C, durante um tempo máximo de 7 minutos, para secagem e transparentização.

A leitura das frações albumina, alfa globulina, beta globulina e gama globulina foram efetuadas por densitometria, sendo as diferentes frações protéicas do soro separadas, manualmente, e seus valores calculados à partir do valor determinado para a taxa de proteína sérica total.

3.3.2.2 Fracionamento das proteínas séricas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Para o fracionamento das proteínas foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) e as recomendações de Fagliari e Silva (2002). A técnica foi feita em uma unidade de eletroforese vertical modelo EV5-2001N, da marca Bioagency.

As placas de vidro, previamente limpas, desengorduradas e montadas em posição vertical, foram preenchidas primeiro com o gel de separação até 1,5 cm antes da altura correspondente ao tamanho do pente, colocando-se sobre ele algumas gotas de etanol. Após um período de aproximadamente 30 a 45 minutos, em que ocorria a polimerização do gel, retirou-se o etanol e preencheu-se a placa com o gel de empilhamento seguido da imediata colocação dos pentes. Decorridos cerca de 60 minutos para polimerizar, retirou-se os pentes e as placas da unidade de suporte e adaptou-se as referidas placas na cuba de eletroforese. A seguir, a cuba foi preenchida com uma solução tampão.

Após o preenchimento das cubas, com solução tampão, aplicou-se, com agulha de Hamilton 5 µl, as amostras nos poços de aplicação. Antes da aplicação, as amostras foram preparadas de forma que, para cada 10 microlitros de soro sangüíneo, fossem acrescentados 30 microlitros de DPBS e 20 microlitros de gel mix. As amostras foram previamente aquecidas durante 10 minutos sobre água em ebulição.

Na sequência, conectou-se a cuba à fonte de energia, submetendo o sistema, inicialmente a uma corrente de 35 a 40 miliamperes e, após a passagem das amostras para o gel separador, aumentou-se a corrente elétrica para 45 a 50 miliamperes.

Terminada a corrida, que pode durar cerca de seis horas, retirou-se os géis das respectivas placas e corou-se o gel, mergulhando-o no corante Coomassie Blue 0,2%, durante 20 minutos; sendo o excesso de corante retirado com solução descorante de ácido acético a 7%. Finalmente, as leituras das frações foram realizadas em densitômetro do Marca Byosystems modelo Epson Expression 1680, e

analisadas no software de análise de imagens VisionWorksLS da marca Ultra-Violet Products

Para perfeita identificação das frações protéicas do soro sangüíneo foi utilizado, em cada corrida de eletroforese, um marcador padrão de pesos moleculares, da marca Invitrogen, com bandas entre 10 kDa e 220 kDa (15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 160 e 220kDa). Nas figuras 3.1 e 3.2 foi demonstrado uma corrida de eletroforese e sua análise em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e as frações protéicas possíveis de serem identificadas nominalmente.

Figura 3.1 -Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando marcador padrão de pesos moleculares da marca Invitrogen, com bandas entre 10 kDa e 220 kDa

Figura 3.2 -Corrida de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no programa estatístico Minitab 14[®]. A análise estatística descrita apresentou as variáveis através de sua média, desvio padrão, mediana e intervalo de confiança.

Para a avaliação da influência do puerpério, as amostras foram submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância, sendo o contraste das médias analisado pelo Teste de Duncan, ambos os testes com níveis de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$). As variáveis que não obedeceram à distribuição normal foram transformadas em logaritmos na base 10 e, novamente submetidas ao Teste de Kolmogorov-Smirnov. Se após a transformação

as variáveis apresentassem distribuição normal, procedeu-se a análise de variância, sendo o contraste das médias analisado pelo Teste de Duncan, ambos os testes com níveis de significância igual a 5% ($p \leq 0,05$). Porém, se ainda as variáveis permanecessem sem distribuição normal, os resultados foram analisados pelo Teste de Kruskal-Wallis (Anova não-paramétrica) e o contraste das médias analisado pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn's.

Para avaliar a influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma, as amostras de animais com retenção e de animais sadios foram comparados momento a momento, sendo inicialmente, realizado o Teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal. As variáveis com distribuição normal foram submetidas ao teste de comparação de médias pelo teste t Student. As variáveis com distribuição não-paramétrica foram analisadas pelo teste de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Deve ser ressaltado que a presente pesquisa é, pelo delineamento experimental proposto, a primeira que teve a preocupação de acompanhar a evolução do proteinograma durante todo o puerpério e fase pós-puerperal, além de avaliar a influência da retenção dos anexos fetais dos bovinos.

4.1 INFLUÊNCIA DO PUERPÉRIO NO PROTEINOGRAMA DE FÊMEAS BOVINAS CLINICAMENTE SADIAS DA RAÇA HOLANDESA

4.1.1 Influência do puerpério no proteinograma obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose

A avaliação dos resultados apresentados na tabela 4.1 e figura 4.1 para os teores séricos das proteínas totais de animais com pós-parto fisiológico demonstrou significativa influência do puerpério e fase pós-puerperal. No proteinograma os valores séricos da concentração das proteínas totais obtidos em amostras colhidas com menos de 24 horas após o parto ($7,33 \pm 0,82$ g/dL) aumentaram gradativamente nos primeiros dias do puerpério, atingindo valor significativamente diferente nas amostras colhidas entre 15 – 30 dias após o parto ($8,08 \pm 0,51$ g/dL). Este resultado concordou com as pesquisas de Larson e Kendal (1957), Feitosa e Birgel (2000), além de Fagliari et al. (1998) que verificaram variação significativa entre o parto e 30 dias pós-parto de $7,46 \pm 0,82$ g/dl e $8,05 \pm 0,92$ g/dl, respectivamente. Discordaram de Uchida, Katoh e Takahashi (1993), que não verificaram diferença até o 35º dia pós-parto.

Os baixos valores para os teores séricos das proteínas totais nos primeiros dias após a parição, nesta pesquisa, devem-se, seguramente, à transferência de globulinas para a glândula mamária. Os resultados corroboram com Moraes et al. (1997) e Nath et al. (2005), que relacionaram a abrupta diminuição da concentração de proteínas totais, no dia do parto, devido à transferência de globulinas para a formação do colostro.

Tabela 4.1 - Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas totais de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0 – 1º dia (0 – 24 horas)	16	7,33 ^{ab}	0,82	7,17	6,89 - 7,76
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	7,11 ^a	0,64	7,00	6,81 - 7,40
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	7,34 ^{ab}	0,62	7,38	7,03 - 7,65
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	7,43 ^{abc}	0,86	7,32	6,56 - 7,91
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	7,64 ^{bcd}	0,49	7,85	7,37 - 7,91
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	7,51 ^{abc}	0,72	7,54	7,14 - 7,87
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	8,08 ^d	0,51	8,03	7,80 - 8,37
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	7,78 ^{bcd}	0,52	7,80	7,52 - 8,04
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	7,90 ^{cd}	0,57	7,98	7,58 - 8,21

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.1 – Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas totais de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Os teores séricos de albumina não sofreram influência do puerpério, sendo que no período estudado os valores de albumina oscilaram entre $2,88 \pm 0,49$ g/dL e $3,34 \pm 0,39$ g/dL (Tabela 4.2 e Figura 4.2). Este resultado concordou com Fagliari et al. (1998) que não verificaram variação significativa do parto ($3,28 \pm 0,40$ g/dl) até os 30 dias pós-parto ($3,39 \pm 0,44$ g/dl). Diferentemente, Feitosa e Birgel (2000) observaram valores mais baixos no dia do parto e que aumentaram a partir deste momento e, Gonçalves e Kozicki (1997) descreveram diminuição dos teores séricos de albumina no pós-parto de vacas com partos eutócicos.

Na presente pesquisa não foi observado o quadro de hipoalbuminemia descrito por Birgel Junior et al. (2003) no puerpério fisiológico de vacas Holandesas.

Os resultados dos teores séricos de alfa globulinas, apresentados na tabela 4.3 e figura 4.3, sofreram influência significativa do puerpério. Os teores séricos de alfa globulina diminuíram, gradativamente, desde as amostras colhidas com menos de 24 horas pós-parto ($1,02 \pm 0,15$ g/dL) até o momento 4º – 6º dia após o parto ($0,83 \pm 0,16$ g/dL).

O valor encontrado no dia do parto foi significativamente maior do que os valores dos momentos 4º – 6º e 30º – 60º dia pós-parto e, apesar de não significativo, foi maior do que todos os outros momentos avaliados no experimento.

Esse valor aumentado no dia do parto pode ser justificado pela resposta de fase aguda do animal, pois, justamente, é na fração de alfa globulinas onde estão distribuídas as proteínas de fase aguda positiva (KANEKO et al., 1997). Os resultados discordam da pesquisa de Feitosa e Birgel (2000), que encontraram valores mais baixos de alfa globulinas no dia do parto, em relação ao 9º e 30º dias pós-parto.

Tabela 4.2 - Influência do puerpério nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Momentos	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0 – 1º dia (0 – 24 horas)	16	2,89 ^a	0,25	2,81	2,76 - 3,02
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	3,01 ^a	0,36	3,04	2,84 – 3,17
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	3,13 ^a	0,29	3,09	2,98 - 3,27
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	3,34 ^a	0,39	3,42	3,13 - 3,55
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	3,14 ^a	0,39	3,07	2,92 - 3,35
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	2,98 ^a	0,45	2,93	2,75 - 3,21
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	3,07 ^a	0,42	3,13	2,84 - 3,31
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	3,09 ^a	0,51	3,14	2,84 - 3,34
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	2,88 ^a	0,49	2,84	2,61 - 3,14

Nota: Letras minúsculas semelhantes na coluna não indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.2 - Influência do puerpério nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Tabela 4.3 - Influência do puerpério nos teores séricos de α -globulina (obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Momentos	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0° – 1° dia (0 – 24 horas)	16	1,02 ^a	0,15	1,01	0,94 – 1,10
1° – 2° dia (24 – 48 horas)	21	0,93 ^{abc}	0,17	0,97	0,85 – 1,01
2° – 4° dia (48 – 96 horas)	18	0,89 ^{abc}	0,17	0,89	0,80 – 0,97
4° – 6° dia (96 – 144 horas)	15	0,83 ^{bc}	0,16	0,84	0,74 – 0,92
6° – 8° dia (144 – 192 horas)	15	0,88 ^{abc}	0,23	0,98	0,75 – 1,01
8° – 15° dia (192 – 360 horas)	17	0,96 ^{ab}	0,25	0,95	0,83 – 1,08
15° – 30° dia (360 – 720 horas)	15	0,93 ^{abc}	0,24	0,91	0,79 – 1,07
30° – 60° dia (720 – 1440 horas)	18	0,79 ^c	0,18	0,79	0,70 – 0,88
60° – 90° dia (1440 – 2160 horas)	15	0,97 ^{ab}	0,14	0,92	0,89 – 1,04

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.3 - Influência do puerpério nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

O puerpério influenciou significativamente os teores séricos de betaglobulina de vacas Holandesas no pós-parto fisiológico. Os valores séricos de betaglobulina oscilaram das amostras colhidas nas primeiras 24 horas pós-parto ($0,70 \pm 0,12$ g/dL) até o 8º –15º dia após o parto ($0,69 \pm 0,11$ g/dL) sem qualquer diferença significativa entre os momentos. A partir deste momento os valores séricos aumentaram, gradativamente, até 60 –190 dias pós-parto ($0,89 \pm 0,12$ g/dL) (Tabela 4.4 e Figura 4.4). A variação nos teores séricos da fração de betaglobulinas foi semelhante ao encontrado na pesquisa de Feitosa e Birgel (2000).

Os resultados dos teores séricos de gamaglobulina, apresentados na tabela 4.5 e figura 4.5, sofreram influência significativa do puerpério. Os teores séricos de gamaglobulinas das amostras desde as primeiras 24 horas ($2,72 \pm 0,65$ g/dL) até o 4º –16º dia pós-parto ($2,57 \pm 0,68$ g/dL) foram significativamente menores do que os valores encontrados nas amostras colhidas após o 15º dia pós-parto. A partir do 15º dia pós-parto os valores de gamaglobulinas variaram entre $3,22 \pm 0,68$ g/dL e $3,32 \pm 0,40$ g/dL (Tabela 4.5 e Figura 4.5).

Os resultados concordam com os achados das pesquisas de Larson e Kendal (1957) e Birgel Junior et al. (2003) e confirmam os resultados apresentados pela pesquisa de Moraes (1997), que constatou que os menores valores de imunoglobulinas séricas foram encontrados até os sete dias pós-parto, indicando ter havido migração de imunoglobulinas da corrente sangüínea para a glândula mamária.

Ao se comparar com os resultados de Feitosa e Birgel (2000), os resultados para a fração de gamaglobulinas, na presente pesquisa, foram sempre superiores aos momentos pesquisados pelos referidos autores.

Tabela 4.4 - Influência do puerpério nos teores séricos de β -globulinas (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Momentos	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0 – 1º dia (0 – 24 horas)	16	0,70 ^{ab}	0,12	0,70	0,63 – 0,76
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	0,71 ^{ab}	0,13	0,71	0,65 – 0,77
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	0,72 ^{ab}	0,11	0,72	0,66 – 0,77
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	0,69 ^{ab}	0,15	0,68	0,61 – 0,77
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	0,62 ^a	0,12	0,64	0,56 – 0,69
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	0,69 ^{ab}	0,11	0,68	0,63 – 0,75
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	0,76 ^{bc}	0,12	0,74	0,69 – 0,82
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	0,69 ^{ab}	0,11	0,67	0,63 – 0,74
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	0,83 ^c	0,11	0,87	0,77 – 0,89

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.4 - Influência do puerpério nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Tabela 4.5 - Influência do puerpério nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Momentos	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0 – 1º dia (0 – 24 horas)	16	2,72 ^{ab}	0,65	2,46	2,37 - 3,06
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	2,45 ^a	0,59	2,26	2,18 – 2,72
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	2,61 ^{ab}	0,58	2,56	2,32 – 2,90
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	2,57 ^{ab}	0,68	2,32	2,20 – 2,95
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	3,00 ^{bcd}	0,43	2,94	2,76 - 3,24
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	2,88 ^{abc}	0,66	2,85	2,54 - 3,21
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	3,32 ^d	0,40	3,35	3,10 - 3,55
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	3,22 ^{cd}	0,68	3,06	2,88 - 3,55
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	3,23 ^{cd}	0,42	3,24	2,99 - 3,46

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.5 - Influência do puerpério nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Os resultados da relação albumina/globulinas, apresentados na tabela 4.6 e figura 4.6 demonstraram uma influência significativa do puerpério sobre esta variável. Os valores para a relação albumina/globulinas aumentaram significativamente do momento do parto ($0,67 \pm 0,13$) até o 4º – 6º dia após o parto ($0,84 \pm 0,16$), sendo neste momento o maior valor encontrado. A partir de então houve diminuição gradativa e significativa dos valores da relação albumina/globulinas até 60 – 90 dias pós-parto ($0,58 \pm 0,14$).

O aumento significativo observado nos primeiros dias do puerpério foi devido, essencialmente, a migração de imunoglobulinas da corrente sangüínea para a glândula mamária (MORAES et al., 1997; NATH et al. 2005). A queda apresentada nos valores da relação albumina/globulinas após o momento 4º – 6º dia pós-parto corresponde ao aumento nos teores séricos das globulinas, sendo as gamaglobulinas as principais globulinas responsáveis por este aumento.

Apesar de ocorrer uma baixa relação albumina/globulinas em diversos momentos do puerpério, este resultado deve ser diferenciado dos baixos valores encontrados por Birgel Junior et al. (2003), pois a baixa relação albumina/globulinas em sua pesquisa, em vacas até 15 dias pós-parto, foi devido essencialmente à hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. Gonçalves e Kozicki (1997) descreveram como relevante o fato da relação decrescer de 1,3 para 0,3, revelando aumento produtivo de globulinas e, conseqüentemente, de anticorpos nos animais com puerpério fisiológico.

Tabela 4.6 - Influência do puerpério na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Momentos	N	Média (g/dl)	Desvio Padrão (g/dl)	Mediana (g/dl)	Intervalo de confiança (g/dl)
0 – 1º dia (0 – 24 horas)	16	0,67 ^{ab}	0,13	0,70	0,60 – 0,74
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	0,76 ^{bc}	0,18	0,76	0,67 – 0,84
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	0,76 ^{bc}	0,15	0,73	0,68 – 0,83
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	0,84 ^c	0,16	0,89	0,75 – 0,93
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	0,70 ^{ab}	0,13	0,66	0,63 – 0,78
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	0,68 ^{ab}	0,18	0,67	0,59 – 0,78
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	0,62 ^a	0,12	0,61	0,55 – 0,68
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	0,69 ^{ab}	0,21	0,69	0,58 – 0,79
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	0,58 ^a	0,14	0,59	0,50 – 0,66

Nota: Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença estatística – ANOVA com pós teste de Duncan ($p < 0,05$)

Figura 4.6 - Influência do puerpério nos teores séricos da relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

4.1.2 Influência do puerpério no proteinograma obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu identificar 21 (vinte e uma) bandas proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 20 kDa a 200 kDa. A partir do método utilizado foi possível a identificação nominal de 8 (oito) destas proteínas: ceruloplasmina (PM= 120 kDa), hemopexina (PM= 87 kDa), transferrina (PM= 78 kDa), albumina (PM= 62 kDa), cadeia pesada de imunoglobulinas (PM= 53 kDa), haptoglobina (PM= 44 kDa), glicoproteína ácida (PM= 36 kDa) e cadeia leve de imunoglobulinas (PM= 28 kDa).

As demais bandas proteicas foram identificadas apenas com base nos respectivos pesos moleculares, como segue os seguintes: 187 kDa, 163 kDa, 144 kDa, 133 kDa, 107 kDa, 95 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 34 kDa, 33 kDa, 31 kDa, 25 kDa e 23 kDa.

O puerpério não influenciou os teores séricos das cadeias pesadas de Imunoglobulinas, e seus valores oscilaram entre 1529 ± 477 mg/dL e 1699 ± 659 mg/dL (Tabela 4.7 e Figura 4.7).

Em relação às cadeias leves de imunoglobulinas, houve influência do puerpério, sendo que seus valores inferiores foram encontrados no primeiro dia após o parto ($423,4 \pm 345,4$ mg/dL) e aumentaram gradativamente até momento entre 15 – 30 dias pós-parto ($1037,6 \pm 260,4$ mg/dL) (Tabela 4.7 e Figura 4.7).

Figura 4.7 – Influência do puerpério nos teores séricos das cadeias pesadas de imunoglobulinas (53 KDa) e cadeia leve (28 KDa) (obtidos pela técnica de eletroforese gel de poliacrilamida SDS PAGE) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008.

A albumina foi avaliada nas duas técnicas de eletroforese utilizadas na pesquisa. Como anteriormente discutido, na eletroforese em acetato de celulose os teores séricos de albumina não sofreram influência do puerpério, sendo que no período estudado os valores de albumina oscilaram entre $2,88 \pm 0,49$ g/dL e $3,34 \pm 0,39$ g/dL (Tabela 4.2 e Figura 4.2).

Na técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida os teores séricos de albumina apresentaram uma variação significativa entre 6 – 8 dias após o parto ($4,57 \pm 0,64$ g/dL) e todos os outros momentos avaliados no decorrer do puerpério (Figura 4.8).

Figura 4.8 – Teores séricos de albumina avaliados através da eletroforese em fita de acetato de celulose e em gel de poliacrilamida, segundo a influência do puerpério em vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Os valores médios encontrados para a concentração de albumina na eletroforese em gel de poliacrilamida foram maiores do que os encontrados na eletroforese em fita de acetato de celulose em todos os momentos estudados. A eletroforese em fita de acetato de celulose, uma técnica mais acessível e de maior facilidade operacional na qual as proteínas com peso molecular acima de 10^6 daltons se deslocam de acordo com sua carga elétrica (NAOUM, 1999) permitiu uma identificação e quantificação aproximada da fração albumina mais fidedigna do que o valor de albumina encontrado na eletroforese em gel de poliacrilamida.

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, como utilizado na presente pesquisa, não permitiu a perfeita separação da fração albumina. As frações protéicas identificadas como transferrina (78 KDa), albumina (62 KDa) e imunoglobulinas de cadeia pesada (53 KDa) apresentaram sobreposição e não possibilitaram uma separação adequada das frações, desta forma dificultando a marcação com precisão do início e final de cada fração protéica.

Outro fator que interferiu na quantificação das imunoglobulinas foi devido ao comprimento de suas cadeias polipeptídicas na corrida da eletroforese em gel de

poliacrilamida, pelo uso de tampão de aplicação da amostra com agentes redutores (2.mercapto).

As imunoglobulinas apresentam em sua composição 4 cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto, consistindo de 2 cadeias idênticas pesadas e 2 cadeias idênticas leves. A presente técnica separa as cadeias em cadeias pesadas de Igs e cadeias leves. As de cadeia pesada, de acordo com sua classe, podem variar entre 55 KDa a 76 KDa, enquanto, as de cadeia leve podem variar entre 22,5 KDa e 27,3 KDa (FARREL et al., 2004).

Portanto, a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10% não se mostrou uma boa técnica para a determinação da concentração de albumina e imunoglobulinas, por esse motivo os resultados serão somente apresentados.

O puerpério influenciou significativamente os teores séricos da hemopexina (87 KDa), entretanto, os valores oscilaram sem que qualquer tendência de aumento ou diminuição pudesse ser verificada, sendo que nesse período os seus valores variaram entre $14,21 \pm 6,55$ mg/dL e $79,1 \pm 58,1$ mg/dL. Na literatura não foram encontrados trabalhos que pudessem ser confrontados com a presente pesquisa (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Influência do puerpério nos teores séricos de imunoglobulinas (Cadeia leve de Ig e Cadeia pesada de Ig) e hemopexina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Evolução do puerpério (dias pós-parto)									
	parto – 1º	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(0– 24 hs)	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
N	16	22	19	16	16	18	17	18	16
Proteínas totais									
(g/dL)	7,32 ± 0,82 ^{ab}	7,11 ± 0,64 ^a	7,34 ± 0,62 ^{ab}	7,43 ± 0,86 ^{abc}	7,64 ± 0,49 ^{bcd}	7,51 ± 0,72 ^{abc}	8,08 ± 0,51 ^d	7,78 ± 0,52 ^{bcd}	7,90 ± 0,57 ^{cd}
	(7,17)	(7,00)	(7,38)	(7,32)	(7,85)	(7,54)	(8,03)	(7,80)	(7,98)
Cadeia pesada de Ig									
(53 KDa)	1580 ± 474 ^a	1631 ± 418 ^a	1632,1 ± 367,9 ^a	1529 ± 477 ^a	1695 ± 495 ^a	1699 ± 659 ^a	1559,9 ± 235,7 ^a	1548 ± 269,7 ^a	1563,1 ± 257,9 ^a
(mg/dL)	(1579)	(1548,7)	(1591,8)	(1460)	(1595)	(1676)	(1571,1)	(1485,4)	(1580,7)
Cadeia leve de Ig									
(28 KDa)	435,3 ± 216,9	423,4 ± 345,4	549,1 ± 367,2	701,9 ± 247,3	652 ± 312,9	568,6 ± 278,8	1037,6 ± 260,4	931 ± 739	629,1 ± 317,8
(mg/dL)	(409,1) ^a	(285,3) ^a	(481,7) ^a	(684) ^{ab}	(592,2) ^{ab}	(547) ^{ab}	(1049,4) ^b	(573) ^{ab}	(538,7) ^{ab}
Hemopexina									
(87 KDa)	52,8 ± 55,2	29,94 ± 27,89	40,29 ± 20	50,3 ± 47,3	14,21 ± 6,55	19,02 ± 9,26	79,1 ± 58,1	63,4 ± 52,2	65,5 ± 39,3
(mg/dL)	(40,9) ^{ac}	(17,77) ^{abd}	(39,37) ^{ac}	(42,5) ^{ac}	(14,1) ^b	(15,95) ^{ab}	(53,6) ^c	(46,2) ^{cd}	(65,9) ^c

Nota: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística (p<0,05)

() - mediana

A transferrina (78 KDa), considerada uma proteína de fase aguda negativa, cujos teores séricos tendem a decrescer na presença de condição inflamatória (KANEKO, 1997), sofreu influência significativa do puerpério.

No presente trabalho, observou-se a resposta de fase aguda induzida pelo parto promovendo a queda da concentração sérica de transferrina. Seus valores diminuíram significativamente do momento do parto ($132,8 \pm 67,4$ mg/dL) chegando ao patamar mínimo entre o 6^o – 8^o dia após o parto ($38,03 \pm 19,47$ mg/dL), retornando somente, aos valores encontrados no dia do parto, nas amostras colhidas entre o 8^o – 15^o dia após o parto ($108,1 \pm 62$ mg/dL), a partir deste momento permaneceu sem variações significativas até o último momento avaliado (Tabela 4.8 e Figura 4.9).

Uma das funções da transferrina é a habilidade de seqüestrar o ferro livre circulante removendo um dos nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, desta forma agindo como elemento bacteriostático (FARREL et al., 2004). Esta função assume papel fundamental na parição, pois no momento do parto o útero é exposto a uma série de microorganismos (SHELDON, 2004; SHELDON; DOBSON, 2004), sendo esta contaminação uma situação dinâmica, com mudanças nas populações de bactérias e espontâneas recontaminações durante as primeiras semanas pós-parto (GRIFFIN et al., 1974).

Para Sheldon et al. (2001), Sheldon e Dobson (2004) e Sheldon (2004) a contaminação bacteriana uterina, qualitativa e quantitativamente, sem dúvida, é dependente da relação entre as populações de bactérias e os mecanismos de defesa. A cinética apresentada pela transferrina na presente pesquisa demonstrou claramente sua atividade como integrante dos mecanismos de defesa na resposta de fase aguda. Com a evolução do puerpério, quando há a cura de boa parte dessas infecções (GRUNERT et al., 2005), os valores séricos de transferrina voltaram aos seus teores encontrados no momento do parto e na fase pós-puerperal.

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.9 - Influência do puerpério nos teores séricos de transferrina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Tabela 4.8 – Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Evolução do puerpério (dias pós-parto)									
	parto – 1º	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(0– 24 hs)	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
N	16	21	18	15	15	17	15	18	15
Proteínas totais									
(g/dL)	7,32 ± 0,82 ^{ab}	7,11 ± 0,64 ^a	7,34 ± 0,62 ^{ab}	7,43 ± 0,86 ^{abc}	7,64 ± 0,49 ^{bcd}	7,51 ± 0,72 ^{abc}	8,08 ± 0,51 ^d	7,78 ± 0,52 ^{bcd}	7,90 ± 0,57 ^{cd}
	(7,17)	(7,00)	(7,38)	(7,32)	(7,85)	(7,54)	(8,03)	(7,80)	(7,98)
Ceruloplasmina									
(120 KDa)	121,1 ± 63,2 ^a	95,52 ± 39,37 ^{ab}	120,8 ± 68,8 ^a	121,5 ± 46 ^a	76,5 ± 48,4 ^b	94,6 ± 53,1 ^{ab}	79,19 ± 33,46 ^{ab}	75,1 ± 64,2 ^b	106,7 ± 47,1 ^{ab}
(mg/dL)	(115,2)	(90,02)	(107,5)	(110,7)	(74,9)	(78,1)	(80,53)	(58,9)	(96,7)
Transferrina									
(78 KDa)	132,8 ± 67,4	87,1 ± 52,1	87,02 ± 33,5	136,2 ± 103,6	38,03 ± 19,47	108,1 ± 62	254,8 ± 127,1	162,8 ± 156	149,8 ± 86,7
(mg/dL)	(110,4) ^{ac}	(73,2) ^a	(92,16) ^a	(99) ^{ac}	(30,7) ^b	(95,9) ^{ac}	(273,8) ^c	(80,5) ^{ac}	(106,9) ^{ac}
Albumina									
(62 KDa)	4,07 ± 0,34 ^a	4,12 ± 0,46 ^a	3,90 ± 0,40 ^a	3,85 ± 0,37 ^a	4,57 ± 0,64 ^b	4,20 ± 0,57 ^a	3,90 ± 0,42 ^a	3,97 ± 0,67 ^a	4,02 ± 0,56 ^a
(g/dL)	(4,07)	(4,14)	(3,92)	(3,78)	(4,52)	(4,13)	(3,81)	(4,06)	(3,97)
Haptoglobina									
(44 KDa)	89,7 ± 43,3	91,7 ± 140,9	91,31 ± 39,75	87,44 ± 35,39	29,15 ± 24,64	74,3 ± 43	84,17 ± 35,68	39,3 ± 16,77	53,36 ± 29,13
(mg/dL)	(88,4) ^a	(55,4) ^{ab}	(89,07) ^a	(80,72) ^a	(20,47) ^b	(69,6) ^{ac}	(85,25) ^a	(36,56) ^{bc}	(48,52) ^{ab}
Glicoproteína ácida									
(36 KDa)	31,69 ± 24,48	36,2 ± 40,27	50,4 ± 46,8	30,56 ± 33,48	13,51 ± 13,39	14,38 ± 20,55	62,8 ± 50,3	30,41 ± 17,12	34,27 ± 23,35
(mg/dL)	(23,46) ^{abc}	(26,01) ^{abc}	(24,4) ^{ac}	(13,54) ^{abc}	(10,41) ^{ab}	(8,17) ^b	(46,4) ^c	(27,66) ^{ac}	(30,42) ^{ac}

Nota: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística (p<0,05)

() - mediana

Além das proteínas de fase aguda, a identificação de outras frações protéicas presentes no plasma sanguíneo torna-se útil como indicador do estado de sanidade e/ou imunológico dos animais (PASSOS, 2004); diante disto foram apresentadas na tabela 4.9 as proteínas que não puderam ser identificadas e cujos pesos moleculares variavam entre 187 e 23 KDa. Durante os 90 primeiros dias pós-parto, os valores médios destas frações protéicas oscilaram conforme a seguir discriminado: 187 KDa – entre $171,1 \pm 50,9$ e $467,3 \pm 156,5$ mg/dl; 163 Kda - entre $7,16 \pm 4,82$ e $23,37 \pm 10,86$ mg/dl; 144 KDa – entre $8,89 \pm 5,43$ e $24,33 \pm 21,08$ mg/dl; 133 KDa – entre $8,58 \pm 4,32$ e $31,13 \pm 34,17$ mg/dl; 107 KDa – entre $8,79 \pm 4,97$ e $27,58 \pm 13,91$ mg/dl; 95 KDa – entre $38,66 \pm 18,22$ e $74,11 \pm 20,75$ mg/dl; 40 KDa – entre $10,87 \pm 6,44$ e $75,51 \pm 35,24$ mg/dl; 38 KDa – entre $6,09 \pm 4,51$ e $41,96 \pm 18,47$ mg/dl; 34 KDa – entre $6,38 \pm 4,84$ e $41,24 \pm 26,16$ mg/dl; 33 KDa – entre $5,82 \pm 4,09$ e $35,53 \pm 22,84$ mg/dl; 31 KDa – entre $14,62 \pm 9,27$ e $52,33 \pm 35,59$ mg/dl; 25 KDa – entre $156 \pm 67,5$ e $489,3 \pm 130,2$ mg/dl; e, 23 KDa – entre $12,47 \pm 8,7$ e $81,9 \pm 46,5$ mg/dl.

No presente trabalho, através do fracionamento das proteínas séricas, utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível identificar três proteínas de fase aguda positivas: ceruloplasmina (120 KDa), haptoglobina (44 KDa) e glicoproteína ácida. Estas proteínas elevam suas concentrações plasmáticas imediatamente após a instalação de um processo inflamatório (GODSON et al., 1996).

As proteínas ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida sofreram influência significativa do puerpério, sendo que a ceruloplasmina e a haptoglobina apresentaram um padrão de curva semelhante durante todo o período estudado; porém, o comportamento da glicoproteína ácida foi distinta no início do puerpério, mas a partir das amostras colhidas entre o 8º – 15º dia após o parto, a cinética foi semelhante a da ceruloplasmina e haptoglobina.

Os teores séricos de ceruloplasmina apresentaram-se aumentados no dia do parto ($121,1 \pm 63,22$ mg/dL) sofrendo leve queda (não significativa) até o primeiro dia pós-parto ($95,52 \pm 39,37$ mg/dL) para depois retornarem, nos momentos 2º – 4º e 4º – 6º dia pós-parto aos valores apresentados na parição. Logo depois, os teores séricos de ceruloplasmina diminuíram significativamente nas amostras 6º – 8º dia pós-parto, e assim se mantiveram no decorrer do puerpério e fase pós-puerperal (Tabela 4.8 e Figura 4.10).

Os teores séricos de haptoglobina também apresentaram-se aumentados no momento da parição ($89,7 \pm 43,3$ mg/dL), diminuindo (não significativamente) no primeiro dia pós-parto ($91,7 \pm 140,9$ mg/dL) para depois retornarem, nos momentos 2º – 4º e 4º – 6º dia pós-parto aos valores apresentados no parto. Após, os teores séricos diminuíram significativamente nas amostras 6º – 8º dia pós-parto, para aumentarem gradativamente até as amostras entre o 15º – 30º dias pós-parto, retornando aos valores no momento 30 – 60 dias pós-parto aos valores encontrados na fase pós-puerperal (Tabela 4.8 e Figura 4.10).

Na presente pesquisa a parição provocou uma resposta de fase aguda sendo demonstrada pelo aumento das proteínas de fase aguda ceruloplasmina e haptoglobina no momento do parto. Estas proteínas provavelmente responderam aos danos teciduais decorrentes da passagem do feto pelo canal cervical e a expulsão dos anexos fetais, além de possível influência do cortisol e da prostaglandina aumentados nesta fase (ALSEMGEEST et al., 1993).

Após o evento do parto, foi demonstrado um segundo aumento destas proteínas de fase aguda, evidenciado nas amostras colhidas no 2º – 4º e 4º – 6º dias pós-parto, que correspondem seguramente ao estímulo da contaminação bacteriana instalada no útero após o parto (ALSEMGEEST et al., 1993; REGASSA; NOAKES, 1999).

As proteínas ceruloplasmina e haptoglobina apresentaram um terceiro aumento de seus valores, porém sendo apenas estatisticamente significativo na concentração sérica da haptoglobina. Este aumento pode estar relacionado a possíveis estímulos infecciosos, devido às variações nas populações bacterianas, grau de infecção ou retardos na involução uterina (SMITH et al., 1998ab; SHELDON et al., 2001). O grau de inflamação e as camadas envolvidas do útero pode ser um fator que influencia na concentração das proteínas de fase aguda (SMITH et al., 1998a).

A eliminação da contaminação bacteriana no útero é progressiva e declina de 93% aos 15 dias pós-parto, para 78% entre 16 e 30 dias, 50% entre 31 e 45 dias e, finalmente, para 9% entre 46 e 60 dias pós-parto (ELLIOT et al., 1968; SHELDON et al., 2002).

A involução uterina, grau de inflamação e lesão das diferentes camadas uterinas, identificação e quantificação de patógenos contaminantes não foram avaliados na presente pesquisa, porém, influenciaram decisivamente nos resultados e podem ser observados na variação nos resultados individuais interpretados no desvio padrão, das diferentes proteínas de fase aguda nos momentos estudados.

Os resultados concordaram com Sheldon et al. (2001), que descreveram uma diminuição das concentrações de haptoglobina e ceruloplasmina com a involução uterina em vacas com puerpério fisiológico, porém ressaltaram o fato de que poderia haver aumento na concentração dependente do escore de crescimento de bactérias no útero e, independentemente, do tempo de involução uterina.

Cabe ressaltar que no período do puerpério recente os animais estão mais predispostos a apresentarem distúrbios metabólicos e hepáticos (CURTIS et al., 1983; NAOUM, 1999). Os animais utilizados na presente pesquisa foram oriundos de propriedades tecnificadas e de animais de alta produção leiteira e, desta forma, susceptíveis a apresentar graus variados de alterações metabólicas e hepáticas que, no exame clínico proposto e estabelecido na presente pesquisa, poderiam não ter seu diagnóstico definitivo no momento, necessitando de exames complementares.

Isto poderia interferir no proteinograma dos animais, principalmente, nas proteínas de fase aguda.

O presente trabalho discordou de Skinner, Brown e Roberts (1991) que não verificaram influência da parição nos teores de haptoglobina, entretanto, concordou no fato destes autores relacionarem o aumento da concentração sérica de haptoglobina com uma possível infecção uterina no pós-parto.

A glicoproteína ácida sofreu influência do puerpério, no entanto não foi possível demonstrar significativamente o aumento na sua concentração, devido ao estímulo de resposta de fase aguda promovido pelo parto e à contaminação bacteriana do útero no pós-parto recente. Sheldon et al. (2001), descreveram, também, variações significativas na concentração de glicoproteína sérica, porém levando-se em consideração o grau de contaminação bacteriana no interior do útero (Tabela 4.8 e Figura 4.10).

Nota: Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.10 - Influência do puerpério nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Tabela 4.9 – Influência do puerpério nos teores séricos das frações protéicas não identificadas (pesos moleculares de 187 KDa, 163 KDa, 144 KDa, 133 KDa, 107 KDa, 95 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 34 KDa, 33 KDa, 31 KDa, 25 KDa, 23 KDa) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008 (continua)

Evolução do puerpério (dias pós-parto)									
	parto – 1º	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(0– 24 hs)	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
N	16	21	18	15	15	17	15	18	15
Proteínas totais									
(g/dL)	7,32 ± 0,82 ^{ab}	7,11 ± 0,64 ^a	7,34 ± 0,62 ^{ab}	7,43 ± 0,86 ^{abc}	7,64 ± 0,49 ^{bcd}	7,51 ± 0,72 ^{abc}	8,08 ± 0,51 ^d	7,78 ± 0,52 ^{bcd}	7,90 ± 0,57 ^{cd}
	(7,17)	(7,00)	(7,38)	(7,32)	(7,85)	(7,54)	(8,03)	(7,80)	(7,98)
187 KDa									
(mg/dL)	306,6 ± 66,5 ^a	209,9 ± 88,2 ^b	306,1 ± 117,1 ^a	285,9 ± 70,8 ^a	188,1 ± 119,6 ^b	285,7 ± 69,7 ^a	171,1 ± 50,9 ^b	180,2 ± 83,2 ^b	467,3 ± 156,5 ^c
	(307,1)	(210,1)	(323,8)	(279,1)	(224,8)	(285,3)	(160)	(173,6)	(428,8)
163 Kda									
(mg/dL)	20,47 ± 19,17	12,47 ± 9,07	16,41 ± 9,92	13,19 ± 5,89	7,16 ± 4,82	12,8 ± 5,39	23,37 ± 10,86	8,1 ± 4,94	14,38 ± 6,78
	(17,48) ^{ac}	(9,1) ^{ab}	(14,21) ^{ac}	(11,66) ^{abc}	(6,37) ^b	(12,26) ^{abc}	(21,86) ^c	(7,5) ^{ab}	(14,2) ^{abc}
144 Kda									
(mg/dL)	21,87 ± 13,05	18,81 ± 13,01	24,33 ± 21,08	23,49 ± 12,7	8,89 ± 5,43	15,09 ± 10,22	21,84 ± 8,39	9,55 ± 8,22	18,81 ± 13,19
	(20,48) ^a	(15,05) ^{ab}	(20,04) ^a	(25,02) ^a	(8,14) ^b	(13,74) ^{ab}	(20,59) ^a	(8,14) ^b	(15,48) ^{ab}
133 Kda									
(mg/dL)	31,13 ± 34,17	14,99 ± 8,31	17,63 ± 8,27	19,5 ± 10,54	8,58 ± 4,32	17,45 ± 5,92	20,6 ± 8,76	11,64 ± 6,77	17,79 ± 10,68
	(25,35) ^a	(15,15) ^{abc}	(16,9) ^{ac}	(18,03) ^{ac}	(7,2) ^b	(16,79) ^{ac}	(17,6) ^{ac}	(12,26) ^{bc}	(13,3) ^{abc}
107 Kda									
(mg/dL)	23,84 ± 14,13	16,05 ± 14,9	27,58 ± 13,91	23,08 ± 7,37	8,79 ± 4,97	17,8 ± 7,83	24,19 ± 11,91	15,35 ± 5,97	18,97 ± 9,02
	(21,99) ^{ab}	(10,45) ^{ac}	(24,87) ^b	(23,39) ^{ab}	(8,87) ^c	(15,03) ^{abc}	(24,49) ^{ab}	(15,53) ^{abc}	(19,51) ^{abc}
95 Kda									
(mg/dL)	67,14 ± 18,54 ^{ab}	49,58 ± 17,04 ^{cde}	62,04 ± 21,49 ^{abc}	58,2 ± 11,97 ^{bcd}	38,66 ± 18,22 ^e	45,68 ± 15,79 ^{de}	48,94 ± 15,51 ^{cde}	43,68 ± 15,54 ^e	74,11 ± 20,75 ^a
	(64,18)	(47,76)	(61,02)	(56,59)	(41,26)	(49,56)	(49,08)	(44,49)	(73,55)
40 Kda									
(mg/dL)	41,19 ± 25,26 ^a	27,16 ± 21,41 ^a	45,35 ± 20,08 ^a	42,92 ± 17,74 ^a	10,87 ± 6,44 ^b	35,06 ± 27,36 ^a	75,51 ± 35,24 ^c	31,97 ± 13,2 ^a	42,44 ± 25,56 ^a
	(33,91)	(23,62)	(41,24)	(42,47)	(9,14)	(26,06)	(78,6)	(28,12)	(30,63)

(conclusão)

Evolução do puerpério (dias pós-parto)									
	parto – 1º	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(0– 24 hs)	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
N	16	21	18	15	15	17	15	18	15
38 KDa									
(mg/dL)	15,59 ± 11,82 (11,56) ^{abc}	16,5 ± 16,12 (9,57) ^{ac}	32,49 ± 16,55 (23,37) ^{bd}	27,42 ± 9,56 (24,84) ^{abd}	6,09 ± 4,51 (4,22) ^c	16,81 ± 14,45 (10,83) ^{abc}	41,96 ± 18,47 (42,19) ^d	18,84 ± 8,24 (16,63) ^{abd}	19,41 ± 10,82 (16,91) ^{abd}
34 KDa									
(mg/dL)	15,37 ± 11,58 (11,82) ^{ab}	12,28 ± 7,76 (9,15) ^{ab}	19,54 ± 8,21 (16,88) ^{ac}	15,84 ± 4,91 (16) ^{ac}	6,38 ± 4,84 (5,55) ^b	15,38 ± 13,04 (12,31) ^{ab}	41,24 ± 26,16 (39,08) ^c	21,33 ± 10,91 (18,2) ^{ac}	24,12 ± 15,82 (19,1) ^{ac}
33 KDa									
(mg/dL)	18,54 ± 19,33 (12,76) ^{abc}	13,06 ± 7,8 (11,66) ^{ab}	16,75 ± 8,26 (16,8) ^{ac}	17,6 ± 5,14 (17,3) ^{ac}	5,82 ± 4,09 (4,71) ^b	11,85 ± 9,59 (6,79) ^{ab}	35,53 ± 22,84 (35,65) ^c	19,28 ± 11,65 (19,68) ^{ac}	25,92 ± 11,81 (28,37) ^{ac}
31 KDa									
(mg/dL)	34,36 ± 21,63 ^{ad} (29,29)	27,08 ± 12,67 ^{ab} (27,04)	47,16 ± 25,54 ^{cd} (41,48)	51,37 ± 16,49 ^c (48,84)	14,62 ± 9,27 ^b (12,22)	30,97 ± 26,42 ^{abd} (23,37)	52,33 ± 35,59 ^c (48,31)	26,04 ± 10,75 ^{ab} (28,72)	44,52 ± 25,81 ^{cd} (45,43)
25 KDa									
(mg/dL)	192,7 ± 79,1 ^a (164)	156 ± 67,5 ^a (158,5)	208,7 ± 108,1 ^{ab} (190,1)	289,7 ± 83,4 ^b (289,6)	237,6 ± 132,9 ^{ab} (180,9)	230,3 ± 165,7 ^{ab} (173,9)	383,8 ± 92,9 ^c (406,4)	489,3 ± 130,2 ^d (483,1)	424,5 ± 132,5 ^{cd} (457,7)
23 KDa									
(mg/dL)	19,8 ± 9,04 (18,97) ^{ab}	33,74 ± 37,92 (22,26) ^{abe}	46,42 ± 25,88 (43,74) ^{ad}	46,38 ± 17,91 (44,86) ^{acd}	12,47 ± 8,7 (7,45) ^b	14,86 ± 12,85 (10,37) ^{bc}	81,9 ± 46,5 (77,9) ^d	31,02 ± 17,77 (28) ^{abd}	61,37 ± 33,59 (62,8) ^{de}

Nota: Letras minúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística (p<0,05)

() - mediana

4.2 INFLUÊNCIA DA RETENÇÃO DOS ANEXOS FETAIS NO PROTEINOGRAMA DE FÊMEAS BOVINAS DA RAÇA HOLANDESA

4.2.1 Influência da retenção dos anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas, obtido pela técnica de eletroforese em acetato de celulose

Ao se comparar os teores séricos de proteínas totais de animais com pós-parto fisiológico aos de animais com retenção dos anexos fetais, observou-se diferença estatística significativa somente no momento entre 15 – 30 dias após o parto, onde os valores obtidos para os animais sadios foi $8,08 \pm 0,51$ g/dL e para animais com retenção dos anexos fetais foi $7,22 \pm 1,00$ g/dL (Tabela 4.10 e Figura 4.11).

Conforme apresentado na tabela 4.10 e figura 4.11, não houve diferença significativa na comparação dos outros pares de média (parto – 1; 2 – 4; 4 – 6; 6 – 8; 8 – 15; 30 – 60; 60 – 90 pós parto), sendo que nesses momentos os valores oscilaram entre $7,11 \pm 0,64$ g/dL e $7,90 \pm 0,57$ g/dL nos animais com pós-parto fisiológico e entre $7,00 \pm 0,66$ g/dL e $7,65 \pm 0,86$ g/dL nos animais com retenção dos anexos fetais. Estes resultados discordam de Gonçalves e Kozicki (1997), que verificaram nos animais com retenção um gasto excessivo de proteínas do parto até o quinto dia pós-parto, e concordam com Mulei et al. (1993), cujos resultados apresentados no período 3 e 4 dias pós-parto (8,1 g/dL sadios; 7,9 g/dL retenção) não demonstraram diferença significativa entre os animais saudáveis e com retenção dos anexos fetais.

Tabela 4.10 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das proteínas totais de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	Proteínas totais (g/dl)	N	Proteínas totais (g/dl)
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	$7,11 \pm 0,64^A$ (7,00)	9	$7,27 \pm 0,84^A$ (6,98)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)		$7,34 \pm 0,62^A$ (7,38)		$7,00 \pm 0,66^A$ (7,13)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	$7,43 \pm 0,86^A$ (7,32)	11	$7,30 \pm 0,54^A$ (7,54)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)		$7,64 \pm 0,49^A$ (7,85)		$7,36 \pm 0,64^A$ (7,29)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	$7,51 \pm 0,72^A$ (7,54)	18	$7,64 \pm 0,84^A$ (7,76)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)		$8,08 \pm 0,51^A$ (8,03)		$7,22 \pm 1,00^B$ (7,12)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	$7,78 \pm 0,52^A$ (7,80)	17	$7,36 \pm 0,81^A$ (7,30)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)		$7,90 \pm 0,57^A$ (7,98)		$7,65 \pm 0,86^A$ (7,54)

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

() - mediana

Figura 4.11 – Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das proteínas totais de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Os resultados apresentados na tabela 4.11 e figura 4.12 demonstraram influência significativa da retenção dos anexos fetais sobre os teores séricos de albumina. Os resultados evidenciaram que, a partir das amostras colhidas entre 2 – 4 dias pós-parto, os valores de albumina nos animais com retenção dos anexos fetais foram significativamente menores do que os obtidos nos animais com pós-parto fisiológico.

No período estudado, os valores de albumina nos animais com retenção dos anexos fetais oscilaram entre $2,28 \pm 0,37$ g/dL e $2,86 \pm 0,26$ g/dL, enquanto nos animais com pós-parto fisiológico esses valores oscilaram entre $2,88 \pm 0,49$ g/dL e $3,34 \pm 0,39$ g/dL.

Estes resultados concordam com Souza (2005), que relatou diminuição dos teores séricos de albumina em fêmeas bovinas com endometrites ou retenção dos anexos fetais, e concordam parcialmente com Gonçalves e Kozicki (1997) que verificaram diminuição dos teores séricos de albumina, porém tanto nos animais com retenção como nos animais sem retenção dos anexos fetais.

A diminuição dos teores de albumina sérica pode ocorrer devido aos distúrbios metabólicos e hepáticos que podem estar presentes no periparto de vacas Holandesas, já que os animais utilizados nesta pesquisa eram de propriedades de alta produção leiteira, e que animais neste período do periparto são mais predispostos a distúrbios metabólicos e hepáticos (CURTIS et al., 1983; NAOUM, 1999). Curtis et al. (1985) demonstraram que vacas com retenção dos anexos fetais têm risco aumentado de distúrbios metabólicos como a cetose.

Esses distúrbios metabólicos e hepáticos, no periparto, poderiam diminuir o aporte de energia e nutrientes para a síntese hepática de proteínas, ou mesmo causar lesões hepáticas que diminuíssem ou até inibissem a síntese de proteínas pelo fígado.

Outra justificativa desta diminuição de albumina sérica é a sua resposta frente a processos que estimulem uma resposta inflamatória de fase aguda. Ela é considerada uma proteína de fase aguda negativa (ECKERSALL; CONNER, 1988; JAIN, 1989; KANEKO et al., 1997), e diminui seus teores séricos devido à resposta de fase aguda induzida pela retenção dos anexos fetais. A retenção dos anexos fetais é considerada fator de risco para a instalação de infecções uterinas porque, atrasa a involução uterina e eliminação do lóquio, causa lesões teciduais e inibe a função de neutrófilos (LEBLANC et al., 2002).

Sugere-se que estes eventos acima relacionados devam coexistir, interferindo de forma variada nos animais, de maneira que haja um somatório destes fatores, resultando em menor aporte de albumina na circulação sangüínea.

Neste estudo, como os valores séricos das proteínas totais foram iguais nos dois grupos, exceto entre 15 –l 30 dias pós-parto, e os teores séricos de albumina foram menores em todos os momentos, exceto no 1º dia pós-parto, pode-se considerar que houve um aumento nos teores séricos das globulinas nos animais com retenção dos anexos fetais.

Tabela 4.11 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	Albumina (g/dl)	N	Albumina (g/dl)
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	3,01 ± 0,36 ^A (3,04)	9	2,86 ± 0,26 ^A (2,87)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	3,13 ± 0,29 ^A (3,09)	18	2,65 ± 0,27 ^B (2,73)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	3,34 ± 0,39 ^A (3,42)	11	2,68 ± 0,44 ^B (2,71)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	3,14 ± 0,39 ^A (3,07)	14	2,75 ± 0,28 ^B (2,77)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	2,98 ± 0,45 ^A (2,93)	18	2,65 ± 0,46 ^B (2,63)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	3,07 ± 0,42 ^A (3,13)	17	2,28 ± 0,37 ^B (2,33)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	3,09 ± 0,51 ^A (3,14)	17	2,64 ± 0,55 ^B (2,56)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	2,88 ± 0,49 ^A (2,84)	16	2,52 ± 0,46 ^B (2,58)

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

() - mediana

Figura 4.12 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

O aumento da concentração das globulinas verificado na presente pesquisa nos animais com retenção dos anexos fetais refere-se, principalmente, ao aumento da fração de alfa-globulinas. Este fato pode ser observado nos resultados apresentados na tabela 4.12 e figura 4.13. Demonstrou-se diferença significativa no início do puerpério, entre 1 –1 2 dias e 4 –1 6 dias após o parto, sendo os valores dos animais com retenção dos anexos fetais superiores aos encontrados para os animais com puerpério fisiológico.

Este aumento pode ser justificado pela presença de uma resposta inflamatória aguda, pois as proteínas de fase aguda estão, em sua grande maioria, distribuídas nesta fração (KANEKO et al., 1997). Diferentemente dos animais com puerpério fisiológico, onde os valores diminuíram gradativamente a partir do parto, os animais com retenção dos anexos fetais mantiveram os valores de fração alfa-globulinas aumentados até o 4 –1 6 dias após o parto.

Com a evolução do puerpério e da fase pós-puerperal, verificou-se apenas diferença significativa entre 30 –1 60 dias após o parto, com os valores séricos de alfa-globulina dos animais com retenção dos anexos fetais superiores ao dos animais com pós-parto fisiológico, respectivamente, $0,79 \pm 0,18$ g/dL e $1,04 \pm 0,20$ g/dL.

A avaliação dos resultados apresentados na tabela 4.13 e figura 4.14 demonstraram que os teores séricos de betaglobulinas não sofreram influência da retenção dos anexos fetais. No período estudado os valores de betaglobulinas oscilaram, nos animais com retenção dos anexos fetais, entre $0,71 \pm 0,13$ g/dL e $0,81 \pm 0,15$ g/dL, enquanto nos animais com pós-parto fisiológico esses valores oscilaram entre $0,62 \pm 0,12$ g/dL e $0,83 \pm 0,11$ g/dL.

Tabela 4.12 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	α -globulina (g/dl)	N	α -globulina (g/dl)
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	$0,93 \pm 0,17^A$ (0,97)	9	$1,07 \pm 0,29^A$ (1,08)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	$0,89 \pm 0,17^A$ (0,89)	18	$1,01 \pm 0,21^A$ (1,01)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	$0,83 \pm 0,16^A$ (0,84)	11	$1,15 \pm 0,09^B$ (1,13)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	$0,88 \pm 0,23^A$ (0,98)	14	$1,04 \pm 0,30^A$ (1,04)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	$0,96 \pm 0,25^A$ (0,95)	18	$1,08 \pm 0,21^A$ (1,02)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	$0,93 \pm 0,24^A$ (0,91)	17	$1,10 \pm 0,32^A$ (1,17)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	$0,79 \pm 0,18^A$ (0,79)	17	$1,04 \pm 0,21^B$ (0,98)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	$0,97 \pm 0,14^A$ (0,92)	16	$1,04 \pm 0,18^A$ (1,05)

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)
() - mediana

Figura 4.13 -Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de α -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Tabela 4.13 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	β -globulina (g/dl)	N	β -globulina (g/dl)
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	$0,71 \pm 0,13^A$ (0,71)	9	$0,68 \pm 0,15^A$ (0,65)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)		$0,72 \pm 0,11^A$ (0,72)		$0,71 \pm 0,13^A$ (0,72)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	$0,69 \pm 0,15^A$ (0,68)	11	$0,77 \pm 0,14^A$ (0,75)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	$0,62 \pm 0,12^A$ (0,64)	14	$0,76 \pm 0,15^B$ (0,74)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	$0,69 \pm 0,11^A$ (0,68)	18	$0,76 \pm 0,13^A$ (0,74)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	$0,76 \pm 0,12^A$ (0,74)	17	$0,74 \pm 0,17^A$ (0,76)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	$0,69 \pm 0,11^A$ (0,67)	17	$0,69 \pm 0,16^A$ (0,68)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	$0,83 \pm 0,11^A$ (0,87)	16	$0,81 \pm 0,15^A$ (0,81)

Nota: Letras maiúsculas semelhantes nas linhas indicam não haver diferença estatística ($p < 0,05$)

() - mediana

Figura 4.14 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de β -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Semelhante à fração de betaglobulinas, os teores séricos de gamaglobulina não sofreram influência da retenção dos anexos fetais. No período estudado os valores de gamaglobulina oscilaram, nos animais com retenção dos anexos fetais, entre $2,63 \pm 0,56$ g/dL e $3,29 \pm 0,46$ g/dL, enquanto nos animais com pós-parto fisiológico esses valores oscilaram entre $2,45 \pm 0,59$ g/dL e $3,32 \pm 0,40$ g/dL (Tabela 4.14e Figura 4.15).

A cinética da fração sérica da gamaglobulina nos momentos estudados foi semelhante nos dois grupos, sugerindo não haver diferença no comportamento desta fração entre animais com puerpério fisiológico e animais com retenção dos anexos fetais.

Nos animais com puerpério fisiológico este comportamento da fração de gamaglobulinas deve-se a migração de imunoglobulinas da corrente sangüínea para a glândula mamária (MORAES, 1997; NATH et al., 2005), porém tal situação não pode ser explicada nos animais com retenção dos anexos fetais, pois Lona e Romero (2001) verificaram que os níveis de imunoglobulinas presentes no colostro de vacas com retenção dos anexos fetais ($7,58 \pm 6,72$ g/dL) era significativamente mais baixo, menos de 50%, comparado com animais sem retenção dos anexos fetais ($15,13 \pm 8,56$ g/dL). Os mesmos autores sugeriram a participação do corticosteróide como responsável pela diminuição da concentração de imunoglobulinas, e também pela retenção dos anexos fetais.

Na avaliação da relação albumina/globulinas, os resultados demonstraram influência significativa da retenção dos anexos fetais. A partir das amostras colhidas entre o 2º –l 4º dia após o parto, os animais com retenção dos anexos fetais apresentaram valores médios significativamente menores e, apenas igualando-se aos valores dos animais sem retenção dos anexos fetais, entre os 30 –l 60 dias pós-parto (Tabela 4.15 e Figura 4.16).

Os animais com retenção dos anexos fetais apresentaram um quadro descrito por Birgel Junior et al. (2003) para animais sadios no puerpério recente, que apresentaram um proteinograma caracterizado por hipoalbuminemia e diminuição dos valores da relação albumina-globulinas, próximo do limite de quadros caracterizados por insuficiência hepática, isto é, valores da relação albumina/globulinas menores do que 0,5. Ao longo de todos os momentos estudados, na presente pesquisa, a relação albumina/globulinas permaneceu

diminuída sugerindo que estes animais possam ter apresentado um quadro de insuficiência hepática nessa fase.

Tabela 4.14 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de γ -globulinas (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	γ -globulina (g/dl)	N	γ -globulina (g/dl)
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	$2,45 \pm 0,59^A$ (2,26)	9	$2,66 \pm 0,65^A$ (2,51)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	$2,61 \pm 0,58^A$ (2,56)	18	$2,63 \pm 0,56^A$ (2,67)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	$2,57 \pm 0,68^A$ (2,32)	11	$2,69 \pm 0,58^A$ (2,61)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	$3,00 \pm 0,43^A$ (2,94)	14	$2,81 \pm 0,58^A$ (2,76)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	$2,88 \pm 0,66^A$ (2,85)	18	$3,16 \pm 0,74^A$ (3,06)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	$3,32 \pm 0,40^A$ (3,35)	17	$3,10 \pm 0,63^A$ (2,91)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	$3,22 \pm 0,68^A$ (3,06)	17	$3,00 \pm 0,66^A$ (3,11)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	$3,23 \pm 0,42^A$ (3,24)	16	$3,29 \pm 0,46^A$ (3,41)

Nota: Letras maiúsculas semelhantes nas linhas indicam não haver diferença estatística ($p < 0,05$)
() - mediana

Figura 4.15 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de γ -globulina (obtidos pela técnica de eletroforese em acetato de celulose) de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Tabela 4.15 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

Dias pós-parto	Fisiológico		Retenção dos Anexos Fetais	
	N	Rel. albumina/globulinas	N	Rel. albumina/globulinas
1º – 2º dia (24 – 48 horas)	21	0,76 ± 0,18 ^A (0,76)	9	0,67 ± 0,14 ^A (0,69)
2º – 4º dia (48 – 96 horas)	18	0,76 ± 0,15 ^A (0,73)	18	0,62 ± 0,13 ^B (0,61)
4º – 6º dia (96 – 144 horas)	15	0,84 ± 0,16 ^A (0,89)	11	0,59 ± 0,13 ^B (0,59)
6º – 8º dia (144 – 192 horas)	15	0,70 ± 0,13 ^A (0,66)	14	0,60 ± 0,08 ^B (0,61)
8º – 15º dia (192 – 360 horas)	17	0,68 ± 0,18 ^A (0,67)	18	0,55 ± 0,15 ^B (0,51)
15º – 30º dia (360 – 720 horas)	15	0,62 ± 0,12 ^A (0,61)	17	0,47 ± 0,10 ^B (0,50)
30º – 60º dia (720 – 1440 horas)	18	0,69 ± 0,21 ^A (0,69)	17	0,58 ± 0,19 ^A (0,57)
60º – 90º dia (1440 – 2160 horas)	15	0,58 ± 0,14 ^A (0,59)	16	0,50 ± 0,11 ^A (0,51)

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença estatística ($p < 0,05$)
() - mediana

Figura 4.16 - Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais na relação albumina/globulinas de vacas da raça Holandesa - São Paulo, 2008

4.2.2 Influência da retenção anexos fetais no proteinograma de fêmeas bovinas, obtido pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE)

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu identificar 21 (vinte e uma) banda proteica, cujos pesos moleculares variaram de 20 kDa e 200 kDa. A partir do método utilizado foi possível a identificação nominal de 8 (oito) destas proteínas: ceruloplasmina (PM= 120 kDa), hemopexina (PM= 87 kDa), transferrina (PM= 78 kDa), albumina (PM= 62 kDa), cadeia pesada de imunoglobulinas (PM= 53 kDa), haptoglobina (PM= 44 kDa), glicoproteína ácida (PM= 36 kDa) e cadeia leve de imunoglobulinas (PM= 28 kDa).

As demais bandas proteicas foram identificadas apenas com base nos respectivos pesos moleculares, sendo os seguintes: 187 kDa, 163 kDa, 144 kDa, 133 kDa, 107 kDa, 95 kDa, 40 kDa, 38 kDa, 34 kDa, 33 kDa, 31 kDa, 25 kDa e 23 kDa.

Os resultados apresentados na tabela 4.16 e figura 4.17, em relação às imunoglobulinas de cadeia pesada e imunoglobulinas de cadeia leve demonstraram que houve influência significativa da retenção dos anexos fetais.

Como já descrito e justificado os resultados para as cadeias leves e pesadas de imunoglobulinas ficam comprometidos nesta técnica utilizada e, desta maneira, não foram feitas considerações em relação às diferenças significantes encontradas entre os grupos, sendo apenas apresentados os resultados.

Figura 4.17 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das cadeias pesadas e de cadeias leves de imunoglobulinas de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Apesar de a eletroforese em gel de poliácridamida não ter sido o método mais confiável para a mensuração de albumina sérica na presente pesquisa (Tabela 4.17 e Figura 4.18), mesmo assim foi possível demonstrar a influência significativa da retenção dos anexos fetais sobre os teores séricos de albumina.

As diferenças encontradas na técnica de eletroforese em gel de poliácridamida foram semelhantes às descritas na técnica de eletroforese em acetato de celulose, isto é, a partir das amostras colhidas entre 2 – 4 dias pós-parto, os valores séricos de albumina nos animais com retenção dos anexos fetais foram significativamente menores do que os obtidos nos animais com pós-parto fisiológico, exceto, nas amostras colhidas entre 60° – 90° dia pós-parto quando a albumina deixou de sofrer influência da retenção dos anexos fetais.

Figura 4.18 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de albumina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

A concentração sérica de hemopexina (87 KDa) sofreu influência da retenção dos anexos fetais nas amostras colhidas entre o 15º - 30º e 60º - 90º dias pós-parto, porém, não houve na literatura consultada, trabalhos que pudessem ser confrontados (Tabela 4.16).

Tabela 4.16 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das imunoglobulinas (Ig cadeia leve e Ig cadeia pesada) e hemopexina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008.

Evolução do puerpério (dias pós-parto)								
	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
Cadeia pesada Ig (mg/dL)								
Fisiológico	1631 ± 418 ^A (1548,7)	1632,1 ± 367,9 ^A (1591,8)	1529 ± 477 ^A (1460)	1695 ± 495 ^A (1595)	1699 ± 659 ^A (1676)	1559,9 ± 235,7 ^A (1571,1)	1548 ± 269,7 ^A (1485,4)	1563,1 ± 257,9 ^A (1580,7)
Retenção	1754 ± 401 ^A (1815)	1638 ± 336,1 ^A (1576,9)	2072 ± 361 ^B (2081)	1710,4 ± 356,3 ^A (1758,4)	1930 ± 488 ^A (1954)	1941 ± 587 ^B (1845)	1846 ± 469 ^B (1777)	1744,5 ± 341,9 ^A (1686,8)
Cadeia leve Ig (mg/dL)								
Fisiológico	423,4 ± 345,4 (285,3) ^A	549,1 ± 367,2 (481,7) ^A	701,9 ± 247,3 (684) ^A	652 ± 312,9 (592,2) ^A	568,6 ± 278,8 (547) ^A	1037,6 ± 260,4 (1049,4) ^A	931 ± 739 (573) ^A	629,1 ± 317,8 (538,7) ^A
Retenção	957 ± 469 (838) ^A	1002 ± 492 (956) ^B	781,8 ± 276,7 (765,1) ^A	1051 ± 403 (889) ^B	1121,2 ± 369 (1056,8) ^B	898 ± 440 (689) ^B	1188,8 ± 345,3 (1273,9) ^B	551 ± 427 (383) ^B
Hemopexina (mg/dL)								
Fisiológico	29,94 ± 27,89 (17,77) ^A	40,29 ± 20 (39,37) ^A	50,3 ± 47,3 (42,5) ^A	14,21 ± 6,55 (14,1) ^A	19,02 ± 9,26 (15,95) ^A	79,1 ± 58,1 (53,6) ^A	63,4 ± 52,2 (46,2) ^A	65,5 ± 39,3 (65,9) ^A
Retenção	15,33 ± 10,9 (11,92) ^A	28,49 ± 21,44 (22,46) ^A	28,07 ± 19,2 (19,02) ^A	21,08 ± 12,79 (17,2) ^A	28,4 ± 19,04 (20,49) ^A	26,07 ± 15,63 (23,11) ^B	108,5 ± 119,5 (52,5) ^A	38,43 ± 23,23 (35,37) ^B

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05)

() - mediana

Conforme visualizado na tabela 4.17 e figura 4.19, houve influência negativa da retenção dos anexos fetais na concentração de transferrina (78 KDa), proteína de fase aguda negativa, de forma que a normalização dos seus valores só ocorreu no momento entre o 30º –l 60º dia pós-parto, diferentemente dos animais com puerpério fisiológico, que elevaram seus valores séricos nas amostras colhidas entre o 8 º –l 15º dia pós-parto.

Os animais com retenção dos anexos fetais permaneceram com os valores séricos de transferrina diminuídos por um período maior em relação aos animais com puerpério fisiológico. Seus teores séricos permaneceram baixos até o momento entre o 15º –l 30º dia pós-parto. Isto pode ser associado ao fato das vacas que retêm os anexos fetais terem seis vezes mais chance de desenvolverem infecções uterinas (SMITH; RISCO, 2005) devido ao atraso na involução uterina, na eliminação do lóquio, pelas lesões teciduais, inibição das funções de neutrófilos, além de manter uma grande quantidade de tecidos necróticos no interior do útero criando ambiente ideal para o crescimento bacteriano (LEBLANC et al., 2002). Todos estes fatores podem estimular a resposta inflamatória de fase aguda e conseqüente participação da transferrina, como uma proteína de fase aguda negativa.

Nota: Letras maiúsculas diferentes nos momentos, entre animais com puerpério fisiológico e retenção dos anexos fetais, indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.19 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de transferrina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Tabela 4.17 – Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos das proteínas de fase aguda (ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina e glicoproteína ácida) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Evolução do puerpério e fase pós-puerperal (dias pós-parto)								
	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
Ceruloplasmina (mg/dL)								
Fisiológico	95,52 ± 39,37 ^A (90,02)	120,8 ± 68,8 ^A (107,5)	121,5 ± 46 ^A (110,7)	76,5 ± 48,4 ^A (74,9)	94,6 ± 53,1 ^A (78,1)	79,19 ± 33,46 ^A (80,53)	75,1 ± 64,2 ^A (58,9)	106,7 ± 47,1 ^A (96,7)
Retenção	63,8 ± 71,9 ^A (43,7)	154,5 ± 69,9 ^A (148,4)	153,5 ± 59,8 ^A (135,9)	130,2 ± 59,8 ^B (119,3)	126,2 ± 74,7 ^A (95,8)	116,2 ± 60,6 ^B (114,5)	89,6 ± 79,4 ^A (50,1)	139,4 ± 131,3 ^A (109,1)
Transferrina (mg/dL)								
Fisiológico	87,1 ± 52,1 (73,2) ^A	87,02 ± 33,5 (92,16) ^A	136,2 ± 103,6 (99) ^A	38,03 ± 19,47 (30,7) ^A	108,1 ± 62 (95,9) ^A	254,8 ± 127,1 (273,8) ^A	162,8 ± 156 (80,5) ^A	149,8 ± 86,7 (106,9) ^A
Retenção	65,05 ± 28,12 (68,95) ^A	63,6 ± 48,6 (46,1) ^A	130,7 ± 69,4 (114,9) ^A	88,7 ± 100,8 (45,2) ^A	66,28 ± 34,75 (60,8) ^B	93,6 ± 63,1 (85,5) ^B	193,9 ± 65,6 (199,7) ^A	106,2 ± 47,8 (111,7) ^A
Albumina (g/dL)								
Fisiológico	4,12 ± 0,46 ^A (4,14)	3,90 ± 0,40 ^A (3,92)	3,85 ± 0,37 ^A (3,78)	4,57 ± 0,64 ^A (4,52)	4,20 ± 0,57 ^A (4,13)	3,90 ± 0,42 ^A (3,81)	3,97 ± 0,67 ^A (4,06)	4,02 ± 0,56 ^A (3,97)
Retenção	3,68 ± 0,66 ^A (3,73)	3,22 ± 0,48 ^B (3,23)	3,29 ± 0,54 ^B (3,37)	3,42 ± 0,61 ^B (3,10)	3,53 ± 0,57 ^B (3,60)	3,36 ± 0,55 ^B (3,45)	2,77 ± 0,60 ^B (2,75)	3,89 ± 0,73 ^A (3,89)
Haptoglobina (mg/dL)								
Fisiológico	91,7 ± 140,9 (55,4) ^A	91,31 ± 39,75 (89,07) ^A	87,44 ± 35,39 (80,72) ^A	29,15 ± 24,64 (20,47) ^A	74,3 ± 43 (69,6) ^A	84,17 ± 35,68 (85,25) ^A	39,3 ± 16,77 (36,56) ^A	53,36 ± 29,13 (48,52) ^A
Retenção	61,57 ± 29,25 (59,47) ^A	112,6 ± 46,2 (104,3) ^A	70,4 ± 46 (49,7) ^A	167,2 ± 114,9 (170,9) ^B	118 ± 61 (101,1) ^B	63 ± 60 (35,5) ^A	67,89 ± 38,82 (57,85) ^B	31,17 ± 25,01 (28,93) ^B
Glicoproteína ácida (mg/dL)								
Fisiológico	36,2 ± 40,27 (26,01) ^A	50,4 ± 46,8 (24,4) ^A	30,56 ± 33,48 (13,54) ^A	13,51 ± 13,39 (10,41) ^A	14,38 ± 20,55 (8,17) ^A	62,8 ± 50,3 (46,4) ^A	30,41 ± 17,12 (27,66) ^A	34,27 ± 23,35 (30,42) ^A
Fisiológico	36,96 ± 27,54 (29,84) ^A	83,38 ± 39,05 (76,78) ^B	55,6 ± 75,2 (32,5) ^A	85,7 ± 86 (40,9) ^B	42,86 ± 25,34 (43,62) ^B	13,7 ± 20,42 (8,69) ^B	51,8 ± 33 (49,92) ^B	19,58 ± 19,62 (13,54) ^A

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05)

() - mediana

Por meio do fracionamento das proteínas séricas, utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida, foi possível identificar três proteínas de fase aguda positivas: ceruloplasmina (120 KDa), haptoglobina (44 KDa) e glicoproteína ácida.

Os teores séricos de haptoglobina sofreram influência da retenção dos anexos fetais. Houve diferença significativa nas amostras entre 6º –1 8º e 8º –1 15 dias pós-parto, onde os valores dos animais com retenção dos anexos fetais foi superior ao dos animais com puerpério fisiológico (Tabela 4.17; Figura 4.20).

Nos animais com retenção dos anexos fetais não foi verificada a queda da concentração de haptoglobina evidenciada nos animais com puerpério fisiológico, após o pico nos momentos 2º –1 4º e 4º –1 6º dias pós-parto, que ocorreu devido ao estímulo da contaminação bacteriana instalada no útero após o parto. Os animais com retenção dos anexos fetais demonstraram nas amostras colhidas entre 6 –1 8 dias pós-parto um aumento superior a 8 vezes o valor encontrado de haptoglobina nos animais com puerpério fisiológico e que, apesar de diminuir a concentração no momento 8 –1 15 dias pós-parto, mesmo assim permaneceu significativamente maior do que nos animais com puerpério fisiológico.

Os teores de ceruloplasmina sofreram influência da retenção dos anexos fetais, sendo que os valores dos animais com retenção foram significativamente maiores nos momentos 6º –1 8º e 15º –1 30º dias pós-parto em relação aos animais com puerpério fisiológico. Como ocorrido com os teores séricos da haptoglobina, os valores de ceruloplasmina permaneceram aumentados nos animais com retenção dos anexos fetais, retornando apenas aos valores encontrados nas amostras colhidas entre 8 –1 15 dias pós-parto para os animais com puerpério fisiológico e, novamente, diferiram no momento 15º –1 30º dia pós-parto (Tabela 4.17; Figura 4.21).

Sugere-se que esta diferença nas proteínas de fase aguda haptoglobina e ceruloplasmina entre os animais com retenção dos anexos fetais e os animais com puerpério fisiológico, seja devido ao estímulo provocado pela contaminação bacteriana associada à retenção dos anexos fetais, que atrasa a involução uterina, a eliminação do lóquio, causa lesões teciduais e aumenta a chance dos animais desenvolverem infecções uterinas (LEBLANC et al., 2002; SMITH; RISCO, 2005).

Os resultados em relação a haptoglobina discordaram de Hirvonen et al. (1999), que descreveram valores aumentados de haptoglobina apenas em casos de metrites agudas severas, diagnosticadas entre 4 e 11 dias pós-parto.

Cabe ressaltar que os animais inseridos nos diversos momentos do grupo “retenção dos anexos fetais” foram tratados com antibioticoterapia sistêmica ou intra-uterina, logo após o diagnóstico de retenção dos anexos fetais, isto é, no dia do parto, sendo que, invariavelmente, esse tratamento era feito antes que houvesse prejuízos, já descritos da retenção dos anexos fetais. O presente trabalho não teve como objetivo avaliar os diferentes protocolos terapêuticos utilizados (drogas, doses, período e vias de aplicação).

Smith et al. (1998a,b) trabalharam com um grupo de vacas com metrite puerperal tóxica e verificaram que a concentração de haptoglobina teve correlação com a gravidade da doença, além de verificarem a eficiência da terapia antimicrobiana. Os pesquisadores testaram três protocolos de tratamentos e não observaram diferença na concentração de haptoglobina entre os tratamentos, mas sim em relação à resposta ao tratamento. Hirvonen et al. (1999) sugeriram que o aumento significativo de haptoglobina reflita processos inflamatórios que não estão restritos apenas ao endotélio.

Os resultados discordaram de Skinner, Brown e Roberts (1991) que verificaram aumento significativo dos valores de haptoglobina apenas nos animais com retenção dos anexos fetais entre 3 e 5 dias pós-parto.

Nota: Letras maiúsculas diferentes nos momentos, entre animais com puerpério fisiológico e retenção dos anexos fetais, indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.20 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de haptoglobina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Nota: Letras maiúsculas diferentes nos momentos, entre animais com puerpério fisiológico e retenção dos anexos fetais, indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.21 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de ceruloplasmina de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

A retenção dos anexos fetais influenciou significativamente os teores séricos de glicoproteína ácida, com diferença significativa nas amostras colhidas nos momentos 2º –1 4º, 6º –1 8º, 8º –1 15º, 15º –1 30º, 30º –1 60º dias pós-parto (Tabela 4.17).

A cinética de aumento da glicoproteína foi semelhante à da haptoglobina nos animais com retenção dos anexos fetais, demonstrando que a glicoproteína ácida respondeu aos prejuízos causados pela retenção dos anexos fetais, prolongando a queda do pico nos animais com puerpério fisiológico devido à contaminação bacteriana no pós-parto.

A glicoproteína ácida foi, entre as 3 proteínas de fase aguda identificadas na presente pesquisa, a única que apresentou um padrão diferente de curva entre os dois grupos retenção e fisiológico (Figura 4.22).

Este padrão de curva diferente ocorreu porque não houve, nos animais com puerpério fisiológico, uma resposta significativa de aumento da concentração de glicoproteína ácida, devido à contaminação bacteriana uterina no pós-parto recente. Diferentemente, os teores séricos de glicoproteína ácida, nos animais com retenção dos anexos fetais, responderam de forma significativa à contaminação bacteriana associada a retenção dos anexos fetais.

Os resultados corroboram com os achados de Hirvonen et al. (1999) que descreveram que a média dos valores desta proteína foi significativamente maior em vacas com metrite aguda em relação a vacas controle na primeira semana pós-parto, permanecendo aumentada por muitas semanas e que não foi possível correlacionar com a gravidade da doença. Nos animais com retenção dos anexos fetais a concentração de glicoproteína ácida aumentou até as amostras entre 8 –1 15 dias pós-parto. Após este momento as concentrações diminuem, o que concordou com os resultados de Cairoli et al. (2006) que verificaram em novilhas com endometrite pós-parto que os valores permaneceram aumentados durante 2 semanas no pós-parto.

As causas que promoveram as diferenças existentes nos momentos entre 15 –1 30 e 30 –1 60 dias pós-parto não puderam ser elucidadas, pois o fator de estímulo das proteínas de fase aguda não pode ser diagnosticado pelo exame clínico proposto na presente pesquisa.

Nota: Letras maiúsculas diferentes nos momentos, entre animais com puerpério fisiológico e retenção dos anexos fetais, indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Figura 4.22 - Influência da retenção dos anexos fetais nos teores séricos de glicoproteína ácida de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008

Além das proteínas de fase aguda, a identificação de outras frações protéicas presentes no plasma sanguíneo torna-se útil como indicador do estado de sanidade e/ou imunológico dos animais (PASSOS, 2004); diante disto foram apresentadas na Tabela 4.18 as proteínas que não puderam ser identificadas e cujos pesos moleculares variavam entre 187 e 23 KDa. Durante os 90 primeiros dias pós-parto, os valores médios destas frações protéicas oscilaram conforme a seguir discriminado: 187 KDa – entre $64,5 \pm 62,6$ e $503,1 \pm 120,7$ mg/dl; 163 Kda - entre $5,96 \pm 5,42$ e $33,7 \pm 46,4$ mg/dl; 144 KDa – entre $10,28 \pm 7,62$ e $36,8 \pm 53,1$ mg/dl; 133 KDa – entre $5,07 \pm 2,61$ e $33,6 \pm 49,1$ mg/dl; 107 KDa – entre $15,13 \pm 6,28$ e $31,64 \pm 18,84$ mg/dl; 95 KDa – entre $32,73 \pm 15,53$ e $77,29 \pm 15,27$ mg/dl; 40 KDa – entre $27,55 \pm 25,51$ e $168,7 \pm 86,7$ mg/dl; 38 KDa – entre $56,69 \pm 25,7$ e $13,3 \pm 14,5$ mg/dl; 34 KDa – entre $17,51 \pm 16,18$ e $64,1 \pm 42,9$ mg/dl; 33 KDa – entre $17,22 \pm 21,58$ e $58,39 \pm 32,91$ mg/dl; 31 KDa – entre $31,05 \pm 19,21$ e $65,43 \pm 33,16$ mg/dl; 25 KDa – entre $123 \pm 84,4$ e $347 \pm 190,3$ mg/dl; e, 23 KDa – entre $24,61 \pm 18,09$ e $56,84 \pm 37,18$ mg/dl.

Tabela 4.18 – Influência do puerpério e da fase pós-puerperal nos teores séricos das frações protéicas não identificadas (pesos moleculares de 187 KDa, 163 KDa, 144 KDa, 133 KDa, 107 KDa, 95 KDa, 40 KDa, 38 KDa, 34 KDa, 33 KDa, 31 KDa, 25 KDa, 23 KDa) de vacas Holandesas, criadas no Estado de São Paulo - São Paulo, 2008. (continua)

Evolução do puerpério e fase pós-puerperal (dias pós-parto)								
	1° – 2°	2° – 4°	4° – 6°	6° – 8°	8° – 15°	15° – 30°	30° – 60°	60° – 90°
	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
187 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	209,9 ± 88,2 ^A (210,1)	306,1 ± 117,1 ^A (323,8)	285,9 ± 70,8 ^A (279,1)	188,1 ± 119,6 ^A (224,8)	285,7 ± 69,7 ^A (285,3)	171,1 ± 50,9 ^A (160)	180,2 ± 83,2 ^A (173,6)	467,3 ± 156,5 ^A (428,8)
Retenção	64,5 ± 62,6 ^B (50)	114 ± 64,7 ^B (94,9)	98,8 ± 39 ^B (102,7)	102,2 ± 49,7 ^B (111,1)	130 ± 80,1 ^B (112,5)	259,6 ± 128,2 ^B (256,9)	137 ± 125,4 ^A (70)	503,1 ± 120,7 ^A (468,2)
163 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	12,47 ± 9,07 (9,1) ^A	16,41 ± 9,92 (14,21) ^A	13,19 ± 5,89 (11,66) ^A	7,16 ± 4,82 (6,37) ^A	12,8 ± 5,39 (12,26) ^A	23,37 ± 10,86 (21,86) ^A	8,1 ± 4,94 (7,5) ^A	14,38 ± 6,78 (14,2) ^A
Retenção	19,15 ± 14,28 (16,61) ^A	19,25 ± 9,22 (16,65) ^A	12,3 ± 14,11 (7,64) ^A	12,29 ± 8,74 (9,34) ^A	13,54 ± 9,41 (10,34) ^A	5,96 ± 5,42 (3,79) ^B	33,7 ± 46,4 (5,22) ^B	12,63 ± 9,96 (9,97) ^A
144 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	18,81 ± 13,01 (15,05) ^A	24,33 ± 21,08 (20,04) ^A	23,49 ± 12,7 (25,02) ^A	8,89 ± 5,43 (8,14) ^A	15,09 ± 10,22 (13,74) ^A	21,84 ± 8,39 (20,59) ^A	9,55 ± 8,22 (8,14) ^A	18,81 ± 13,19 (15,48) ^A
Retenção	14,85 ± 12,58 (11,76) ^A	14,29 ± 7,03 (13,72) ^B	17,59 ± 10,06 (16,04) ^A	16,25 ± 8,59 (14,09) ^B	17,51 ± 9,29 (14,71) ^A	10,28 ± 7,62 (7,84) ^B	36,8 ± 53,1 (9,07) ^A	16,22 ± 14,13 (11,61) ^A
133 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	14,99 ± 8,31 (15,15) ^{abc}	17,63 ± 8,27 (16,9) ^{ac}	19,5 ± 10,54 (18,03) ^{ac}	8,58 ± 4,32 (7,2) ^b	17,45 ± 5,92 (16,79) ^{ac}	20,6 ± 8,76 (17,6) ^{ac}	11,64 ± 6,77 (12,26) ^{bc}	17,79 ± 10,68 (13,3) ^{abc}
Retenção	5,07 ± 2,61 (4,07) ^B	8,08 ± 4,92 (6,66) ^B	9,69 ± 4,3 (9,8) ^B	6,03 ± 6,29 (4,29) ^B	12,52 ± 10,54 (9,37) ^B	6,45 ± 3,55 (5,35) ^B	33,6 ± 49,1 (4,25) ^A	19,17 ± 12,52 (16,17) ^A
107 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	16,05 ± 14,9 (10,45) ^A	27,58 ± 13,91 (24,87) ^A	23,08 ± 7,37 (23,39) ^A	8,79 ± 4,97 (8,87) ^A	17,8 ± 7,83 (15,03) ^A	24,19 ± 11,91 (24,49) ^A	15,35 ± 5,97 (15,53) ^A	18,97 ± 9,02 (19,51) ^A
Retenção	22,35 ± 15,66 (15,91) ^A	27,15 ± 23,82 (23,46) ^A	20,78 ± 9,85 (17,73) ^A	25,4 ± 10,61 (28,34) ^B	31,64 ± 18,84 (23,45) ^B	15,13 ± 6,28 (14,23) ^B	46,2 ± 59,2 (13,4) ^A	20,69 ± 14,55 (18,75) ^A

Evolução do puerpério e fase pós-puerperal (dias pós-parto)								
	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
95 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	49,58 ± 17,04 ^A (47,76)	62,04 ± 21,49 ^A (61,02)	58,2 ± 11,97 ^A (56,59)	38,66 ± 18,22 ^A (41,26)	45,68 ± 15,79 ^A (49,56)	48,94 ± 15,51 ^A (49,08)	43,68 ± 15,54 ^A (44,49)	74,11 ± 20,75 ^A (73,55)
Retenção	37,06 ± 29,27 ^A (36,55)	44,01 ± 17,03 ^B (43,4)	35,76 ± 9,59 ^B (35,13)	32,73 ± 15,53 ^A (31,79)	41,66 ± 17,95 ^A (42,21)	41,3 ± 14,55 ^A (40,46)	74,4 ± 63,7 ^A (40,1)	77,29 ± 15,27 ^A (75,99)
40 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	27,16 ± 21,41 ^A (23,62)	45,35 ± 20,08 ^A (41,24)	42,92 ± 17,74 ^A (42,47)	10,87 ± 6,44 ^A (9,14)	35,06 ± 27,36 ^A (26,06)	75,51 ± 35,24 ^A (78,6)	31,97 ± 13,2 ^A (28,12)	42,44 ± 25,56 ^A (30,63)
Retenção	39,78 ± 13,31 ^B (38,52)	58,63 ± 28,35 ^A (50,36)	168,7 ± 86,7 ^B (183,2)	36,25 ± 25,14 ^B (32,05)	48,68 ± 29,28 ^A (49,23)	46,2 ± 87,2 ^B (19,5)	103,6 ± 53,1 ^B (95,7)	27,55 ± 25,51 ^A (21,29)
40 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	27,16 ± 21,41 ^A (23,62)	45,35 ± 20,08 ^A (41,24)	42,92 ± 17,74 ^A (42,47)	10,87 ± 6,44 ^A (9,14)	35,06 ± 27,36 ^A (26,06)	75,51 ± 35,24 ^A (78,6)	31,97 ± 13,2 ^A (28,12)	42,44 ± 25,56 ^A (30,63)
Retenção	39,78 ± 13,31 ^B (38,52)	58,63 ± 28,35 ^A (50,36)	168,7 ± 86,7 ^B (183,2)	36,25 ± 25,14 ^B (32,05)	48,68 ± 29,28 ^A (49,23)	46,2 ± 87,2 ^B (19,5)	103,6 ± 53,1 ^B (95,7)	27,55 ± 25,51 ^A (21,29)
38 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	16,5 ± 16,12 (9,57) ^A	32,49 ± 16,55 (23,37) ^A	27,42 ± 9,56 (24,84) ^A	6,09 ± 4,51 (4,22) ^A	16,81 ± 14,45 (10,83) ^A	41,96 ± 18,47 (42,19) ^A	18,84 ± 8,24 (16,63) ^A	19,41 ± 10,82 (16,91) ^A
Retenção	28,14 ± 20,51 (17,24) ^B	25,46 ± 15,39 (18,55) ^A	56,69 ± 25,7 (55,19) ^B	33,63 ± 22,69 (30,73) ^B	41,81 ± 36,09 (26,41) ^B	13,13 ± 14,5 (7,62) ^B	43,91 ± 37,71 (40,82) ^B	13,04 ± 11,44 (9,36) ^B
34 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	12,28 ± 7,76 (9,15) ^A	19,54 ± 8,21 (16,88) ^A	15,84 ± 4,91 (16) ^A	6,38 ± 4,84 (5,55) ^A	15,38 ± 13,04 (12,31) ^A	41,24 ± 26,16 (39,08) ^A	21,33 ± 10,91 (18,2) ^A	24,12 ± 15,82 (19,1) ^A
Retenção	21,11 ± 13,63 (15,74) ^A	25,41 ± 11,9 (26,92) ^A	64,1 ± 42,9 (71,7) ^B	23,62 ± 20,39 (17,57) ^B	37,78 ± 36,29 (27,1) ^B	18,12 ± 19,01 (12,38) ^B	43,61 ± 40,48 (39,27) ^B	17,51 ± 16,18 (11,75) ^A

(Conclusão)

Evolução do puerpério e fase pós-puerperal (dias pós-parto)								
	1º – 2º	2º – 4º	4º – 6º	6º – 8º	8º – 15º	15º – 30º	30º – 60º	60º – 90º
	(24– 48 hs)	(48– 96 hs)	(96– 144 hs)	(144– 192 hs)	(192– 360 hs)	(360– 720 hs)	(720– 1440 hs)	(1440– 2160 hs)
33 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	13,06 ± 7,8 (11,66) ^A	16,75 ± 8,26 (16,8) ^A	17,6 ± 5,14 (17,3) ^A	5,82 ± 4,09 (4,71) ^A	11,85 ± 9,59 (6,79) ^A	35,53 ± 22,84 (35,65) ^A	19,28 ± 11,65 (19,68) ^A	25,92 ± 11,81 (28,37) ^A
Retenção	23,33 ± 10,33 (22,41) ^B	35,83 ± 22,61 (34,92) ^B	34,55 ± 12,35 (32,38) ^B	22,3 ± 11,33 (21,37) ^B	27,75 ± 18,57 (25,2) ^B	17,22 ± 21,58 (9,33) ^B	58,39 ± 32,91 (60,11) ^B	14,47 ± 10,89 (9,91) ^B
31 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	27,08 ± 12,67 ^A (27,04)	47,16 ± 25,54 ^A (41,48)	51,37 ± 16,49 ^A (48,84)	14,62 ± 9,27 ^A (12,22)	30,97 ± 26,42 ^A (23,37)	52,33 ± 35,59 ^A (48,31)	26,04 ± 10,75 ^A (28,72)	44,52 ± 25,81 ^A (45,43)
Retenção	39,73 ± 16,66 ^B (33,79)	52,89 ± 25,93 ^A (48,6)	51,82 ± 22,04 ^A (54,52)	38,41 ± 29,3 ^B (29,92)	45,7 ± 21,19 ^B (51,07)	26,58 ± 15,4 ^B (23,45)	65,43 ± 33,16 ^B (66,67)	31,05 ± 19,21 ^A (22,21)
25 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	156 ± 67,5 ^A (158,5)	208,7 ± 108,1 ^A (190,1)	289,7 ± 83,4 ^A (289,6)	237,6 ± 132,9 ^A (180,9)	230,3 ± 165,7 ^A (173,9)	383,8 ± 92,9 ^A (406,4)	489,3 ± 130,2 ^A (483,1)	424,5 ± 132,5 ^A (457,7)
Retenção	259,3 ± 90 ^B (237,4)	259,9 ± 107,1 ^A (239,2)	123 ± 84,4 ^B (111,6)	300,2 ± 159,6 ^A (231,3)	276,9 ± 165,9 ^A (181,7)	223,1 ± 145,5 ^B (188,6)	339,8 ± 133,3 ^B (334,9)	347 ± 190,3 ^A (339)
23 KDa (mg/dL)								
Fisiológico	33,74 ± 37,92 (22,26) ^A	46,42 ± 25,88 (43,74) ^A	46,38 ± 17,91 (44,86) ^A	12,47 ± 8,7 (7,45) ^A	14,86 ± 12,85 (10,37) ^A	81,9 ± 46,5 (77,9) ^A	31,02 ± 17,77 (28) ^A	61,37 ± 33,59 (62,8) ^A
Retenção	57,99 ± 29,09 (50,18) ^B	56,84 ± 37,18 (58,4) ^A	16,44 ± 12,93 (12,36) ^B	54,64 ± 34,8 (42,87) ^B	48,59 ± 26,5 (51,9) ^B	24,61 ± 18,09 (15,01) ^B	30,35 ± 13,85 (28,36) ^A	32,63 ± 16,65 (28,38) ^B

Nota: Letras maiúsculas diferentes nas colunas indicam diferença estatística entre os grupos (p<0,05)

() - mediana

5. CONCLUSÕES

Nas condições deste estudo e com base nos resultados obtidos foi possível concluir que:

- 1) As proteínas de fase aguda avaliadas neste experimento alteraram de forma significativa nos animais com puerpério fisiológico e com retenção dos anexos fetais.
- 2) Nos animais com puerpério fisiológico as proteínas de fase aguda positivas, sejam elas haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida, responderam de forma significativa tanto ao estímulo do parto quanto à contaminação bacteriana uterina no pós-parto. A glicoproteína ácida apresentou menor magnitude.
- 3) Nos animais com retenção dos anexos fetais, as proteínas de fase aguda, sejam elas a haptoglobina, ceruloplasmina e glicoproteína ácida, responderam de forma significativa ao estímulo da contaminação bacteriana uterina no pós-parto e ao estímulo da retenção dos anexos fetais, prolongando o tempo da duração da resposta inflamatória.
- 4) A proteína glicoproteína ácida representou mais evidentemente o quadro de inflamação aguda induzida pela retenção dos anexos fetais.
- 5) Nos animais com retenção dos anexos fetais, a proteína albumina comportou-se como proteína de fase aguda negativa, provavelmente por fatores diversos, como a interferência de distúrbios hepáticos ou metabólicos; desvio de sua síntese hepática para a produção de outras proteínas; e inflamação, infecção e absorção de toxinas bacterianas.
- 6) A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, com tampão de aplicação com agente redutor não é indicada para o estudo do comportamento das proteínas albumina e imunoglobulinas.
- 7) Por meio da técnica de eletroforese em fita de acetato de celulose demonstrou-se que o puerpério não alterou de forma significativa a concentração de albumina, mas alterou significativamente as frações alfa, beta e gamaglobulinas.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa, 1998. 574 p.
- ALSEMGEEEST, S. P. M.; KALSBECK, H. C.; WENSING, T.; KOEMAN, J. P.; VAN EDEREN, A. M.; GRUYS, E. Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (HP) as parameters of inflammatory diseases in cattle. **The Veterinary Quarterly**, v.16, n.1, p. 21-23, 1994.
- ALSEMGEEEST, S. P.; TAVERNE, M. A. M.; BOOSMAN, R.; VAN DER WEYDEN, B. C.; GRUYS, E. Peripartum acute-phase protein serum amyloid-A concentration in plasma of cows and fetuses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p.164-167, 1993.
- BARROS FILHO, I. R. **Contribuição ao estudo da bioquímica em zebuínos da raça Nelore (*Bos indicus*, L. 1758) criados no Estado de São Paulo**.1995.133 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo,São Paulo, 1995.
- BIRGEL, E. H.; PEREIRA, P. C.; BOTTINO, J. A.; AMARAL, V. Considerações sobre o teor de proteína total, albumina, globulinas e relação albumina/globulinas no plasma de 3 lotes de bovinos da raça Hereford. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 31, n. 4, p.103-108, 1964.
- BIRGEL JUNIOR, E. H.; NEVES, F. S.; SALVATORE, L. C. A; MIRANDOLA, R. M.; TÁVORA, J. P. F.; BIRGEL, E. H. Avaliação da Influência da Gestação e do Puerpério sobre a Função Hepática de Bovinos da Raça Holandesa. **Ars Veterinária**, v. 19, n. 2, p.172-178, 2003.
- CAI, T. Q.; WESTON, P. G.; LUND, L. A.; BRODIE, B.; MCKENNA, D. J.; WAGNER, W. C. Association between neutrophil functions and periparturient disorders in cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 55, n. 7, p. 934-943, 1994.
- CAIROLI, F.; BATTOCCHIO, M.; VERONESI, M. C.; BRAMBILLA, D.; CONSERVA, F.; EBERINI, I.; WAIT, R.; GIANAZZA, E. Serum protein pattern during cow pregnancy: Acute-phase proteins increase in the peripartum period. **Electrophoresis**, n. 27, p. 1617–1625, 2006.
- CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005.
- CHASSAGNE, M.; BARNOUIN, J. Circulating PgF2 α and nutritional parameters at parturition in dairy cows with and without retained placenta: relation to prepartum diet. **Theriogenology**, v. 38, n. 3, p.407-418, 1992.

CONNER, J. G.; ECKERSALL, P. D.; FERGUSON, J.; DOUGLAS, T. A. A acute phase response in the dog following surgical trauma. **Research in Veterinary Science**, v. 45, n. 1, p.107-110, 1988.

CONNER, J.; ECKERSALL, P. D.; WISEMAN, A.; BAIN, R.K.; DOUGLAS, T. A. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. **Research Veterinary Science**, v. 47, p. 203-207, 1989.

D'ANGELINO, J. L.; ARAUJO, L. M.; BIRGEL, E. H.; REICHMANN, C. E.; ARAUJO, W. P. Influência da gestação e do puerpério sobre o proteinograma sanguíneo de bovinos da raça Holandesa Branca e Preta. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.12, p.197-204, 1975.

DOHMEN, M. J. W.; JOOP, K.; STURK, A.; BOLS, P. E. J.; LOHUIS, J. A. C. M. Relationship between intra-uterine bacterial contamination, endotoxin levels and the development of endometritis in postpartum cows with distocia or retained placenta. **Theriogenology**, v. 54, p.1019-1032, 2000.

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

EDINGHER, V. H.; MILLER, I.; STANER, C.; GEMEINER, M. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horse. **Distch. Tierarztl. Wsch.,Leine**, v. 9, p. 426-430, 1992.

ELLIOT, L.; MCMAHON, K. J.; GIER, H. T.; MARION, G. B. Uterus of the cow after parturition: bacterial content. **American Journal of Veterinary Research**, v. 29, n. 1, p. 77-81, 1968.

FAGLIARI, J. J.; OKUDA, H. T.; PASSIPIERI, M.; CURI, P. R. Valores de referência das proteínas séricas de bovinos Guzerá em diferentes faixas etárias. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 43, n. 1, p. 39-60, 1991.

FAGLIARI, J. J.; SANTAN, A. E.; MARCHIO, W.; CAMPOS FILHO, E.; CURI, P. R. Constituintes sanguíneos de vacas das raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) e de bubalinos (*Bubalus bubalis*) da raça Murah durante a gestação, no dia do parto e no puerpério. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 50, n. 3, p. 273-282, 1998.

FAGLIARI J. J.; SILVA, S. L. Hemograma e proteinograma plasmático de eqüinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 559-586, 2002.

FAGLIARI, J. J.; WEISS, D. J.; MCCLENANHAN, D.; EVANSON, O.A. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 4, p. 383-387, 2003.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H. Variação da concentração de imunoglobulinas G e M, de proteína total e suas frações eletroforéticas e da atividade da gamaglutamiltransferase no soro sanguíneo de vaca holandesas, antes e após o parto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 2, p.11-116, 2000.

FEITOSA, F. L. F.; BIRGEL, E. H.; MIRANDOLA R. M. S.; PERRI, S. H. V. Proteinograma sérico de bezerros holandeses do nascimento até um ano de vida. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 105-108, 2001.

FERNANDES, C. A. C.; COSTA, D. S.; VIANA, J. H. M. Impacto da retenção de placenta sobre a performance reprodutiva de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 1, p. 26-30, 2001.

GILBERT, R. P.; GRÖHN, Y. T.; MILLER, P. M.; HOFFMAN, D. J. Effect of parity on periparturient neutrophil function in dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 36, p. 75-82, 1993.

GODSON, D. L. et al. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.51, p. 277-292, 1996.

GONÇALVES, D.; KOZICKI, L. E. Perfis bioquímicos e imunológicos no período peripartal de vacas leiteiras com e sem retenção de placenta. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 34, n. 6, p. 364-370, 1997.

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

GRIFFIN, J. F. T.; HARTIGAN, P. J.; NUNN, W. R. Non-specific uterine infection and bovine fertility. I. Infection patterns and endometritis during the first seven weeks post-partum. **Theriogenology**, v. 1, n. 3, p. 91-106, 1974.

GRÖHN, Y. T.; HERB, H. N.; MCCULLOCH, C. E.; SALONIEMI, H. S. Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 8, p. 25-39, 1990.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. **Obstetrícia veterinária**. 1. ed. Porto alegre: Ed. Sulina, 1982. p. 323.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G.; BIRGEL JUNIOR, E. H. **Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos – Ginecologia**. Editora Livraria Varela, São Paulo – SP, 2005. 551 p.

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

GUNNINK, J. W. Retained placenta and leucocytic activity. **Veterinary Quarterly**, v. 6, n. 2, p. 52-54, 1984.

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

HIRVONEN, J.; HUSZENICZA, G.; KULCSAR, M.; PYÖRÄLÄ, S. Acute-response in dairy cows with acute postpartum metritis. **Theriogenology**, v. 51, p. 1071-1083, 1999.

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

HOEDEMAKER, M.; LUND, L. A.; WAGNER, W. C. Function of neutrophils and chemoattractant properties of fetal placental tissue during the last month of pregnancy in cows. **American Journal Veterinary Research**, v. 53, n. 9, p. 1524-1529, 1992.

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

JAIN, N. C. Acute phase protein. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy: small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 468-471.

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

JOOSTEN, I.; HENSEN, E. J. Retained placenta: an immunological approach. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 451-461, 1992.

JOOSTEN, I.; STELWAGEN, J.; DIJKHUIZEN, A. A. Economic and reproductive consequences of retained placenta in dairy cattle. **The Veterinary Record**, v. 123, p. 53-57, 1988.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997, 932 p.

KARSAI, F.; SCHÄFER, M. Diagnostische Erfahrungen bei metabolisch bedingten Leberkrankheiten der Milchkühe. **Monatshefte für Veterinärmedizin**, v.39, p.181-186, 1984.

KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **Br Veterinary Journal**, v. 148, p. 279-281, 1989.

KIMURA, K.; GOFF, J. P.; KEHRLI, M. E.; REINHARDT, T. A. Decreased neutrophil function as a cause of retained placenta in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 544-550, 2002.

KREMERS, B.; BRIERE, R. O.; BATASAKIS, J. G. Reflectance densitometry of cellulose acetate protein electrophoresis. **American Journal of Medical Technology**, v. 33, p. 28-34, 1967.

KUMAR, R.; SHARMA, I. J.; RAO, M. L. V.; QUADRI, M. A. Status of haemogram, plasma proteins, minerals and sub-clinical ketosis in cows and buffaloes. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 71, n. 2, p. 118-121, 2001.

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

LARSON, B. L.; KENDAL, K. A. Changes in specific blood serum proteins levels associated with parturition in the bovine. **Journal Dairy Science**, v. 40, p. 659, 1957.

LEBLANC, S. J.; DUFFIELD, T. F.; LESLIE, K. E. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 9, p. 2223-2236, 2002.

LONA-D, V.; ROMERO-R, C. Short communication: Low levels of colostral immunoglobulins in some dairy cows with placental retention. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 389-391, 2001.

MADSEN, S. A.; WEBER, P. S. D.; BURTON, J. L. Altered expression of cellular genes in neutrophils of periparturient dairy cows. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 86, p. 159-175, 2002.

MINOCCHERI, F. Aspetto genetico delle aptoglobine di alcune specie animali. **Archivio Veterinario Italiano**, v. 16, p. 433-447, 1965.

MORAES, M. P.; WEIBLEN, R.; SILVA, A. M.; TOBIAS F. L. Evolução da imunidade passiva em fêmeas bovinas da raça Holandesa. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 27, p. 435-440, 1997.

MULEI, C. M.; MUTIGA, E. R.; GITAU, G. K. Retained foetal membranes in cattle: relationship between bacterial isolates, blood picture and systemic involvement. **Indian Journal of Animal Science**, v. 63, n. 3, p. 235-238, 1993.

NAOUM, P. C. **Eletroforese: técnicas e diagnósticos**. Livraria e Editora Santos, 1999. 121 p.

NATH, H. C.; BARUAH, K. K.; BARUAH, A.; SARMAH, H. D.; SARMAH, B. C. Serum cholesterol and protein in pre, peri and postpartum cows. **Indian Veterinary Journal**, v. 82, p. 519-521, 2005.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3. ed. New York: Worth, 2000. 1152 p.

OLIVEIRA, A. R.; VOGEL, J. Proteinograma eletroforético de bovinos normais da raça Canchim. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 5, p.165-166, 1984.

PATEL, P. M.; DHAMI, A. J.; HINSU, T. V.; RAMANI, V. P.; SARVAIYA, N. P.; KAVANI, F. S. Comparative evaluation of blood biochemical and progesterone profile of fertile and infertile estrous cycles in postpartum Holstein Friesian cows. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 76, n. 3, p. 191-195, 2006.

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.

REGASSA, F.; NOAKES, D. E. Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria. **The Veterinary Record**, v. 144, p. 502-506, 1999.

SAUT, J. P. E. **Influência do puerpério e da retenção dos anexos fetais sobre o hemograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa**. 2004. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SAUT, J. P. E.; BIRGEL JUNIOR, E. H. Influência do período pós-parto sobre o leucograma de fêmeas bovinas da raça Holandesa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43; n. 5, p. 588-597, 2006.

SCHUKKEN, Y. H.; ERB, H. N.; SMITH, R.D. The relationship between mastitis and retained placenta in a commercial population of Holstein dairy cows. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 5, p. 181-190, 1988.

SEVELIUS, E.; ANDERSON, M. Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. **Veterinary Record**, v. 137, p. 663-667, 1995.

SHELDON, I. M. The postpartum uterus. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 20, p. 569-591, 2004.

SHELDON, I. M.; DOBSON, H. Postpartum uterine health in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 295-306, 2004.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; DOBSON, H. Acute phase protein response to postpartum uterine bacterial contamination in cattle. **The Veterinary Record**, v. 148, p. 172-175, 2001.

SHELDON, I. M.; NOAKES, D. E.; RYCROFT, A. N.; PFEIFFER, D. U.; DOBSON, H. Influence of uterine bacterial contamination after parturition on ovarian dominant follicle selection and follicle growth and function in cattle. **Reproduction**, v. 123, p. 837-845, 2002.

SINGH, S. V.; PACHAURI, S. P. Acute phase proteins in bovine mastitis. **Indian Journal Animal Sciences**, New Delhi, v. 72, n. 1, p. 20-22, 2002.

SKINNER, J. G.; BROWN, R. A. L.; ROBERTS, L. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. **The Veterinary Record**, v. 128, p. 147-149, 1991.

SKINNER, J. G.; ROBERTS, L. Haptoglobin as an indicator of infection in sheep. **The Veterinary Record**, v. 134, p. 33-36, 1994.

SMITH, B. I.; DONOVAN, G. A.; RISCO, C.; YOUNG, C. R.; STANKER, L. H.; ELLIOTT, J. Serum haptoglobin concentrations in Holstein dairy cattle with toxic puerperal metritis. **The Veterinary Record**, v. 142, p. 83-85, 1998a.

SMITH, B. I.; DONOVAN, G. A.; RISCO, C.; LITTELL, R.; YOUNG, C. R.; STANKER, L. H.; ELLIOTT, J. Comparison of various antibiotic treatments for cows diagnosed with toxic puerperal metritis. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1555-1562, 1998b.

SMITH, B. I.; RISCO, C. A. Management of periparturient disorders in dairy cattle. **Veterinary Clinics Food Animal**, v. 21, p. 503-521, 2005.

SMITH, B. P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1993. p. 258-260.

SOUZA, R. M. **Avaliação da função hepática e do lipidograma no período puerperal e pós-puterperal e suas inter-relações com os distúrbios reprodutivos de fêmeas bovinas da raça Holandesa, criadas no Estado de São Paulo**. 2005. 192 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

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

SPOONER, R. L. Haemoglobin reactive protein in cattle: partial characterisation. **Research in Veterinary Science**, v. 14, p. 90-96, 1973.

SRINIVAS, T.; NAIDU, K. S.; BRAHMAIAH, K. V.; RAO, T. S. C. S.; KUMAR, P. R. Retained foetal membranes in crossbred cows a haematological and biochemical study. **Indian Veterinary Journal**, v. 76, p. 233-235, 1999.

STRUFALDI, B. **Prática de bioquímica clínica**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1987.

TAKIGUCHI, M.; FUGINAGA, T.; MIZUNO, S.; OTOMO, K. Isolation characterization, and quantitative analysis of c- reactive protein from house. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v. 51, p. 1215-1220, 1990.

THOMAS, J. S. Overview of plasma proteins. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2006. 1344 p.

UCHIDA, E.; KATOH, N.; TAKAHASHI, K. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 55, p. 893-894, 1993.

VOGEL, J.; RUSSO, E.; SZECHY, A. M. Contribuição a bioquímica do sangue de zebus (*Bos indicus*) das raças Nelore e Guzerá. **Revista Militar de Remonta e Veterinaria**, n.1-4, p.1957.

WAGNER, W. C. Endocrine physiology of parturient cows and placental retention. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 2, p. 61-71, 1989.

YOSHINO, K.; KATOH, N.; TAKAHASHI, K.; YUASA, A. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, p. 951-956, 1992.