

## PROTEINOGRAMA SÉRICO DE ÉGUAS COM PLACENTITE ASCENDENTE

CAMILA GERVINI WENDT<sup>1</sup>; DEBORA MACHADO NOGUERA<sup>2</sup>; LAURA CORRÊA DE OLIVEIRA<sup>3</sup>; CLÁUDIA HAETINGER<sup>4</sup>; ALICE CORREA SANTOS<sup>5</sup>; CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – camiila\_wendt@hotmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – debora.noguera@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – laura.coliveira@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - cloue\_haet@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - alice.cs@live.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas - cewn@terra.com.br

### 1. INTRODUÇÃO

Perdas gestacionais tardias representam um grande problema na indústria equina, a causa mais frequente de perdas no terço final é da gestação é a placentite. Esta enfermidade normalmente é causada por uma infecção ascendente que se insere na placenta via cérvix (TROEDSSON, M. H. T., 1997). O principal agente causador de infecções placentárias é o *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (GILES *et al.*, 1993).

Proteínas de fase aguda (PFAs) são consideradas marcadores precoces do processo inflamatório, auxiliando da detecção do grau e curso da inflamação (CRISMAN *et al.*, 2008). As PFAs sofrem alterações na concentração sanguínea em animais submetidos a injúrias, como infecções, inflamações, traumas cirúrgicos ou estresse (MURATA *et al.*, 2004). As concentrações séricas dessas proteínas estão relacionadas com a severidade da desordem e da área afetada (KENT e GOODALL, 1991) e a quantificação de sua concentração pode fornecer informações para o diagnóstico e prognóstico do animal.

A identificação sérica dessas proteínas pode ser realizada por eletroforese (KANEKO *et al.*, 1997). Segundo Fagliari e Silva (2002), a eletroforese de gel poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), além de ser de baixo custo, fácil execução e necessitar de um volume reduzido de amostra, possibilita visualização de concentrações proteicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas com pesos moleculares variando de 24.000 até 340.000 daltons.

O objetivo deste estudo foi avaliar o proteinograma sérico em éguas após a indução e o tratamento de placentite ascendente.

### 2. METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado na temporada reprodutiva 2012-2013. Foram utilizadas oito éguas mestiças do Centro de Experimentação em Equinocultura da Palma (CEEP), da Universidade Federal de Pelotas, no município de Capão do Leão, Rio Grande do Sul (31°48'08.2"S; 52°29'51.4"O).

Entre os dias 290-300 de gestação, as éguas foram submetidas à indução de placentite, através da infusão intra-cervical de *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* na concentração de 10<sup>7</sup> UFC, conforme protocolo sugerido por Bailey *et al.* (2010). Todas as éguas foram diagnosticadas com placentite, devido à secreção vulvar de aspecto purulento, o desenvolvimento precoce do úbere e o espessamento da junção útero placentária. Na avaliação microbiológica da secreção foi identificado o crescimento de *S. equi zooepidemicus*, além da

presença de células inflamatórias por citologia, confirmando o diagnóstico de placentite ascendente. O tratamento foi realizado 48 horas pós-indução, conforme o protocolo utilizado por Feijó *et al.* (2014). Sendo este com sulfametoxazol e trimetoprim na dose de 30 mg/kg, a cada 12 horas, durante 10 dias e flunixin meglumine, na dose de 1,1mg/kg, a cada 24 horas, durante sete dias.

As éguas foram acompanhadas constantemente após a indução, e todos os partos foram assistidos para avaliar a necessidade de intervenção. A placenta foi inspecionada e pesada imediatamente após a expulsão, foram coletados fragmentos de sete pontos desta, conforme o método de Schlafer (2004), e encaminhados para avaliação histopatológica.

Foram analisadas amostras plasmáticas das éguas em oito momentos: 60 dias pré-parto (M1), 30 dias pré-parto (M2), no dia da indução (M3), 24 horas pós-indução (M4), 48 horas pós-indução (M5), no dia que antecedeu o parto (M6), imediatamente após o parto (M7) e 24 horas após o parto (M8). As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da UNESP – Jaboticabal para a realização do proteinograma.

A concentração plasmática de proteína total foi determinada pelo método calorimétrico, por reação com biureto, utilizando-se o kit comercial (Labtest®), sendo a leitura realizada por espectrofotômetro. Foi utilizada a eletroforese de gel de acrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) para a obtenção da concentração das frações proteicas, conforme descrito por Laemmli (1970). As concentrações dessas proteínas foram determinadas pelo densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301 - Tokio, Japan). Como referência, utilizou-se uma solução marcadora (Sigma - Saint Louis, EUA) com pesos moleculares 29.000, 45.000, 66.000, 97.400, 116.000 e 205.000 daltons (Da), além de proteínas purificadas – albumina, IgG, haptoglobina e transferrina.

Para avaliar a influência dos diferentes momentos nas proteínas de fase aguda foi realizada a análise de variância simples pelo teste One Way AOV, com a comparação entre as médias através do teste LSD. Os resultados foram analisados através do programa Statistics 8.0.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas sob nº 1589/2012.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No método utilizado foram observadas 23 bandas proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 16KDa a 245 KDa, sendo possível a identificação das seguintes frações proteicas: 175 KDa, 102 KDa, 83 KDa, 63 KDa, 50 KDa, 41 KDa, 39 KDa e 28 KDa. De todas as bandas proteicas encontradas somente as bandas de 39Kda e 41Kda apresentaram alteração em sua cinética nos momentos avaliados. De acordo com a solução marcadora (Sigma – Saint Louis, EUA), podemos sugerir que essas proteínas seriam  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (39Kda) e haptoglobina (41Kda).

A concentração da proteína de 39Kda ( $\alpha$ 1-glicoproteína ácida) das éguas apresentou crescimento gradativo a partir das 48 horas após a indução da placentite (fig. 1). Já a de 41Kda (haptoglobina) apresentou uma curva de crescimento gradativo conforme aproximação do parto, como demonstrado na figura 2, apesar de não apresentar aumento significativo entre os momentos.

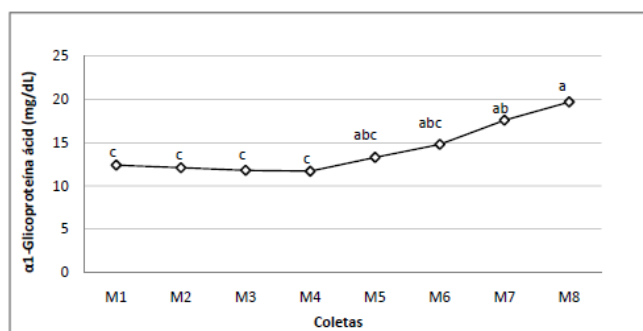


Figura 1. Concentração sérica de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (mg/dL) nas amostras coletadas em oito momentos de éguas com placentite ascendente.

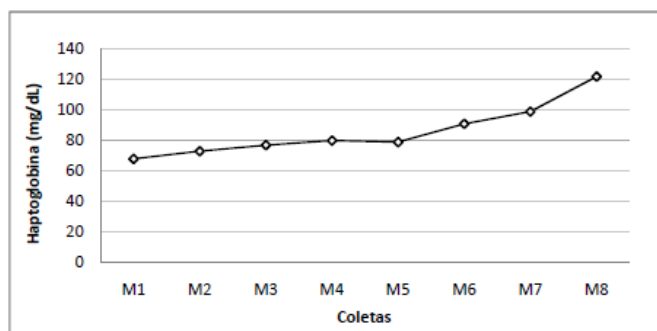


Figura 2. Concentração sérica de haptoglobulina (mg/dL) nas amostras coletadas em oito momentos de éguas com placentite ascendente.

Os níveis das proteínas de 39Kda ( $\alpha$ 1-glicoproteína ácida) e 41 Kda (haptoglobina) aumentaram significativamente após o estímulo e se mantiveram em níveis crescentes até o dia do parto. Por serem ambas proteínas de fase aguda do tipo positivas, seus níveis elevados ou crescentes indicam presença e persistência do estímulo inflamatório (Takiguchi et al., 1990; Kaneko et al., 1997). Para Bailey et al. (2010), utilizando tratamento a base de sulfametoxazol e trimetoprim na dose de 30mg/Kg, em modelo experimental de placentite induzida, foi possível prolongar a gestação de éguas com placentite ascendente. No entanto, para o mesmo autor, o protocolo terapêutico não foi eficaz em eliminar completamente a infecção bacteriana no útero. Assim, os níveis crescentes de proteínas de fase aguda após a indução da placentite, podem indicar a persistência do processo inflamatório.

De acordo com Eckersall e Bell (2010), os níveis das proteínas de fase aguda apresentam um pico em seu acréscimo a partir de 24-48 horas após o estímulo, o que ocorreu nos dados do presente estudo. Apesar disso, eles ainda relatam que devem rapidamente declinar quando na extinção do processo. Os níveis da proteína de 39Kda ( $\alpha$ 1-glicoproteína ácida) são valiosos para o prognóstico e monitoramento de tratamentos e, particularmente, úteis como marcadores para a detecção de doenças no estágio inicial, da extensão e progressão da doença e acessar a eficácia de tratamentos ou de alterações relacionadas, na tentativa de melhorar o manejo ou o meio ambiente (Smith, 2005). Os níveis da de 41Kda (haptoglobina) nas éguas demonstraram uma curva semelhante e, apesar dos aumentos não serem significativos, são também indicativos de que houve resposta desta proteína ao estímulo sem regressão após o tratamento.

#### 4. CONCLUSÕES

No presente estudo, foi demonstrado aumento crescente dos níveis das proteínas de 39Kda e 41Kda, respectivamente sugeridas como  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e haptoglobina, em éguas 48 horas após a indução de placentite, até o momento do parto. Não está elucidado, entretanto, se estes níveis refletem a persistência do processo inflamatório placentário ou estas alterações são fisiológicas no periparto, sendo necessários novos estudos para explorar este dado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAILEY, C.S.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.A. et al. Treatment efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole, pentoxifylline and altrenogest in experimentally induced equine placentitis. **Theriogenology**, Philadelphia, USA, v.74, p.402–412, 2010.
2. CRISMAN, M.V.; SCARRATT, W.K.; ZIMMERMAN, K.L. Blood proteins and inflammation in the horse. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, Philadelphia, USA, v.24, p.285–297, 2008.
3. ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine - Review. **Veterinary Journal**, United Kingdom, v.185, p.23-27, 2010.
4. FAGLIARI, J.J.; SILVA, S.L. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hígidos acometidos por abdômen agudo, antes e após laparotomia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, v.54, n.6, p.559-586, 2002.
5. FEIJÓ, L.S.; CURCIO, B.R.; HAETINGER, C. et al. Maturidade de potros nascidos de éguas com placentite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, v.66, n.6, p.1662-1670, 2014.
6. GILES, R.C.; DONAHUE, J.M.; HONG C.B. et al. Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3,527 cases (1986-1991). **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg. v.203, p.1170–1175, 1993
7. KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997.
8. KENT, J.E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Veterinary Journal**, Fordham, Reino Unido, v.23, p.59–66, 1991.
9. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, Londres, Inglaterra, v.227, p.680-685, 1970.
10. MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. **Veterinary Journal**, United Kingdom, v.168, p.28-40, 2004.
11. SCHLAFER, D. Postmortem examination of the equine placenta, fetus, and neonate: Methods and interpretation of findings. **American Association of Equine Practitioners**. Lexington, KY v.50, p.144-345, 2004.
12. SMITH, K. The glycosylation of alpha-1-acid glycoprotein – structurally complex functionally important? **5th International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins**, Dublin. p.8, 2005.
13. TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M. et al. Isolation, characterization, and quantitative analysis of C-reactive protein from horses. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg. v.51, p.1215-1220, 1990.
14. TROEDSSON, M.H.T., RENAUDIN C.D., ZENT W.W., STEINER J.V. Transrectal Ultrasonography of the placenta in Normal Mares and Mares with Pending Abortion: A Field Study. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, Phoenix, Arizona, USA, v. 43 p. 246 – 248, 1997.