

PROTEINOGRAMA DE OVELHAS ACOMETIDAS POR CASOS NATURAIS DE TOXEMIA DA PREENHEZ

Alexandre Tadeu Mota Macedo¹
Rodolfo José Cavalcanti Souto¹
Carla Lopes de Mendonça¹
José Jurandir Fagliari²
Paulo César Silva²
Pierre Castro Soares¹
José Augusto Bastos Afonso¹

RESUMO

Os estudos sobre a toxemia da prenhez (TP) na espécie ovina têm sido constantes e inovadores em alguns conceitos, porém não há relatos no Brasil sobre o proteinograma em ovelhas acometidas por casos naturais da doença. Diante disso, objetivou-se avaliar o proteinograma de ovelhas com a enfermidade e comparar os resultados de acordo com a presença apenas da TP e de outras doenças concomitantes. Foram avaliadas 35 ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns/UFRPE, diagnosticadas com TP, no período de 2007 a 2013. Os animais foram submetidos ao exame clínico e ultrassonográfico, seguido de coleta de sangue e urina para exames laboratoriais. Todos os animais exibiram uma sintomatologia clínica condizente com um quadro de TP. Os níveis séricos de beta-hidroxi-butarato (BHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) encontraram-se elevados em todas as ovelhas. Os valores de cortisol e glicose também estavam elevados e os de insulina reduzidos, além disso, todos os animais apresentaram cetonúria. Das 35 ovelhas avaliadas, 25 apresentaram apenas o quadro de TP (G1), e 10 além da TP apresentaram também outras enfermidades infecciosas concomitantes (G2). No proteinograma, houve aumento nos níveis séricos de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina e redução da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente) nos dois grupos, enquanto que os de IgG mostraram discreta elevação nos animais do G1 e os de fibrinogênio no G2. Diante disso, podemos concluir que a severa complexidade do transtorno metabólico desencadeado pela TP em ovelhas provoca alterações no perfil das proteínas de fase aguda (PFA) e que o padrão de resposta foi semelhante em ambos os grupos experimentais.

Palavras-chave: Clínica de ruminantes, distúrbio metabólico, eletroforese, ovinos, proteínas de fase aguda.

PROTEIN PROFILE IN EWES AFFECTED BY NATURAL PREGNANCY TOXEMIA

ABSTRACT

Studies on pregnancy toxemia in ewes have been constant and innovative in some respects. However, there are no previous reports on the protein profile of ewes naturally affected by this condition in Brazil. Thus, the aim of the present study was to determine the protein profile of Brazilian ewes affected with pregnancy toxemia and compare the results with ewes

¹ Departamento de Medicina Veterinária. Clínica de Ruminantes, Universidade Federal Rural de Pernambuco Contato para correspondência.

² Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, UNESP, Campus Jaboticabal.

affected with concomitant diseases. Thirty-five ewes with a diagnosis of pregnancy toxemia were evaluated at the Bovine Clinic of the Rural Federal University of Pernambuco, Garanhuns Campus, between 2007 and 2013. The animals were submitted to clinical and ultrasound exams, followed by blood and urine collection for laboratory exams. All animals exhibited clinical symptoms of pregnancy toxemia, with elevated beta-hydroxybutyrate acid and non-esterified fatty acids. Ketonuria was found in all animals. The hormone profile revealed high levels of cortisol and low levels of insulin. Among the 35 ewes analyzed, 25 only exhibited pregnancy toxemia (G1) and ten also exhibited concomitant infectious illnesses (G2). The protein test revealed increased serum levels of haptoglobin, α 1-acid glycoprotein and transferrin as well as reduced PM 23000 Da (protein not yet nominally identified) in both groups, whereas IgG was slightly elevated in the animals in G1 and fibrinogen was elevated in G2. Based on the present findings, the severe complexity of metabolic disorder triggered by pregnancy toxemia in ewes causes changes in the profile of acute phase proteins and the response pattern was similar in both experimental groups.

Keywords: Ruminant clinic, metabolic disorder, electrophoresis, sheep, acute phase protein

PROTEINOGRAMA DE OVEJAS AFECTADAS POR CASOS NATURALES DE TOXEMIA DE LA PRENHEZ

RESUMEN

Los estudios sobre la toxemia de la preñez (TP) en ovejas han sido constantes y innovadores en algunos conceptos, pero no hay estudios en Brasil sobre las concentraciones de proteína de casos clínicos naturales de la enfermedad en esta especie. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones de proteína en sangre de casos clínicos naturales de TP en ovejas y comparar los resultados de acuerdo a la presencia sólo de TP y TP con enfermedades infecciosas intercurrentes. Evaluamos 35 ovejas se reunieron en la Clínica Bovina, Campus Garanhuns/UFRPE diagnosticado con TP en el período de 2007 a 2013. Los animales fueron sometidos a un examen clínico y ultrasonido, seguida de la recogida de sangre y orina para análisis de laboratorio. Todos los animales mostraron síntomas clínicos compatibles con un marco de TP. Los niveles séricos de beta-hidroxibutirato (BHB) y ácidos grasos no esterificados (NEFA) que se encuentran a ser altos en todas las ovejas. Cortisol sérico y la glucosa también eran altas, mientras que la insulina reducida, además, todos los animales mostraron cetonuria. Entre las ovejas 35 evaluados, 25 manifestaron sólo el marco TP (G1), y 10 más allá de la TP también tenía otras enfermedades infecciosas concomitantes (G2). En proteinograma, hubo un aumento en la haptoglobina sérica, glucoproteína α 1-ácido y transferrina en ambos grupos experimentales. Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el trastorno metabólico grave complejidad, provocada por TP en ovejas provoca una respuesta de fase aguda, independientemente de si los animales muestran enfermedades infecciosas intercurrentes.

Palabras clave: Rumiantes clínica, trastorno metabólico, electroforesis, las ovejas, las proteínas de fase aguda.

INTRODUÇÃO

A toxemia da preñez (TP) é uma enfermidade de grande importância na caprinovinocultura, sobretudo na região do semiárido nordestino, pois é a doença metabólica que mais comumente ocorre nestas espécies. Provoca grandes prejuízos econômicos devido às

perdas decorrentes do óbito, tanto das matrizes como de suas crias (1,2,3,4). A enfermidade em caprinos e ovinos é altamente fatal, com letalidade próxima a 100% (2). Na Clínica de Bovinos/UFRPE, campus Garanhuns, situada em uma mesorregião de Pernambuco que detém uma das principais criações de pequenos ruminantes do Estado, a ocorrência da enfermidade tem sido registrada com frequência ao longo dos anos, tendo alcançado os maiores índices no ano de 2008, onde foi diagnosticada em 13,6% dos ovinos atendidos (5).

A TP caracteriza-se por transtornos no perfil metabólico (energético e protéico) e hormonal, que geralmente ocorrem no terço final da gestação em fêmeas com múltiplos fetos (3,6,7,8). As alterações metabólicas se desenvolvem quando cabras e ovelhas não conseguem atender à demanda de glicose da unidade feto-placentária, ocorrendo então hipoglicemia, depleção do glicogênio hepático e a mobilização de gordura, com consequente formação de corpos cetônicos. Neste contexto, com os níveis sanguíneos de corpos cetônicos elevados e os de glicose alterados, os sinais clínicos se manifestam (9,10,11,12).

Os animais geralmente não respondem ao tratamento, principalmente quando sua condição clínica é ruim e o sucesso depende da detecção da condição no início, para assegurar um retorno rápido a um apetite normal (10). Como as proteínas de fase aguda (PFA) são consideradas um indicador sensível e rápido de distúrbios inflamatórios em ruminantes, sua avaliação na TP em caprinos e ovinos tem sido estudada com a finalidade de possíveis aplicações práticas no diagnóstico e prognóstico desta enfermidade (13).

As PFA são assim chamadas, porque sua concentração plasmática é alterada rapidamente em processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e estresse (14,15,16). A produção de PFA é mediada pela ação de citocinas pró-inflamatórias liberadas nos estágios iniciais da infecção e/ou inflamação, e sua concentração pode aumentar (PFA positiva) ou diminuir (PFA negativa) como consequência do estímulo inflamatório. Como exemplos de PFA positivas, temos a α 1-glicoproteína ácida, a α 1-antitripsina, a ceruloplasmina, a haptoglobina e o fibrinogênio, entre outras, e de PFA negativas, temos a albumina e a transferrina. A função destas PFA é ligar-se a moléculas que oferecem risco ao organismo, bem como a debris resultantes da injúria tissular, e assim promover a eliminação destes organismos patogênicos e o reparo do tecido (17).

Os estudos sobre os aspectos clínicos, epidemiológicos, o perfil metabólico e hormonal de ovelhas com TP têm sido relativamente amplos, porém são poucos em relação ao proteinograma de animais com casos clínicos naturais da doença, não havendo inclusive relatos no Brasil. Além disso, o comportamento das PFA em enfermidades metabólicas ainda é pouco estudado, quando comparado às doenças infecciosas, por exemplo. Diante disso, este trabalho se propôs a realizar o proteinograma de ovelhas acometidas por casos clínicos naturais de TP, a fim de avaliar o comportamento das PFA nesta enfermidade, e verificar se existem diferenças nos animais que apresentaram apenas a TP e nos acometidos por outras doenças concomitantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta dos dados: As informações foram colhidas dos prontuários clínicos de 35 ovelhas atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns/UFRPE, diagnosticadas com TP, durante o período de 2007 a 2013. As ovelhas foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo (G1) foi composto por 25 ovelhas, que apresentaram apenas a TP, e o segundo grupo (G2) foi composto por 10 ovelhas, que além da TP tiveram também doenças infecciosas intercorrentes. Os animais eram todos provenientes do Estado de Pernambuco, sendo estas das raças Santa Inês, Dorper e mestiças, com idade entre 1 e 5 anos, peso médio de 63 kg, submetidas predominantemente ao sistema intensivo de produção, recebendo diferentes tipos de concentrado em quantidade elevada. A maioria das ovelhas apresentava o escore corporal

quatro, o que correspondeu a 39,39%. O exame clínico foi realizado de acordo com Radostits et al. (18). Os animais foram submetidos ao exame ultra-sonográfico para avaliação do número e viabilidade do(s) feto(s). Todas as ovelhas apresentaram quadro clínico de TP, cetonúria, níveis de beta-hidroxibutirato (BHB) acima de 0,8 mmol/L e de ácidos graxos não esterificados (AGNE) acima de 0,4 mmol/L, que foram estabelecidos como ponto de corte, de acordo com Kaneko et al. (19).

Colheita das amostras: Amostras de sangue foram colhidas por venopunção jugular, com agulha 25x8mm em tubos siliconizados vacutainer e centrifugadas a 3500rpm por cinco minutos, com os anticoagulantes fluoreto de sódio/oxalato e EDTA a 10% (ácidoetilenodiaminotetracético, sal dissódico), para obtenção de plasma e determinação de glicose e fibrinogênio, respectivamente. As amostras obtidas em tubos sem anticoagulante, para obtenção do soro, foram empregadas na realização das análises bioquímicas, hormonais e proteinograma. As alíquotas de soro foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e mantidas em ultrafreezer (-80°C) (Ultralow freezer NuAire Inc.) para posterior processamento laboratorial.

Análises laboratoriais: O teor plasmático de fibrinogênio foi determinado pelo método de precipitação pelo calor (56-58°C) e a leitura realizada por refratometria, conforme preconizado por Jain (14). A concentração da proteína total no soro sanguíneo foi determinada pelo método colorimétrico de ponto final por reação do biureto (Labtest Diagnóstica S.A). A separação das proteínas foi realizada utilizando-se a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio(SDS-PAGE), utilizando o sistema vertical de eletroforese, conforme descrito por Laemmli (20) e Fagliari e Silva (21). Para a identificação das frações proteicas foi empregada, como referência, solução marcadora (Sigma-Aldrich Corporation 3050 Spruce Street. St. Louis MO63103, Missouri, USA) com pesos moleculares variando de 6.500 a 200.000 Daltons (Da), além das proteínas purificadas albumina, imunoglobulina G(IgG), haptoglobina, α 1-antitripsina e transferrina. Após o fracionamento o gel foi corado durante dez minutos em solução de azul de Coomassie, constituída de metanol (50%), água (40%), ácido acético glacial (9,75%) e azul de Coomassie73 (0,25%). Em seguida o gel foi colocado em solução de ácido acético a 7% para retirada do excesso de corante, até que as frações proteicas se apresentassem nítidas. A determinação das concentrações proteicas foi obtida por meio de densitômetro computadorizado (Shimadzu CS 9301, Japan). Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) e β -hidroxibutirato (BHB) foram avaliados em analisador bioquímico semi-automático LabQuest com o uso de reagentes comerciais (Randox Laboratories Ltd) e para as determinações hormonais de cortisol e insulina, foi empregada a técnica da electroquimioluminescência empregando-se reagentes comerciais (Cobas®). A determinação plasmática de glicose (Labtest Diagnóstica) foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Para a pesquisa de corpos cetônicos na urina foram empregadas fitas reagentes para urinálise (22).

Análise estatística: Os dados obtidos nos dois grupos (G1 x G2) foram submetidos à análise estatística, comparando-os entre si, na qual foi empregado o teste *t de Student*, com nível de 5% de significância ($p < 0,05$) (23).

RESULTADOS

As ovelhas acometidas, de forma geral, exibiram um quadro clínico de decúbito (30,35%), apatia (45,16%), escore corporal IV (39,39%), febre (68,75%), mucosas congestas (72,73%), desidratação (96,97%), edema nos membros (28,13%), taquicardia (93,55%), taquipnéia (53,13%), inapetência a anorexia (63,3%), diminuição da motilidade do rúmen ou atonia ruminal (90,63%) e sintomatologia nervosa com amaurose (11,76%) e opistónono

(2,94%). Das 35 ovelhas utilizadas, 25 (71,43%) apresentaram apenas TP (G1) e 10 (28,57%), apresentaram outra enfermidade concomitante (G2). Destas últimas, quatro apresentaram mastite, sendo que em duas delas, já era uma mastite crônica, três tiveram broncopneumonia, uma teve um quadro de pleuropneumonia, outra de gastroenterite e pneumonia associadas e a última apresentou uma glossite.

Nas ovelhas do G1, foram observadas gestações múltiplas em 70% dos casos, sendo que 55% delas foram duplas e 15% triplas. No G2, 83,33% das gestações foram múltiplas, sendo duplas em 50% dos casos e triplas em 33,33% destes. Foi necessária a realização de cesariana em 68,42% das ovelhas do G1, enquanto que 15,79% delas foram submetidas à manobra obstétrica, assim como tiveram parto eutócico este mesmo percentual de animais. Já no G2, 75% das ovelhas foram submetidas à cesariana e 25% à manobra obstétrica. Em relação aos borregos, houve uma taxa de mortalidade de 48,65% no G1, sendo que em 13,51% dos casos foi uma morte pré-matura. No G2, a mortalidade foi de 38,46%, com 15,38% de mortes pré-maturas. O índice de sobrevivência materna foi de 78,26% no G1 e de 70% no G2.

Todos os animais apresentaram níveis séricos elevados de BHB e AGNE. Os valores médios de cortisol e glicose encontraram-se elevados, enquanto que os de insulina estavam reduzidos, além disso, todas as ovelhas apresentaram cetonúria (Tabela 1). Ao comparar os resultados destas variáveis entre os grupos, não existiram diferenças ($P>0,05$).

Tabela 1. Valores médios e desvios padrão ($x \pm s$) de BHB, AGNE, glicose, cortisol e insulina de ovelhas com toxemia da prenhez (G1) (n=25 animais) e TP com doenças infecciosas intercorrentes (G2) (n=10 animais), atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns, UFRPE, no período de 2007 a 2013.

Parâmetros	G1	G2	Valores de Referência
BHB (mmol/L)	1,6±1,3 ^a	1,33±1,09 ^a	0 – 0,7 ¹
AGNE (mmol/L)	1,3±0,55 ^a	1,1±0,5 ^a	<0,4 ¹
Glicose (mg/dL)	100,4±43,02 ^a	93,92±68,46 ^a	50-80 ¹
Cortisol (nmol/L)	176,16±168,96 ^a	342,76±320,52 ^a	47,14-52,31 ²
Insulina (pmol/L)	8,09±14,5 ^a	4,64±3,05 ^a	85-175 ¹

*Letras idênticas na mesma linha, $P \geq 0,05$.

Fonte: ¹Kaneko et al. (19); ²Carvalho (24).

Quanto ao proteinograma, as amostras permitiram a identificação de 17 a 23 proteínas, cujos pesos moleculares (PM) variaram de 21.032 a 266.006 Da. Os valores observados são demonstrados na Tabela 2. Foram consideradas de interesse clínico e submetidas à protocolo estatístico, as seguintes proteínas: albumina, ceruloplasmina, transferrina, haptoglobina, α -1 glicoproteína ácida (GPA), PM 30.000 Da, PM 23.000 Da (proteínas ainda não identificadas nominalmente), α 1 anti-tripsina e as imunoglobulinas IgA e IgG, além do fibrinogênio.

Houve aumento nos níveis séricos de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina nas ovelhas em ambos os grupos. No entanto, ocorreu redução dos níveis da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente) também nos dois grupos. Os valores de IgG dos animais do G1 e os de fibrinogênio do G2 encontraram-se pouco aumentados, enquanto os da proteína total, albumina, ceruloplasmina, IgA e α 1-antitripsina estão dentro dos valores de normalidade. A análise estatística dos dados das PFA demonstrou não existir diferenças ($P>0,05$) entre os grupos estudados.

Tabela 2. Valores médios e desvios padrão ($x \pm s$) da proteína total (PT) e das proteínas de fase aguda (PFA) de ovelhas com toxemia da prenhez (G1) (n=25 animais) e TP com doenças infecciosas intercorrentes (G2) (n=10 animais), atendidas na Clínica de Bovinos, campus Garanhuns, UFRPE, no período de 2007 a 2013.

Proteínas (mg/dL)	G1	G2	Valores de Referência
Proteína Total (g/dL)	7,6±1,53 ^a	7,17±1,07 ^a	6,0 – 7,9 ¹
IgA	53,5±25,38 ^a	51,72±25,11 ^a	40,28 – 75,49 ^{5,6}
Ceruloplasmina	55,1±26,04 ^a	61,35±18,0 ^a	27,57 – 94,02 ^{4,6}
Transferrina	493,9±134,21 ^a	501,31±135,47 ^a	437,07 – 469,15 ^{6,5}
Albumina	4101,5±948,09 ^a	4017,09±576,72 ^a	3713,7 – 4204,48 ^{6,4}
α 1-Antitripsina	241,6±67,44 ^a	212,13±16,81 ^a	176,98 – 247,79 ^{6,5}
IgG	2134,9±639,28 ^a	1794,24±476,95 ^a	1657,47 – 2107,23 ^{6,5}
Haptoglobina	89,9±148,88 ^a	178,5±176,7 ^a	8,95 – 10,31 ^{5,6}
GPA	33,5±17,18 ^a	29,91±12,34 ^a	4,61 – 7,67 ^{6,5}
PM 30000 Da	27,3±13,17 ^a	21,17±9,85 ^a	Não encontrado
PM 23000 Da	127,5±39,12 ^a	101,19±17,8 ^a	156,25 – 193,27 ^{6,5}
Fibrinogênio	433,3±190,61 ^a	550,0±236,88 ^a	100 – 500 ³

^aLetras idênticas P \geq 0,05.

Fonte: ¹Kaneko et al. (19); ³Jain (14); ⁴Costa et al. (25); ⁵Lemos (26); ⁶Campos (27).

DISCUSSÃO

As manifestações clínicas e os exames laboratoriais permitiram chegar ao diagnóstico de TP nas ovelhas deste trabalho e estão de acordo com a literatura (4,7,18,28,29). Os resultados do proteinograma revelaram a inferência da TP nos níveis de haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e transferrina em ovelhas com TP, quando comparados aos resultados de Lemos (26) e Campos (27), que estudaram a dinâmica do proteinograma em ovelhas saudáveis no período de 10 dias antes do parto a 90 dias pós-parto e 30 dias antes do parto a 30 dias pós-parto, respectivamente. Os resultados do presente trabalho se assemelham parcialmente aos relatados por Ametaj (30) e El-Deeb (31), que relataram aumento dos níveis de haptoglobina (Hp), amiloide sérica-A (SAA) e fibrinogênio (Fbg) em vacas com esteatose hepática em ovelhas com TP, respectivamente. Já Yoshino et al. (32) relataram aumentos nos níveis de haptoglobina após restrição alimentar em vacas, e González et al. (13) em cabras com TP induzida experimentalmente. De acordo com Eckersall e Bell (33), a Hp é a proteína de fase aguda mais importante nos ruminantes, o que pôde ser observado no presente trabalho, onde foi a PFA que apresentou os valores mais elevados em ambos os grupos experimentais.

A dinâmica deste processo foi descrita na medicina humana e em vacas no periparto, nos quais transtornos metabólicos podem iniciar e promover uma descontrolada inflamação sistêmica (34,35). Yaqoob e Calder (36) relataram que, em humanos, elas alteram o metabolismo lipídico, promovem o aumento da concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na circulação e o estresse oxidativo, sendo estes, fatores que contribuem de forma significativa para a inflamação sistêmica e o desenvolvimento de doenças inflamatórias. De acordo com Tothova et al. (37), vacas leiteiras podem sofrer distúrbios metabólicos semelhantes e alterações na homeostase durante o período do periparto, na síndrome da lipomobilização e na acidose ruminal sub-aguda. Segundo estes autores, alterações na homeostase e desafios fisiológicos que ocorrem em animais com doenças metabólicas podem contribuir para a ativação do sistema imune do hospedeiro, incluindo a iniciação de respostas inflamatórias.

Segundo Tothova et al. (38), a homeostase energética e o metabolismo em geral estão alterados em vacas acometidas pela síndrome da lipomobilização, pois, ao avaliarem vacas leiteiras entre uma e duas semanas após o parto, com concentrações séricas de AGNE acima de 0,35 mmol/L, encontraram valores médios significativamente mais elevados de Hp e SAA do que em vacas cujas concentrações destes ácidos estavam abaixo de 0,35 mmol/L. Além disso, o estudo demonstrou uma correlação altamente positiva entre as concentrações de ambas as proteínas de fase aguda avaliadas (Hp e SAA) com as de AGNE de vacas em lactação pós-parto. De acordo com Bernabucci et al. (39) e Sordillo et al. (35) o aumento nas concentrações de AGNE na circulação estão diretamente associados com o aumento das condições inflamatórias sistêmicas, e grandes quantidades de reservas de tecido adiposo durante períodos de deficiência de energia estão relacionados com efeitos adversos à saúde em vacas no período de transição. Condição esta que provavelmente tenha ocorrido nas ovelhas acometidas pela TP.

Há outro fator a ser considerado e ocorrido neste estudo, é a relação entre as PFA e a gestação, que foi relatado por Bastos (40). Com o intuito de estabelecer a cinética destas proteínas em ovelhas da raça Santa Inês, ao longo da gestação e no pós-parto, o autor constatou uma maior elevação nos índices de Hp nos dias 1-7 e 15-21 dias pós-parto. Em um estudo semelhante em ovelhas, Azib e Taha (41) constataram uma correlação positiva entre a concentração da Hp sérica e o intervalo entre o início da distocia e o tratamento, por cesariana (50,3mg/dL \pm 20,7) ou manualmente assistido (3,83mg/dL \pm 115,1). Estes autores sugerem que as concentrações desta proteína são indicativas da presença e grau de dano tecidual que ocorrem na distocia, além de indicarem a intervenção precoce para minimizar as complicações advindas no pós-parto, fato este ocorrido na maioria dos animais atendidos neste estudo.

É importante salientar ainda, que as citocinas pró-inflamatórias, precursoras das PFA, estão associadas com respostas imunes e implicadas na patogênese da TP devido ao seu papel na lesão endotelial (42,43). Uma intensa resposta inflamatória sistêmica e produção aumentada de citocinas ocorrem na TP, e defeitos em células do trofoblasto e destruição de detritos placentários são considerados importantes fatores indutores (44,45). A hipóxia na placenta devido diminuição da perfusão sanguínea, por sua vez, induz a produção placentária das citocinas inflamatórias IL-1 α e TNF- α (46). Nos humanos, a Hp pode também participar dos mecanismos que acontecem no útero gestante e que são necessários para a manutenção da integridade da unidade feto-placentária (47). Estas circunstâncias podem ter ocorrido em algumas ovelhas acometidas pela TP.

Em relação ao comportamento da α 1-glicoproteína ácida (GPA), sabe-se que esta é uma importante proteína de fase aguda na clínica de ovinos, sendo utilizada no monitoramento de processos inflamatórios e infecções em geral. Como foi constatado por Eckersall (33) em um estudo com ovinos infectados experimentalmente com linfadenite caseosa, onde ele verificou um leve e persistente aumento da concentração desta proteína ainda após quatro semanas de infecção. A GPA, além de ser produzida pelos hepatócitos, pode também ser produzida por células mamárias e outro fator importante é que a sua expressão gênica é controlada por uma combinação da regulamentação dos seus principais mediadores, ou seja, uma rede de citocinas, envolvendo principalmente a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-6 (IL-6) e por glicocorticoides (48,49), cujos valores foram bastante elevados nas ovelhas deste trabalho. Saut et al. (50), estudando a influência do puerpério sobre o proteinograma sérico de caprinos da raça Saanen, observaram aumento nos níveis de GPA entre o primeiro e o quinto dia pós-parto, porém a partir do sétimo dia após o parto verificou-se a diminuição de seus teores séricos. Sheldon et al. (51), também relatam o aumento da GPA no puerpério fisiológico de bovinos, sendo que nesta espécie animal o

retorno aos patamares de normalidade ocorria tardiamente, somente a partir do 21º dia pós-parto.

Com relação ao resultado da transferrina sérica (Tf), que apresentou uma elevação discreta, apesar de ser classificada como uma proteína de fase aguda negativa, Jain (14) e Tizard (52) relatam que a concentração desta proteína pode aumentar durante a prenhez. Wick et al. (53) também observaram concentrações elevadas de Tf em mulheres grávidas. Um dos fatores que poderiam justificar esta condição é que apesar da transferrina ser produzida primariamente nos hepatócitos, há também síntese em macrófagos e células do epitélio mamário (54,55,56). Entretanto, Moser et al. (57) verificaram que esta PFA não sofreu alteração em vacas com cetose clínica, mesmo numa condição em que a função hepática poderia estar comprometida.

Quanto aos valores da PM 23000 Da (proteína ainda não identificada nominalmente), que estavam reduzidos em ambos os grupos, em relação aos resultados obtidos por Lemos (26) e Campos (27), não foram encontradas informações na literatura consultada sobre o comportamento desta proteína em animais com TP. Os presentes autores não verificaram diferença estatística nos valores médios desta proteína em ovelhas prenhas e saudáveis, que praticamente se mantiveram constantes ao longo dos momentos de observação. Rocha (58) observou na espécie bovina, a elevação nos teores desta proteína após a ingestão do colostro, aumentando gradativamente até os 30 dias de vida. Os resultados obtidos no presente trabalho podem sugerir que na TP em ovelhas, a PM 23000 Da se comporte como uma proteína de fase aguda negativa, sendo, no entanto, necessários mais estudos que possam dar embasamento a esta hipótese.

Os resultados obtidos para a IgG, comparados aos de Lemos (26) e Campos (27), discordam dos encontrados por Lacetera et al. (59) e Hefnawy et al. (60) que encontraram um decréscimo nos índices desta imunoglobulina em ovelhas e cabras com TP, respectivamente, e justificam que o estado de imunossupressão nos animais com cetose, pode ser o resultado da ação dos corpos cetônicos (β -hidroxibutirato) que podem inibir a função de leucócitos *in vitro*, e este efeito pode afetar a resposta imune negativamente *in vivo*, a IgG especificamente (61). Porém, resultados compatíveis foram encontrados por Ropstad et al. (62) em vacas com balanço energético negativo, e associam este quadro a presença de doenças e a transtornos concomitantes. Fato este encontrado em alguns animais estudados. É importante ressaltar ainda que nos casos dos primeiros autores, a doença foi obtida experimentalmente, diferindo do presente estudo em que foram utilizados apenas casos clínicos naturais.

A elevação do fibrinogênio nas ovelhas do G2, em relação aos valores de Jain (14), também foi relatada por Ametaj (30) e El-Deeb (31) em vacas com esteatose hepática e ovelhas com TP, respectivamente, que atribuíram esse aumento a uma resposta de fase aguda. Além disso, o aumento dos níveis desta PFA no G2 provavelmente está relacionado ao fato destes animais terem apresentado além da TP, doenças infecciosas intercorrentes, como mastite, broncopneumonia, pleuropneumonia, gastroenterite e glossite. Pois de acordo com Cole et al. (63), Borges et al. (64) e Tothova et al. (37), as maiores e mais consistentes elevações na concentração desta PFA tem sido observada em animais com doenças infecciosas, como peritonite, pericardite, endotoxemia, septicemia, afecções podais, abscessos hepáticos, pneumonia e falência renal aguda.

Embora a proteína total esteja dentro dos limites da normalidade para a espécie ovina segundo Kaneko (19), há uma tendência desta ao limite superior, o que também foi observado por Santos et al. (7). Alguns autores como Cantley et al. (65), Andrews et al. (66), Van Saun (67) e Smith e Sherman (3) relataram a elevação da proteína total em ovelhas com TP, e justificam esta alteração em função dos diferentes graus de desidratação encontrados nos animais acometidos. No presente estudo, 96,97% das ovelhas encontravam-se com algum grau de desidratação, o que poderia explicar esse comportamento da PT.

Os resultados encontrados para a albumina, comparados aos de Costa et al. (25) e Campos (27), se assemelham aos relatados por Cantley et al. (65), Van Saun (67) e Santos et al. (7), em que não houve alteração em relação aos índices de normalidade para a espécie ovina. González et al. (13) também não observaram alterações nos níveis séricos de albumina em cabras com TP induzida experimentalmente. Segundo Andrews et al. (66), alterações nos índices da albumina no sangue estão relacionadas a problemas crônicos ou mudanças agudas na hidratação do animal, e por ter uma meia vida longa, os seus níveis sanguíneos em ovelhas com TP, apresentando evolução aguda, não diferem das ovelhas sadias no mesmo estágio da gestação. Souto et al. (8) porém, relataram uma redução nos níveis de albumina em cabras com TP, e a justificaram devido a uma falha hepática ou renal como consequência da enfermidade, o que também foi relatado por Yarim e Ciftci (68) em ovelhas. Segundo González et al. (69) a sua diminuição pode estar presente em situações onde existe infiltração gordurosa em animais com alta lipomobilização, podendo ser um indicador da funcionalidade hepática. É importante levar em consideração ainda que, de acordo com Aldred e Schreiber (70) e Gabay e Kushner (71), a albumina sérica é a principal proteína de fase aguda negativa, ou seja, durante a resposta de fase aguda, a demanda por aminoácidos para a síntese de proteínas de fase aguda positivas aumenta, o que exige a revisão das prioridades da síntese hepática de proteínas, assim a sua síntese é regulada negativamente e aminoácidos são desviados para a síntese de PFA positivas.

Quanto à concentração de ceruloplasmina, que se encontra dentro da faixa de normalidade para espécie ovina, de acordo com Costa et al. (25) e Campos (27), não foram encontrados dados na literatura consultada sobre o comportamento desta PFA em ovelhas acometidas com este tipo de transtorno. Bastos (40), porém, estudando ovelhas da raça Santa Inês, ao longo da gestação e no pós-parto, verificou um decréscimo da ceruloplasmina a partir do dia 17 da prenhez e que permaneceu significativamente diminuída até o dia 84, em comparação com os valores antes da sincronização do ciclo estral. Contudo, o período periparto não exerceu influência sobre a atividade desta proteína. Já Kincaid e White (72), conduzindo pesquisas com ovelhas da raça Merino, demonstraram que a atividade da ceruloplasmina decresce entre os dias 40 e 130 de gestação, atingindo valores em torno de 80U/mL, em comparação com o valor de 120 U/mL relativo ao início da gestação. Esta PFA tem sido avaliada também em estudos com bovinos, no auxílio de diagnóstico em muitas condições de doenças, como mastite e pneumonia por pasteurelose (73,74).

Os resultados obtidos para a IgA, quando comparados aos resultados de Lemos (26) e Campos (27), discordam dos encontrados por Hefnawy et al. (60) que encontraram um decréscimo nos índices desta imunoglobulina, em cabras com TP. Estes autores atribuíram o resultado, a uma significativa correlação negativa desta com o β -hidroxibutirato. No entanto, Nonnecke et al. (75) relataram que não existe quaisquer relações significativas entre os indicadores plasmáticos de condição metabólica com funções imunes em vacas leiteiras.

A α_1 -antitripsina (ATT) se apresentou dentro da normalidade quando comparada aos resultados de Lemos (26) e Campos (27). Não foram encontradas informações na literatura consultada sobre o comportamento desta PFA em ovelhas com TP. De acordo com Kaneko et al. (76), ela pode sofrer um rápido aumento, porém de forma inespecífica, em casos de processos inflamatórios. Nos humanos, em certas reações inflamatórias de fase aguda, a AAT eleva-se, a fim de limitar os danos causados por neutrófilos ativados e suas enzimas elastases, limitando a lesão do tecido hospedeiro por proteases no local da inflamação (77). Porém, segundo Tothova et al. (37) pouco se sabe sobre o comportamento e a utilidade de diagnóstico desta PFA em ruminantes.

CONCLUSÃO

Diante dos achados obtidos neste trabalho podemos concluir que a severa complexidade do transtorno metabólico desencadeado pela toxemia da prenhez em ovelhas provoca alterações no perfil das proteínas de fase aguda. O que pôde ser evidenciado na elevação dos níveis séricos de algumas PFA, com destaque para a haptoglobina e a $\alpha 1$ -glicoproteína ácida. Outro fator a ser considerado é que o padrão de resposta foi semelhante em ambos os grupos experimentais, não havendo diferença o fato de alguns animais terem apresentado doenças infecciosas intercorrentes.

REFERÊNCIAS

1. Marteniuk JV, Herdt TH. Pregnancy toxemia and ketosis of ewes and does. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1988;4(2):307-15.
2. Schild AL. Cetose. In: Riet-Correa F, Schild AL, Lemos RAA, Borges JR. *Doenças de ruminantes e eqüídeos.* 3a ed. Santa Maria: Pallotti; 2007. p.281-9.
3. Smith MC, Sherman D. *Goat medicine.* 2nd ed. Philadelphia: Lea and Febiger; 2009.
4. Campos AGS, Afonso JAB, Santos RA, Mendonça CL, Guimarães JA. Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Cienc Anim Bras.* 2010;11(3):623-8.
5. Clínica de Bovinos Campus Garanhuns. Livro de registro dos animais atendidos, ano 2008. Garanhuns: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2008.
6. Pugh DG. *Clínica de ovinos e caprinos.* 1a ed. São Paulo: Roca; 2005.
7. Santos FCO, Mendonça CL, Silva Filho AP, Carvalho CCD, Soares PC, Afonso JAB. Indicadores bioquímicos e hormonais de casos naturais de toxemia da prenhez em ovelhas. *Pesqui Vet Bras.* 2011;31(11):974-80.
8. Souto RJC, Afonso JAB, Mendonça CL, Carvalho CCD, Filho APS, Cajueiro JFP, et al. Achados bioquímicos, eletrolíticos e hormonais de cabras acometidas com toxemia da prenhez. *Pesqui Vet Bras.* 2013;33(10):1174-82.
9. Kronfeld DS. Ketosis in pregnancy sheep and lactating in ewes: a review. *Aust Vet J.* 1972;48(12):301-7.
10. Andrews A. Pregnancy toxemia in the ewe. *In Pract.* 1997;19(6):306-12.
11. Corrêa MN, González FHD, Silva SC. *Transtornos metabólicos nos animais domésticos.* Pelotas: Editora e Gráfica Universitária PREC-UFPel; 2010.
12. Hefnawy AE, Shousha S, Youssef S. Hematobiochemical profile of pregnant and experimentally pregnancy toxemic goats. *J Basic and Appl Chem.* 2011;1(8):65-9.

13. González FHD, Hernández F, Madrid J, Martínez–Subiela S, Tvarijonaviciute A, Céron JJ, et al. Acute phase proteins in experimentally induced pregnancy toxemia in goats. *J Vet Diagn Invest.* 2011;23(1):57-62.
14. Jain NC. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea and Febinger; 1993.
15. Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004;168(1):28-40.
16. Murata H. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *Vet J.* 2007;173(3):473-4.
17. Diegnan T, Alwan A, Kelly J, McNair J, Warren T, O'Farrelly C. Serum haptoglobin: an objective indicator of experimentally-induced Salmonella infection in calves. *Res Vet Sci.* 2000;69(2):153-8.
18. Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats.* 10th ed. Edinburgh: WB Saunders; 2007.
19. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 6th ed. San Diego: Academic Press; 2008.
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227(5259):680-5.
21. Fagliari JJ, Silva SL. Hemograma e proteinograma plasmático de equinos hípidos e de equinos acometidos por abdômem agudo antes e após laparotomia. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002;54(6):559-86.
22. Dirksen G, Grunder HD, Stober M. *Rosenberger: exame clínico dos bovinos.* 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.
23. Curi PR. *Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas.* Botucatu: Tipomic; 1997.
24. Carvalho CCD. *Indicadores preditivos para o diagnóstico e controle da toxemia da prenhez em ovelhas [tese].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2013.
25. Costa NA, Simão LCV, Santos RA, Afonso JAB, Fagliari JJ, Cardoso EC, et al. Proteinograma e teores de cobre, ferro e zinco no soro de ovelhas da raça Santa Inês com mastite experimental por *Staphylococcus aureus*. *Pesqui Vet Bras.* 2010;30(5):435-42.
26. Lemos VF. *Proteinograma do soro sanguíneo e lácteo de ovelhas da raça Santa Inês em diferentes fases da lactação [dissertação].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2011.
27. Campos AGS. *Estudo hematológico e proteinograma sanguíneo e do colostro de ovelhas suplementadas com propilenoglicol e com cobalto associado à vitamina b12 e de suas respectivas crias [tese].* Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco; 2014.

28. Bruére NA, West DM. The sheep: health, disease and production. Palmerston North, New Zealand: Massey University; 1993.
29. Rook JS. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2000;16(2):293-317.
30. Ametaj BN. A new understanding of the causes of fatty liver in dairy cows. *Adv Dairy Technol.* 2005;17:97-112.
31. El-Deeb WM. Novel biomarkers for pregnancy toxemia in ewes: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines. *Open Access Sci Rep.* 2012;1(4):243.
32. Yoshino K, Katoh N, Takahashi K, Yuasa A. Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation. *Am J Vet Res.* 1993;54(5):689-94.
33. Eckersall PD, Bell R. Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 2010;185(1):23-7.
34. Gatzka C, Bremerich D, Kaufmann M, Ahr A. Isolated decrease in haptoglobin during pregnancy: diagnosis by chance or pathological? *Zentralbl Gynakol.* 2002;124(2):120-2.
35. Sordillo LM, Contreras GA, Aitken SL. Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows. *Anim Health Res Rev.* 2009;10(1):53-63.
36. Yaqoob P, Calder PC. Fatty acids and immune functions: new insights into mechanisms. *Br J Nutr.* 2007;98 Suppl 1:S41-5.
37. Tothova C, Nagy O, Kovac G. Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet Med.* 2014;59(4):163-80.
38. Tothova CS, Nagy O, Kovac G. Changes in the concentrations of selected acute phase proteins and variables of energetic profile in dairy cows after parturition. *J Appl Anim Sci.* 2014;42(3):278-83. doi: 10.1080/09712119.2013.842485.
39. Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2005;88(6):2017-26.
40. Bastos BL. Cinética das proteínas de fase aguda durante a gestação e pós-parto de ovelhas da raça Santa Inês como ferramenta auxiliar no monitoramento da saúde gestacional [dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2008.
41. Azib DM, Taha MB. Effect of dystocias on serum haptoglobin in Awassi ewes. *Theriogenology.* 1997;48(4):559-62.
42. Akoum A, Lemay A, Brunet C, Hebert J. Cytokine-induced secretion of monocyte chemoattractant protein-1 by human endometrial cells in culture. The Group d'Investigation en Gynecologie. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;172(2 Pt 1):594-600.

43. Redman CW, Sargent IL. Latest advances in understanding preeclampsia. *Science*. 2005;308:1592-4.
44. Sacks G, Sargent I, Redman C. In innate view of human pregnancy. *Immunol Today*. 1999;20(3):114-8.
45. Sargent IL, Germain SJ, Sacks GP, Kumar S, Redman CW. Trophoblast deportation and the maternal inflammatory response in pre-eclampsia. *J Reprod Immunol*. 2003;59(2):153-60.
46. Benyo DF, Miles TM, Conrad KP. Hypoxia stimulates cytokine production by villous explants from the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(5):1582-8.
47. Berkova N, Lemay A, Dresser DW, Fontaine J, Kerizit J, Goupil, S. Haptoglobin is present in human endometrium and shows elevated levels in the decidua during pregnancy. *Mol Hum Reprod*. 2001;7(8):747-54.
48. Fournier T, Medjoubi N, Porquet D. Alpha-1 acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1482(1-2):157-71.
49. Hocheplied T, Berger FG, Baumann H, Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14(1):25-34.
50. Saut JPE, Souza RM, Birgel DB, Pogliani FC, Cavalcante CZ, Miyashiro SI, et al. Influência do puerpério sobre o proteinograma sérico de caprinos da raça Saanen obtido por eletroforese em gel de poliacrilamida. *Semina Cienc Agrar*. 2009;30(3):661-70.
51. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft H, Dobson H. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *Vet Rec*. 2001;148(6):172-5.
52. Tizard IR. *Imunologia veterinária: uma introdução*. 6a ed. Roca: São Paulo; 2002.
53. Wick M, Pinggera W, Lehmann P. *Ferritin im Eisenstoffwechsel – Diagnostische Strategien*. New York: Springer Verlag, Wien; 1991.
54. Weinberg ED. Iron withholding: a defense against infection and neoplasia. *Physiol Rev*. 1984;64(1):65-102.
55. De Jong G, Van Dijk, JP, Van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta*. 1990;190(1-2):1-46.
56. Eckersall PD. Proteins, proteomics, and the dysproteinemia. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6a ed. San Diego: Academic Press; 2008. p.117-55.
57. Moser M, Pfister H, Bruckmaier RM. Blood serum transferrin concentration in cattle in various physiological states, in veal calves fed different amounts of iron, and in cattle affected by infectious and non-infectious diseases. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1994;41(6):413-20.

58. Rocha TG. Eletroforetograma das proteínas do soro lácteo de vacas canchim primíparas e pluríparas. In: Anais do 8o Congresso Brasileiro de Buiatria; 2009; Belo Horizonte. Belo Horizonte: Ciência Animal Brasileira; 2009. Suplemento 1.
59. Lacetera N, Bernabucci U, Ronchi B, Nardone A. Effects of subclinical pregnancy toxemia on immune responses in sheep. *Am J Vet Res.* 2001;62(7):1020-4.
60. Hefnawy AE, Youssef S, Shousha S. Some immunohormonal changes in experimentally pregnant toxemic goats. *Vet Med Int.* 2010;2010:1-5.
61. Sartorelli P, Paltrinieri S, Agnes F. Non-specific immunity and ketone bodies. I: in vitro studies on chemotaxis and phagocytosis in ovine neutrophils. *J Vet Med.* 1999;46(10):613-9.
62. Ropstad E, Larsen HJ, Refsdal AO. Immune function in dairy cows related to energy balance and metabolic status in early lactation. *Acta Vet Scand.* 1989;30(2):209-19.
63. Cole DJ, Roussel AJ, Whitney MS. Interpreting a bovine CBC: evaluating the leukon and acute-phase proteins. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1997;92(5):470-8.
64. Borges NC, Vieira D, Silva LAF, Fioravanti MCS. Valores leucocitários e nível de fibrinogênio plasmático de bovinos com pododermatite. *Cienc Anim Bras.* 2006;7(1):97-102.
65. Cantley CEL, Ford CM, Heath MF. Serum fructosamine in ovine pregnancy toxemia: A possible prognostic index. *Vet Rec.* 1991;128(6):525-6.
66. Andrews AH, Holland-Howes VE, Wilkinson JID. Naturally occurring pregnancy toxemia in the ewe and treatment with recombinant bovine somatotropin. *Small Rumin Res.* 1996;23:191-7.
67. Van Saun RJ. Pregnancy toxemia in a flock of sheep. *J Am Vet Med Assoc.* 2000;21(10):1536-9.
68. Yarin GF, Ciftci G. Serum protein pattern in ewe with pregnancy toxemia. *Vet Res Commun.* 2009;33(5):431-8.
69. González F, Muiño R, Pereira V, Campos R, Castellote JLB. Indicadores sanguíneos de lipomobilização e função hepática no início da lactação em vacas leiteiras de alta produção. In: Anais do 8o Congresso Brasileiro de Buiatria; 2009; Belo Horizonte. *Cienc Anim Bras.* 2009; Supl 1:64-9.
70. Aldred AR, Schreiber G. The negative acute phase protein. In: Mackiewicz I, Kushner I, Baumann H. *Acute phase proteins. Molecular biology, biochemistry, and clinical applications.* Boca Raton, Florida; CRC Press; 1993. p.21-37.
71. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340(6):448-54.

72. Kincaid RL, White CL. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake of tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. *Journal of Animal Science*. 1988;66(12):3252-8.
73. Chassagne M, Barnouin J, Chacornac JP. Biological predictors of early clinical mastitis occurrence in Holstein cows under field conditions in France. *Prev Vet Med*. 1998;35(1):29-38.
74. Fagliari JJ, Weiss DJ, McClenahan D, Evanson OA. Serum protein concentrations in calves with experimentally induced pneumonic pasteurellosis. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2003;55(4):383-7.
75. Nonnecke BJ, Franklin ST, Young JW. Effects of ketones, acetate, and glucose on in vitro immunoglobulin secretion by bovine lymphocytes. *J Dairy Sci*. 1992;75(4):982-90.
76. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5a ed. New York: Academic Press; 1997.
77. Janciauskiene SM, Bals R, Koczulla R, Vogelmeier C, Köhnlein T, Welte T. The discovery of α 1antitrypsin and its role in health and disease. *Respir Med*. 2011;105(8):1129-39.

Recebido em: 11/08/2015

Aceito em: 02/12/2016