

PERFIL ELETROFORÉTICO DO PROTEINOGRAMA DO LÍQUIDO PERITONIAL DE EQUÍNOS COM OBSTRUÇÃO EXPERIMENTAL DO CÓLON MENOR

Carlos Henrique Camara Saquetti¹, Rafael Resende Faleiros², Delphim da Graça Macoris², José Jurandir Fagliari², Suedney de Lima Silva²

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações do proteinograma do líquido peritoneal de equínos submetidos à isquemia e reperfusão do cólon menor por distensão intraluminal. Para isso utilizou-se 10 animais submetidos à laparotomia pelo flanco, em posição quadrupedal, para a indução de obstrução no cólon menor durante um período de quatro horas. Cinco animais foram instrumentados, mas sem distensão (Grupo Controle – G1), em cinco outros animais promoveu-se uma isquemia mural por distensão do cólon menor através de um manguito inflado com 40 mmHg (Grupo Distendido – G2). Foram colhidas amostras de sangue imediatamente antes dos procedimentos, com 4h de isquemia e com 3h e 12h de reperfusão. As amostras do líquido peritoneal coletou-se nos momentos: basal, 4h de isquemia, 3h reperfusão e 12h de reperfusão. Após centrifugação e alíquotização das amostras, as proteínas de fase aguda foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e suas concentrações foram determinadas através de densitometria computadorizada. Encontrou-se 19 proteínas no fracionamento eletroforético e o peso molecular variou de 185.000 a 14.000 Daltons. Os pesos moleculares encontrados, correspondentes às proteínas de fase aguda mais conhecidas, foram 130.000 D (ceruloplasmina), 122.000 D (proteína C-reativa), 85.000 D (transferrina), 68.000 D (albumina), 61.000 D (α_1 antitripsina), 58.000 D (α_1 antiqumotripsina), 47.000 D (haptoglobina) e 40.000 D (glicoproteína ácida). Os resultados demonstraram que as proteínas de fase aguda elevaram imediatamente após o trauma cirúrgico, bem como ocorre a queda da concen-

tração das proteínas totais e de algumas proteínas específicas no líquido peritoneal.

Palavras-chave: agudo, fase, proteína, equino.

INTRODUÇÃO

Edwards (1997), mostrou que nos Estados Unidos e no Reino Unido apenas 3,9% e 4% dos casos de cólica eqüina tem como sede o cólon menor. Já no Brasil, em um estudo realizado na Universidade de São Paulo, (SILVA et al., 1998) verificaram que 30,95% das afecções cirúrgicas do intestino grosso de equínos ocorreram no cólon menor, sendo grande parte dessas obstruções intraluminais. Faleiros et al. (2002a), acreditaram que a nutrição improvisada e a constante ingestão de poluentes possam ser fatores contribuintes para a maior ocorrência. Ainda, o cólon menor é o segmento do trato gastrointestinal, mais predisposto a alterações circulatórias, uma vez que a afecção deste órgão implica em sinais clínicos menos intensos, o que acarreta demora no atendimento, dificulta o diagnóstico, ocasionando um atraso na indicação cirúrgica, o que por sua vez permite o agravamento da distensão intraluminal desse órgão (KELLER; HORNEY, 1985; DART et al., 1999).

A endotoxemia, a isquemia e reperfusão, a infecção, os procedimentos cirúrgicos e outros agravantes induzem a resposta inicial do organismo, que inclui várias alterações fisiológicas denominadas resposta de fase aguda da inflamação (TAKIGUCHI et al., 1990). Dentre estas alterações está a modificação do metabolismo hepático, com aumento da produção de glicoproteínas denominadas proteínas de fase aguda (PFA) (TAKIGUCHI

¹ Médico veterinário. Mestre. SHIN QI 06 Conjunto 03 Casa 19 Lago Norte Cep: 71520-030 Brasília-DF. Fone: (61) 3879-8241, carlossaquetti@yahoo.com.br

² Médico Veterinário. Professor. Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária – UNESP. Jaboticabal-SP.

et al., 1990; GODSON et al., 1996), que começam a ser detectáveis 4 horas após a indução do dano (FAGLIARI, et al. 1998). Como a concentração plasmática de proteínas de fase aguda é diretamente proporcional ao grau de lesão tecidual ou de inflamação, esta pode chegar a aumentar até 100 vezes sua concentração mediante uma lesão tecidual (KENT, 1992). O aumento da concentração das proteínas de fase aguda é um fenômeno bem conhecido durante a resposta a uma infecção. Sabe-se também que as proteínas associadas à resposta de fase aguda variam entre as diferentes espécies animais, e que o perfil dessas proteínas difere de acordo com o estímulo (GODSON et al., 1996).

As proteínas de fase aguda aumentam em resposta a produção de mediadores químicos liberados pelos macrófagos e leucócitos durante os processos inflamatórios e infecciosos (DEIGNAN et al., 2000; KENT, 1992). Os valores elevados vão diminuindo de acordo com o efeito de tratamento eficaz. Elas podem ter a função de retirar radicais livres de oxigênio do organismo, através da produção de imunoglobulinas e reparação tecidual (GRUYS et al., 1994; KENT, 1992).

Os valores séricos das proteínas de fase aguda não sofrem alteração em condições não inflamatórias, independente da condição corporal ou qualquer forma de estresse. Em condições não infecciosas como cetose e febre do leite foi demonstrado por Skinner (2001) que os valores de haptoglobina plasmática não se alteraram.

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como positivas ou negativas (KANEKO et al., 1997). No primeiro grupo, enquadram-se, dentre outras, o fibrinogênio, a glicoproteína ácida e a haptoglobina (TAKIGUCHI et al., 1990; TRUMEL et al., 1996), as quais se elevam imediatamente após a instalação do processo inflamatório ou endotoxêmico (GODSON et al., 1996), decrescendo rapidamente com a regressão da lesão (KENT, 1992). No segundo grupo destacam-se a albumina e a transferrina, cujas concentrações séricas tendem a decrescer na presença de condições inflamatórias (KANEKO et al., 1997).

A ceruloplasmina tem como principal função transportar cobre no sangue, e é reconhecida como uma proteína de fase aguda positiva, ou seja, aumenta após um estímulo inflamatório (OKUMURA et al., 1991).

Nos animais, a proteína de fase aguda de maior importância varia de uma espécie para outra. O uso clínico dessas proteínas tem se limitado àquele cuja técnica se adequa à rotina laboratorial,

ou seja, de análises fácil e rápida (KENT, 1992). Por essa razão, o fibrinogênio é, provavelmente, a proteína de fase aguda mais mensurada no plasma dos animais, porém não é a mais importante (KANEKO et al., 1997). Um dos maiores empecilhos para a utilização da análise das PFAs na rotina é o fato de que os métodos mais apurados para sua mensuração ainda são demorados e laboriosos (KENT, 1992).

O fracionamento eletroforético representa um dos mais confiáveis métodos de identificação e quantificação das proteínas dos fluidos corporais (KANEKO et al., 1997). Gordon (1995) relatou que o uso da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) possibilita a detecção de concentrações protéicas extremamente baixas e a identificação de 20 a 30 proteínas, utilizando-se micro-quantidade de amostra, enquanto outras técnicas utilizadas como a fita de acetato de celulose ou filme de agarose permitem apenas a identificação de cinco a sete grupos de proteínas (EDINGER et al., 1992; MATTEWS, 1982). Além disso, o gel de poliacrilamida é livre de cargas elétricas, ao contrário de outras matrizes, fornecendo bandas protéicas nítidas (GORDON, 1995).

Para a espécie equina, consideram-se como as mais importantes proteínas de fase aguda o fibrinogênio, a amilóide-A, a glicoproteína ácida α -1, a proteína C-reativa, a haptoglobina e a ceruloplasmina (NUNOKAWA et al., 1993).

A amilóide-A também tem demonstrado ser bom indicador de infecção em eqüinos, pois seus níveis aumentam tanto nas virais como nas bacterianas, naturais ou induzidas, seja em fetos, neonatos ou adultos (KENT, 1992; YAMASHITA et al., 1991). Devido à alta concentração da amilóide-A no soro de equinos com sinais clínicos de inflamação e com inflamação induzida experimentalmente, e devido ao fato de sua concentração diminuir à medida que o foco inflamatório é tratado, acredita-se que essa é a mais sensível proteína de fase aguda para equinos (NUNOKAWA et al., 1993). A glicoproteína ácida α -1 também foi isolada nessa espécie (TAIRA et al., 1992).

O presente estudo visou avaliar as alterações no proteinograma do líquido peritonial de eqüinos submetidos à isquemia do cólon menor por obstrução intraluminal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 10 eqüinos, machos e fêmeas, sem raça definida, com idade $7 \pm 2,3$ anos,

pesando 333±40 kg e com escore corporal entre 2,5 a 3,5 (1-5) (SPEIRS, 1997). Submeteu-se os animais à avaliações clínica e hematológica para se confirmar a higidez.

Após jejum alimentar de 12h, os animais foram sedados com xilazina³ (0,5mg/kg IV) e butorfanol⁴ (0,1 mg/kg IM) e tiveram o flanco esquerdo anestesiado por meio da técnica de "L" invertido com bupivacaína⁵ 0,5% associada à lidocaína⁶ 2% sem vasoconstritor, após ter a tricotomia e a antiseptia. Decorridos 15 minutos da infiltração anestésica realizou-se a laparotomia no flanco esquerdo com incisão da pele de aproximadamente 20 cm, incisão do músculo oblíquo abdominal externo e divulsão romba dos outros planos musculares. Em seguida, a cavidade peritoneal foi explorada e, não se encontrando qualquer anormalidade, um segmento inicial do cólon menor, à aproximadamente 50 cm da transição com o cólon transverso foi delimitado. Realizou-se então a indução da obstrução intraluminal segundo modelo descrito por Faleiros et al. (2002b). No segmento exposto praticou-se enterotomia na borda anti-mesentérica para a colocação de um manguito de aproximadamente 15 cm de diâmetro, acoplado a um equipo de polietileno com uma pêra insufladora em sua extremidade. A pressão no interior do manguito foi registrada e monitorada por meio de um fisiógrafo⁷ devidamente calibrado. Para evitar o deslocamento do manguito, em direção oral ou aboral foram colocadas ligaduras feitas com dreno de Penrose nº 3 ao redor do cólon menor, aplicada de modo a não ocluir as irrigações mesentérica e mural. Realizou-se então a enterorrafia com sutura simples contínua total no primeiro plano e um segundo plano no padrão *cushing*, ambas feitas com fio Poliglactina 910⁸ 00, mantendo-se o equipo por entre as bordas da ferida. Após tal procedimento, os segmentos das alças expostos foram lavados com solução de Ringer com lactato e recolocados na cavidade. A ferida do flanco foi reduzida segundo técnica de rotina, deixando-se o equipo exterioriza-

do por entre as bordas da ferida. Cinco animais foram instrumentados mas não tiveram o manguito inflado (Grupo Controle – G1). Em cinco animais inflou-se e o manguito com ar até atingir 40 mmHg, pressão essa capaz de reduzir em média 73,6% da perfusão na microcirculação da parede intestinal (Grupo Distendido – G2) (FALEIROS et al., 2002b).

Após 3 horas do início da obstrução, os animais foram induzidos à anestesia geral. Receberam como pré-medicação midazolam⁹ (0,15 mg/kg, IV) e infusão sob pressão de éter gliceril guaiacol¹⁰ a 10% (100 mg/kg IV), recebendo então tiopental¹¹ (12,5 mg/kg IV). Após intubação orotraqueal, a manutenção anestésica foi feita por halotano¹² volatilizado em 15 mL/kg de oxigênio, em circuito anestésico semi-fechado com ventilação controlada¹³. Durante o procedimento cirúrgico administrou-se 5 a 10 mL/kg/min., IV, de solução de Ringer com lactato para auxiliar na manutenção da pressão arterial média, entre 70 e 100 mmHg. Quando a fluidoterapia não era suficiente para este fim, administrava-se dobutamina¹⁴ na dose de 1 a 5 mg/kg/min.

Foram realizadas celiotomias medianas, de aproximadamente 25 cm, para permitir a exposição do cólon menor distendido. Completado o período de 4 horas de isquemia, a desobstrução do lumen deu-se por meio do esvaziamento e retirada do manguito. Após nova síntese da enterotomia e irrigação da área com Ringer com lactato, realizou-se a laparorrafia, segundo técnica de rotina e, em seguida, permitiu-se a recuperação anestésica do animal.

No início do período de recuperação, os animais receberam 0,005 mg/kg IM de buprenorfina¹⁵ e foram colocados em baias individuais até completar o período de 12 horas de reperusão. Ao final desse período sedou-se os animais com xilazina⁶ (1 mg/kg, IV), seguiu-se anestesia geral induzida por tiopental¹² (10 mg/kg, IV) e a eutanásia realizada por meio de infusão intravenosa de solução saturada de sulfato de magnésio.

³ Sedazine-Fort Dogde

⁴ Torbugesic – Fort Dodge

⁵ Neocaína 0,5% – Cristália

⁶ Xilestesin sem Vasoconstritor – Cristália

⁷ Fisiógrafo – Mod. 7-8p24.5, Grass – USA

⁸ Vycril 2-0 – Eticon

⁹ Dormire – Cristália

¹⁰ Éter Gliceril Guaiacol – Henryfarma Ltda.

¹¹ Tiopental – Cristália

¹² Halotano – Cristália

¹³ Aparelho de anestesia, Mod. 28003; Mallardiric, USA.

¹⁴ Dobutrex

¹⁵ Tengesic – Schering-Plough

Colheu-se amostras de fluido peritoneal de todos os grupos para a realização do proteínograma, imediatamente antes do início do procedimento, após 4 horas de isquemia, após 3 e 12 horas de reperfusão.

O fluido peritoneal para a realização do proteínograma foi colhido em frascos estéreis e sem anticoagulante para separação do fibrinogênio.

Amostras do fluido peritoneal colhidas para a eletroforese obteve-se após centrifugação. Fracionou-se então as amostras em 3 alíquotas para se minimizar o risco de perda do material, dentro de uma capela de fluxo laminar. Essas amostras foram acondicionadas em frascos criogênicos estéreis e imediatamente congeladas à temperatura de -180°C , até o momento da realização do proteínograma. Os valores das proteínas totais do líquido peritoneal foram obtidos através de espectrofotometria.

Determinou-se as frações das proteínas através de densitometria computadorizada¹⁶. Elas foram identificadas utilizando-se como referência, um marcador com pesos moleculares de 29.000, 45.000, 66.000, 116.000 e 205.000 Daltons (D) e por comparação da mobilidade da α -1 antitripsina purificada. Os valores das concentrações das proteínas constituintes de cada fração foram determinados pela proporção dessas em relação aos valores da proteína total de cada momento.

RESULTADOS

No líquido peritoneal dos 10 animais, submetidos ao experimento foram encontradas 19 proteínas, com peso molecular variando de 185.000 a 14.000 D.

Das proteínas de fase aguda conhecidas, sete se apresentaram de maneira mais constante nos géis da eletroforese. Foram elas 130.000 D, 122.000 D, 85.000 D, 61.000 D, 58.000 D, 47.000 D e 40.000 D.

No G1, a concentração da proteína 58.000 D apresentou aumento significativo durante a isquemia, chegando a 5 vezes o valor basal. Ao fim da quarta hora de instrumentação esses valores se reduziram. O teor da proteína de 122.000 D apresentou um pequeno aumento até 4h da instrumentação, que reduziu-se aos valores basais. As concentrações das proteínas 61.000 D e da 47.000 D mantiveram o mesmo comportamento da proteína supracitada, porém com menor aumento. Imediatamente após o início da cirurgia, o teor da

proteína de 40.000 D elevou-se e, em seguida, seus valores diminuíram até próximo ao valor basal às 12 horas de reperfusão. A proteína de 130.000 D apresentou aumento progressivo de sua concentração até o final do experimento.

No G2 a proteína de 58.000 D apresentou o mesmo comportamento que no G1, porém chegando a aumentar 70 vezes em relação ao seu valor basal. A proteína 122.000 D apresentou um pequeno aumento após a indução da obstrução, sendo esse significativo ao final da reperfusão. A concentração da proteína 61.000 D aumentou até o final da isquemia, e depois começou a diminuir. Os valores da proteína de 47.000 D mantiveram comportamento semelhante em todos os grupos com elevação até o final do período de isquemia, diminuição no início da reperfusão e novo aumento ao final da 12ª hora de reperfusão. A proteína de 130.000 D apresentou discreto aumento ao final do período de isquemia, diminuição no início da reperfusão e manteve-se constante até o final da reperfusão.

A análise de correlação entre o G1 e o G2 demonstrou, que a proteína C-reativa, a antitripsina, a antiqumotripsina, a haptoglobina e a glicoproteína ácida têm maior correlação, nas condições desse experimento.

DISCUSSÃO

Fagliari et al. (1998) relataram que, pela comparação das bandas das proteínas encontradas, com o peso molecular de proteínas de referência e o padrão de corrida das proteínas purificadas, pode-se estimar quais proteínas compunham cada banda. Para os animais deste estudo as possíveis proteínas de fase aguda encontradas foram a ceruloplasmina (130.000 D), proteína C-reativa (122.000 D), transferrina (85.000 D) α -1 antitripsina (61.000 D), α -1 antiqumotripsina (58.000 D), haptoglobina (47.000 D) e a glicoproteína ácida (40.000 D).

A ceruloplasmina apresentou aumento em suas concentrações após o início da instrumentação corroborando com Okumura et al. (1991), que utilizaram eqüinos com sinais clínicos de inflamação e constataram aumento dessa proteína sugerindo ser uma proteína de fase aguda. Fagliari et al. (1998) também verificaram aumento dessa proteína quatro horas após a indução de laminite em pôneis.

Segundo Kaneko et al. (1997), a transfer-

¹⁶ Shimadzu-CS-9301PC, Tóquio, Japão

rina é uma proteína de fase aguda negativa. No entanto, no presente estudo houve aumento dos valores dessa proteína no líquido peritoneal, padrão que ocorreu no G2, pode indicar que a diminuição na concentração sérica ocorra devido a uma migração dessa proteína para a cavidade peritoneal.

A α -1 antitripsina apresentou aumento nas concentrações após o início do trauma. Esse valor se inverteu logo após a reperfusão. Kaneko et al. (1997) descreveram tal comportamento como característica de proteínas de fase aguda.

A concentração da glicoproteína ácida elevou-se logo após o trauma cirúrgico, sugerindo ser uma proteína inflamatória de fase aguda, como mencionado por Taira et al. (1992), e que Fagliari et al. (1998) também encontraram em seu experimento.

CONCLUSÕES

- O período de 16h para avaliar as alterações no proteinograma do fluido peritoneal é suficiente para se perceber as mudanças que ocorrem nas concentrações das proteínas, porém não fornece dados do comportamento dessas proteínas quanto a seus picos, persistência destes e quanto tempo as concentrações dessas se mantêm alteradas;
- a ceruloplasmina, a proteína C-reativa, a haptoglobina e a glicoproteína ácida parecem ser proteínas de fase aguda importantes nos eqüinos, visto nas concentrações no líquido peritoneal logo após o início dos procedimentos cirúrgicos;
- a transferrina, que é uma proteína de fase aguda negativa, eleva-se no sítio da lesão.

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita – Campus de Jaboticabal, sob protocolo número 005690.

Electrophoretic profile from peritoneal fluid proteinogram of equines with small colon experimental obstruction

ABSTRACT

The purpose of the present study was to evaluate equine proteinogram alterations on equine peritoneal fluid submitted to small colon ischemia and reperfusion by intraluminal distension. For that, ten animals in standing position were submitted to flank

laparotomy to induce small colon obstruction during a four hours period. Five animals were instrumented, but without distention or treatment (control group – G1), five other animals were submitted to mural ischemia by small colon distension with the use of an inflated balloon with 40mmHg (distended group – G2). Blood samples were taken immediately before the procedures, 4 hours after ischemia and 3 hours and 12 hours of reperfusion. The peritoneal fluid samples were obtained in the following moments: basal, 4 hours of ischemia, 3 and 4 hours of reperfusion. After centrifugation and fragmentation of the samples, the acute phase proteins were separated by polyacrylamide gel electrophoresis with dodecil sodium sulphate (SDS-PAGE) and their concentrations were determined by computerized densitometry. In the samples 19 proteins were found in electrophoretic fractionations and molecular weight varied from 185.000 to 14.000 Daltons. The molecular weights found that correspond to the most recognized acute phase proteins were 130.000 (ceruloplasmin), 122.000 (c-reactive protein), 85.000 (α -1 antitripsin), 47.000 (haptoglobina) and 40.000 (acid glycoprotein). The results demonstrated that acute phase proteins rise immediately after surgical traumas, however, total proteins and some specific proteins of peritoneal fluid concentration decline.

Keywords: acute, phase, protein, equine.

REFERÊNCIAS

DART, A. S.; DOWLING, B. A.; HODGSON, D. R. Large intestine In: Auer & Stick, **Equine surgery**, 2 ed. Saunders, Philadelphia, p.257-285, 1999.

DEIGNAN, T.; ALWAN, A.; KELLY, J.; McNAIR, J.; WARREN, T.; O'FARRELLY, C. Serum haptoglobina: objective indicator of experimentally-induced salmonella infection in calves. **Research in Veterinary Science**, v.69, p.153-158, 2000.

EDWARDS, G. B. Diseases and surgery of the small colon. **Veterinary Clinics of North America: Equine practice**, v.13, n.2, p. 359-375, 1997.

EDINGER, H.; MILLER, I.; STANEK, C.; GEMEINER, M. Electrophoretic serum protein patterns in laminitic horses. **Deutsche Tierärztl Wochenschr**, v.99, p.426-430, 1992.

FALEIROS, R. R.; ALVES, G. E. S.; SANTOS, R.

- L.; MARQUES Jr, A. P.; MACORIS, D. G. Experimental ischemia and reperfusion in equine small colon. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.3, p.341-350, 2002.a.
- FALEIROS, R. R.; MACORIS, D. G.; ALESSI, A. C.; SAQUETTI, C. H. C.; RASERA, L. Effect of intraluminal distention on microvascular perfusion in the equine small colon. **American Journal Veterinary Research**, v.63, n.9, p.1292-1297, 2002.b.
- FAGLIARI, J. J.; MCCLENAHAN, D.; EVANSON, O. A.; WEISS, D. J. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimental alimentary laminitis. **American Journal Veterinary Research**, v.59, p.1234-1237, 1998.
- GODSON, D. L.; CAMPOS, M.; ATTAH-POKU, S. K.; REDMOND, M. J.; CORDEIRO, D. M.; SETHI, M. S.; HARLAND, R. J.; BABIUK, L. A. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. **Veterinary Immunology**, v.51, p.277-292, 1996.
- GORDON, A. H. **Electrophoresis of proteins in polyacrylamida and starch gels**. Elsevier Publ. Co., New York, p.213, 1995.
- GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M., Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Veterinary bulletin**, v.64, n.11, p.1009-1018, 1994.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRISS, M. C. Clinical biochemistry of domestic animals. 6th ed. San Diego: **Academic Press**, p.932, 1997.
- KELLER, S. D.; HORNEY, F. D. Disease of the equine small colon. **Compendium Continued Education Practice Veterinary**, v.7, n.2, s113-s120, 1985.
- KENT, J. Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. **British Veterinary Journal**, v.148, p.279-282, 1992.
- MATTEWS, A. G. Serum protein electrophoresis in horse and ponies. **Equine Veterinary Journal**, v.14, p.322-324, 1982.
- NUNOKAWA, Y.; FUJINAGA, T.; TAIRA, T.; OKUMURA, M.; YAMASHITA, K.; TSUNODA, N.; HAGIO, M. Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.55, n.6, p.1011-1016, 1993.
- OKUMURA, M.; FUJINAGA, T.; YAMASHITA, K.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Isolation, characterization, and quantitative analysis of ceruloplasmin from horses. **American Journal Veterinary Research**, v.52, n.12, p.1979-1985, 1991.
- SKINNER, J. G., International standardization of acute phase proteins. **Veterinary Clinical Pathology**, v.30, n.1, p.2-7, 2001.
- SILVA, L. C. C.; FERREIRA, M. A.; FANTONI, D. T.; ALVARENGA, J.; ZOPPA, A. L. V.; REYES, E. F.; FUTEMA, F.; MIGLIATI, E. R.; AMBRÓSIO, A. M. Estudo retrospectivo das afecções do intestino grosso em eqüinos, submetidos à laparotomia, no período de janeiro de 1992 a abril de 1998. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIRURGIA E ANESTESIOLOGIA VETERINÁRIA, III, 1998, Belo Horizonte. **Anais... CBCAV**, 1998.
- SPEIRS, C.V. **Clinical examination of horse**. Pennsylvania: Saunders Company, p.358, 1997.
- TAIRA, T.; FUJINAGA, T.; TAMURA, K.; IZUMI, M.; ITOH, H.; TSUNODA, N.; YAMASHITA, K.; OKUMURA, M.; MIZUNO S. Isolation and characterization of α -2 acid glycoprotein from horses, and its evaluation as an acute-phase reactive protein in horse. **American Journal Veterinary Research**, v.53, p.961-965, 1992.
- TAKIGUCHI, M.; FUJINAGA, T.; NAIKI, M.; MIZUNO, S.; OTOMO, K. Isolation, characterization, and quantitative analysis of c-reactive protein from horses. **American Journal Veterinary Research**, v.51, p.1215-1220, 1990.
- TRUMEL, C.; SCHELCHER, F.; BRAUM, J. P.; GUELFY, J. F. L'electrophorese des protéines sériques: principes d'interpretation chez le chien, le chat et le cheval. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.147, p.123-130, 1996.
- YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; TAKIGUCHI, M.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Serum c-reactive protein in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammation on its serum concentration. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.53, p.1019-1024. 1991.