

Determinação da concentração sérica de proteínas de fase aguda em equinos por técnicas espectrofotométricas

Jean Silva Ramos^{1*}, Filipe Simeão Fröhlich Klug¹, Bruno Lopes Bastos³, José Tadeu Raynal Rocha Filho⁴, Maria Consuelo Caribé Ayres², José Eugênio Guimarães²

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Av. Professor Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP. 05508-270, Brasil – E-mail: filipeklug@usp.br.

²Departamento de Anatomia, Patologia e Clínicas Veterinárias, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia. Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA. 40170-110, Brasil – E-mail: ayresmcc@gmail.com e jeugenio@ufba.br.

³Instituto Multidisciplinar de Saúde – Campus Anísio Teixeira (IMS-CAT), Universidade Federal da Bahia (UFBA), rua Rio de Contas, # 58, bloco 17, Lote 58, Candeias, Vitória da Conquista, BA, Código Postal: 45029-094, Brasil – E-mail: bastosbt@gmail.com.

⁴Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia. Av. Reitor Miguel Calmon S/N, Vale do Canela, Salvador, Ba. 40.110-100, Brasil – E-mail: jrraynal@hotmail.com.

* Autor para a correspondência, E-mail: jeanramos4@usp.br

RESUMO. Proteínas de fase aguda (PFA) podem ser uma alternativa para o prognóstico, monitoramento e diagnóstico de enfermidades. Estudos envolvendo PFA em equinos com metodologias de fácil acesso e baixo custo são importantes para a utilização no contexto hospitalar. Objetivou-se determinar a concentração sérica das proteínas haptoglobina (Hp) e ceruloplasmina (Cp) por técnica espectrofotométrica, comparar os gêneros e avaliar a associação entre estas proteínas com o fibrinogênio (Fib), em animais da raça Brasileiro de Hipismo. O estudo não probabilístico intencional delineou dois grupos: G1= 11 fêmeas e G2= 9 machos. Exames hematológicos do volume globular, leucócitos totais, proteínas totais e fibrinogênio plasmáticos e exame clínico foram realizados para constatar a higidez dos animais. Como resultado geral (G1 + G2) as médias de Hp e Cp foram $0,29 \pm 0,12$ g/L e $20,1 \pm 8,6$ UI/L, respectivamente. Tanto fêmeas quanto machos apresentaram concentrações similares para ambas as PFA. A concentração de Hp no G1 foi de $0,30 \pm 0,11$ g/L e no G2 de $0,26 \pm 0,13$ g/L. Os valores das concentrações de Cp no G1 foi de $19,8 \pm 10,6$ UI/L e no G2 de $20,48 \pm 5,9$ UI/L. A Hp apresentou correlação moderada significativa com o Fib ($P = 0,046$). O estudo da detecção das proteínas Hp e Cp não evidencia a influência do sexo, e mostra associação entre a Hp e Fib. Ainda ressalta a importância da utilização de técnicas espectrofotométricas para a detecção de PFA.

Palavras chave: Haptoglobina, Ceruloplasmina, Brasileiro de Hipismo, Espectrofotometria

Determination of the serum concentration of acute phase proteins in horses by spectrophotometric techniques

ABSTRACT. Acute phase proteins (APPs) may be an alternative for the prognosis, monitoring and diagnosis of diseases. Studies involving PFA in horses with easy access and low cost methodologies are important for use in the hospital context. The objective of this study was to determine the serum concentration of the haptoglobin (Hp) and ceruloplasmin (Cp) proteins by spectrophotometric technique, to compare the genera and to evaluate the association between these proteins and fibrinogen (Fib) in Brazilian Sport Horse. The intentional non-probabilistic study delineated two groups: G1 = 11 females and G2 = 9 males. Hematological exams of the mean cell volume, total leukocytes, total

proteins and fibrinogen and clinical examination were performed to verify the health of the animals. As a general result (G1 + G2) the mean values of Hp and Cp were 0.29 ± 0.12 g / L and 20.1 ± 8.6 IU / L, respectively. Both females and males presented similar concentrations for both APPs. The concentration of Hp in G1 was 0.30 ± 0.11 g / L and in G2 0.26 ± 0.13 g / L. The values of the concentrations of Cp in G1 were 19.8 ± 10.6 IU / L and in G2 of 20.48 ± 5.9 IU / L. Hp showed a moderate significant correlation with Fib (P = 0.046). The study of the detection of Hp and Cp proteins does not show the influence of sex, and shows an association between Hp and Fib. It also highlights the importance of the use of spectrophotometric techniques for the detection of APP.

Keywords: Haptoglobin, Ceruloplasmin, Brazilian Sport Horse, Spectrophotometry

Determinación de la concentración sérica de las proteínas de fase aguda en caballos por técnicas espectrofotométricas

RESUMEN. Las proteínas de fase aguda (PFA) pueden ser una alternativa para el pronóstico, monitoreo y diagnóstico de enfermedades. Los estudios que involucran PFA en equinos con metodologías de fácil acceso y bajo costo, son importantes para la utilización en el contexto hospitalario. Se determinó la concentración sérica de las proteínas haptoglobina (Hp) y ceruloplasmina (Cp) por técnica espectrofotométrica, se compararon los géneros y evaluaron las asociaciones entre estas proteínas con el fibrinógeno (Fib) en animales de la raza Brasileiro de Hipismo. El estudio no probabilístico intencional delineó dos grupos (G1 = 11 hembras y G2 = 9 machos). Los exámenes hematológicos del volumen globular, los leucocitos totales, la proteína total y el fibrinógeno plasmático y el examen clínico se realizaron para constatar la salud de los animales. Como resultado general (G1 + G2) los promedios de Hp y Cp fueron $0,29 \pm 0,12$ g / L y $20,1 \pm 8,6$ UI / L, respectivamente. Tanto las hembras como los machos presentaron concentraciones similares para ambas PFA. La concentración de Hp en el G1 fue de $0,30 \pm 0,11$ g / L y en el G2 de $0,26 \pm 0,13$ g / L. Los valores de las concentraciones de Cp en el G1 fueron de $19,8 \pm 10,6$ UI / L y en el G2 de $20,48 \pm 5,9$ UI / L. La Hp presentó una correlación moderada significativa con el Fib (P =0,046). El estudio de la detección de las proteínas Hp y Cp no evidencia la influencia del sexo, y muestra asociación entre la Hp y Fib. También destaca la importancia de la utilización de técnicas espectrofotométricas para la detección de PFA.

Palabras clave: Haptoglobina, Ceruloplasmina, Brasileiro de Hipismo, Espectrofotometría

Introdução

As PFA podem ser classificadas como positivas e negativas. A haptoglobina, ceruloplasmina, alfa1-glicoproteína ácida, amiloide A sérica e a proteína C reativa são exemplos de proteínas positivas, pois frente a estímulos traumático e cirúrgico ou em casos de enfermidades, suas concentrações na circulação aumentam. A albumina e a transferrina são consideradas PFA negativas, com diminuição da concentração sérica (Murata et al., 2004, González et al., 2007, Eckersall and Bell, 2010, Tóthová et al., 2011).

A Hp é uma alfa-globulina que se destaca por sua capacidade de ligação com a hemoglobina (Hb), formando o complexo haptoglobina-hemoglobina; tem ação bacteriostática, antioxidante e imunomodulador (Eaton et al.,

1982, Gutteridge, 1987, Eckersall and Conner, 1988). A Cp também é uma alfa-globulina e é responsável pelo transporte de 80 a 95% do cobre plasmático (Cousins, 1985, Eckersall and Conner, 1988). Sua aplicação para o diagnóstico é menos comum que outras PFA, mas há um grande número de estudos confirmando que sua atividade ferroxidase é um indicador de infecção em várias espécies: bovinos (Conner et al., 1989, Sheldon et al., 2001), equinos (Barton and Embury, 1987, Auer et al., 1989, Fagliari et al., 1998) e cães (Conner et al., 1988).

A aplicabilidade dessas proteínas foi constatada em diferentes investigações em equinos: em estudos cirúrgicos associados a laparotomia, em cólica equina (Di Filippo et al., 2014), infecções bacterianas durante a involução uterina pós-parto (Regassa et al., 2002), laminites (Martins Filho et al., 2008), rabiomiólise (El-deeb

[and El-Bahr, 2014](#)) e alterações pós-exercício físico ([Cywińska et al., 2012](#)).

O conhecimento laboratorial de técnicas para detecção de alterações da concentração das PFA para possível uso na rotina hospitalar como marcadores biológicos pode auxiliar no diagnóstico clínico de alterações em equinos.

O objetivo foi determinar a concentração sérica das proteínas haptoglobina e ceruloplasmina por técnica espectrofotométrica, estabelecer a comparação entre gêneros e avaliar a associação entre estas proteínas com o fibrinogênio em equinos.

Material e métodos

Foi realizado um estudo não probabilístico intencional com animais adultos, com idade superior a 2 anos, divididos em dois grupos, G1 = 11 fêmeas e G2 = 9 machos da raça Brasileira de Hipismo. Os animais eram provenientes do Esquadrão da Polícia Montada, Salvador, Bahia, Brasil.

Os animais selecionados aleatoriamente apresentavam-se hígidos pelo exame físico geral, sem o uso no trabalho nos dias anteriores, e com leucograma e eritrograma dentro da normalidade. Todos os animais foram mantidos em baias, com alimentação à base de feno, concentrado, sal mineral, água *ad libitum* e assistência veterinária diária.

Obtiveram-se amostras de sangue por meio de venopunção da jugular externa, em tubos a vácuo; um sem e outro com o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA-K3). Os tubos para hematologia foram transportados em isopor sob-refrigeração. Os tubos sem anticoagulante permaneceram à temperatura ambiente (25° C). No laboratório, submeteu-se os tubos sem anticoagulante a uma centrifugação a 1000 x G por 5 minutos para a extração do soro sanguíneo. Em seguida, as amostras foram alíquotadas e conservadas à -20° C até o momento das dosagens da Hp e Cp.

Para o leucograma, precedeu-se a contagem total de leucócitos com a utilização da câmara de Neubauer e microscopia óptica. Os esfregaços sanguíneos corados pelo Panótico Rápido (Laborclin, São Paulo, Brasil) permitiu a realização da contagem diferencial dos leucócitos. As determinações de proteínas totais e fibrinogênios plasmáticos ocorreram com o uso de refratômetro clínico ([Souza et al., 2006](#)).

Realizaram-se as determinações laboratoriais e dosagem de PFA no Laboratório de Diagnóstico das Parasitoses dos Animais (LDPA) do Hospital de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia.

Na análise da haptoglobina, descrita [Jones and Mould \(1984\)](#), adaptada por [Bastos et al. \(2013\)](#) usou a capacidade de ligação da Hp com a hemoglobina. A produção de hemolisado, um dos reagentes da reação, foi realizada com a adição de 2 mL de solução salina a 0,9% em 10 mL de sangue de equino sadio, conservado em EDTA-k2, e submetido a centrifugação (1000 x G / 5 minutos) por três vezes, para remover o plasma, plaquetas, leucócitos e concentrar os glóbulos vermelhos. Após a concentração dos eritrócitos, estes foram lisados com água destilada (600 µL) e a solução submetida ao congelamento. Após 24 horas, a solução com os eritrócitos lisados e com a adição de clorofórmio na proporção de 1:3, ocorreu a separação da hemoglobina dos detritos celulares, por meio de uma nova centrifugação a 1000 x G, durante 5 minutos. A hemoglobina concentrada, quando adicionada à solução de ferricianeto de potássio (2%), e com um cálculo de ajuste, permitiu a obtenção da solução de metahemoglobina a 0,3 g/L, molécula necessária para ligação com a Hp e posterior formação de complexos. A diluição seriada com padrão de Hp (soro humano medido pelo kit comercial Beckman Coulter, Brea, CA, USA) permitiu a obtenção da concentração de Hp linear entre 0 a 0,56 g / L. Todas as amostras seriadas do padrão e do teste possuem um controle e também um teste. Para os poços teste adicionou-se 50 µL de solução de metahemoglobina e nos poços referente ao controle de cada amostra, 50 µL de solução fisiológica (0,9%). A formação dos complexos ocorreu após a adição de 150 µL do substrato de guaiacol e 50 µL de peróxido de hidrogênio (0,02 mol/L), em todos os poços teste e controle de cada amostra. Após 10 minutos, realizou-se uma leitura espectrofotométrica com comprimento de onda de 492 nanômetros.

A ceruloplasmina (Cp) foi mensurada por meio de sua atividade oxidásica com o uso de técnica espectrofotométrica ([Schosinsky et al, 1974](#)). Em dois tubos (A = teste e B = controle), adicionou-se 50µL de soro sanguíneo em 750 µL de solução de acetato (pH = 5). Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria à temperatura de 30° C, e cronometrado 5min, adicionou-se 200 µL de 3,3'-Dimethoxybenzidine (ortho-Dianisidine) como substrato em cada tubo. O bloqueio da

reação dos tubos A e B ocorreu após 15 e 5 minutos, respectivamente, pela adição de 2 mL de ácido sulfúrico. Realizou-se a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nanômetros. Com a subtração e correção de fator das absorbâncias obtidas nos tubos A e B, obteve-se o valor da concentração de Cp em UI/L.

O programa estatístico para análise de resultados, Statistical Package for the Social Sciences, versão 18 (SPSS, 2005) Inc., Chicago, IL, USA) foi utilizado para a realização de uma estatística descritiva, avaliação da normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk, comparação de gêneros pelo teste T-Student ($P < 0,05$), e correlação dos parâmetros Hp, Cp e Fib por meio da correlação de Pearson ($P < 0,05$).

Os procedimentos experimentais estavam aptos pela aprovação da comissão de ética de uso de animais da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), campos de Ondina, sob protocolo n.º. 41/2015.

Resultados e Discussão

O resultado dos valores do leucograma, volume globular (VG), proteína total (PT) e fibrinogênio plasmático (Fib) estavam dentro do intervalo de referência (Weiss and Wardrop, 2010) para a espécie estudada (Tabela 1).

Tabela 1. Média e desvio padrão do leucograma, volume globular, proteína total e fibrinogênio plasmático de equinos da raça Brasileiro de Hipismo, BH (n = 20)

	BH	Valores de Referência*
Le x ($10^3/\mu\text{L}$)	$7,9 \pm 1,3$	5,4 – 14,3
Mo x ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,2 \pm 0,2$	0 – 1,0
Li x ($10^3/\mu\text{L}$)	$2,7 \pm 0,7$	1,5 – 7,7
Ne x ($10^3/\mu\text{L}$)	$4,7 \pm 0,8$	2,2 - 8,5
Eos x ($10^3/\mu\text{L}$)	$0,2 \pm 0,2$	0 – 1,0
VG (%)	$32,6 \pm 3,4$	32 – 53
PT (g/dL)	$6,7 \pm 0,4$	5,8 - 8,7
Fib (mg/dL)	250 ± 114	100 – 400

*Valores de Referência segundo Weiss & Wardrop (2010); Le = Leucócitos totais; Mo = Monócitos; Li = Linfócitos; Ne = Neutrófilos segmentados; Eos = Eosinófilos; VG = Volume globular; PT = Proteína total sérica; Fib = Fibrinogênio.

Estudos a respeito da técnica espectrofotométrica para detecção de Hp, conforme descrito por Jones and Mould (1984) realizados em equinos são escassos (Hulten et al., 2002, Alsaad and Abdul-Hameed, 2012, Sikora et

al., 2016), assim como para a técnica de detecção de Cp descrita por Schosinsky et al. (1974).

Os animais (n = 20) apresentaram uma média de Hp de $0,29 \pm 0,12$ g/L, sendo as fêmeas (G1) com valores de $0,30 \pm 0,11$ g/L e os machos (G2) com $0,26 \pm 0,13$ g/L. Para a Cp (n=20) a concentração média foi de $20,1 \pm 8,6$ UI/L; G1 com $19,8 \pm 10,6$ UI/L e G2 com $20,48 \pm 5,9$ UI/L. Pelo teste T-student os grupos G1 e G2 não apresentaram diferenças para ambas as proteínas (Figura 1).

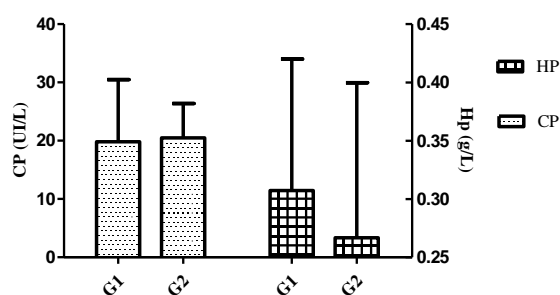


Figura 1. Médias da ceruloplasmina (Cp), UI/L e haptoglobina (Hp), g/L de equinos da raça Brasileiro de Hipismo; G1 - fêmeas, n = 11 e G2 - machos, n = 9.

Em cavalos hípidos da raça Standardbred, adultos, Hulten et al. (2002) encontraram um valor de $1,0 \pm 0,3$ g/L para a Hp; enquanto El-deeb and El-Bahr (2014) obtiveram concentração de $0,8 \pm 0,20$ g/L em cavalos adultos, da raça Árabe, diferente da raça BH do presente estudo ($0,29 \pm 0,12$ g/L). Por outro lado, estes valores da raça BH estavam próximos aos obtidos por Basile et al. (2013) que realizaram estudo com cavalos adultos e sádios de equitação ($0,48 \pm 0,17$ g/L), por meio da eletroforese de proteínas.

A Hp apresentou uma correlação positiva moderada com o fibrinogênio ($R^2 = 0,451$, $P = 0,046$), mas com a Cp não houve correlação significativa. O fibrinogênio é a proteína mais utilizada nas rotinas hospitalares de equinos, e a correlação observada com a Hp mostra a importância desta última proteína, já que ambas apresentaram associação (Figura 2).

O uso destas proteínas de fase aguda na pesquisa clínica, associado a outras PFA como amilóide A sérica, tem sido amplamente estudado em uma diversidade de doenças e alterações fisiológicas em equinos. O comportamento das PFA frente a esforços físicos foi alvo de estudos em equinos (Cywinska et al., 2011, Cywinska et al., 2013) e, já se sabe que estas proteínas sofrem alterações de acordo a intensidade e duração do exercício. Em outro estudo, a Amiloide A sérica

aumentou significativamente quando cavalos árabes e não árabes de diferentes sexos foram submetidos a corridas de longas distâncias (Cywińska et al., 2012).

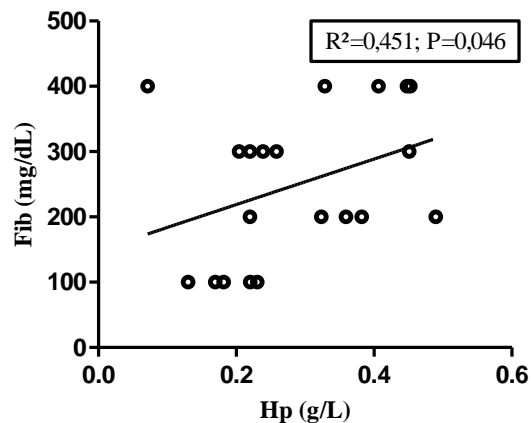


Figura 2. Associação entre o fibrinogênio (Fib) e haptoglobina (Hp), em equinos fêmeas e machos da raça Brasileiro de Hipismo (n = 20).

Após a indução de artrite com anfotericina B, injetada na articulação cárpica de 24 cavalos da raça Standardbred, observou-se claudicação em todos os animais após seis horas e, em 24 horas todos os cavalos apresentaram elevação na concentração sérica da Hp, retornando aos valores basais quinze dias após o início do experimento. Os autores alegaram utilização desta proteína como marcador biológico para o monitoramento de enfermidades articulares (Hulten et al., 2002).

Em equinos de diferentes raças após orquiectomia, Di Filippo et al. (2014) avaliaram a Hp e Cp no soro sanguíneo e fluido peritoneal. Verificaram aumento da Hp com 24h no fluido peritoneal que permaneceu até 144h; enquanto que no soro, somente depois de 96 e 120h é que ocorreu elevação significativa. Já a Cp tanto, no fluido peritoneal como no soro sanguíneo não apresentou alterações. Nogueira et al. (2013) ressaltaram que o uso das PFA no fluido peritoneal é mais eficiente do que o sérico, o que pode auxiliar no diagnóstico de processos inflamatórios abdominais.

Quanto a influência do sexo sobre os valores de Hp e Cp pouco se conhece. Alguns estudos mostram elevações na concentração de Hp em fêmeas com alterações no trato reprodutivo, como em casos de morte embrionária precoce, além de mudanças na concentração antes e após a ovulação, com uma média estatisticamente mais alta para as fêmeas quando comparada com os machos (Krakowski et al., 2011). Em um estudo

realizado em jumentas, Aziz et al. (2012) não observaram alteração da Hp relacionada com o status reprodutivo.

Em comparação com outros parâmetros laboratoriais, as PFA são mais úteis que as citocinas na detecção de alterações na circulação, pois ocorre uma oscilação grande nas concentrações séricas das citocinas, além do custo elevado de dosagem por meio de kits comerciais (Gruys et al., 2006).

Diferentes idades, raças e técnicas podem influenciar nos resultados observados na literatura. Esclarecer a influência destas variáveis sobre a concentração das PFA nesta espécie pode contribuir para a utilização destas proteínas em pesquisas e hospitais veterinários.

Conclusão

Foi possível estabelecer a concentração de Hp e Cp por metodologia espectrofotométrica. O gênero não influenciou na concentração sérica de ambas as proteínas. A Hp apresentou associação com o fibrinogênio. Este estudo reforça a necessidade de pesquisas com as proteínas em destaque, com uso da metodologia empregada, com foco no prognóstico, monitoramento e diagnóstico de enfermidades em equinos.

Agradecimentos

Ao Médico Veterinário Reinaldo Jorge Ferreira de Matos do Esquadrão da Polícia Montada, Salvador, Bahia, Brasil, nossos agradecimentos.

Referências Bibliográficas

- Alsaad, K. M. & Abdul-Hameed, A. A. 2012. Clinical, hemato-biochemical studies of equine laminitis in horses in Mosul. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 26, 169-178.
- Auer, D. E., Ng, J. C., Thompson, H. L., Inglis, S. & Seawright, A. A. 1989. Acute phase response in horses: changes in plasma cation concentrations after localised tissue injury. *The Veterinary Record*, 124, 235-239.
- Aziz, D. M., Hiss-Pesch, S., Mielenz, B. & Sauerwein, H. 2012. Haptoglobin baseline value in jennies and the effect of ovariectomy on its serum concentration. *Animal Reproduction Science*, 132, 83-87.
- Barton, M. D. & Embury, D. H. 1987. Studies of the pathogenesis of *Rhodococcus equi*

- infection in foals. *Australian Veterinary Journal*, 64, 332-339.
- Basile, R. C., Ferraz, G. C., Carvalho, M. P., Albernaz, R. M., Araújo, R. A., Fagliari, J. J. & Queiroz-Neto, A. 2013. Physiological concentrations of acute-phase proteins and immunoglobulins in equine synovial fluid. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33, 201-204.
- Bastos, B. L., Loureiro, D., Raynal, J. T., Guedes, M. T., Vale, V. L. C., Moura-Costa, L. F., Guimarães, J. E., Azevedo, V., Portela, R. W. & Meyer, R. 2013. Association between haptoglobin and IgM levels and the clinical progression of caseous lymphadenitis in sheep. *BMC Veterinary Research*, 9, 254.
- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Ferguson, J. & Douglas, T. A. 1988. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science*, 45, 107-110.
- Conner, J. G., Eckersall, P. D., Wiseman, A., Bain, R. K. & Douglas, T. A. 1989. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. *Research in Veterinary Science*, 47, 203-207.
- Cousins, R. J. 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Reviews*, 65, 238-309.
- Cywińska, A., Szarska, E., Górecka, R., Witkowski, L., Hecold, M., Bereznowski, A., Schollenberger, A. & Winnicka, A. 2012. Acute phase protein concentrations after limited distance and long distance endurance rides in horses. *Research in Veterinary Science*, 93, 1402-1406.
- Cywinska, A., Szarska, E., Kowalska, A., Ostaszewski, P. & Schollenberger, A. 2011. Gender differences in exercise-induced intravascular haemolysis during race training in thoroughbred horses. *Research in Veterinary Science*, 90, 133-137.
- Cywinska, A., Witkowski, L., Szarska, E., Schollenberger, A. & Winnicka, A. 2013. Serum amyloid A (SAA) concentration after training sessions in Arabian race and endurance horses. *BMC Veterinary Research*, 9, 9-91.
- Di Filippo, P. A., Ramalho, G. F., Silva, M. L., Jardim, A. A. & Freitas, R. A. B. 2014. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos submetidos à orquiectomia. *Ciência Rural*, 44, 2221-2227.
- Eaton, J. W., Brandt, P. & Lee, J. T. 1982. Haptoglobin: a natural bacteriostat. *Science*, 215, 691-693.
- Eckersall, P. D. & Bell, R. 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, 185, 23-27.
- Eckersall, P. D. & Conner, J. G. 1988. Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 12, 169-178.
- El-deeb, W. M. & El-Bahr, S. M. 2014. Selected biochemical indicators of equine rhabdomyolysis in arabian horses: acute phase proteins and trace elements. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34, 484-488.
- Fagliari, J. J., McClenahan, D., Evanson, O. A. & Weiss, D. J. 1998. Changes in plasma protein concentrations in ponies with experimentally induced alimentary laminitis. *American Journal of Veterinary Research*, 59, 1234-1237.
- González, F. H. D., Martínez-Subiela, S. & Cerón, J. J. 2007. Haptoglobina en rumiantes: generalidades y posibles aplicaciones clínicas. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 23, 5-17.
- Gruys, E., Toussaint, M. J. M., Niewold, T. A., Koopmans, S. J., Van Dijk, E. & Meloen, R. H. 2006. Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta Histochemica*, 108, 229-232.
- Gutteridge, J. M. C. 1987. The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 917, 219-223.
- Hulten, C., Grönlund, U., Hirvonen, J., TULAMO, R. M., Suominen, M. M., Marhaug, G. & Forsberg, M. 2002. Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and α 2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 34, 699-704.
- Jones, G. E. & Mould, D. L. 1984. Adaptation of the guaiacol (peroxidase) test for haptoglobins to a microtitration plate system. *Research in Veterinary Science*, 37, 87-92.
- Krakovski, L., Krawczyk, C. H., Kostro, K., Stefaniak, T., Novotny, F. & Obara, J. 2011. Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp

- and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 624-629.
- Martins Filho, L. P., Fagliari, J. J., Moraes, J. R. E., Sampaio, R. C., Oliveira, J. A. & Neto, J. C. L. 2008. Estudo clínico e laboratorial da fase prodrômica da laminite equina induzida por sobrecarga de carboidrato. *Ars Veterinaria*, 23, 32-39.
- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168, 28-40.
- Nogueira, A. F. S., Di Filippo, P. A., Abrahão Anai, L., Pereira, G. T. & Santana, A. E. 2013. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos hípidos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. *Ciência Rural*, 43, 2018-2024.
- Regassa, F., Sheldon, I. M. & Noakes, D. E. 2002. Effect of experimentally induced metritis on uterine involution, acute phase protein response and PGFM secretion in the postpartum ewe. *Veterinary Record*, 150, 605-607.
- Schosinsky, K. H., Lehmann, H. P. & Beeler, M. F. 1974. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of o-dianisidine dihydrochloride. *Clinical Chemistry*, 20, 1556-1563.
- Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. & Dobson, H. 2001. Acute phase protein responses to uterine bacterial contamination in cattle after calving. *The Veterinary Record*, 148, 172-175.
- Sikora, M., Król, J., Nowak, M., Stefaniak, T., Aubertsson, G. & Kozdrowski, R. 2016. The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 58, 382-386.
- Souza, M. V., Coutinho de Souza, P., Lima Rodrigues, B., Ribeiro Júnior, J. I. & Rodrigues Cordeiro, R. 2006. Concentração do fibrinogênio no plasma sanguíneo de equinos da raça Mangalarga marchador por diferentes métodos. *Revista Ceres*, 53.
- SPSS. 2005. *Statistical package for the social science for windows user's guide release 11.5*, IL, USA, SPSS Inc., 44th, Michigan Avenue, Chicago.
- Tóthová, C., Nagy, O., Seidel, H. & Kováč, G. 2011. Acute phase proteins as markers of diseases in farm animals. *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. InTech.
- Weiss, D. J. & Wardrop, J. K. 2010. *Schalm's Veterinary Hematology*, Iowa, USA.

Article History:
Received 9 September 2017
Accepted 10 October 2017
Available online 25 November 2017

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.