

## Relação do proteinograma sérico e as fases folicular e luteal do ciclo estral em éguas\*

### Relation of the serum proteins and the follicular and luteal phases of the estrous cycle in mares

Mariana Lemos Nagib Jorge,\*\* Cássia Maria Barosso Orlandi,\*\*\* Carmen Zilda Pereira de Toledo,\*\*\*\* Karina Favaretto Strini,\*\*\*\*\* Carlos Guilherme de Castro Schutzer,\*\*\*\*\* Luis Fernando Cione Maldonado,\*\*\*\*\* Aureo Evangelista Santana\*\*\*\*\*

#### Resumo

O objetivo deste estudo foi obter o perfil eletroforético das proteínas séricas em éguas cíclicas e verificar as diferenças entre as fases folicular e luteal do ciclo estral nesta espécie. Foram utilizadas 18 éguas, totalizando 36 amostras de soro, sendo duas de cada égua. As amostras foram colhidas no estro e no diestro. As proteínas séricas totais foram obtidas pelo método do Biureto, a partir da utilização de Kits comerciais (LABTEST®) e, as diferentes subfrações proteicas, por eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE). O eletroforetograma das proteínas séricas colocou em evidência a presença de 17 a 25 frações proteicas, cujos pesos moleculares variaram de 22 a 254 kDa. Identificaram-se duas proteínas ainda não nomeadas oficialmente, de massas moleculares (MM) 23 kDa e 144 kDa. Os valores médios  $\pm$  SEM obtidos para cada variável no estro e no diestro, respectivamente, foram: proteínas totais (g/dL)  $7,11 \pm 0,07$  e  $7,36 \pm 0,07$ ; albumina (mg/dL)  $4790,83 \pm 69,10$  e  $5027,19 \pm 69,10$ ;  $\alpha 1$  glicoproteína ácida (mg/dL)  $4,90 \pm 0,31$  e  $4,93 \pm 0,31$ ; ceruloplasmina (mg/dL)  $15,28 \pm 1,31$  e  $10,65 \pm 1,31$ ; haptoglobina (mg/dL)  $22,70 \pm 1,16$  e  $27,06 \pm 1,16$ ; transferrina (mg/dL)  $329,00 \pm 9,78$  e  $350,16 \pm 9,78$ ; IgA (mg/dL)  $119,91 \pm 6,30$  e  $107,03 \pm 6,30$ ; IgG (mg/dL)  $1525,07 \pm 40,18$  e  $1517,25 \pm 40,18$ ; MM 23 (mg/dL)  $204,44 \pm 8,61$  e  $219,79 \pm 8,61$ ; MM 144 (mg/dL)  $22,13 \pm 0,55$  e  $21,49 \pm 0,55$ . Não houve diferença significativa das proteínas totais e suas frações do estro para o diestro. Conclui-se que as modificações hormonais durante as fases do ciclo estral da égua não interferem no proteinograma sérico.

*Palavras-chave:* diestro, eletroforese, equino, estro, proteínas.

#### Abstract

This study aimed to obtain the electrophoretic profile of serum proteins in cyclic mares and to verify the differences between the follicular and luteal phases of the estrous cycle in this species. Eighteen mares were used, totaling 36 serum samples, two of each mare. Samples were collected both in estrus and in diestrus. Total serum proteins were obtained by the Biureto method, by using commercial kits (LABTEST®), while the different protein subfractions by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The electroforetogram of serum proteins evidenced the presence of 17 to 25 protein fractions, whose molecular weights ranged from 22 to 254 kDa. Two proteins that were not yet officially named were identified, of molecular weights (MW) of 23 kDa and 144 kDa. The mean values ( $\pm$  SEM) obtained for each variable in estrus and diestrus were, respectively: total proteins (g/dL)  $7.11 \pm 0.07$  and  $7.36 \pm 0.07$ ; albumin (mg/dL)  $4790.83 \pm 69.10$  and  $5027.19 \pm 69.10$ ;  $\alpha 1$  acid glycoprotein (mg/dL)  $4.90 \pm 0.31$  and  $4.93 \pm 0.31$ ; ceruloplasmine (mg/dL)  $15.28 \pm 1.31$  and  $10.65 \pm 1.31$ ; haptoglobine (mg/dL)  $22.70 \pm 1.16$  and  $27.06 \pm 1.16$ ; transferrin (mg/dL)  $329.00 \pm 9.78$  and  $350.16 \pm 9.78$ ; IgA (mg/dL)  $119.91 \pm 6.30$  and  $107.03 \pm 6.30$ ; IgG (mg/dL)  $1525.07 \pm 40.18$  and  $1517.25 \pm 40.18$ ; MW 23 (mg/dL)  $204.44 \pm 8.61$  and  $219.79 \pm 8.61$ ; MW 144 (mg/dL)  $22.13 \pm 0.55$  and  $21.49 \pm 0.55$ . No significant difference was verified in total proteins and its fractions in estrus and diestrus. The hormonal changes during the specific stages of the estrous cycle of the mare do not interfere with the serum proteinogram.

*Keywords:* diestrus, electrophoresis, equine, estrus, proteins.

\*Recebido em 29 de fevereiro de 2018 e aceito em 30 de setembro de 2019.

\*\*Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Botucatu-SP, Brasil.

Autor para correspondência: marianalnj@hotmail.com

\*\*\*Universidade Brasil, Descalvado-SP, Brasil.

\*\*\*\*Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Jaboticabal-SP, Brasil.

\*\*\*\*\*Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia-MG, Brasil.

\*\*\*\*\*EMBRIO-EQUI, Central de Reprodução Equina, São Simão-SP, Brasil

\*\*\*\*\*Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas-MG, Brasil.

\*\*\*\*\*Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Unesp, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Jaboticabal-SP, Brasil.

## Introdução

O útero é o local de deposição do sêmen na espécie equina e de desenvolvimento da vida nos seus estágios embrionário e fetal. Após o acasalamento da égua normalmente ocorre um processo inflamatório auto limitante, visando à remoção do excesso de espermatozoides, plasma seminal, debris e contaminantes uterinos (Samper et al., 2016). É essencial para o desenvolvimento do embrião que o endométrio uterino se mantenha hígido e isento de quaisquer alterações ambientais e contaminações (Panzani et al., 2014).

As fêmeas equinas, durante o período reprodutivo, estão sobre influência hormonal e apresentam algumas alterações no organismo. Sabe-se que alguns fatores como idade, raça, sexo, hormônios, gestação, lactação, nutrição e estresse podem influenciar também as concentrações das proteínas plasmáticas. Assim como alguns hormônios que podem promover aumento ou diminuição das proteínas plasmáticas totais, devido ao seu efeito anabólico ou catabólico (Eckersall, 2008).

As proteínas são indispensáveis à vida, representando a base da estrutura de células, tecidos e órgãos. São os componentes mais abundantes no plasma sanguíneo. Muitas vezes funcionam como catalisadores enzimáticos nas reações bioquímicas, carreadores de muitos constituintes do plasma e na defesa orgânica, sob a forma de anticorpos (Eckersall, 2008; Allison, 2015). O plasma contém uma grande variedade de proteínas que inclui albumina, globulinas, enzimas, proteínas específicas de transporte, hormônios proteicos e fatores de coagulação. A maioria delas é sintetizada no fígado a partir de aminoácidos e é certo que todas possuem funções distintas e específicas. As imunoglobulinas são sintetizadas pelos linfócitos B e plasmócitos (Tizard, 2014).

O estudo do proteinograma de um indivíduo fornece informações importantes para a compreensão de processos fisiológicos e patológicos, além de auxiliar no diagnóstico de afecções. Uma das ferramentas usuais para a quantificação das proteínas séricas é o fracionamento eletroforético sob condições desnaturantes (Cecilian et al., 2014). Atualmente a espectrometria de massas tornou-se a técnica de eleição para a identificação de proteínas, porém sua aplicação prática ainda é restrita, em vista dos seus custos (Aebersold e Mann, 2016).

Na área de reprodução equina verifica-se que há pouquíssimos relatos referentes à dosagem de proteínas no soro sanguíneo, durante fases específicas do ciclo estral. Nestas fases, as éguas estão sob influência do estrógeno (estro) e progesterona (diestro) e sabe-se que os hormônios são um dos fatores que podem influenciar o proteinograma. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi obter o perfil eletroforético das proteínas séricas em éguas cíclicas e verificar possíveis diferenças entre as fases folicular e luteal do ciclo estral.

## Material e métodos

As éguas incluídas neste experimento integraram grupos experimentais que foram submetidos a técnicas e manobras concordantes com as normas de bem-estar animal estabelecidas pela Comissão de Ética e Uso de Animais – CEUA, da FCAV-Unesp, campus de Jaboticabal, protocolo de aprovação número: 006757/12.

Foram utilizadas 18 éguas, sem raça definida, mantidas em piquetes na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, alimentadas com feno, ração, sal mineral e água *ad libitum*. Incluíram-se neste estudo animais com idades entre cinco e 15 anos (com idade média  $\pm$  SEM de  $7,7 \pm 0,7$  anos), peso corporal de 350 a 450 kg, em estado corporal satisfatório (escore de condição corporal 5, variando de 1 a 9) e com ciclicidade regular. Realizou-se o acompanhamento ultrassonográfico para determinação das fases do ciclo estral. As éguas aptas a fazerem parte do experimento foram aquelas que apresentavam ciclicidade regular, com pelo menos um intervalo inter-ovulatório determinado por meio das avaliações ginecológicas, palpação e ultrassonografia transretal (transdutor linear 5 MhZ, Mindray® DP-2200, Shenzhen, China).

As amostras de sangue das éguas foram colhidas no estro e no diestro, mais precisamente nos meses de setembro a novembro, durante a estação reprodutiva. A colheita de sangue no estro foi realizada quando a égua apresentava comportamento de estro, edema uterino de grau 2 ou 3 (classificação 1 – 5; Samper, 2009) e folículos ovarianos medindo entre 28 e 38 mm de diâmetro, ambos detectados por meio de ultrassonografia transretal (Aurich, 2011). A colheita de sangue no diestro foi realizada após 6 a 9 dias da detecção da ovulação. Por volta do 6º dia após a ovulação a concentração de progesterona, produzida pelo corpo lúteo (CL), atinge o pico e se mantém em um platô, até que se inicie a luteólise (Arruda et al., 2001).

Foram determinados o tônus uterino e cervical por meio de palpação transretal, seguido da avaliação ultrassonográfica para verificação do CL, ecogenicidade uterina e possível presença de fluido no lúmen uterino.

Foram colhidos 5 mL de sangue mediante venopunção jugular, em cada colheita, no estro e no diestro. As amostras de sangue de todos os animais foram armazenadas em tubos sem anticoagulante. A seguir, o tubo foi submetido à centrifugação por 5 minutos, a 800 g, para obtenção do soro, que foi envasado e armazenado para posterior avaliação das proteínas séricas totais e eletroforetograma das referidas proteínas.

Inicialmente, uma alíquota da amostra de soro sanguíneo, de cada unidade experimental, foi processada para dosagem de proteínas totais. As alíquotas remanescentes foram armazenadas adequadamente, sob congelamento ( $-18$  °C), até o momento da análise eletroforética. As concentrações de proteínas totais do soro foram obtidas pelo método do Biureto, com o auxílio de um conjunto de reagentes, e leituras espectrofotométricas.

Para o fracionamento eletroforético das diferentes proteínas do soro realizaram-se corridas eletroforéticas das amostras em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio, conforme técnica descrita por Laemmli (1970). Após fracionamento, o gel foi corado, durante 2 horas, em solução de azul de *coomassie*. Em seguida, o gel foi descorado (solução de metanol e ácido acético) até o fundo se tornar translúcido e as frações proteicas se apresentarem nítidas. Após a descoloração, o gel foi conservado em solução de ácido acético a 7%. As imagens dos géis foram adquiridas e a densidade óptica e massas moleculares das bandas proteicas foram determinadas utilizando um densitômetro computadorizado. O cálculo foi baseado num padrão de massas moleculares comercial, o qual foi adicionado em uma das canaletas do gel durante a corrida eletroforética

das amostras, utilizando-se marcadores de diferentes massas moleculares (SigmaMarker™). Utilizou-se a densitometria para calcular as concentrações proteicas de cada banda obtida no densitograma, baseado na concentração de proteína total obtida em cada amostra. A Figura 1 ilustra o desenho do estudo.

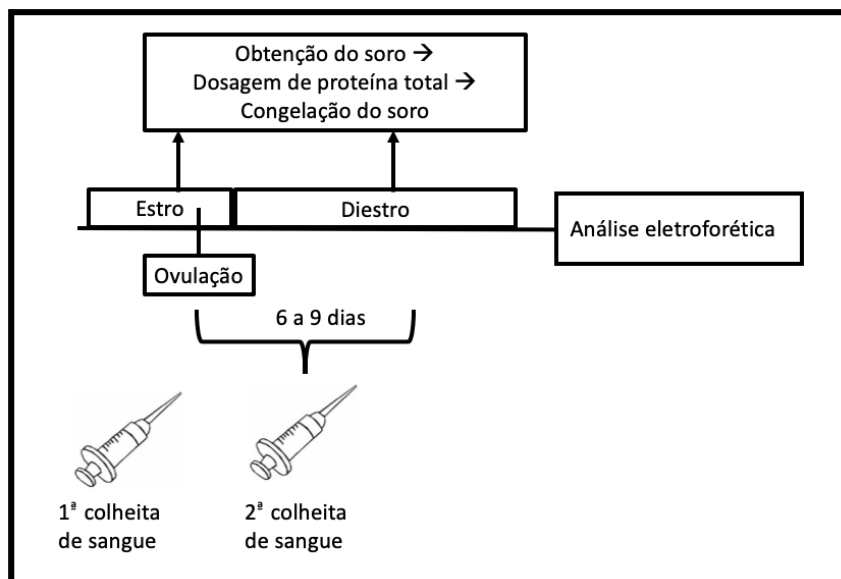


Figura 1: Desenho do estudo.

Os dados foram analisados pelo programa AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaio Agronômicos (Barbosa e Maldonado Júnior, 2008). Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F e demonstrados por média  $\pm$  SEM, nas diferentes fases do ciclo estral, tendo  $P < 0,05$  como significativo.

## Resultados e discussão

Após o fracionamento eletroforético das proteínas séricas de éguas, detectou-se a presença de 17 a 25 frações proteicas por traçado eletroforético, cujas massas moleculares variaram de 22 a 254 kDa. Dentre as proteínas encontradas, nove foram consideradas de importância, sendo elas: albumina (66,4 kDa),  $\alpha 1$  glicoproteína ácida (43 kDa), ceruloplasmina (151 kDa), haptoglobina (100 kDa), transferrina (76 kDa), IgA (150 kDa), IgG (150 kDa) e duas proteínas ainda não nomeadas oficialmente, com massa molecular de 23 kDa (MM 23) e 144 kDa (MM 144).

Os valores médios  $\pm$  SEM obtidos para proteínas totais e suas frações no estro e no diestro estão apresentados na Tabela 1. Não foram verificadas diferenças significativas para proteínas totais séricas e suas frações entre as fases do ciclo estral da égua.

Os valores médios obtidos para proteínas totais (PT) estão dentro dos limites de normalidade descritos para a espécie (5,8 a 8,7 g/dL), segundo Kramer (2000). Neste

ensaio, verificou-se um aumento de 3,52% desta variável no diestro quando comparado ao estro.

Sabe-se que a albumina é a fração proteica mais abundante no plasma, sendo a principal responsável pela manutenção da pressão coloidosmótica plasmática, é também uma proteína de transporte (Eckersall, 2008). Os valores aqui obtidos são considerados levemente aumentados (valor de referência: 2,6 a 4,1 g/dL; Kahn, 2013), porém há que se considerar que se tratava de animais hígidos, manejados de forma rigorosa e sistematizada e, além disso, cabe ressaltar que não apresentavam sinais clínicos de desidratação. Verificou-se, com base nos resultados da Tabela 1, que houve um aumento de 4,93% na concentração da albumina sérica no diestro, quando comparado ao estro. Quando foram analisados os valores médios obtidos para albumina, no estro e no diestro, notou-se uma correspondência em relação às proteínas totais de 67,40% e 68,30%, respectivamente.

A  $\alpha 1$  glicoproteína ácida é uma proteína imunomoduladora, com capacidade de ligar-se a metabólitos endógenos e a drogas (Eckersall, 2008). No diestro houve um aumento discreto de sua concentração em 0,61% quando comparada ao estro. Esta proteína correspondeu a aproximadamente 0,07% das proteínas totais no estro e diestro.

A ceruloplasmina é conhecida por liberar o ferro dos órgãos de estoque, portanto funcionando como uma ferroquelatase plasmática (Eckersall, 2008). No diestro, houve uma redução de 30,30% em relação ao estro. Foi a proteína que apresentou o maior percentual de alteração. No estro essa proteína correspondeu a aproximadamente 0,21% das proteínas séricas totais, e no diestro esse valor foi de 0,14%.

A haptoglobina liga-se a hemoglobina livre no plasma, prevenindo danos oxidativos nos tecidos (Eckersall, 2008). Ela

Tabela 1: Valores médios e "standard error of the mean" ( $\mu \pm$  SEM) obtidos para proteínas totais séricas e suas frações, no estro e no diestro, e valor de P, nas distintas fases do ciclo estral de éguas cíclicas

	Estro ( $\mu \pm$ SEM)	Diestro ( $\mu \pm$ SEM)	Valor de P
Proteínas totais (g/dL)	7,11 $\pm$ 0,07	7,36 $\pm$ 0,07	0,09 <sup>NS</sup>
Albumina (mg/dL)	4790,83 $\pm$ 69,10	5027,19 $\pm$ 69,10	0,10 <sup>NS</sup>
$\alpha 1$ glicoproteína ácida (mg/dL)	4,90 $\pm$ 0,31	4,93 $\pm$ 0,31	0,96 <sup>NS</sup>
Ceruloplasmina (mg/dL)	15,28 $\pm$ 1,31	10,65 $\pm$ 1,31	0,09 <sup>NS</sup>
Haptoglobina (mg/dL)	22,70 $\pm$ 1,16	27,06 $\pm$ 1,16	0,07 <sup>NS</sup>
Transferrina (mg/dL)	329,00 $\pm$ 9,78	350,16 $\pm$ 9,78	0,29 <sup>NS</sup>
IgA (mg/dL)	119,91 $\pm$ 6,30	107,03 $\pm$ 6,30	0,32 <sup>NS</sup>
IgG (mg/dL)	1525,07 $\pm$ 40,18	1517,25 $\pm$ 40,18	0,92 <sup>NS</sup>
MM 23 (mg/dL)	204,44 $\pm$ 8,61	219,79 $\pm$ 8,61	0,38 <sup>NS</sup>
MM 144 (mg/dL)	22,13 $\pm$ 0,55	21,49 $\pm$ 0,55	0,56 <sup>NS</sup>

<sup>NS</sup> não significativo

também é responsável por modular a atividade dos linfócitos T (Krakowski et al., 2011). No diestro houve um aumento de 19,21% dessa proteína em relação ao estro. Tal proteína correspondeu a aproximadamente 0,32% das proteínas séricas no estro e 0,37% no diestro.

A transferrina é responsável pelo transporte de ferro (Eckersall, 2008). No diestro houve um aumento de 6,43% desta proteína em relação ao estro. Ela correspondeu a 4,63% das proteínas plasmáticas no estro e 4,76% no diestro. Valores semelhantes ao encontrado no presente estudo foram descritos por Di Filippo et al. (2014) em equinos hípidos.

A IgA é encontrada nas secreções respiratórias, gastrointestinais e no trato geniturinário, sendo muito importante na imunidade local (Eckersall, 2008). Os valores médios obtidos para IgA, neste ensaio, mostraram-se dentro da normalidade (60 a 350 mg/dL) descritos por Tizard (2014). No diestro houve uma redução de 10,74% em sua concentração quando comparada ao estro. No estro esta proteína correspondeu a aproximadamente 1,70% das proteínas séricas e no diestro a 1,45%. Há relatos de valores semelhantes àqueles encontrados neste estudo, reportados por Nogueira et al. (2013).

A IgG é a principal imunoglobulina presente no soro, cuja biossíntese representa uma resposta a agentes infecciosos e toxinas (Eckersall, 2008). Segundo Tizard (2014) os valores de referência estão entre 1000 a 1500 mg/dL, e os animais geralmente apresentaram um aumento discreto dessa concentração, podendo, algumas vezes, se manterem dentro da faixa de normalidade. Ao observarem-se os dados da Tabela 1, verifica-se que no diestro houve uma redução de 0,51% desta proteína em relação ao estro. No estro esta proteína correspondeu a 21,45% das proteínas séricas e no diestro a aproximadamente 20,60%.

A fração proteica de MM 23 é uma proteína ainda não nomeada oficialmente, no diestro ela apresentou um aumento de 7,51% em relação ao estro. No estro esta proteína correspondeu a 2,90% das proteínas séricas e no diestro a 3,00%. Já, a fração proteica de MM 144 apresentou um decréscimo de 2,89% e correspondeu a 0,31% e 0,30% no estro e diestro, respectivamente.

Segundo os resultados obtidos observou-se que as proteínas que apresentaram aumento de suas concentrações do estro em relação ao diestro foram: albumina,  $\alpha 1$  glicoproteína ácida,

haptoglobina, transferrina e MM 23. Já as proteínas que diminuíram suas concentrações foram: ceruloplasmina, IgA, IgG e MM 144.

As proteínas de fase aguda promovem o aumento da fagocitose dos patógenos que penetram no útero durante o acasalamento natural ou inseminação artificial, auxiliando no restabelecimento das condições necessárias para o desenvolvimento da gestação. Há relatos de aumento dos níveis séricos de haptoglobina e amiloide sérico A em éguas com perda embrionária precoce (até os 40 dias de prenhez). Isto mostra que a quantificação das proteínas séricas pode ser uma ferramenta importante no monitoramento da gestação e no diagnóstico precoce de inflamações subclínicas do trato reprodutivo que podem levar a perda embrionária (Krakowski et al., 2011).

Num estudo onde se avaliou a concentração de proteínas de fase aguda, em éguas com placentite induzida, encontraram-se resultados importantes, posto que, as concentrações séricas de haptoglobina e amiloide sérico A alteraram-se de maneira significativa. As éguas do grupo com placentite induzida apresentaram um rápido aumento das referidas frações proteicas até o momento do aborto. Os resultados obtidos no referido estudo fazem crer que a haptoglobina e amiloide sérico A podem ser biomarcadores úteis nos casos de placentite, auxiliando no diagnóstico precoce da afecção (Silva et al., 2013; Canisso et al., 2014). Outro estudo, nesta mesma linha, também identificou alterações na cinética da haptoglobina e  $\alpha 1$  glicoproteína ácida em éguas com placentite induzida (Haetinger et al., 2016).

Estes estudos evidenciam a importância do conhecimento do proteinograma como ferramenta auxiliar diagnóstica, sendo que sua quantificação permite a identificação precoce de enfermidades em curso (Riond et al., 2009). As proteínas de fase aguda podem ser utilizadas como biomarcadores de inflamação e infecção, além de auxiliarem no estabelecimento do diagnóstico e prognóstico dos pacientes (Eckersall e Bell, 2010). O presente estudo permitiu a obtenção do proteinograma sérico de éguas em momentos distintos do ciclo estral.

## Conclusões

As modificações hormonais durante as fases do ciclo estral não interferem no proteinograma sérico de éguas saudáveis. Contudo, ele deve ser investigado em condições patológicas.

## Agradecimentos

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro a esta pesquisa (processo número 2014/10900-1).

## Referências

AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature*, v.537, n.7620, p.347-355, 2016.

ALLISON, R.W. *Avaliação laboratorial das proteínas do plasma e do soro sanguíneo*. In: THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON R.W.; CAMPBELL, T.W. (eds.) *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015, p. 398-411.

ARRUDA, R. P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J. R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos? *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.38, n.5, p.233-239, 2001.

AURICH, C. Reproductive cycles of horses. *Animal Reproduction Science*, v.124, n.3, p.220-228, 2011.

BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. *AgroEstat - Sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos*, versão 1.0, 2008.

- CANISSO, I.F.; BALL, B.A.; CRAY, C.; WILLIAMS, M.C.; SCOGGIN, K.E.; DAVOLLI, G.M.; SQUIRES, E.L.; TROEDSSON, M.H. Serum Amyloid A and Haptoglobin concentration are increased in plasma of mares with ascending placentitis in the absence of changes in peripheral leukocyte counts or fibrinogen concentration. *American Journal of Reproductive Immunology*, v.72, n.4, p.376-385, 2014.
- CECILIANI, F.; ECKERSALL, D.; BURCHMORE, R.; LECCHI, C. Proteomics in veterinary medicine: applications and trends in disease pathogenesis and diagnostics. *Veterinary Pathology*, v.51, n.2, p.351-362, 2014.
- DI FILIPPO, P.A.; SANTOS, G.S.; GRAÇA, F.A.S.; NOGUEIRA, A.F.S.; ALVES, A.E.; SANTANA, A.E. Proteinograma do líquido sinovial de equinos hípidos obtido por eletroforese em gel de poli-acrilamida. *Ciência Rural*, v.44, n.7, p.1268-1271, 2014.
- ECKERSALL, P.D. *Proteins, proteomics, and the dysproteinemias*. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (eds.) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6<sup>th</sup> ed. San Diego: Academic Press, 2008, p.117-155.
- ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*, v.185, n.1, p.23-27, 2010.
- HAETINGER, C.; CURCIO, B.R.; LINS, L.A.; MULLER, V.; FEIJÓ, L.S.; PAZINATO, F.M.; AMARAL, L.A.; NOGUEIRA, C.E.W. Proteinograma sérico de éguas com placentite ascendente e seus respectivos neonatos: dados preliminares. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.68, n.6, p.1465-1469, 2016.
- KAHN, C.M. *Guias de referência*. In: KAHN, C.M. (ed.) *Manual Merck de Veterinária*. 10<sup>a</sup> ed. São Paulo: Roca, 2013, p.3344-3353.
- KRAMER, J.W. *Normal Hematology of the Horse*. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. (eds.) *Schalm's Veterinary Hematology*. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 2000, p.1069-1074.
- KRAKOWSKI, L.; KRAWCZYK, C.H.; KOSTRO, K.; STEFANIAK, T.; NOVOTNY, F.; OBARA, J. Serum levels of acute phase proteins: SAA, Hp and progesterone (P4) in mares with early embryonic death. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, n.4, p.624-629, 2011.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v.227, n.5259, p.680-685, 1970.
- NOGUEIRA, A.F.S.; DI FILIPPO, P.A.; ANAI, L.A.; PEREIRA, G.T.; SANTANA, A.E. Proteinograma sérico e do líquido peritoneal de equinos hípidos e daqueles submetidos à obstrução intestinal experimental. *Ciência Rural*, v.43, n.11, p. 2018-2024, 2013.
- PANZANI, D.; ROTA, A.; MARMORINI, P.; VANNOZZI, I.; CAMILLO, F. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.82, n.6, p.807-814, 2014.
- RIOND, B.; WENGER-RIGGENBACH, B.; HOFMANN-LEHMANN, R.; LUTZ, H. Serum protein concentrations from clinically healthy horses determined by agarose gel electrophoresis. *Veterinary Clinical Pathology*, v.38, n.1, p.73-77, 2009.
- SAMPER, J.C. *Uterine edema in the mare*. In: SAMPER, J.C. (ed.) *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. 2<sup>nd</sup> ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2009, p.133-138.
- SAMPER, J.C.; Stanford, M.S.; French, H.M.; Chapwanya, A. Post-breeding inflammation in mares after insemination with large and low doses of fresh or frozen semen. *Pferdeheilkunde*, v.32, n.1, p.24-26, 2016.
- SILVA, M.A.C.; CANISSO, I.F.; MACPHERSON, M.L.; JOHNSON, A.E.M.; DIVERS, T.J. Serum amyloid A concentration in healthy periparturient mares and mares with ascending placentitis. *Equine Veterinary Journal*, v.45, n.5; p.619-624, 2013.
- TIZARD, I.R. *Anticorpos: receptores solúveis de antígenos*. In: TIZARD, I.R. (ed.) *Imunologia Veterinária*, 9<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014, p. 165-174.