

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Marcadores bioquímicos em equinos frente à resposta inflamatória

Inaraã Dias da Luz

Pelotas, 2020.

Inaraã Dias da Luz

Marcadores bioquímicos em equinos frente à resposta inflamatória

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Prof.^a Dr.^a Bruna da Rosa Curcio

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira

Pelotas, 2020.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L979 Luz, Inaraã Dias da

Marcadores bioquímicos em equinos frente à resposta inflamatória / Inaraã Dias da Luz ; Bruna da Rosa Curcio, orientadora ; Carlos Eduardo Wayne Nogueira, coorientador. — Pelotas, 2020.

32 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Proteína de fase aguda. 2. Marcador inflamatório. 3. Paraoxonase-1. 4. Inflamação. 5. Equinos. I. Curcio, Bruna da Rosa, orient. II. Nogueira, Carlos Eduardo Wayne, coorient. III. Título.

CDD : 636.1

Inaraã Dias da Luz

Marcadores bioquímicos em equinos frente à resposta inflamatória

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 19/02/2020.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Bruna da Rosa Curcio (Orientador)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.^a Dr.^a Raqueli Teresinha França
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr.^a Josiane de Oliveira Feijó
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas.

Dr.^a Luciana Araujo Lins (Suplente)
Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, que me deu forças para vencer todas as dificuldades. A minha avó Iloina Aguirre Dias (*in memoriam*), que infelizmente não pode estar presente neste momento tão importante da minha vida. Também dedico aos meus familiares e amigos queridos pelo apoio incondicional durante essa caminhada.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus. Sem fé, não conseguiria trilhar esse caminho tortuoso, nem saberia agradecer os momentos prósperos.

À minha família, principalmente a minha mãe Guaraciára e minha dinda Suelena por serem minhas maiores incentivadoras e por sonharem meus sonhos como se fossem os delas, fazendo sempre o possível e o impossível para que tudo se realizasse.

Aos meus amigos, que certamente me tornaram mais forte, fazendo com que o percurso se tornasse mais alegre, minha gratidão eterna e amizade.

Aos meus mestres, dedico minha formação e o profissional que me tornei, uns pelo exemplo e outros pelas provações, mas todos foram indispensáveis para meu crescimento pessoal e profissional.

Ao Grupo de Ensino Pesquisa e Extensão em Clínica Médica de Equinos (ClinEq), pelo auxílio na realização deste trabalho.

A minha orientadora Prof.^a Dr.^a Bruna da Rosa Curcio e ao meu Coorientador Prof. Dr. Carlos Eduardo Wayne Nogueira pela oportunidade e orientações.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que de alguma forma fizeram parte desta conquista!

Muito obrigada!

*“Onde senão no cavalo encontramos nobreza sem arrogância,
amizade sem inveja e beleza sem vaidade”.*

(Ronald Duncan, 1979)

Resumo

LUZ, Inaraã Dias da. **Marcadores bioquímicos em equinos frente à resposta inflamatória**. 2020. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A reação de fase aguda é uma resposta inespecífica do sistema imune manifestada quando o organismo sofre injúrias que alteram sua homeostase. Tal reação tem por finalidade reparar os danos sofridos, uma vez que as células lesadas liberam mediadores inflamatórios que por sua vez estimulam a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos. As proteínas produzidas são marcadores inespecíficos do processo inflamatório, apesar disso, as mesmas são muito sensíveis permitindo a identificação precoce da resposta inflamatória. A reação de fase aguda também pode ser evidenciada por outras alterações sistêmicas como leucocitose, febre, gliconeogênese, catabolismo dentre outras. Assim este estudo tem como justificativa a necessidade de um entendimento mais preciso sobre a atividade da enzima PON-1 mediante a resposta inflamatória em equinos, e se a mesma pode ser utilizada como um biomarcador de confiança. O presente estudo avaliou a atividade da PON-1 em equinos submetidos a estímulo inflamatório agudo local por meio da administração de adjuvantes vacinais. Foram utilizados 12 equinos, 8 machos e 4 fêmeas com idades entre 2-4 anos alocados em 3 grupos: grupo controle (CONT), grupo xantana (Xa) e grupo hidróxido de alumínio (HA). No grupo Xa administrou-se 2 mL de xantana 0,4% acrescido de $\frac{1}{4}$ de montanide, no grupo HA administrou-se 2 mL de hidróxido de alumínio 10%, já no grupo controle administrou-se 2 mL de solução cloreto de sódio 0,9%. Amostras de sangue seriadas (1-72 horas após administração dos adjuvantes) foram coletadas para avaliação da atividade da PON-1 no soro através de espectrofotometria. Na avaliação clínica, os animais pertencentes aos grupos Xa e HA apresentaram edema e sensibilidade dolorosa no sítio de aplicação do adjuvante. Os grupos apresentaram os seguintes valores plasmáticos descritos com média \pm erro padrão da média: CONT 43,75 \pm 8,17 U/mL, Xa 53,41 \pm 10,07 U/mL e HA 65,29 \pm 14,21 U/mL, não apresentando diferença estatística na atividade sérica da PON-1 entre os grupos independente no momento avaliado ($p>0,05$). Conclui-se que a atividade da PON-1 não apresentou diminuição frente a processos inflamatórios agudos estimulados através da administração dos adjuvantes vacinais em equinos, não se concretizando um biomarcador de confiável em alterações inflamatórias localizadas.

Palavras-chave: Proteína de fase aguda. Marcador inflamatório. Paraoxonase-1. Inflamação. Equinos.

Abstract

LUZ, Inaraã Dias. **Biochemical markers in horses related to the inflammatory response**. 2020. 32p. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

The acute phase reaction is a non-specific response of the immune system manifested when the body suffers injuries that alter its homeostasis. This reaction aims to repair the damage, since the injured cells release inflammatory mediators, which in turn stimulate the production of acute phase proteins by hepatocytes. The proteins produced are nonspecific markers of the inflammatory process, despite that, they are very sensitive allowing the early identification of the inflammatory response. The acute phase reaction can also be evidenced by other systemic changes, such as leukocytosis, fever, gluconeogenesis, catabolism, among others. Thus, the purpose of this study is understanding the specific activity of the enzyme PON-1 through the inflammatory response in horses, and whether it can be used as a reliable biomarker. The present study evaluated PON-1 activity in horses submitted to local acute inflammatory response through the administration of vaccine adjuvants. Twelve horses, 8 males and 4 females, aged 2-4 years were allocated to 3 groups: control group (CONT), xanthan group (Xa) and aluminum hydroxide group (HA). In the Xa group, 2 ml of 0.4% xanthan plus $\frac{1}{4}$ of montanide were administered, in the HA group, 2 ml of 10% aluminum hydroxide was administered, while in the control group, 2 ml of sodium chloride 0.9 % was administered. Peripheral blood samples (1-72 hours after administration of the adjuvants) were collected to assess serum PON-1 activity through spectrophotometry. Clinical evaluation showed that horses from Xa and Ha groups presented edema and painful sensitivity at the site of adjuvant application. Plasmatic concentration of PON-1, described with mean \pm standard error of the mean, was: CONT 43.75 ± 8.17 U / mL, Xa 53.41 ± 10.07 U / mL and HA 65.29 ± 14.21 U / mL. There were not observed statistical difference in serum PON-1 activity between groups, independent of the time of evaluation ($p > 0.05$). It was concluded that PON-1 activity did not decrease in response of acute inflammatory processes stimulated through the administration of vaccine adjuvants in horses. So, PON-1 showed not be a reliability biomarker for local inflammatory response in horses.

Keywords: Acute phase protein. Inflammatory marker. Paraoxonase-1. Inflammation. Equine.

Lista de Figuras

- Figura 1 Aumento de volume na região peitoral esquerda de um equino após 72h da administração do adjuvante xantana (Xa)..... 26
- Figura 2 Atividade sérica da PON-1 (U/mL) em equinos descrita com média e erro padrão da média de acordo com os grupos: Controle, Xantana e Hidróxido de alumínio. Pela análise de variância por medidas repetidas ($p < 0,05$) 27

Lista de Abreviaturas e Siglas

CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CEEP	Centro de Ensino e Experimentação em Equinocultura da Palma
CONT	Controle
H	Hora
HA	Hidróxido de alumínio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
NM	Nanômetros
PFA	Proteína de fase aguda
PON	Paraoxonase
RFA	Reação de fase aguda
UFPEL	Universidade Federal de Pelotas
XA	Xantana

Lista de Símbolos

-	Menos
%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
Δ	Delta
®	Marca registrada
mg/dL	Miligramas por decilitro
nº	Número
U/mL	Microgramas por mililitro
m/s ²	Força gravitacional

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Objetivos.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivo Específico.....	14
3 Artigo.....	15
4 Considerações Finais.....	28
Referências.....	29
Anexo A.....	33

1 Introdução

O organismo frente a injúrias como estresse, traumas ou infecções inicia um processo de reparação na busca da restauração da homeostase através de uma resposta inespecífica do sistema imune inato caracterizada como reação de fase aguda (RFA) (ECKERSALL; BELL, 2010). Tal reação é estimulada quando as células lesadas liberam metabólitos do ácido araquidônico e produtos do estresse oxidativo, seguido da liberação de citocinas a partir de macrófagos e monócitos (ECKERSALL; BELL, 2010).

Em resposta ao aumento destes mediadores pró-inflamatórios ocorre a estimulação da produção de proteínas de fase aguda (PFA) pelos hepatócitos (ECKERSALL; BELL, 2010). Tais proteínas são marcadores inespecíficos de inflamação precoces e sensíveis, capazes de detectar infecções subclínicas antes que ocorra elevação do número de leucócitos circulantes (CALDIN et al., 2009), alterando suas concentrações em mais de 25% em resposta à estimulação de citocinas pró

Os níveis séricos circulantes das PFA podem aumentar (positivas) ou reduzir (negativas) mediante à inflamação (MURATA et al., 2004). Haptoglobina, fibrinogênio, proteína C reativa, amiloide A sérica (SAA), alfa-feto proteína (AFP) e ceruloplasmina C3 compõem o grupo das positivas, já albumina, transferrina e paraoxonase-1 (PON-1) das negativas (CECILIANI et al., 2012; ECKERSALL; BELL, 2010).

Além das alterações nas PFAs, a RFA pode se manifestar nos organismos de diferentes formas como febre, leucocitose, elevação do cortisol sérico, redução das concentrações de tiroxina, ferro e zinco e mudanças metabólicas como lipólise, gliconeogênese e catabolismo muscular (CERÓN et al., 2005).

Aa PON-1 é uma enzima produzida no fígado (FERRE et al., 2002) e encontra-se no sangue ligada à lipoproteína de alta densidade (HDL) (DRAGANOV et al., 2000). Uma importante função atribuída a mesma é a sua capacidade de evitar a oxidação e peroxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), assim como de outras membranas celulares (DRAGANOV et al., 2005), protegendo dos danos oxidativos.

Esta enzima faz parte de um grupo de três tipos de PON (PON-1, PON-2 e PON-3). Assim como a PON-1, a PON-3 é sintetizada no fígado e se liga ao HDL, apresentando a mesma função antioxidante. Apesar disso, as concentrações plasmáticas de PON-3 são consideravelmente menores do que as de PON-1 (DRAGANOV et al., 2000). A PON-2 mesmo sendo a menos estudada, sabe-se que a mesma é expressa em uma variedade de tecidos, incluindo pâncreas, coração, cérebro, fígado, rins, pulmão e testículos. Apesar do papel fisiológico da PON-2 ainda não esteja totalmente elucidada, também apresenta função antioxidante prevenindo a peroxidação do LDL exclusivamente de forma intracelular. (MASELLI, 2007).

Em humanos (COSTA et al., 2003) e bovinos (KRAUSE, 2014) o uso da PON-1 como biomarcador na resposta sistêmica frente a processos inflamatórios está descrita na literatura, assim sendo utilizada como forma de diagnóstico e monitoramento de processos inflamatórios.

Em bovinos, sua atividade no soro foi confirmada por Aldridge (1953), depois foi caracterizada principalmente como uma PFA negativa, reduzindo seus níveis circulantes em resposta às citocinas liberadas durante a inflamação (BIONAZ et al., 2007), com isso tem sido utilizada como biomarcador para diagnóstico de doenças, dentre elas patologias do trato uterino em vacas pós-parto (CAMPOS et al., 2017; KRAUSE et al., 2014; SCHNEIDER et al., 2013), por exemplo. Por outro lado, já foi demonstrada uma relação entre maiores níveis séricos de PON-1 com parâmetros de fertilidade em vacas leiteiras (KRAUSE et al., 2014; RINCÓN et al., 2016; SILVEIRA et al., 2019), assim como em humanos (BROWNE et al., 2007).

Em equinos, o uso da PON-1 como marcador do processo inflamatório agudo local ainda não está completamente elucidada. Desta forma, este estudo tem como justificativa a necessidade de um entendimento mais preciso do comportamento da enzima PON-1.

O objetivo do nosso estudo foi caracterizar o comportamento da PON-1 frente a uma resposta inflamatória local desencadeada pela administração de adjuvantes vacinais conhecidos por desencadear tal resposta.

Considerando o exposto, tem-se como hipótese que frente a uma injúria tecidual local ocorrerá a redução da atividade sérica da PON-1

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade sérica da enzima PON-1 em equinos adultos em relação a resposta inflamatória aguda local.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a atividade sérica da enzima PON-1 em equinos submetidos ao estímulo de resposta inflamatória aguda local induzida através da administração de adjuvantes vacinais.

Avaliar se a PON-1 irá diminuir suas concentrações séricas de forma significativa mediante ao processo inflamatório local, concretizando-se como um biomarcador confiável para espécie equina.

3 Artigo

Atividade sérica da enzima paraoxonase (PON-1) em equinos submetidos a administração intramuscular de diferentes adjuvantes vacinais

LUZ, I. D.; NOGUEIRA, C. E. W.; BORBA, L. A.; SANTOS, A. C.; RINCÓN, J. A. A.; DALCIN, A. L. P.; SILVA, G. C.; CURCIO, B. R.

Será submetido à revista Ciência Rural

1 **Atividade sérica da enzima paraoxonase (PON-1) em equinos submetidos a**
2 **administração intramuscular de diferentes adjuvantes vacinais**

3 **Activity of the enzyme paraoxonase (PON-1) in horses submitted to intramuscular**
4 **injection of vaccinal adjuvants**

5 Inaraã Dias da Luz¹; Carlos Eduardo Wayne Nogueira¹; Luciana de Araújo Borba¹; Alice
6 Correa Santos²; Joao Alveiro Alvarado Rincón¹; Augusto Luiz Postal Dalcin¹; Gabriela Castro
7 da Silva¹; Bruna da Rosa Curcio^{1*}

8
9 **RESUMO**

10 A PON-1 é uma proteína de fase aguda inflamatória e sua atividade plasmática tem sido
11 utilizada para fins de diagnóstico e prognóstico. Objetivou-se avaliar a atividade de PON-1 em
12 equinos submetidos a estímulo inflamatório agudo local através da administração de adjuvantes
13 vacinais. Utilizou-se 12 equinos, 8 machos e 4 fêmeas com idades entre 2-4 anos, divididos em
14 3 grupos: controle (CONT), xantana (Xa) e hidróxido de alumínio (HA). Nos grupos Xa e HA
15 administrou-se 2 mL do respectivo adjuvante vacinal por via intramuscular, e solução salina no
16 grupo CONT. Amostras de sangue seriadas (1 a 72 horas após administração) foram coletadas
17 para avaliação da atividade da PON-1 no soro por espectrofotometria. Clinicamente os animais
18 dos grupos Xa e HA apresentaram edema e sensibilidade no sítio de aplicação do adjuvante. Os

¹Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTEC, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

I. D. Luz: <https://orcid.org/0000-0001-7880-7208>

C. E. W. Nogueira: <https://orcid.org/0000-0002-8555-7953>

L. A. Borba 17: <https://orcid.org/0000-0003-1006-9389>

A. C. Santos 19: <https://orcid.org/0000-0002-6768-8693>

J. A. A. Rincón: <https://orcid.org/0000-0002-1413-5120>

A. L. P. Dalcin: <https://orcid.org/0000-0002-2133-0530>

G. C. Silva: <https://orcid.org/0000-0001-8302-3715>

B. R. Curcio: <https://orcid.org/0000-0001-8678-3816>

1 valores plasmáticos de PON-1 mínimos e máximos identificados estavam entre 38,5 a 76,5
2 U/mL, níveis esses semelhantes ao descrito como intervalo de referência para equinos
3 saudáveis. Comparando os grupos, não foi observada diferença nas concentrações de PON-1,
4 independente do momento avaliado ($p>0,05$). Conclui-se que a atividade da PON-1 não
5 apresentou diminuição frente a processos inflamatórios agudos locais estimulados através da
6 administração dos adjuvantes vacinais em equinos, não se concretizando um marcador de
7 confiabilidade em alterações inflamatórias localizadas.

8 **Palavras-chave:** proteína de fase aguda, xantana, hidróxido de alumínio.

9 **ABSTRACT**

10 A PON-1 is an inflammatory phase protein and its plasma activity has been used for diagnostic
11 and prognostic purposes. The aim of this study was to evaluate PON-1 activity in horses
12 submitted to acute inflammatory stimulus through the administration of vaccine adjuvants.
13 Twelve horses (8 males and 4 females), aged 2 to 4 years, were divided into 3 groups: control
14 (CONT), xanthan (Xa) and aluminum hydroxide (HA). Vaccine adjuvant (2mL) or saline water
15 was given intramuscularly, respectively in Xa, HA and CONT groups. Blood samples were
16 taken (1 to 72 hours after injections) to evaluate the activity of PON-1 by spectrophotometry.
17 Horses from Xa and HA groups showed edema and pain at the site of adjuvant injection. Values
18 minimum and maximum of PON-1 concentrations were between 38.5 to 76.5 U/mL, which were
19 in accordance of reference range for healthy horses. It was not observed difference in the PON-
20 1 levels among treatment groups, regardless of the time evaluated ($p> 0, 05$). In conclusion,
21 activity of PON-1 does not change according the local acute inflammatory process after
22 injection of vaccine adjuvants in horses. So PON-1 was not a reliable marker of local
23 inflammatory damages.

24 **Keywords:** acute phase protein, xanthan, aluminum hydroxide.

1 **INTRODUÇÃO**

2 A reação de fase aguda é uma resposta inespecífica que minimiza danos teciduais
3 auxiliando na reparação, restaurando a homeostase pós infecção, trauma ou estresse, estimulada
4 quando as células lesadas liberam metabólitos do ácido araquidônico e produtos do estresse
5 oxidativo, seguido da liberação de citocinas a partir de macrófagos e monócitos (ECKERSALL
6 & BELL, 2010). Aumentos na circulação destes mediadores pró-inflamatórios estimulam
7 produção de proteínas de fase aguda (PFA) pelos hepatócitos (ECKERSALL & BELL, 2010).

8 As PFA compreendem um grande grupo de proteínas que se reduzem ou se elevam em
9 resposta às infecções ou lesões teciduais, e os níveis geralmente refletem o grau e extensão do
10 processo (CHAVATTE et al., 1992). Possuem a finalidade de inibir a continuidade do dano
11 isolando e destruindo o agente agressor, ativando o processo de reparação (CERÓN, 2005;
12 CHAVATTE et al., 1992).

13 A paraoxonase-1 (PON-1) é considerada uma PFA negativa, uma vez que os processos
14 inflamatórios são associados com a diminuição da sua atividade. Sendo utilizada na medicina
15 humana para fins de diagnóstico, em situações de inflamação associada ao estresse oxidativo
16 (FAGGIONI, 2003; LEE et al., 2005), contudo ainda com uso limitado na medicina veterinária
17 (RUGGERONE et al., 2018).

18 No ano de 2018 foi realizado um estudo com diferentes categorias animais, sendo todos
19 classificados como hípidos, com intuito de padronizar os valores de referência para espécie
20 equina. O qual demonstrou que mesmo apresentando níveis baixos quando comparado a outras
21 espécies domésticas, a atividade da PON-1 apresenta potencial de utilização para o diagnóstico
22 e monitoramento da resposta ao tratamento como descrito em outras espécies (RUGGERONE
23 et al., 2018). Contudo, RUGGERONE et al. (2018) utilizaram somente animais saudáveis,
24 sendo necessário mais estudos para avaliar sua resposta em diferentes estados patológicos.

1 O presente estudo objetivou avaliar o comportamento da enzima PON-1 em equinos
2 submetidos ao estímulo de resposta inflamatória aguda local através da administração dos
3 adjuvantes vacinais xantana e hidróxido de alumínio, amplamente utilizados tanto na medicina
4 humana como na veterinária, mas que causam reconhecido estímulo de processo inflamatório
5 (PERRIE et al., 2008; PETROVSKY, 2008.)

7 **MATERIAIS E MÉTODOS**

8 Neste estudo foram utilizados 12 equinos mestiços Crioulos, sendo 8 machos e 4 fêmeas
9 com idades entre 2 e 4 anos, do plantel do Centro de Ensino e Experimentação em
10 Equinocultura da Palma (CEEP), da Universidade Federal de Pelotas, no município do Capão
11 do Leão (31°48'08.2"S; 52°29'51.4"O).

12 Os equinos foram submetidos a avaliação clínica inicial, sendo classificados como
13 hígidos por apresentarem os parâmetros dentro dos limites fisiológicos para a espécie. Para
14 avaliar o comportamento da PON-1 em resposta ao processo inflamatório agudo, foi empregada
15 a administração dos adjuvantes vacinais hidróxido de alumínio e xantana.

16 Os animais foram categorizados em 3 grupos através de delineamento experimental
17 inteiramente casualizado: grupo controle (CONT) composto por 3 machos e 1 fêmea, grupo
18 xantana (Xa) composto por 3 machos e 1 fêmea e grupo hidróxido de alumínio (HA) composto
19 por 2 machos e 2 fêmeas. No grupo Xa administrou-se 2 mL de xantana a 0,4% acrescido de ¼
20 de montanide, no grupo HA administrou-se 2 mL de hidróxido de alumínio a 10% e no grupo
21 controle administrou-se 2mL de solução fisiológica 0,9%, todos os grupo foram aplicados por
22 via intramuscular na região do músculo peitoral esquerdo.

23 Foram coletados 8 mL de sangue por animal por venopunção da jugular em sistema a
24 vácuo em dois tubos de 4 mL cada contendo ativador de coágulo, com antisepsia prévia nos
25 momentos 0h (previamente a administração dos adjuvantes) 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 8h, 10h,

1 12h, 24h, 48h e 72h após a administração dos adjuvantes. As amostras foram centrifugadas a
2 5.000 g para separação e obtenção do soro que foi acondicionado em dois microtubos por
3 animal para congelamento a -80C e subsequente análise laboratorial. Além das coletas de soro,
4 foi realizada avaliação clínica individual do sítio de aplicação dos adjuvantes para identificação
5 da resposta inflamatória através do aumento de volume e temperatura local, além da presença
6 de sensação dolorosa.

7 Para determinação da atividade da PON-1 utilizou-se um protocolo previamente
8 descrito (BROWNE et al., 2007). Utilizou-se um tampão Tris/HCl 20mM, contendo 1mM de
9 cloreto de cálcio e 4mM de fenilacetato como solução de trabalho. As amostras foram diluídas
10 (1:4) em Tampão 20Mm Tris/HCL. A leitura foi realizada através de espectrofotômetro UV-
11 VIS (Femto, São Paulo, Brasil) adicionando-se 3,3 μ L da amostra diluída em 500 μ L da solução
12 trabalho. O comprimento de onda utilizado foi de 270 nm e um tempo de leitura de 30 segundos,
13 sendo a atividade da enzima determinada pela fórmula: Δ absorbância x 115 x 4, sendo expressa
14 em U/mL (BROWNE et al., 2007). As análises foram realizadas no Laboratório de Metabologia
15 e Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas.

16 Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média. Todas as análises
17 foram realizadas através do programa Statistix10.0[®]. Foi realizada análise de variância por
18 medidas repetidas para comparação entre os grupos e comparação entre as médias pelo teste de
19 Tukey. Foi utilizado nível de significância de 5%.

20 Esta pesquisa foi realizada após avaliação e aprovação do Comitê de Ética em
21 Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas, com protocolo nº 3072.

22

23 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

24 Na avaliação clínica dos animais foi observada resposta inflamatória local em todos os
25 animais submetidos a administração de adjuvantes. Uma vez que todos animais dos grupos

1 xantana (Figura 1 - Aumento de volume na região peitoral esquerda de um equino após 72h da
2 administração do adjuvante xantana (Xa)) e hidróxido de alumínio apresentaram edema,
3 sensação dolorosa e aumento de temperatura no local da aplicação dos adjuvantes.

4 A atividade sérica da PON-1 não apresentou diferença entre os grupos de adjuvantes
5 vacinais utilizados. Os grupos apresentaram média \pm erro padrão da média os seguintes valores:
6 CONT 43,75 \pm 8,17 U/mL, Xa 53,41 \pm 10,07 U/mL e HA 65,29 \pm 14,21 U/mL ($p>0,05$) (Figura 2
7 - Atividade sérica da PON-1 (U/mL) em equinos descrita com média e erro padrão da média de
8 acordo com os grupos: Controle, Xantana e Hidróxido de alumínio. Pela análise de variância
9 por medidas repetidas ($p>0,05$)).

10 A atividade sérica da enzima PON-1 não apresentou diminuição nos grupos de equinos
11 em que foi identificada resposta inflamatória local após administração do adjuvante. Sabe-se
12 que a atividade desta enzima é menor em equinos do que nas demais espécies domésticas, em
13 vista de possíveis alterações no metabolismo hepático e lipídico, os quais interferem
14 diretamente na síntese e atividade da PON-1, ou ainda que cada espécie tem suas próprias
15 isoformas para atingir diferentes concentrações séricas (RUGGERONE et al., 2018).

16 O intervalo de referência (valores mínimos e máximos) da PON-1 encontrado no
17 presente estudo foram 38,5 a 76,5 U/mL, o que está de acordo com o intervalo de referência
18 descrito para animais hígdos da espécie equina em estudo publicado recentemente
19 (RUGGERONE et al., 2018). Dessa maneira, como a atividade enzimática nos animais que
20 apresentaram resposta inflamatória aguda (grupos Xa e HA) e os que não apresentaram essa
21 resposta (CONT) são semelhantes e encontram-se dentro do intervalo de referência descrito
22 para animais saudáveis, sugere-se que a lesão tecidual localizada não seja capaz de desencadear
23 a reação de fase aguda de forma suficiente para alterar a atividade sérica da PON-1.

24 Em vacas leiteiras, estudos anteriores sugeriram que apesar da enzima PON-1 atuar
25 como uma PFA negativa (SCHNEIDER et al., 2013; BIONAZ et al., 2007), não há evidências

1 experimentais de que a atividade da PON-1 seja modulada durante um desafio inflamatório
2 agudo. O que pode justificar a manutenção dos valores de PON-1 dentro do intervalo de
3 referência para a espécie equina encontrados no presente estudo.

4 Mais estudos são necessários para caracterizar a relação entre a ocorrência de
5 alterações clínicas sistêmicas em equinos e a ocorrência de redução da atividade da PON-1.
6 Especificamente, a atividade PON-1 poderia ser usada para fins de diagnóstico, como na
7 medicina humana, em situações que podem induzir o estresse oxidativo, como na sepse,
8 alterações cardiovasculares, renais ou hepáticas (RUGGERONE et al., 2018). Além disso,
9 resultados de amostras sequenciais coletadas após a instituição de um tratamento poderiam ser
10 úteis para avaliar o prognóstico clínico do paciente, como utilizado em outras espécies.

11

12 **CONCLUSÃO**

13 Conclui-se que a atividade da PON-1 não apresentou diminuição relacionada a presença
14 de uma resposta inflamatória aguda local, estimulada pela administração dos adjuvantes
15 vacinais xantana e hidróxido de alumínio em equinos. Assim, a utilização de PON-1 não se
16 concretiza como marcador adequado para avaliação de resposta inflamatória localizada.

17

18 **AGRADECIMENTOS**

19 Este trabalho foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
20 Tecnológico (CNPq), e ele foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de
21 Pessoal de Nível Superior (CAPES). Brasil - Código financeiro 001.

22

23 **CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES:**

24 BORBA, L.A, CURCIO, B.R e NOGUEIRA, C.E.W conceberam e projetaram os
25 experimentos. BORBA, L.A e DALCIN, A.L.P realizaram a administração dos adjuvantes

1 vacinais e as coletas de amostras sanguíneas. SANTOS, A.C realizou a manipulação dos
2 adjuvantes vacinais. LUZ, I.D, SILVA, G.C e RINCÓN, J.A.A realizaram as análises
3 laboratoriais. BORBA, L.A, CURCIO, B.R e NOGUEIRA, C.E.W supervisionaram os
4 experimentos com animais e forneceram os dados clínicos. LUZ, I.D e CURCIO, B.R
5 realizaram as análises estatísticas de dados experimentais. LUZ, I.D e CURCIO prepararam o
6 rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a
7 versão final.

8 **COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA:**

9 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Faculdade de
10 Veterinária da UFPel, sob o n° 4750.

11 **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES:**

12 Os autores declaram não ter potencial conflitos de interesse com respeito à pesquisa, autoria
13 e/ou publicação deste artigo.

14 **REFERÊNCIAS**

15 BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in
16 transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4 p. 1740-1750, 2007. Available
17 from: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17369214/>>. Accessed: Mar. 16, 2018. doi:
18 10.3168/jds.2006-445.

19 BROWNE, R.W. et al. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1
20 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2,
21 p. 310–317, 2007. Available from: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17185369/>>. Accessed:
22 Out. 24, 2018. doi: 10.1373/clinchem.2006.074559.

23 CERÓN, J.J. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives.
24 **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005. Available from:<

- 1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15902658/>>. Accessed: Jun. 17, 2019. doi: 10.1111/j.1939-
2 165x.2005.tb00019.x.
- 3 CHAVATTE, P.M., et al. (1992) Measurement of serum amyloid A protein (SAA) as an aid to
4 differential diagnosis of infection in new-born foals. **Equine Infectious Diseases**. v. 4, p. 33-
5 38, 1992.
- 6 ECKERSALL, P.David. et al. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation
7 in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010. Available from:
8 < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20621712/>>. Accessed: Dez.12, 2019. doi:
9 10.1016/j.tvjl.2010.04.009.
- 10 FAGGIONI, T. **O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em**
11 **uma população humana**. 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Curso de Pós-
12 graduação em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz.
- 13 LEE, C.T. et al. Paraoxonase activity in Greek migrants and Anglo–Celtic persons in the
14 Melbourne Collaborative Cohort Study: relationship to dietary markers. **European Journal of**
15 **Nutrition**, v. 44, n. 4, p. 223–230, 2005. Available from: <
16 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15309416/>>. Accessed: Abr. 19, 2018. doi: 10.1007/s00394-
17 004-0514-y.
- 18 PERRIE, Y. et al. Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein
19 antigens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 272–280, 2008. Available
20 from:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18555624/>>. Accessed: Jul. 06,2019. doi:
21 10.1016/j.ijpharm.2008.04.036.
- 22 PETROVSKY, N. Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma. **Expert**
23 **Review of Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 7–10, 2008. Available from:
24 <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18251687/>>. Accessed: Set. 30,2019. doi:
25 10.1586/14760584.7.1.7.

1 RUGGERONE, B. et al. Validation of a paraoxon-based method for measurement of
2 paraoxonase (PON-1) activity and establishment of RI s in horses. **Veterinary Clinical**
3 **Pathology**, v. 47, n. 1, p. 69–77, 2018. Available from: <
4 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29575140/>>. Accessed: Oct. 07, 2019. doi:
5 10.1111/vcp.12562.

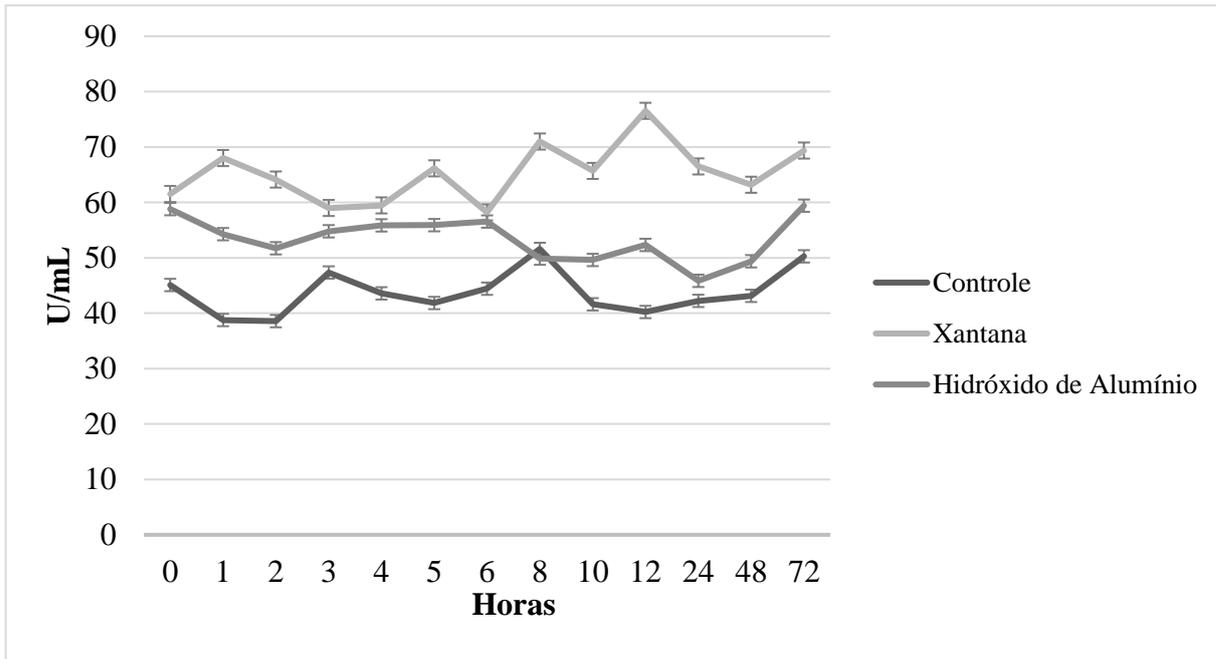
6 SCHNEIDER, A. et al. Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed
7 with uterine infection. **Research in Veterinary Science**, v. 95, n. 1, p.269-271, 2013. Available
8 from: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23540606/>>. Accessed: Mar. 12, 2019. doi:
9 10.1016/j.rvsc.2013.02.010



10

11 Figura 1 - Aumento de volume na região peitoral esquerda de um equino após 72h da
12 administração do adjuvante xantana (Xa)

13



14

15 Figura 2 - Atividade sérica da PON-1 (U/mL) em equinos descrita com média e erro padrão da
16 média de acordo com os grupos: Controle, Xantana e Hidróxido de alumínio. Pela análise de
17 variância por medidas repetidas ($p > 0,05$)

4 Considerações Finais

Baseado no exposto, com os resultados apresentados no presente estudo, pode-se concluir que a avaliação dos níveis séricos da enzima PON-1 em equinos não demonstrou ser um marcador adequado para avaliação da presença de processo inflamatório localizado.

Referências

ALDRIDGE, W.N. Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. **Biochemical Journal**, v. 53, n. 1, p. 117–124, 1953. DOI: 10.1042/bj0530117.

BIONAZ, M. et al. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n. 4 p. 1740-1750, 2007. DOI: 10.3168/jds.2006-445. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(07\)71660-0/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(07)71660-0/fulltext). Acesso em: 06/2019.

BROWNE, Richard W. *et al.* Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 310-317, 2007. DOI: 0.1373/clinchem.2006.074559. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/53/2/310/5627281>. Acesso em: 12/2018.

CALDIN, Marco *et al.* Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 1, p. 63-68, 2009. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2008.00087. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.2008.00087.x>. Acesso em: 10/2018.

CAMPOS, Felipe Terres *et al.* The acute effect of intravenous lipopolysaccharide injection on serum and intrafollicular HDL components and gene expression in granulosa cells of the bovine dominant follicle. **Theriogenology**, v. 89, p. 244-249, 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.11.013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X16305544?via%3Dihub>. Acesso em: 10/2018.

CECILIANE, Fabrizio *et al.* Acute phase proteins in ruminants. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 14, p. 4207-4231, 2012. DOI: doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391912002102#!>. Acesso em 05/2018.

CERÓN, Jose Joaquín. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p.85-99, 2005. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2005.tb00019.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1939-165X.2005.tb00019.x?sid=nlm%3Apubmed>. Acesso em: 09/2018.

CHAVATTE, P.M., et al. **Measurement of serum amyloid A protein (SAA) as an aid to differential diagnosis of infection in new-born foals.** *Equine Infectious Diseases*. v. 4, p. 33-38, 1992.

COSTA, Lucio G *et al.* Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 54, n. 1, p. 371-392. 2003. DOI: 10.1146/annurev.med.54.101601.152421. Disponível em: https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.med.54.101601.152421?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 01/2019

DRAGANOV, Dragomir I. *et al.* Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high-density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. **The Journal of biological chemistry**, v.275, n.43, p.33435-33442, 2000. DOI: 10.1074/jbc.M004543200. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258\(20\)89029-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021-9258(20)89029-2) . Acesso em: 11/2019.

DRAGANOV, Dragomir I. *et al.* Human paraoxonases (PON1, PON2, and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. **Journal of lipid research**, v.46, n.6, p.1239-1247, 2005. DOI: 10.1194/jlr.M400511-JLR200. Disponível em: <https://www.jlr.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=15772423>. Acesso em: 11/2019

ECKERSALL, P. David; BELL, Rory. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, n.1, p. 23-27, 2010. DOI: 10.1016/j.tvjl.2010.04.009. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023310001176?via%3Dihub> . Acesso em: 11/2019.

FAGGIONI, T. **O efeito do hábito de fumar sobre a atividade da enzima paraoxonase em uma população humana.** 2003. 88f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

FERRE, Natália *et al.* Serum paraoxonase activity: A new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. **Clinical Chemistry**. v. 48, n. 2, p. 261-268, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/clinchem/48.2.261>. Disponível em: <https://academic.oup.com/clinchem/article/48/2/261/5641582>. Acessado: 05-2018

KRAUSE, Ana Rita. T. *et al.* Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.8-14, 2014. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2013.12.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378432013003710?via%3Dihub>. Acesso em: 06/2019.

LEE, Chee Teik *et al.* Paraoxonase activity in Greek migrants and Anglo–Celtic persons in the Melbourne Collaborative Cohort Study: relationship to dietary markers.

European Journal of Nutrition, v. 44, n. 4, p. 223-230. 2005. DOI: 10.1007 / s00394-004-0514-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00394-004-0514-y>. Acesso em:10/2018.

MASELLI, Luciana Morganti Ferreira. **Estudo dos polimorfismos das paraoxonases 1 e 2 em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana e avaliação do potencial de peroxidação lipídica**. 2007. Tese (Doutorado em Alergia e Imunopatologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **Veterinary journal**, v.168, n.1, p.28-40, 2004. DOI: 10.1016 / S1090-0233 (03) 00119-9. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1090023303001199?via%3Dihub>. Acesso em: 10/2018.

PERRIE, Yvonne *et al.* Vaccine adjuvant systems: enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 272-280. 2008. DOI: 10.1016 / j.ijpharm.2008.04.036. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378517308003438?via%3Dihub>. Acesso em: 11/2018.

PETROVSKY, Nikolai. Freeing vaccine adjuvants from dangerous immunological dogma. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 1, p. 7-10. 2008. DOI: 10.1586 / 14760584.7.1.7. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14760584.7.1.7> . Acesso em: 03/2019.

RINCÓN, J. *et al.* Exogenous paraoxonase-1 during oocyte maturation improves bovine embryo development in vitro. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 51, p.827-830. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.12730>

RUGGERONE, Beatrice *et al.*, Validation of a paraxon-based method for measurement of paraoxonase (PON-1) activity and establishment of RI in horses. **Veterinary Clinical Pathology**, v.47, n.1, p.69-70, 2018. DOI: 10.1111 / vcp.12562. Disponível em: <https://air.unimi.it/handle/2434/571575#.YKakZKhKjIU>. Acesso em: 03/2019.

SCHNEIDER, A. *et al.* Short communication: acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection. **Research in Veterinary Science.**, v.95, p.269-271, 2013. DOI: 10.1016/j.rvsc.2013.02.010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528813000647?via%3Dihub> . Acesso em: 09/2018.

SILVEIRA, Pedro Augusto Silva. *et al.* Polymorphisms in the anti-oxidant paraoxonase-1 (PON1) gene associated with fertility of postpartum dairy cows. **Theriogenology**, v.125, p.302-309, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.11.024

Anexos

Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



UF-Pel
CEEA
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Pelotas, 19 de junho de 2013

De: Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Professor Carlos Eduardo Wayne Nogueira
Faculdade de Veterinária

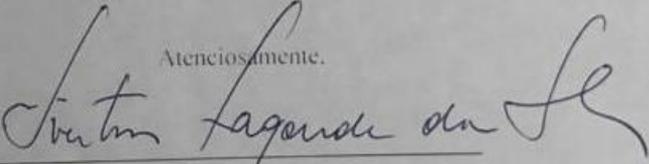
Senhor Professor:

A *CEEA* analisou o projeto intitulado: “**Valor preditivo da mensuração de proteínas de fase aguda na rotina clínica de equinos**”, processo nº23110.003072/2013-90, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer e assiná-lo, reenviar o processo à *CEEA*. Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 3072**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva
Presidente da CEEA

Ciente em: 19/06 /2013

Assinatura do Professor Responsável:

