



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROTEINOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DE CÃES  
(*Canis familiares* - LINNAEUS, 1758) CLINICAMENTE  
SAUDÁVEIS.**

**MÁRIO SÉRGIO ALMEIDA FALCÃO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA-DF  
DEZEMBRO/ 2008**

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROTEINOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DE CÃES  
(*Canis familiares* - LINNAEUS, 1758) CLINICAMENTE  
SAUDÁVEIS.**

**MÁRIO SÉRGIO ALMEIDA FALCÃO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> . DR<sup>a</sup> . PAULA DINIZ GALERA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 003 /2008**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO/2008**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FALCÃO, M.S.A. **Proteinograma do humor aquoso de cães (*Canis familiares* - LINNAEUS, 1758) clinicamente saudáveis**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2008, 77 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado, empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor a Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Falcão, Mário Sérgio Almeida

Proteinograma do Humor Aquoso de Cães Clinicamente Saudáveis./Mário Sérgio Almeida Falcão. Brasília, 2008. Orientação Paula Diniz Galera – Brasília, 2008.

Dissertação de Mestrado – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2008.

1. cão. 2. proteína. 3. humor aquoso.4.olho

CDU

Agris/FAo

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**PROTEINOGRAMA DO HUMOR AQUOSO DE CÃES (*Canis familiares* -  
LINNAEUS, 1758) CLINICAMENTE SAUDÁVEIS.**

**FALCÃO, MÁRIO SÉRGIO ALMEIDA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE  
ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

**APROVADO POR:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Paula Diniz Galera ( Universidade de Brasília-UnB)

---

Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino Wouk (Universidade Federal do Paraná)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francislete Melo (União Pioneira de Integração Social).

**BRASÍLIA/DF, 05 de DEZEMBRO de 2008**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, princípio e fim de tudo, meu Senhor e meu Deus, te louvo e te agradeço por mais essa conquista, que sem Ti não seria possível.

A minha família que é tão especial para mim, aos meus pais, obrigado por esse amor incondicional, ao meu irmão Márcio, a minha irmã Milena, ao meu cunhado Nilson por todo amor, carinho e apoio, amo vocês. A minha sogra e meu sogro, as minhas cunhadas e concunhado, vocês são um exemplo para mim, admiro muito vocês, obrigado por tudo, amo vocês. Ao meu sobrinho Tiago, seu sorriso é sempre uma esperança.

A minha Esposa, Minha vida, te amo muito linda, você foi importantíssima nessa conquista, estar com você é maravilhoso e me faz a cada dia, uma pessoa melhor, te amo muito.

A minha Orientadora Prof. Dra. Paula Diniz Galera, por toda confiança, paciência e incentivo para realização deste trabalho.

Ao Meu querido amigo Levi, na lembrança o seu sorriso e as suas palavras, no coração a saudade e eterna gratidão. Sei que está vendo tudo ai de cima.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho, por toda a ajuda, apoio e incentivo, muito obrigado.

“Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas”

*Antoine de Saint-Exupéry*

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Diniz Galera, por toda confiança depositada ao longo de todo este tempo, por ter compartilhado comigo todo seu conhecimento, a minha admiração a você faz com que eu siga seus passos na cirurgia e na docência. Não tenho como agradecer-lá. Como agradecer a alguém que acreditou em quem não tinha nada a oferecer, como agradecer todo carinho e atenção depositados e a força e o estímulo para continuar, me faltariam palavras, você sempre será a minha “Prof.”. Te admiro muito, estar com você nos faz melhor sempre, te adoro.

Ao Prof. Cássio Ricardo Ribeiro, por todas amizade e apoio e dicas para realização deste trabalho, valeu Cassild’s.

Ao Prof. Richard Filgueiras, que conheci ao longo desta caminhada, por todos os ensinamentos, amizade e confiança, te admiro muito como pessoa e como profissional, obrigado por tudo.

A todos os professores do Hvet UnB que me ensinam muito a cada dia, com muita dedicação e atenção.

A todos os residentes do Hvet da UnB, que ajudaram muito nesta fase da minha vida.

A Maria Fernanda Machado e a Larissa Borges, pela ajuda direta na realização deste trabalho, pelos dias sem almoço e pelas palavras de incentivo e carinho, adoro vocês.

A Martha Rocha e a Ana Barbara Silva, meninas, vocês são dez, obrigado pelo ombro amigo e pelo incentivo nas horas difíceis, adoro vocês.

A Anahi Silva e a Bruna Lopes, sempre com seus “pepinos”, obrigado por tudo meninas.

A Ana Carolina Rodarte que mesmo distante, sei que sempre posso contar com seu apoio e amizade, você é uma grande amiga, saudades.

Ao Prof.Dr. Túlio Cesar, sem você este trabalho não teria saído, toda a sua dedicação e vontade de ajudar o próximo, a sua dedicação e paciência. Grande Túlio, não tenho como agradecer-lo.

A Profa. Dra. Elida Campos, pela confiança e por ter acreditado na realização deste trabalho.

A todo pessoal do lab. 0, ao Davi Rosa, a Greice Lucena, a Renata Timbó e a Viviane de Souza, conviver com vocês foi maravilhoso, fez deste trabalho, menos ardo e muito divertido.

Ao grande amigo Rômulo Vitelli, por sua amizade, dedicação e disponibilidade, obrigado por tudo, acredito muito em você.

A todo pessoal do laboratório de patologia clínica pelo apoio neste projeto, em especial a Roberta Rendy, que ajudou diretamente, obrigado por tudo.

A todos os estagiários que ao longo desta jornada me ensinaram muito, obrigado a todos vocês.

A Luiza Quintão, que mesmo longe, sempre esta perto, você faz falta viu.

A equipe dos sonhos, que sempre será inesquecível.

A Laila Manftoum, obrigado por tudo, por sua amizade, carinho, apoio, sem você as coisas não são as mesmas, torço por você.

A todos os colegas de mestrado, meu muito obrigado.

As parceiras Cecília Azevedo e Fernanda Firmino, mais uma jornada concluída, partilhar com vocês mais este momento foi muito bom, vocês estão no coração.

Aos meus grandes amigos, Tiago Mauriz e Rodrigo torres, que souberam entender os momentos de ausência e sempre torcem por mim e me apóiam, valeu galera.

Ao Prof. Dr. Antônio Felipe Paulino Wouk e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Francislete Melo pelas correções e considerações para melhoria deste trabalho, meu muito obrigado.

## CAPÍTULO I

### INTRODUÇÃO

O humor aquoso é um fluido intra-ocular, produzido no corpo ciliar por processos ativos e passivos, importante para o suprimento e remoção de nutrientes e metabólitos de tecidos oculares avasculares (FITT; GONZALEZ, 2006; DUAN *et al.*, 2008).

Contém proteínas em sua composição (BLOGG; COLES, 1971; HAZEL *et al.*, 1985; GUM *et al.*, 2007) que podem desempenhar um papel importante na patogênese de diversas doenças oftálmicas (GRUS *et al.*, 2007; DUAN *et al.*, 2008). Sabe-se que os níveis de proteína se elevam em desordens do segmento anterior (GALERA, 2002; SLATTER, 2005; GUM *et al.*, 2007) e, através dos avanços dos estudos moleculares (GRUS *et al.*, 2007), tem-se demonstrado que algumas dessas proteínas possuem correlação com mecanismos patológicos, ou mesmo quanto ao prognóstico de algumas desordens oculares (TAKASE *et al.* 2006; WEINSTEIN *et al.*, 2007; GRUS *et al.*, 2007; DUAN *et al.*, 2008).

A quantidade de proteínas presentes no humor aquoso de cães é regulada pelas barreiras hemato - oculares, como a retiniana e a aquosa, as quais controlam o influxo de proteínas para o aquoso (COOLEY *et al.*, 1984; TRIPATHI *et al.*, 1992; GUM *et al.*, 1999; GALERA, 2002; TOWNSEND, 2008). Com a desestabilização dessas barreiras há um aumento dos níveis de proteínas no aquoso, o qual passa a ser denominado de aquoso secundário, ou plasmóide, cujos níveis protéicos



assemelham-se aos do plasma (KROHNE *et al.*, 1998; COOLINS & MOORE 1999; SLATTER, 2005).

A análise dessas proteínas possui implicações clínicas e diagnósticas, sendo a quantificação das proteínas totais e a eletroforese de grande aplicabilidade e repetibilidade em animais de companhia (DIAS, 1979; HAZEL *et al.*, 1985; GRUS *et al.*, 2007).

Os valores dos níveis protéicos do humor aquoso em cães saudáveis situam-se em torno de 0,5% dos valores plasmáticos (SLATTER, 2005; TOWNSEND, 2008). Entretanto, a literatura mostra grande diversidade nos valores dos níveis protéicos do humor aquoso de cães saudáveis (HAZEL *et al.*, 1985; COOLINS; MOORE, 1999; GALERA, 2002; BRITO *et al.* 2006; RIBEIRO, 2007). Os dados fornecidos pela literatura referem-se a uma análise da proteína total, sem que uma descrição metodológica ou um padrão da técnica utilizada para tal mensuração tenham sido previamente estabelecidos. Pequenas modificações da técnica empregada, sejam decorrentes da experiência do profissional que as executa, sejam pelas modificações permitidas pelo método (a exemplo do Método de Bradford modificado) podem ocasionar diversidade de valores. A padronização do método implica na possibilidade de repetibilidade e, conseqüentemente, confiabilidade dos dados obtidos.

## REFERENCIAL TEÓRICO

Os olhos são estruturas metabolicamente ativas, que apresentam alto grau de atividade no desempenho de muitas funções e para manutenção da fisiologia ocular (WILLIAMS, 2008).

O bulbo ocular é diferenciado anatomicamente em três câmaras e três túnicas. A câmara anterior é delimitada pela córnea e íris, a câmara posterior, entre a íris e cápsula anterior da lente e a câmara vítrea, localizada posterior à lente (SLATTER, 1990; KURAL *et al.*, 1995; GUM, 1999; SLATTER, 2005).

As túnicas são divididas em fibrosa, vascular e nervosa. Pertencem à túnica fibrosa a córnea e a esclera, à túnica vascular a íris, corpo ciliar e coróide, e à túnica nervosa a retina (GUM, 1999; SLATTER, 2005).

A túnica vascular, denominada úvea, desempenha papel importante na fisiologia oftálmica, bem como na reação imunológica ocular às mais diversas agressões (COLLINS; MOORE, 1991; STADES *et al.*, 1999; TAKASE *et al.*, 2006; SIMON, 2008).

A úvea localiza-se próxima à região escleral e é uma estrutura altamente vascularizada (SIMON, 2008; TOWNSEND, 2008). Divide-se, ainda, em trato uveal anterior, composta pela íris e corpo ciliar, e úvea posterior ou coróide (STADES *et al.*, 1999; van der WOERDT, 2001; COLITZ, 2007; SIMON, 2008; TOWNSEND, 2008).

A íris, através dos seus grupos musculares, controla a entrada da luz que penetra no olho alterando o diâmetro pupilar (van der WOERDT, 2001; TOWNSEND, 2008). O músculo dilatador da pupila situa-se próximo ao epitélio posterior e a pupila, o qual possui disposição radial que se insere na placa fibrosa vizinha à pupila, estendendo-se até a raiz da íris, e é inervado por fibras simpáticas (van der WOERDT, 2001; SLATTER, 2005; COLITZ, 2007; SIMON, 2008; TOWNSEND, 2008). O músculo constritor localiza-se no limite da separação entre o estroma e o epitélio posterior, próximo da borda palpebral, e é inervado por fibras parassimpáticas (BLOUIN, 1984; COLITZ, 2007; SIMON, 2008)

Em sua face anterior a íris apresenta duas regiões, a ciliar e a pupilar. A sua margem anterior se apresenta recoberta por células estromais modificadas, denominada camada anterior marginal. Contínuo à sua face anterior observa-se o epitélio pigmentado e o não-pigmentado recobrando o corpo ciliar e, esporadicamente, a retina (BLOUIN, 1984; HAKANSON; FORRESTER, 1990; SLATTER, 2005).

As artérias ciliares longas, temporal e nasal, penetram na íris, próxima a sua base, e formam o círculo arterial maior (van der WOERDT, 2001; SLATTER, 2005; SIMON, 2008).

A coróide é uma região altamente vascularizada que provê a nutrição e termoregulação para atividade metabólica da retina. É constituída de coriocapilares, camada de vasos médios, pelo *tapetum*, camada vascular calibrosa e supracoróide. Essa estrutura é visível em animais com fundo não pigmentado e pigmentado (van der WOERDT, 2001; COLITZ, 2007).

O corpo ciliar em sua face posterior (SIMON, 2008) é formado pela *pars plicata* (porção pregueada) e prolongada posteriormente a *pars plana* (porção plana), as quais se unem à retina (van der WOERDT, 2001; SIMON, 2008).

As fibras zonulares que sustentam a lente inserem-se na *pars plana* e entre os fundos ciliares. Visualizados, em um corte lateral, os corpos ciliares têm forma triangular, com um lado apoiado contra a esclera, o outro contra o corpo vítreo e a base dando apoio a íris e ao ângulo iridocorneal (van der WOERDT, 2001; SIMON, 2008).

O humor aquoso é um fluido intra-ocular, produzido no corpo ciliar (COLITZ, 2007) pelos mecanismos de difusão, ultrafiltração e por secreção ativa pelo processo ciliar (KURAL *et al.*, 1995; GUM, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2005; FAUTSCH *et al.*, 2006; BROOKS, 2008; DUAN *et al.*, 2008).

A difusão de solutos ocorre de uma área de alta concentração para uma de menor concentração. Componentes como os lipídeos solúveis são exemplos de substâncias que sofrem difusão (GUM, 1999). A ultrafiltração dá-se pelo movimento do componente através da membrana celular pelo aumento da força hidrostática (GUM, 1999). Já o transporte ativo requer consumo de energia, fazendo com que o material secretado vá contra um gradiente de concentração. O transporte ativo de alguns solutos, como o sódio (Na<sup>+</sup>), é um dos fatores mais importantes para a formação do humor aquoso (GUM, 1999).

A secreção ativa resulta de processos enzimáticos complexos, nos quais a enzima anidrase carbônica desempenha papel fundamental (SAMUELSON *et al.*, 1985; SLATTER, 1990; GONÇALVES *et al.*, 2005; BORGES *et al.*, 2006; BROOKS, 2008). A isoenzima anidrase carbônica II (CA-II) é uma das mais relevantes na produção do humor aquoso e está presente no epitélio pigmentar e não pigmentar do corpo ciliar (GELATT; MACKAY, 2001; WILLIS *et al.*, 2002; DIETRICH *et al.*, 2007). A anidrase carbônica age como catalizador da reação :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ , importante para formação do aquoso (GUM *et al.*, 2007).

O humor aquoso é fundamental para o suprimento e a remoção de nutrientes e metabólitos de tecidos oculares avasculares (GONÇALVES *et al.*, 2005; FAUTSCH *et al.*, 2006; DUAN, *et al.*, 2008), como a córnea (BLOUIN, 1984; GONÇALVES *et al.*, 2005) e a lente (LAUS *et al.*, 2008), além de ser determinante para a manutenção da pressão intra-ocular (GIOFRINDO, 1995; WOUK *et al.*, 1999;

LLOBET *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2005; FAUTSCH *et al.*, 2006; BROOKS, 2008).

Carboidratos, uréia e aminoácidos estão presentes no aquoso em concentrações variadas (BLOGG; COLES, 1971; GUM *et al.*, 1999; GUM *et al.*, 2007), juntamente com uma mistura complexa de eletrólitos, solutos orgânicos e fatores de crescimento celular (FAUTSCH, *et al.*, 2006). O humor aquoso difere do plasma pela sua concentração muito baixa de proteínas e lipídios (BLOGG & COLES, 1971; DIAS, 1979). Essas proteínas que o compõe são igualmente identificadas no plasma sanguíneo. As albuminas, gama-globulinas e as imunoglobulinas são freqüentemente isoladas, sendo a albumina encontrada em maior proporção (DIAS, 1979; GRUS *et al.*, 2007).

A transferrina, com peso molecular de 80 Kda, é uma proteína responsável pelo transporte de ferro e de zinco para os sítios de absorção, estocagem e utilização. Em combinação com outras substâncias moduladoras de crescimento, a transferrina regula e mantém muitas células do segmento anterior do olho e seu aumento tem sido referido na fisiopatologia do glaucoma (TRIPATHI, 1992).

O humor aquoso produzido no corpo ciliar passa pela câmara posterior e adentra a câmara anterior (HART, 1992; KAUFMAN, 1993; WOUK *et al.*, 1999; SLATTER, 2005; BROOKS, 2008). Durante a passagem do humor aquoso através da câmara anterior, produtos de excreção são eliminados dos tecidos oculares circundantes para o humor aquoso, alterando sua composição química, e este acaba por ser eliminado através do sistema de drenagem uveal (HAKANSON; FORRESTER, 1990; SLATTER, 1990; GRUS *et al.*, 2007). O equilíbrio entre a formação e drenagem desse fluido resulta na manutenção da pressão intra-ocular (BUSKIRK & BRETT, 1977; WOUK *et al.*, 1999; LLOBET *et al.*, 2003; SLATTER, 2005; BROOKS, 2008), regulada por um mecanismo circadiano (RUSSEL, 2001).

A drenagem do humor aquoso dá-se pela via convencional e pela via uveoescleral (MARTIN, 1974; BLOUIN, 1984; STADES, 1999, WOUK *et al.*, 1999; GELLAT, 1999; TIAN *et al.*, 2000; LLOBET *et al.*, 2003; GONÇALVES *et al.*, 2005; FAUTSCH *et al.*, 2006; BROOKS, 2008) (FIGURA 1).

A via convencional é formada pela malha trabecular (MT) e pelos canais de Schlemm (PUTNEY *et al.*, 1999). A MT pode ser descrita como um filtro composto por matriz extracelular (colágeno), organizado em forma de rede, recoberto pelas

células trabeculares endoteliais (TIAN *et al.*, 2000; LLOBET *et al.*, 2003; FAUTSCH *et al.*, 2006).

A via não convencional envolve a íris, corpo ciliar e coróide (BARRIE *et al.*, 1985; SAMUELSON *et al.*, 1985; BILL, 1989; NILSSON, 1997; BROOKS, 2008). Essa via é dependente do músculo do corpo ciliar que, quando contraído, diminui a drenagem do aquoso; por outro lado, seu relaxamento resulta em maior drenagem (BILL, 1989; NILSSON, 1997; GELATT, 1999). Tais alterações no músculo ciliar redistribuem a drenagem do aquoso pela via convencional e não convencional (NILSSON, 1997).

Não existe uma barreira epitelial entre a câmara anterior e o músculo ciliar, ou seja, o humor aquoso passa livremente para os espaços supraciliares e supracoroidal, sendo drenados na região escleral, via uveoescleral (BARRIE *et al.*, 1985; SAMUELSON *et al.*, 1985; BILL, 1989; NILSSON, 1997).

Em cães hípidos, a via uveoescleral é responsável pela drenagem de até 15% do humor aquoso. Entretanto, no glaucoma, sua funcionalidade pode estar reduzida a uma taxa de filtração de 3% (BARRIE *et al.*, 1985). As prostaglandinas otimizam a drenagem dessa via, porque causam relaxamento do músculo ciliar ou mudanças na matrix extracelular, resultando em menor resistência da rota de drenagem uveoescleral (NILSSON, 1997).

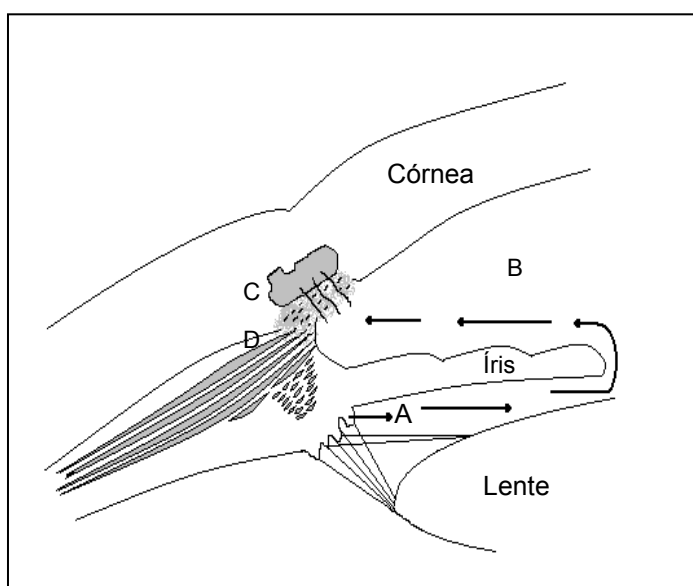


Figura 1 - Figura ilustrativa que demonstra o fluxo do humor aquoso da câmara posterior para a câmara anterior em direção ao ângulo de drenagem iridocorneal e malha

trabecular. A) Câmara posterior. B) Câmara anterior. C) Ângulo iridocorneal. D) Via uveoescleral. As setas demonstram o fluxo de humor aquoso da câmara posterior para câmara anterior.

A matrix extracelular é um tecido especializado composto por vários elementos da malha trabecular como a fibronectina, a laminina e diferentes tipos de colágeno. Esses elementos são essenciais para manutenção do sistema de drenagem do aquoso normal (ZHOU *et al.*, 1996).

Pela presença de suas barreiras oculares, barreiras hemato - aquosa e hemato – retiniana (OKISAKA, 1976; LEE *et al.*, 2008), o olho é considerado um sítio de privilégio imunológico (OHTA *et al.*, 2000; BIROS, 2008).

Esse privilégio imunológico deve-se em parte ao desvio imune da câmara anterior (ACAID), como resultado de uma intensa atividade do sistema imune local, iniciando com a captura do antígeno no olho e culminando com a resposta imune sistêmica. Este fenômeno tem sido estudado através da utilização de proteínas solúveis, antígenos específicos, antígenos de histocompatibilidade e antígenos tumorais. NA ACAID células intra-oculares apresentadoras de antígenos (CAAs) capturam o aloantígeno, enviando-o diretamente para o baço, resultando na ativação dos linfócitos T- reguladores (T<sub>reg</sub>-cells). Cabe a estas células suprimir uma resposta inflamatória exacerbada e posterior dano aos tecidos intra-oculares (BIROS, 2008).

A barreira hemato-aquosa é formada pela *tight junctions* das células do epitélio ciliar (HAKANSON; FORRESTER, 1990; TOWNSEND, 2008), que são responsáveis pela integridade funcional da barreira aquosa e pelo controle do fluxo de fluido para a câmara posterior (COOLEY *et al.*, 1984; GUM *et al.*, 1999; COLITZ, 2007; TOWNSEND, 2008) .

A barreira hemato-retiniana, mais efetiva que a barreira aquosa quanto a sua permeabilidade, também é constituída pelas *tight junctions* entre os capilares retinianos e as células do epitélio pigmentar da retina (COOLEY *et al.*, 1984; HAKANSON; FORRESTER, 1990; GUM *et al.*, 1999; TOWNSEND, 2008).

A composição física e química do humor aquoso depende primariamente da estabilidade dessas barreiras (TRIPATHI *et al.*, 1992). Através delas há o controle do influxo de proteínas (TOWNSEND, 2008) e de outras substâncias orgânicas e inorgânicas para o seu interior (ALLERTON *et al.*, 1962; KAUFMAN, 1993; LEE *et al.*, 2008). Descreve-se ser a concentração de proteína no humor aquoso duzentas

vezes inferior à concentração da proteína plasmática (TOWNSEND, 2008), assim como a concentração de fatores de crescimento (TRIPATHI *et al.*, 1992; GUM *et al.*, 1999; SLATTER, 2005).

Em cães saudáveis, os valores protéicos no aquoso situam-se entre 36,4mg/dL, tendo sido descritas variações entre 21-65mg/dL (HAZEL *et al.*, 1985). Brito *et al.* (2006) referem valores de 25,86mg/dL e Coolins & Moore (1991), 37,4mg/100mL. Slatter (2005) e Townsend (2008) correlacionam a concentração do aquoso a 0,5% do valor das proteínas plasmáticas totais.

Mediante desestruturação da barreira hemato - aquosa, seja decorrente de processos inflamatórios, patológicos e farmacológicos, ou por paracentese de câmara anterior, observa-se um aumento nos níveis protéicos no aquoso (DIAS, 1979; TRIPATHI *et al.*, 1992; GALERA, 2002; BIAGGI *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2007), mormente por albuminas, imunoglobulinas e fibrinogênio (KROHNE *et al.*, 1998). Essas proteínas adentram o aquoso alterando sua composição, ao que se denomina humor aquoso secundário, ou aquoso plasmóide, clinicamente visualizadas como fenômeno Tyndall positivo (DIAS, 1979; TRIPATHI *et al.*, 1992; CAPRIOLI, 1992; KROHNE *et al.*, 1995; GALERA, 2002; BIAGGI *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2007; SIMON, 2008). Foram descritos níveis protéicos de 729mg/dL (COOLINS; MOORE, 1991; SLATTER, 2005) e entre 600 a 2500mg/dL, quando a desestabilização das barreiras oculares resultou de cirurgia intra-ocular (BLOGG; COLES, 1971).

As respostas inflamatórias oculares são inicialmente executadas e reguladas pela interação de um mecanismo complexo, incluindo células inflamatórias e mediadores químicos, ou fatores liberados a partir de células e tecidos (HAKANSON; FORRESTER, 1990).

As inflamações oculares ocorrem em resposta a lesões mecânicas, químicas, térmicas ou ainda alterações sistêmicas, endógenas, humorais e celulares de origem secundária a infecções e causas imunomediadas (GIULIANO, 2004). Após lesão da membrana celular as membranas de fosfolípeos são liberadas e hidrolizadas pela fosfolipases A<sub>2</sub>, resultando na formação do ácido aracdônico. O metabolismo do ácido aracdônico ocorre por ação da via das cicloxigenase ( COX) e lipoxigenases. A atividade COX resulta em tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2</sub>-alfa e prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). Quando as lipoxigenases são ativadas resultam na formação de leucotrienos (LTs). (GALERA,2002; GIULIANO, 2004)

As prostaglandinas são liberadas nos sítios de inflamação, onde interagem com outros mediadores, como bradicinina e a histamina, estimulando terminações nociceptoras, sendo uma das responsáveis da dor decorrentes do trauma ou da cirurgia ocular (FORSYTH *et al.*, 2000, GALERA, 2002). A liberação dessas substâncias leva ao aumento da permeabilidade da barreira hemato-ocular e conseqüente aumento dos níveis de proteína do aquoso (GALERA, 2002).

O estudo das proteínas presentes no humor aquoso de cães, tanto em processos fisiológicos, quanto em processos patológicos, é fundamental para o diagnóstico e tratamento precoce e efetivo das alterações oculares. A análise dessas proteínas pode fornecer a identificação de biomarcadores fundamentais no aprimoramento diagnóstico e terapêutico de doenças oculares. A identificação desses biomarcadores em alterações autoimunes mediante análise do proteoma pode incrementar o diagnóstico destas alterações, a exemplo da uveíte recorrente eqüina (ZIPPLIES, *et al.*, 2008).

Portanto, a análise desse fluido tem sido utilizada como auxílio ao diagnóstico nas diversas afecções oculares em seres humanos (DIAS, 1979; TRIPATHI *et al.*, 1992; BARROS *et al.*, 2003; YAMANE *et al.*, 2003; RIBEIRO; 2007; WEINSTEIN *et al.*, 2007; ROTHOVA, 2008) e em animais (HAZEL *et al.*, 1985; GALERA, 2002; BRITO *et al.*, 2006; WEINSTEIN *et al.*, 2007). Análise citológica (HAZEL *et al.*, 1985; YOUNG, 2007), cultura microbiológica, quantificação da concentração das proteínas totais, perfil bioquímico, contagem diferencial de células (HAZEL *et al.*, 1985; YOUNG, 2007), eletroforese uni e bi-dimensional (ROHDE *et al.*, 1998; DUN *et al.*, 2008), reação de polimerase em cadeia (PCR) (BURNEY *et al.*, 1998; ROTHOVA *et al.*, 2008), reação de imunoensaio (FABER, 2000; DENIS *et al.*, 2003) e cromatografia (TRIPATHI, 1991; BARROS *et al.*, 2003; REGNIER *et al.*, 2003) são alguns exames sugeridos.

Proteínas podem ser quantificadas por vários métodos espectrofotométricos (AZEVEDO *et al.*, 2003) e a sua quantificação na prática laboratorial requer um método rápido e sensível (BRADFORD, 1976). A opção pelo método é dependente da sensibilidade necessária à detecção das substâncias a serem pesquisadas. Os mais difundidos são o de Lowry, o Bradford, o BCA. Esse último, de utilização mais recente, é considerado uma otimização do método de Lowry (AZEVEDO *et al.*, 2003).



O método de Bradford tem sido descrito como método padrão para quantificação de proteínas devido a sua grande sensibilidade e facilidade de execução (BOLLAG *et al.*, 1996; AZEVEDO *et al.*, 2003). Consiste da utilização de um corante de Commassie Blue com a cadeia polipeptídica (BRADFORD, 1976; AZEVEDO *et al.*, 2003).

A ligação da proteína a esse corante produz uma variação no comprimento de onda que é medido na absorbância a 595nm em um espectrofotômetro. Os resultados obtidos pelo espectrofotômetro devem ser colocados na equação de linearidade da curva padrão, para posterior quantificação da proteína total (BRADFORD, 1976; BOLLAG *et al.*, 1996; AZEVEDO *et al.*, 2003).

O corante Vermelho de Pirogalol (Sensiprot®)<sup>1</sup> é um corante que reage com o molibdato de sódio, formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo de cor azul, com o máximo de absorbância em 600nm. Esse reagente, dada a sua sensibilidade, pode detectar concentrações tão pequenas quanto 2,0 mg/dL, sendo indicado para mensurações protéicas de saliva (MARTINEZ *et al.*, 2007), urina (GONÇALVES *et al.*, 2007) e líquido cérebro espinhal (GAMA, *et al.*, 2005). Todavia, para análise direta do humor aquoso ainda não fora testado.

A eletroforese em gel consiste em um método eficaz para separação de macromoléculas, sendo o gel de poliacrilamida e o de agarose os mais empregados (KUCHLE *et al.*, 1994; VOET; VOET, 1995; ROHDE *et al.*, 1998).

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições desnaturantes é um sistema de baixo custo, reprodutível e um método rápido para quantificação e visualização do perfil protéico. Esse método separa as proteínas conforme sua massa molecular (BOLLAG *et al.*, 1996; GRUS *et al.*, 2007). O seu preparo pode dispor de concentrações variadas de acordo com a massa molecular esperada (BOLLAG *et al.*, 1996). Após a corrida, os géis são corados com comassie blue ou ainda nitrato de prata e depois descorados em solução de metanol 25% e ácido acético 10%.

A leitura é realizada por densitometria para confecção dos gráficos de cada amostra. Esse processo permite a classificação das proteínas por sua massa molecular (AEBERSOLD; MANN, 2003).

---

<sup>1</sup> Sensiprot®-Labtest

A citologia do humor aquoso pode ser adjutória no diagnóstico de infecções ou de processos neoplásicos (RASKIN, 2003). Compreende a contagem de células totais, seguida pela sedimentação do fluido para realização do esfregaço ou preparação com fixador próprio. A celularidade esperada para o humor aquoso de cães normais situa-se ao redor de 8,2cel/ $\mu$ l, mas esses valores podem variar de zero a 37 cel/ $\mu$ l (RASKIN, 2003; YOUNG, 2007).

O exame citológico do humor aquoso deve revelar um padrão acelular, uma vez que é um fluido com baixo teor protéico. Ocasionalmente podem-se observar grânulos livres de melanina ou células que contenham melanina (RASKIN, 2003; YOUNG, 2007). A citologia, embora seja um procedimento rápido e de fácil execução, é pouco empregada na rotina oftálmica. Entretanto, apresenta como vantagens ser um procedimento com invasão mínima e bons resultados práticos, podendo auxiliar o clínico no diagnóstico e tratamento das afecções sistêmicas e oculares.

#### OBJETIVOS:

Objetivou-se, com este estudo, estabelecer padrões de normalidade das proteínas totais do humor aquoso de cães considerados clinicamente saudáveis, mediante a padronização do método de Bradford. Ainda, objetivou-se avaliar a sensibilidade de teste colorimétrico bioquímico direto à base do corante vermelho de pirogalol (Sensiprot®), comparativamente ao método de Bradford, comparando-se os valores obtidos por ambos os métodos aos valores de proteínas plasmáticas de cães. Secundariamente, objetivou-se caracterizar o perfil protéico do humor aquoso através do método de eletroforese unidimensional com coloração de nitrato de prata e realizar a análise citológica desse fluido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEBERSOLD, R., MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **NATURE**, v. 422, n. 13, 2003.
- AZEVEDO, M. O. FELIPE, M. S. S., BRÍGIDO, M. M., MARANHÃO, A. Q., DE-SOUZA, M. T. M. **Técnicas básicas em biologia molecular**. Ed. Universidade de Brasília, 2003.
- BARRIE, K. P., GUM, G.G. SAMUELSON, D. A. GELLAT, K. N. Quantitation of uveoscleral outflow in normotensive and glaucomatous beagles by 3h-labeled dextran. **Am J Vet Res.**, 1985,46:84-88.
- BARROS, P. S. M., PADOVANI, C. F., SILVA, V. V., QUEIROZ, L., BARROS, S. B. M. Antioxidant status of dog aqueous humor after extracapsular lens extraction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p. 1491-1494, 2003.
- BILL, A. Uveoscleral drainage of aqueous humor: physiology and pharmacology. **Prog Clin Biol Res.**, 1989;312 : 417-427.
- BIROS, D. Anterior chamber-associated immune deviation. **Vet Clin Small Anim.** 2008,38:309-321.
- BLOGG, J.R., COLES, E.H. Clinicopathological aspects of canine aqueous humor proteins. **Res. Vet. Sci**, v12, p. 95 – 98, 1971.
- BLOUIN, P. Uveitis in the dogs and cat: causes, diagnosis and treatment. **Can Vet J.** v.25, p. 315-323, 1984.
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M.D. In: **Protein Methods.**, 2ed. Editora:Wile-York, 1996.
- BORGES, A.G., BRANDÃO, C. V. S., RANZANI, J. J. T., MARINHO, L. F. L.P., GALLO, R.N., CROCCI, A. J. Ação do cloridrato de dorzolamida a 2% como tópico hipotensor ocular. Estudo experimental em cães. **Archives of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.13-15, 2006.
- BRADFORD, M. M. Arapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.1976, 72: 248-254.
- BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; MAIS F. C. L.; SANTOS, E.S.C; LAUS, I. M. J. Ocular alterations in dogs naturally infected by Leishmania chagasi. In: **Veterinary**

- Medicine. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.** V.58, n.5, out, 2006.
- BROOKS, D. E. Glaucoma. In: HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia.** 1ed. - São Paulo: Med vet ,2008.cap.: 11; p.195-197.
- BURBNEY, D. P., CHAVKIN, M. J., DOW, S. W., POTTER, T. A., LAPPIN, M. R. Polymerase chain reaction for the detection of *Toxoplasma gondii* within aqueous humor of experimentally-inoculated cats. **Veterinary Parasitology**, v.79, p. 181-186, 1998.
- BUSKIRK, E. M., BRETT, J. The canine eye: in vitro dissolution of the barriers to aqueous outflow. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1977, vol.17, n.3; p.258 - 263.
- CAPRIOLI, J. The ciliary epithelia and aqueous humor. In: HART JR., W.M. **Adler's physiology of the eye – Clinical application.** 9° ed. S<sup>t</sup> Louis: Mosby. 1992. ch.7.p.228-247.
- COLITZ, C. M. H. A medley of canine uveitis situations. **The North American Conference-** Orlando, Florida, 2007.
- COOLEY, P. L., MILVAE, R., RIIS, R. C., LARATTA, L. J. Effect of flunixin meglumine on prostacyclin accumulation in the equine eye. **American Veterinary Medical Association**, v. 45, n. 7, p. 1383-1385,1984.
- COLLINS, B. K., MOORE, C. P. Diseases and surgery of the canine anterior úvea. In: Gellat, K. N. **Veterinary ophthalmology.3ªed.**Baltimore: Lippinoot Willians e Wilkins, 1999; 755-795.
- DENIS, H. M., BROOKS, D. E., ALLEMAN, A. R., ANDREW, S. E., PLUMMER, C. Detection of anti-crystallin antibody in dogs with and without cataracts. **Veterinary Ophthalmology**, v.6,n.4,p.321-327, 2003.
- DE BIAGGI, C. P., BARROS, P. S. M., SILVA, V. V., BROOKS, D. E., BARROS, S. B. M. Ascorbic acid levels of aqueous humor of dogs after experimental phacoemulsification. **Veterinary Ophthalmology**, v.19,n.5,p.299-302, 2006.
- DIAS, P.L.R. Postinflammatory and malignant protein patterns in aqueous humor. **British Journal of Ophyhalmology**, v.63,p.161,1979.
- DIETRICH, U. M., CHANDLER, M. J., COOPER, T., VIDYASHANKAR, A., CHEN, G. Effects of topical 2% dorzolamide hydrochloride alone and in combination with 0,5% timolol maleate on intraocular pressure in normal feline eyes. **Veterinary Ophthalmology**, v.10,n.1,p.95-100, 2007.

- DUAN, X.; LU Q., XUE P., ZHANG, H., DONG.Z., YANG, F., WANG, N. Proteomic analysis of aqueous humor from patients with myopia. **Molecular Vision** 2008, 14:370-377.
- FAUTSCH, M.P., et. al. Aqueous humor outflow: what do we know where will it lead us? **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2006, vol.47, n.10; p. 4181-4187.
- FABER, N. A. *et al.* Detection of *Leptospira* spp. in the Aqueous Humor of Horses with Naturally Acquired Recurrent Uveitis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 7, p. 2731-2733. July 2000
- FITT, A. D., GONZALEZ, G. Fluid mechanics of the human eye: aqueous humor flow in the anterior chamber. **Bulletin Of Mathematical Biology**.v 68,p53,2006.
- GALERA, P. D. **Estudo do Flunixin Meglumine (Banamine ®) após aplicação subconjuntival, em cães. 2002. 57f.** Tese (Doutora em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- GIONFRIDDO, J. R., POWELL, C. C., Traumatic glaucoma in a dog. **Vet. Med.**, v. 96, p.830-836, 1995.
- GELATT, K. N., MACKAY, O. E. Changes in intraocular pressure associated with topical dorzolamide and oral methazolamide in glaucomatous dogs. **Veterinary Ophthalmology**, 2001, 4: 61-67.
- GONÇALVES J. B. P., MIRANDA M. C., VALCARENGHI D., BUENO E. C. Análise comparativa de metodologias para dosagem de proteinúria de 24 horas. **RBAC**, vol. 39,n.1, p. 67-69, 2007.
- GONÇALVES, G. F., PIPPI, N. L., PACHALY, J. R. Pressão intra-ocular em cães com catarata. **Arq. Cien. Vet. Zool.**,v. 8, n. 1., p.57-61, 2005.
- GUM, G.G.; GELATT, K.N.; OFRI, R. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. ch. 3, p.151-181.
- GUM, G.G.; GELATT, K.N.;ESSON,D.W. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Blackwell Publishing. 2007. ch. 3, p.149-170.
- GRUS, F. H., JOACHIM, S. C., PFEIFFER, N. Proteomics in ocular fluids. **Proteomics Clin. Appl.**, v1, p.876, 2007.

- HART, W. M. Intraocular pressure. **Adler's physiology of the eye- Clinical application**. 9<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby. 1992, ch.8, p.248-267.
- HAKANSON, N., FORRESTER, S. D. Uveitis in the dog and cat. **Vet Clin Small Anim**, v.20, n.3, may, 1990.
- HAZEL, S.J., HULL, M. A., SEVERIN, G. A., LAUERMAN, L. H. Jr. Laboratory evaluation of aqueous humor in the healthy dog, cat, horse, and cow. **American Journal of Veterinary Research**. v. 46, n. 3, p.657-659. Mar. 1985.
- KAUFMAN, P.L. Aqueous Humor Dynamics. **Clinical Ophthalmology**. William Tasman e Edward A. Joeger. p.1-15, 1993.
- KROHNE, S. G., KROHNE, D. T., LINDLEY, D. M., WILL, M. T. Use of laser flaremetry to measure aqueous humor protein concentration in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, 1995, 206: 1167-1172.
- KROHNE, S. G., BLAIR, M. J., BINGAMAN, D., GIOFRINDO, J. R. Carprofen inhibition of flare in the dog measured by laser flare photometry. **Veterinary Ophthalmology**. 1998, 1:81-84.
- KURAL, E., LINDLEY, D., KROHNE, S. Canine glaucoma: clinical signs and diagnosis. **The compendium collection**, 1995, v.17, n.8, p.38 – 44.
- KUCHLE, M., HO, T. S., NGUYEN, N. X., HANNAPPEL, E., NAUMANN, G. O. H. Protein quantification and electrophoresis in aqueous humor of pseudoexfoliation eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1994, vol.35, n.2-; p. 748 - 752.
- LAUS, J. L., TORRECILHAS, A., BRUNELLI, J., ORIÁ, A. P., ALMEIDA, D. E., TALIERI, I. C. Afecções da lente. In: HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1ed. - São Paulo: Med vet, 2008. cap.: 8; p.195-197.
- LEE, J. Y., EUN, C. K., KIM, H. J., JUNG, Y. J., JAE, S. Y., CHO, B. M., CHOI, S. H. The steroid effect on the blood-ocular barrier change induced by triolein emulsion as seen on contrast-enhanced MR images. **Korean J Radiol**. 2008, 9: 205 - 211.
- LLOBET, A., GASULL, X., GUAL, A. Understanding trabecular meshwork physiology: A key to the control of intraocular pressure? **News Physiol. Sci**, 18: 205-209, 2003.
- MARTIN, C. L. Glaucoma. SLATTER, D. In: **Manual de Cirurgia de Pequenos Animais**, 2ª edição da tradução. Ed. -----, 1998. p.1506- 1521;
- MARTIN, C. L. Development of the pectinate ligament structure of the dog, study by scanning electron microscopy. **Am.J. Vet.Res.**; vol.35, p 1443, 1974.

- MARTINEZ, K. O., , MENDES, L. L., ALVES, J. B. Imunoglobulina A secretora, proteínas totais e fluxo de saliva nas ulcerações aftosas recorrentes. **Revista Brasileira De Otorrinolaringologia** 73 (3) MAIO/JUNHO 2007.
- MORRISON, J. C., BUSKIRK, M. V. The canine eye: pectinate ligaments and aqueous outflow resistance. **Res. In Vis. And Ophthal.**, 1992, p. 726-732.
- NILSSON, S. F. The uveoscleral outflow routes. **Eye**,1997; 11: 149-154.
- OHTA, K., WIGGERT, B., YAMAGAMI, S., TAYLOR, A. W., STREILEIN, J. W. Analysis of immunomodulatory activities of aqueous humor from eyes of mice with experimental autoimmune uveitis. **The American Association of Immunologists**, 2000, p.1185-1192.
- OKISAKA, S. Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: a light and electron microscopic atudy on cynomolgus monkey. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1976, vol.15, n.10; p. 824-834.
- PUTNEY, L. K., VIBAT, C. R. T., O'DONNELL, M. E. Intracellular C1 regulates Na-K-Cl cotransport activity in human trabecular meshwork cells. **American Physiological society**, 1999.
- RASKIN, R. E., MEYER, D. J. Olhos e estruturas anexas.In:**Atlas de Citologia do Cão e do Gato**,2ed.Roca.2003,cp.14.
- REGNIER, A.; BONNEFOI, M.; LESCURE, F. Effect of lysine-acetylsalicylate and phenylbutazone premedication on the protein content of secondary aqueous humor in the dog. **Res. Vet. Sci.**, v.37, p.26-29, 1984.
- RIBEIRO, A.P. **Estudo do meloxicam e do carprofeno administrados por diferentes vias no controle da uveíte em cães** (canis familiares- LINNEAUS, 1758). Tese (Mestre em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- RIBEIRO, C. R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no Distrito Federal – DF – Brasil**. Tese (Doutor em Clínica Médica Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- ROHDE, E., TOMLINSON, A. J., JOHNSON, D. H., NAYLOR, S. Comparison of protein mixtures in aqueous humor by membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**,1998.

- ROTHOVA, A., de BOER, J. H., LOON, N.D., POSTMA, G., VISSER, L., ZUURVEEN, S. J., SCHULLER, M., WEERSINK, A. J. L., van LOON, A. M., GROOT-MIJNES, J. D. F. Usefulness of aqueous humor analysis for the diagnosis of posterior uveitis. **American Academy of ophthalmology**, 2008, p. 306-311.
- RUSSEL, P., TAMM, E. R., GREHN, F. J., PICT, G., JOHNSON, M. The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2001, vol.42, n.5; p.983 - 986.
- SAMUELSON, D. A; GUM, G. G; GELATT, K. N. BARRIER, K. P. Aqueous outflow in the beagle: unconventional outflow, using different-sized microspheres. **Am. J. Vet. Res.**; v.46, p.242-248, 1985.
- SIMON, M. Afecções do trato uveal. In: HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1ed. - São Paulo: Med vet, 2008. cap.: 10; p.173-193.
- SLATTER, D. Estrutura e função do olho. In: SLATTER, D. **Fundamento Da Oftalmologia Veterinária**. 1ed. São Paulo: Roca, 2005 cap1 p.20-22.
- SLATTER, D. Glaucoma. In: **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2ª edição. Ed. W. B. Saunders Company: Philadelphia. 1990. p. 338-364.
- SLATTER, D. Uvea. In: **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2ª edição. Ed. W. B. Saunders Company: Philadelphia. 1990. p. 304 – 337.
- STADES, F. C., BOEVÉ, M. H., NEUMANN, W. & WYMAN, M. Glaucoma. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo, Manole, 1999, p. 128-139.
- TAKASE, H., FUTAGAMI, Y., YOSHIDA, T., KAMOI, K., SUGITA, S., IMAI, Y., MOCHIZUKI, M. Cytokine profile in aqueous humor and sera of patients with infectious or noninfectious uveitis. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2006, vol.47, n.4; p.1557 - 1561.
- TIAN, B., GEIGER, B., EPSTEIN, D.L., KAUFMAN, P. L. Cytoskeletal involvement in the regulation of the aqueous humor outflow. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2000, vol.41, n.3; p.619 – 623.
- TOWNSEND, W. Canine and feline uveitis. **Vet Clin Small Anim**, 2008, p.323-346.
- TRIPATHI, R. C., BARISUTH, N. S. C., TRIPATHI, B. J., GOTSIST, S.S. Quantitative and qualitative analyses of transferrin in aqueous humor from patients with



- primary and secondary glaucomas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1992, vol.33, n.10; p.2867 - 2873.
- Van der WOERDT, A. Management of Intraocular Inflammatory Disease. **CI. Tec. Small Anim. Practice**, vol.16, n°1, p.58-61, 2001.
- VOET, D.; VOET, J.G. Techniques of Protein Purification. In: **Biochemistry**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: John Wiley & Sons. 1995. ch.5, p.71-97.
- WEINSTEIN, W. L., U. M., SAPIENZA, J.S., CARMICHAEL, K. P., MOORE, P. A., KRUNKOSKY, T. M. Identification of ocular matrix metalloproteinases present within the aqueous humor and iridocorneal drainage angle tissue of normal and glaucomatous canine eyes. **Veterinary Ophthalmology**. 2007, 10:108-116.
- WILLIAMS, D. L. Oxidative stress and the eye. **Vet Clin Small Anim**. 2008, 38:179-192.
- WILLIS, A. M., DIEHL K., A., ROBBIN, T. E. Advances in topical glaucoma therapy. **Veterinary Ophthalmology**, 2002, v.5, n1.9-17.
- WOUK, A. F. P., CÍRIO, S., KASECKER, G. G., RAMOS, C., RICHTER, R. K. Novo modelo experimental de glaucoma em cão para o estudo da cicatrização após cirurgia filtrante associada ao uso de agente antifibrótico. **Arch. Vet. Scienc**. V. 4, n.1, p.103-109, 1999.
- YAMANES, K., MINAMOTO, A., YAMASHITA, H., TAKAMURA, H., MIYAMOTO-MYOKEN, Y., YOSHIZATO, K., NABETANI, T., TSUGITA, A., MISHIMA, H. K. Proteome analysis of human vitreous proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p.1177-1187, 2003.
- YOUNG, K. M. Ocular cytology: basic and advanced cases -2 part. **56° Congresso Internazionale Multisala, SCIVAC, Italy**, 2007.
- ZHOU, L., ZHANG, S. YUE, B. Y. J. T. Adhesion of the human trabecular meshwork cells to extracellular matrix proteins. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1996, vol.37, n.1; p. 104-113.
- ZIPPLIES, J.K., HAUCK, S.M., SCHOEFFMANN, S., AMANN, B., STANGASSINGER, M., UEFFING, M., DEEG, C.A. Serum PEDF Levels are decreased in a spontaneous Animal model for human Autoimmune Uveitis. [J Proteome Res](#). 2008 Dec 29

## CAPÍTULO II

### **PERFIL PROTÉICO DO HUMOR AQUOSO DE CÃES (*Canis familiares* - LINNAEUS, 1758) CLINICAMENTE SAUDÁVEIS: PADRONIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS DE BRADFORD E SENSIPROT®, ELETROFORESE (SDS-PAGE) COM COLORAÇÃO DE NITRATO DE PRATA E ANÁLISE CITOLÓGICA**

#### INTRODUÇÃO

O humor aquoso é um fluido intra-ocular produzido no corpo ciliar por processos ativos e passivos, importante para o suprimento e a remoção de nutrientes e metabólitos de tecidos oculares avasculares (DUN *et al.*, 2008), como a córnea e a lente, e é determinante para manutenção da pressão intra-ocular (CAPRIOLI,1992; GIOFRINDO, 1995; STADES,1999; LLOBET *et al.*, 2003). Contém proteínas em sua composição, secretadas para os tecidos do segmento anterior, as quais desempenham um papel importante na patogênese de diversas doenças oculares (DUN *et al.*, 2008).

O humor aquoso difere do plasma pela sua baixa concentração de proteínas e lipídios (BLOGG; COLES, 1971). Carboidratos, uréia e aminoácidos estão presentes, entretanto, em concentrações variadas (BLOGG; COLES, 1971; GUM *et al.*,1999; GUM *et al.*, 2007).

Formado no corpo ciliar esse fluido transparente é composto por proteínas, imunoglobulinas, enzimas e lipídeos, à similitude de um ultrafiltrado plasmático (CAPRIOLI, 1992; KAUFMAN, 1993), preenchendo as câmaras anterior, posterior e a pupila. Cabe ao humor aquoso o suprimento e a remoção de nutrientes e metabolitos dos tecidos avasculares do bulbo ocular (BLOUIN, 1984; BROOKS, 2008).

As barreiras hemato-retiniana e hemato-aquosa controlam o influxo de proteínas para o interior do humor aquoso, constituindo uma barreira funcional entre o sangue dos capilares do estroma ciliar e o aquoso da câmara posterior (HAKANSON; FORRESTER, 1990).

Em cães saudáveis os níveis protéicos situam-se entre 25,86 mg/dl, como descrito por Brito *et al.* (2006). Outros valores médios são descritos por Coolins & Moore (1991), em torno de 37,4 mg/dL. Mediante desestabilização das barreiras hemato-oculares, segue-se um aumento nos níveis protéicos, principalmente por imunoglobulinas e fibrinogênio, com níveis protéicos elevados entre 600 a 2500mg/dL, ao qual se denomina aquoso plasmóide (BLOGG; COLES, 1971; COOLINS; MOORE 1991; SLATTER, 2005). Alguns autores consideram que concentrações entre 21 e 65mg/dL já são referidas clinicamente como *flare* (HAZEL *et al.*, 1985).

A análise do humor aquoso tem sido utilizada como meio auxiliar de diagnóstico em seres humanos, nas mais diversas afecções oculares. Entretanto, seu uso rotineiro é pouco difundido na Medicina Veterinária (RASKIN, 2003).

Este trabalho tem por objetivo a padronização da técnica de análise dos valores protéicos do humor aquoso de cães hígidos, bem como de suas características citológicas.

## ASPECTOS ÉTICOS

Este trabalho de pesquisa foi submetido à avaliação do Comitê de Ética da Universidade de Brasília, de consoante com as normas desta instituição, sendo aprovada a realização do mesmo (protocolo número 66064/2007).

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.3.1. ANIMAIS

Fizeram parte deste estudo cães domiciliados que foram submetidos à orquiectomia e ovariosalpingohisterectomia eletivas no Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV-UnB), com prévio esclarecimento e anuência dos proprietários. Utilizaram-se 23 cães, adultos, sem raça definida, sendo quinze machos e oito fêmeas, pesando entre 10 e 35 Kg, considerados clinicamente sadios, sem histórico pregresso de alterações oftálmicas.

Foram considerados sadios os animais que mediante avaliação clínica completa, constituída por exame físico dos parâmetros fisiológicos, avaliação hematológica, bioquímica sérica (ALT, FA, uréia e creatinina, proteína plasmática total) e avaliação oftálmica, não apresentaram alterações consistentes com afecções sistêmicas.

O exame oftálmico foi realizado mediante a utilização de teste da lágrima de Schirmer<sup>2</sup>, biomicroscopia com lâmpada de fenda<sup>3</sup>, tonometria de aplanção<sup>4</sup>, oftalmoscopia direta<sup>5</sup> e teste de fluoresceína<sup>6</sup>.

### 2.3.2. COLETA E ACONDICIONAMENTO DAS ALIQUOTAS DE HUMOR AQUOSO

Para a realização da anestesia, os animais foram submetidos a jejum prévio de sólidos de doze horas e hídrico de duas horas. Foram coletados de cada animal 5mL de sangue, com seringa de cinco mililitros<sup>7</sup> e agulha<sup>8</sup> 27x8, para realização de hemograma e análise bioquímica mencionada anteriormente.

---

<sup>2</sup> Teste de Schirmer®, Ophthalmos- São Paulo-SP

<sup>3</sup> Portable SL 14®, Kowa- Japan

<sup>4</sup> Tonopen XL®, Mentor O&O-Norwell

<sup>5</sup> Oftalmoscópio direto

<sup>6</sup> Fluoresceína Strips®, Ophthalmos- São Paulo-SP

<sup>7</sup> PRECISION GLIDE, BD, São Paulo-SP

Os animais foram pré-medicados com acepromazina<sup>9</sup> na dose de 0,04mg/Kg e morfina<sup>10</sup> na dose de 0,3mg/Kg, ambos por via intramuscular. Passados 15 minutos da medicação pré-anestésica, realizou-se a venopunção cefálica com cateter<sup>11</sup> apropriado. Por via intravenosa administrou-se, em dose única, anestésico barbitúrico, tiopental sódico<sup>12</sup> (dose: 12,5mg/Kg)( FANTONNI,*et al.*, 2002; GALERA, 2002) e instilação tópica de colírio anestésico<sup>13</sup>.

Procedeu-se a coleta do humor aquoso de ambos os olhos com os animais posicionados em decúbito lateral direito e esquerdo, por paracentese de câmara anterior, com seringa<sup>14</sup> de um mililitro acoplada a agulha hipodérmica 13 x 4,5<sup>15</sup>, posicionando-se o bulbo ocular com auxílio de conjuntiva<sup>16</sup> pequena. A agulha penetrou próxima ao limbo e paralela ao plano da íris. Retirou-se aproximadamente 0,5mL de humor aquoso (figura 1). Os animais receberam a numeração seqüencial em ordem crescente, sendo cada microtubo de polipropileno identificado com o número do animal e o olho correspondente (olho direito =OD; e olho esquerdo=OE). Ato contínuo, confeccionou-se uma lâmina direta para avaliação do perfil celular, e o restante do humor aquoso foi armazenado e acondicionado a -20° para posterior processamento.

Após a coleta do humor aquoso, os cães foram submetidos à anestesia geral inalatória com halotano<sup>17</sup> associada à epidural com lidocaína<sup>18</sup> e, posteriormente, submetida à castração eletiva, conforme a técnica preconizada por Fossum (2005).

---

<sup>8</sup> PRECISION GLIDE, BD, São Paulo-SP

<sup>9</sup> UNIVET VETNIL®, Rhobioofarma, São Paulo-SP

<sup>10</sup> DIMORF®, Cristália, São Paulo-SP

<sup>11</sup> Insyte®, BD, São Paulo-SP

<sup>12</sup> THIOPENTAX, Cristália, São Paulo- SP

<sup>13</sup> ALERGAN®, Alcon- São Paulo-SP

<sup>14</sup> PLASCALP®, Plascalp, Feira de Santana-BA

<sup>15</sup> PLASCALP®, Plascalp, Feira de Santana-BA

<sup>16</sup> EDLO®, Edlo, São Paulo-SP

<sup>17</sup> TANOHALO®, Cristália, São Paulo-SP

<sup>18</sup> XYLESTESIN®, Cristália, São Paulo-SP



Figura 2- Imagem fotográfica de olho direito de cão submetido à paracentese de câmara anterior, com a utilização de agulha 13x4,5mm. Agulha 13x4,5mm penetrando em região perilímbica de olho direito (A, B). Penetração da agulha 13x4,5mm em câmara anterior de olho direito (C). Aspecto do bulbo ocular após aspiração de 0,5mL de humor aquoso (D).

### 2.3.3. - ACOMPANHAMENTOS DA RECUPERAÇÃO ANESTÉSICA E AVALIAÇÃO OFTÁLMICA

Imediatamente após a coleta do humor aquoso, instilou-se, em ambos os olhos, uma gota de atropina<sup>19</sup> a 1%, a fim de se evitarem transtornos oculares referentes à paracentese de câmara anterior.

Os animais foram mantidos sob observação e recuperação anestésica e avaliação oftálmica por um período de 6 a 8 horas e, posteriormente, receberam alta cirúrgica.

### 2.3.4. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO HUMOR AQUOSO PELO MÉTODO DE BRADFORD

<sup>19</sup> ALERGAN®, Alcon- São Paulo-SP

As amostras foram submetidas à quantificação protéica pelo método de Bradford (Bradford 1976). Utilizaram-se para preparação da solução reagente de Bradford, álcool etílico (95%)<sup>20</sup>, ácido fosfórico (85%)<sup>21</sup> e comassie blue G<sup>22</sup>.

Prepararam-se microtubos de polipropileno e pipetaram-se 0,1; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 µL de BSA( albumina sérica bovina), na concentração de 1mg/mL, acrescentando-se, respectivamente: 100; 99; 97,5; 95; 92,5; 90; 87,5; 85; 82,5 e 80 µL de água Milique e 1 (um) mL da solução de Bradford anteriormente preparada (tabela 1).

Após dois minutos as soluções foram transferidas para cubetas<sup>23</sup> para posterior leitura em espectrofotômetro<sup>24</sup> a 595 nm, e estabelecimento de suas absorbâncias.

A partir dos valores de absorbância mensurados em triplicata (BRADFORD, 1976), confeccionou-se um gráfico de dispersão no programa Excel® (2003)<sup>25</sup>, obtendo-se um valor de equação da reta que foi utilizada para quantificação das proteínas totais ( Gráfico 1).

Tabela 1- Volume de BSA pipetado para a leitura de espectrofotômetro, para posterior confecção da curva padrão.

---

<sup>20</sup> SYNTH®, LOTE : A 1082.01.BJ

<sup>21</sup> MERK®, lote: 1005737003

<sup>22</sup> COMMASSIE BRILHANT BLUE G, Sigma, lote:RK 0094.

<sup>23</sup> CUBETA® para espectrofotômetro U-2000

<sup>24</sup> HITACHI® U-2000, Hitachi, Tokuo-Japan

<sup>25</sup> Excel®, 2003

BSA (1mg/ml)	Volume de BSA (µl)	H2O Bidestilada (µl)	Reagente De Bradford
1	1	99	1ml
2,5	2,5	97,5	1ml
5	5	95	1ml
7,5	7,5	92,5	1ml
10	10	90	1ml
12,5	12,5	87,5	1ml
15	15	85	1ml
17,5	17,5	82,5	1ml
20	20	80	1ml

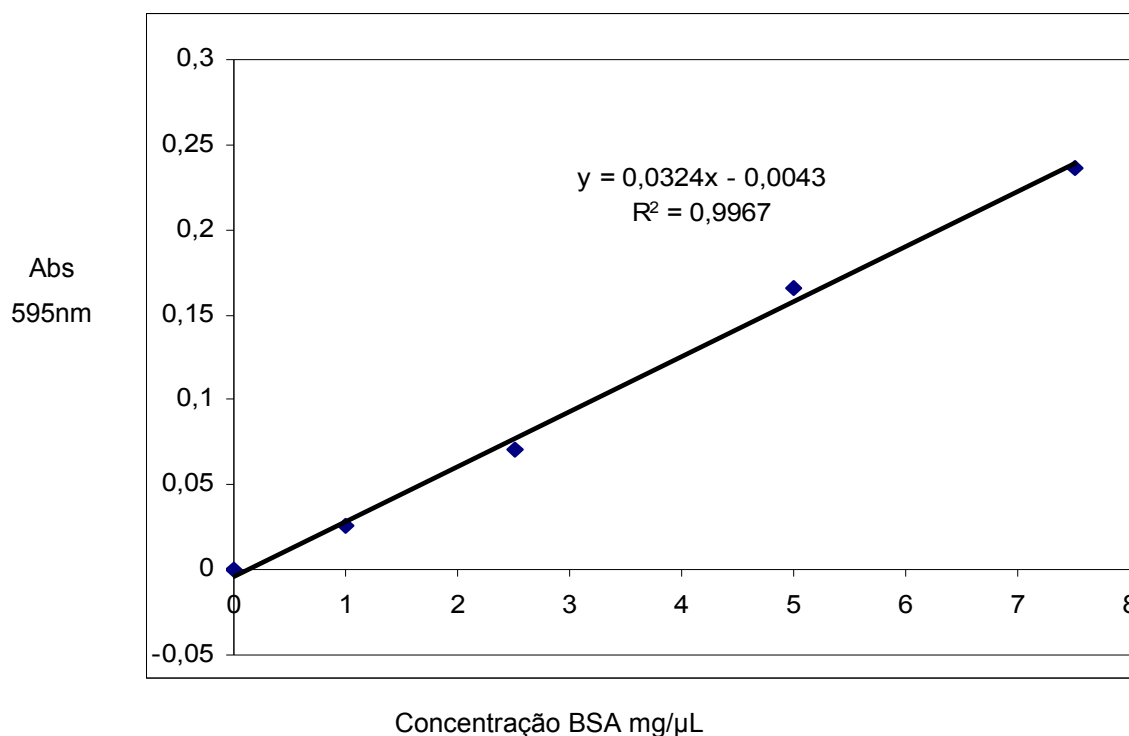
Foram pipetadas 30 µL de cada amostra, adicionada de 70 µL de água bidestilada e 1 mL de reagente de Bradford. Em seguida, as amostras foram transferidas para as cubetas e submetidas à leitura do espectrofotômetro.

Após as leituras, os valores obtidos das absorbâncias foram substituídos na equação da reta da curva padrão ( $y = 0,0324x - 0,0043$ ), fornecendo a quantidade de proteína total presente no humor aquoso (valores expressos em µg/ µL).

GRÁFICO 1 - Gráfico da curva padrão realizado a partir das médias das absorbâncias da leitura de BSA. No eixo X encontramos os valores referentes às



diluições do BSA; no eixo Y os valores encontrados em relação a absorvância de cada diluição.



### 2.3.5. QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO HUMOR AQUOSO PELO MÉTODO SENSIPROT<sup>®</sup>

Para avaliação pelo método de Sensiprot<sup>®</sup> as amostras foram processadas segundo orientação do fabricante para a análise do líquido cefalorraquidiano, para o qual o teste possui indicação - ou seja, imediatamente após a coleta.

Utilizaram-se três tubos de ensaio, um com a amostra, o segundo com o “branco” (água destilada) e o terceiro com a solução padrão. Em cada tubo acrescentou-se 50μL da amostra com água deionizada e 1 mL do reagente de cor vermelho de pirogalol. As misturas foram levadas a banho-maria (37°C) durante cinco minutos. Determinou-se a absorvância do padrão através de analisador bioquímico<sup>26</sup> e a proteína total foi calculada pela divisão da absorvância conforme equação abaixo (tabela 2).

<sup>26</sup> Bioplus 2000-Bioplus, Barueri- SP

$$\text{Proteína (mg/dL)} = \frac{\text{Absorbância do teste}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 50$$

Tabela 2- Fórmula para realização da quantificação das proteínas totais pelo método do Sensiprot®.

	BRANCO	TESTE	PADRÃO
AMOSTRA	-----	50 µl	-----
ÁGUA DEIONIZADA	50 µl	-----	-----
PADRÃO (Nº2)	-----	-----	50 µl
REAGENTE DE COR	1,0mL	1,0mL	1,0mL

### 2.3.6. – CITOLOGIA

Realizou-se citologia mediante a confecção de lâmina direta e coloração de Panóptico<sup>27</sup>.

Para a realização do esfregaço, o humor aquoso foi centrifugado e aplicado sobre uma lâmina devidamente limpa e desengordurada, para posterior visualização.

Após a preparação das lâminas, as mesmas foram coradas com o Panóptico (Instant Prov®), seguindo as recomendações do fabricante. Ato contínuo à coloração, as lâminas foram examinadas em microscopia óptica com a utilização de óleo de imersão.

<sup>27</sup> Instant Prov®- Newprov.

## 2.3.7- SOLUÇÕES E REAGENTES PARA ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

### 2.3.7.1- Reagentes:

#### Reagentes:

- Acrilamida
- Bis-Acrilamida
- Tris
- SDS
- TEMED
- Persulfato de amônio
- 2-mercaptoetanol
- Glicerol
- Bromofenol Blue
- Glicina
- Ácido Clorídrico(HCL)
- Ditioneitol(DTT)

### 2.3.7.2- Soluções de Estoque

#### SOLUÇÃO DE ESTOQUE 1

- 2 M Tris-HCl (pH8.8), 100ml
  - a. 24,2g Tris Base
  - b. Adicione 50 mL de água destilada
  - c. Adicione HCl lentamente até o pH atingir 8.8
  - d. Adicione água destilada para completar o volume final de 100mL.

SOLUÇÃO DE ESTOQUE 2	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 M Tris-HCl (pH6.8), 100mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>e. 12,1g Tris Base</li> <li>f. Adicione 50 mL de água destilada</li> <li>g. Adicione HCl lentamente até o pH atingir 8.8 (aproximadamente 8mL)</li> <li>h. Adicione água destilada para completar o volume final de 100mL</li> </ul>
SOLUÇÃO DE ESTOQUE 3	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10% SDS (w/v), 100mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>i. 10g SDS</li> <li>j. Adicione água destilada para completar o volume final de 100mL</li> </ul>
SOLUÇÃO DE ESTOQUE 4	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 50% glicerol (v/v), 100mL</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>k. 50mL de glicerol</li> <li>l. 50mL de água destilada</li> </ul>
SOLUÇÃO DE ESTOQUE 5	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>1 % Bromofenol Blue</b></li> <li>• <b>100 mg de bromofenol blue</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adicione água destilada para completar o volume final de 100mL e realize a filtração do conteúdo</li> </ul>
SOLUÇÃO DE TRABALHO A	
<p>Solução A</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>a. 30% de acrilamida</li> <li>b. 0,8% de Bis-acrilamida</li> </ul> <p>Dissolver, em 100mL de água bidestilada, 29,2g de acrilamida e 0,8g de bis-acrilamida.</p> <p>A acrilamida é irritante à pele e possui ação neurotóxica.</p>	

SOLUÇÃO DE TRABALHO B	
2.3.7.2.2-	Solução B
c.	75 mL 2 M Tris- Hcl (pH8.8) _____ 1,5 M
d.	4mL de SDS 10 %
e.	21mL de água
SOLUÇÃO DE TRABALHO C	
Solução C	
f.	50mL 1M Tris Hcl ( pH6.8) _____ 0,5M
g.	4mL de SDS 10% _____ 0,4%
h.	46mL de água
SOLUÇÃO DE PERSULFATO DE AMÔNIA	
Persulfato de amônia 10%, 5mL	
i.	0,5 g de persulfato de amônio dissolvido em 5mL de água
SOLUÇÃO DE TAMPÃO DE ELETROFORESE	
Tampão de Eletroforese, 1litro	
k.	3g de Tris
l.	14,4 g glicina
Água para completar um litro	
Pode- se fazer um solução de estoque 10X	
SOLUÇÃO TAMPÃO DE AMOSTRA 5X	
5x Tampão de Amostra	
	0,6ml 1M Tris-Hcl (pH6.8) _____ 60mM
	5mL 50% de Glicerol _____ 25%
	2mL de SDS a 10% _____ 2%
	0,5mL de 2- mercaptoetanol _____ 14,4mM
	1mL 1% bromofenol blue _____ 0,1%
	0,9mL de Água

### 2.3-8 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA:

As amostras foram submetidas à eletroforese, conforme descrito por BOLLAG *et al.* (1996), iniciando-se pela fabricação do gel de acrilamida, composto por duas porções, uma separadora e outra concentradora.

O gel de separação (12%) das amostras (acrilamida/ bisacrilamida na proporção de 30:0,8) foi preparado com 5,250 mL de água de Bidestilada, 3,75 mL de solução tampão B (Tris HCl 1 M pH8,8), 6 mL de acrilamida, 75 µL de persulfato de sódio 10% e 15 µL de TEMED.

O gel de concentração das amostras foi aplicado sobre as placas trinta minutos após a aplicação do gel separador e foi preparado por 2,30 mL de água de Bidestilada, 1 mL de solução tampão C (0,5M Tris Hcl pH 6,8), 0,67 mL de acrilamida, 30 µL de persulfato de amônio e 5 µL de TEMED.

Após polimerização do gel, as amostras foram preparadas para posterior aplicação no mesmo. A preparação das amostras foi realizada a partir da adição de 10 µL da amostra do humor aquoso (KUCHLE, 1993), acrescido com 2 µL do tampão 5x e 3 µL de água Bidestilada, totalizando 15µL, e centrifugação a 10.000 rpm por 15 segundos. As amostras foram aquecidas a 94°C por 10 minutos e novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 15 segundos para abaixar as gotículas condensadas, sendo aplicadas no gel.

A aplicação no gel foi padronizada da esquerda para direita; no primeiro poço colocou-se o marcador de massa molecular<sup>28</sup> conhecido, em segundo poço aplicação de BSA e, seguidamente, as amostras de olho direito e olho esquerdo de cada animal (figura 2).

Realizou-se eletroforese sob voltagem constante de 100 v até que as amostras atingissem o gel concentrador, e então mantido a 120 v no gel separador por aproximadamente duas horas. Após a eletroforese, os géis foram armazenados em solução fixadora (100 mL de metanol, 100 mL de ácido acético glacial e 800 mL de água bidestilada).

---

<sup>28</sup> Benchmark Pré-Stained- Protein Labber

Tabela 3 – Volumes de Soluções utilizadas para a confecção de gel separador e gel Concentrador.

GEL SEPARADOR	VOLUMES	GEL CONCENTRADOR	VOLUMES
SOLUÇÃO A	6 mL	SOLUÇÃO A	0,67 mL
SOLUÇÃO B	3,75mL	SOLUÇÃO B	1,0 mL
SDS 10 %	150µL	SDS 10 %	40 µL
H <sub>2</sub> O	5,1mL	H <sub>2</sub> O	2,260mL
PERSULFATO DE AMÔNIO	120 µL	PERSULFATO DE AMÔNIO	60 µL
TEMED	15 µL	TEMED	5 µL

Os géis foram submetidos à coloração por nitrato de prata (BOLLOG *et al.* 1996). Para coloração com prata os géis foram imersos e mantidos na solução fixadora por uma hora. Decorrido esse período foram retirados da solução, acrescidos de 50 mL de etanol 50% e mantidos no agitador por 10 minutos. Após este momento a solução de etanol foi substituída por uma solução sensibilizadora (tiosulfato de sódio 20 mg/100mL), permanecendo o gel imerso nesta solução por 2 minutos. Seguiu-se uma breve lavagem em água destilada (três vezes, por 20 segundos) e imersão do gel em 50 mL de solução de nitrato de prata acrescida de 75 µL de formaldeído. O gel imerso foi levado ao agitador por 15 minutos e submetido à rinsagem, conforme descrito anteriormente. Finalmente, foi submetido à solução reveladora (50 mL de carbonato de sódio 6%, 2 mL de solução sensibilizadora e 50 µL de formaldeído) até o aparecimento das bandas protéicas. A solução reveladora foi então substituída por solução de parada para posterior análise do gel por densitometria.

Tabela 4 – Protocolo utilizado para coloração à base de Nitrato de Prata .

Solução sensibilizadora é formada por tiosulfato de sódio 20mg/mL  
Solução reveladora é formada por 100mL de carbonato de sódio 6 %, 2mL de solução sensibilizadora e 50µl de formaldeído.

SOLUÇÃO CORANTE	TEMPO
50 MI de Solução Fixadora	1 hora
50mL Etanol 50%	10 minutos agitador
50 mL Solução Sensibilizadora	1 minuto
Lavar com água destilada	3x de 20 segundos
50mL de Solução de Nitrato de Prata	15 minutos no agitador
Lavar com água destilada	3x de 20 segundos
50MI de Solução Reveladora	Até aparecer as bandas
Lavar com água destilada	3x de 20 segundos
Solução de Parada	Armazenagem



## 2.4 – DENSITOMETRIA

Os géis corados em prata foram fotografados por meio foto documentador ®<sup>29</sup> e as bandas de proteína foram posteriormente avaliadas pelo software ImageQuant 5.2.

## 2.5 – ANÁLISE ESTADÍSTICAS

Procedeu-se a análise dos dados pelo software GraphPad Prism 4, apresentados em torno dos valores médios. Os resultados foram analisados estatisticamente mediante o teste one-way análise de variância (ANOVA), pelo teste de Tukey's, teste de comparação múltipla e teste T student. Os valores de P menores que 0.05 ( $p < 0.05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

## RESULTADOS

### 2.6.1 RESULTADO DA AVALIAÇÃO OFTÁLMICA

Os animais não apresentaram alterações oculares por ocasião da avaliação oftálmica realizada.

### 2.6.2 RESULTADO DA AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA E BIOQUÍMICA SÉRICA

Os valores referentes ao hemograma e a bioquímica sérica estão elencados na tabela 5 e são condizentes com valores considerados normais

---

<sup>29</sup> Filber Lourmat

Tabela 5 – Valores normais, médias e desvios-padrão de constituintes hematológicos e do soro sanguíneo de cães (n=23 animais)

<b>Parâmetros</b>	<b>N</b>	<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>Média ± Desvio Padrão</b>	<b>Valores Normais (a)</b>
Hemácias (x10 <sup>6</sup> / L)		6,14±0,78		5,5 - 8,5
Hemoglobina (g/dL)		12,61±1,71		12 – 18
Volume globular (%)		35,32±4,85		37 – 55
VCM (fI)		57,7±6,17		66 – 77
CHCM (g/Dl)		35,58±0,8		
Leucócitos (x10 <sup>3</sup> / L)		11,25±4,04		6 – 18
Bastonetes (x10 <sup>3</sup> / L)				
Segmentados (x10 <sup>3</sup> / L)		7,36±2,87		
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> / L)		2,16±2,27		
Monócitos (x10 <sup>3</sup> / L)		0,56±0,38		
Eosinófilos (x10 <sup>3</sup> / L)		1,16±1,10		
Basófilos (x10 <sup>3</sup> / L)				
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> )		324±123		> 150
Creatinina (mg/dL)		0,90±0,19	0,98±0,28	0,5 - 1,5
Uréia (mg/dL)		29,08±7,94	32,51±17,30	15 – 65
PPT (mg/dL)		6,92±0,68	7,33±1,22 *	5,8 - 7,9
ALT (U/L)		34,56± 8,72	43,05±15,64	10 – 88
ALP (U/L)		27,56±12,17	56,93±29,32	20 – 150

ALT (U/L) alanina aminotransferase

AST (U/L) aspartato aminotransferase

ALP (U/L) fosfatase alcalina

GGT (U/L) gama glutamiltransferase

PT (mg/dL) Proteínas totais

(a) Fonte: Kaneko *et al.*, 1997; Thrall, 2007

### 2.6.3-RESULTADOS DA AVALIAÇÃO PROTÉICA DO HUMOR AQUOSO

Os valores protéicos médios obtidos pelo método de Bradford foram de 33,88 mg/dL e 36,82 mg/dL, com erro padrão de  $\pm 2,55$ . Mediante análise com o método Sensiprot®, os resultados médios obtidos foram 9,04 mg/dL e 7,56 mg/dL para o olho direito (OD) e olho esquerdo (OE), respectivamente, e erro padrão de  $\pm 1,28$  olho direito e  $\pm 0,84$  olho esquerdo. Não foi observada diferença estatística entre os valores protéicos obtidos dos olhos direitos, comparativamente àqueles dos olhos esquerdos, em ambos os testes analisados individualmente (gráfico 2).

Quando os valores encontrados pelos dois testes foram confrontados, observaram-se diferenças estatísticas significativas entre os métodos de Bradford e o Sensiprot®, quando avaliados ODB (olho direito Bradford) x ODS (olho direito pelo Sensiprot®) e OEB (olho esquerdo Bradford) x OES (olho esquerdo pelo Sensiprot®) e quando comparado OD x OES e OE x ODS, com valores de  $p < 0.0001$ , apresentados no gráfico 2.

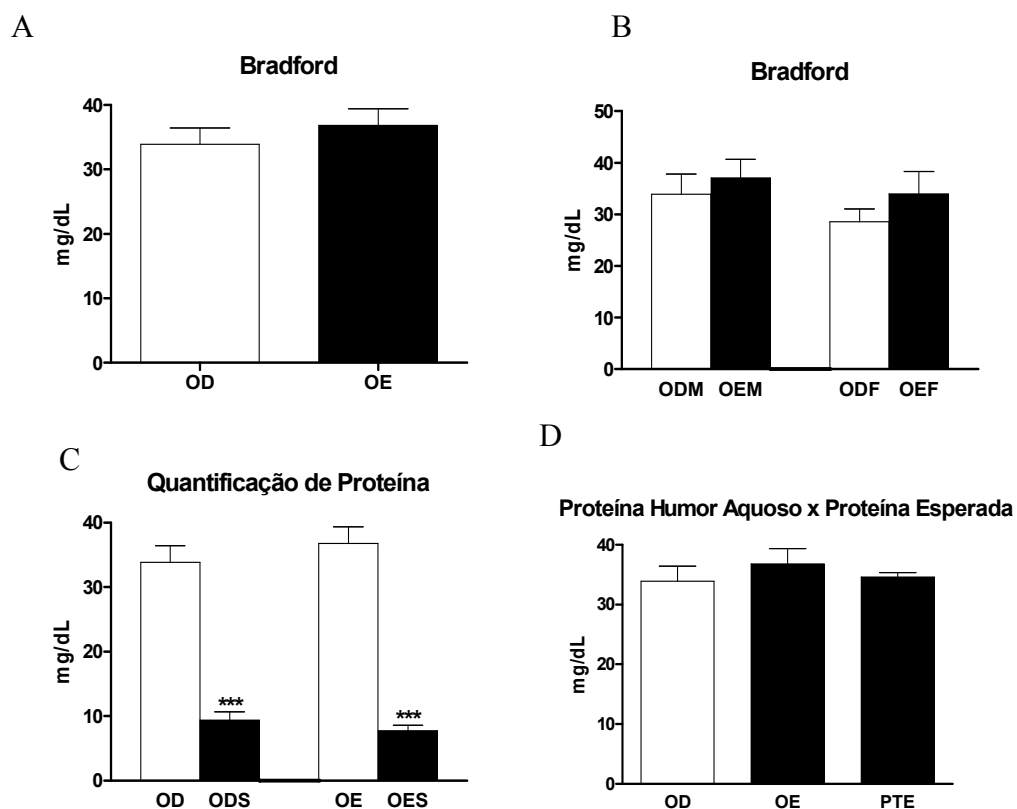


Gráfico 2 – A. Quantidade de proteína total do olho direito e olho esquerdo pelo método de Bradford. B. Comparação entre os valores de proteína total, entre os olhos de machos (ODM e OEM) e fêmeas (ODF e OEF). C. Comparação entre os valores de proteína total pelo método de Bradford e método Sensiprot® (\*\*\*) estatisticamente significativo  $p < 0,0001$ ). D. Valores de Proteínas médios encontrados em comparação com o valor esperado de acordo com a proteína plasmática total.

Os valores das proteínas totais do humor aquoso dos dois olhos dos 23 animais, fornecidos pelo método de Bradford e pelo Sensiprot®, foram comparados com os valores de proteína plasmática total (PPT). As médias obtidas pelo método de Bradford apresentaram valor médio de 0,50% do valor das proteínas sanguíneas totais, e aquelas obtidas pelo método do Sensiprot® o valor médio encontrado foi de 0,11%.

Observou-se, ainda, uma correlação positiva entre os valores da PPT e os valores protéicos do humor aquoso obtidos mediante análise pelo método de Bradford; ou seja, quando há um aumento da PPT seguiu-se um aumento da proteína do humor aquoso, como evidenciado nos animais 19 e 20 (tabela 6). Essa correlação não foi observada pelo método do Sensiprot® (Tabela 6).

Tabela 6 – Valor da porcentagem de proteína no aquoso em relação ao valor da proteína plasmática, demonstrando a relação positiva entre o aumento da proteína plasmática e a proteína no aquoso.

<b>ANIMAL</b>	Proteína Sg. Total em mg/dL	Percentual de proteína do aquoso em relação a proteína plasmática (%)
<b>1 OD M</b>	6200	0,58
<b>1 OE M</b>	6200	0,60
<b>2 OD F</b>	7000	0,58
<b>2 OE F</b>	7000	0,56
<b>18 OE F</b>	7200	0,71
<b>20 OD M</b>	8800	0,73
<b>20 OE M</b>	8800	0,73
<b>MÉDIA</b>	6900	0,50

A eletroforese e a coloração em prata permitiram a visualização de seis bandas protéicas principais. Alguns animais apresentaram bandas complementares

a essas, de forma aleatória. As bandas foram denominadas PI, PII, PIII, PIV, PV, PVI, PVII, PVIII, PIX, PX para melhor visualização e entendimento (Figura 3).

Através da densitometria calculou-se a quantidade de  $\mu\text{g}$  de cada amostra a partir do seu volume fornecido pelo programa ImageQuant 5.2, usando como referência o valor previamente conhecido do BSA adicionado ao gel.

Mediante o valor do marcador de massa molecular (190-15 Kda) e do conhecimento prévio da massa molecular do BSA (66 Kda), inferiu-se que as massas moleculares das proteínas presentes no humor aquoso de cães clinicamente saudáveis situam-se entre 120 e 25 Kda (figura 4).

Tabela 7 – Proteínas presentes no humor aquoso de cães clinicamente sadios, com seu tamanho em Kda aproximado associada a concentração de cada proteína em  $\mu\text{g}/\text{dL}$  de OD, OE.

Proteínas no Humor Aquoso	Massa Molecular (Kda)	OD: média e desvio padrão	OE: média e desvio padrão
Banda PI	<120 kda>85	1,65 $\pm$ 0,43 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1,66 $\pm$ 0,65 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PII	>80Kda<120	1,87 $\pm$ 0,49 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1,90 $\pm$ 0,61 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PIII	66 Kda	2,12 $\pm$ 0,67 $\mu\text{g}/\text{dL}$	2,24 $\pm$ 0,67 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PIV	>60Kda<66	1,44 $\pm$ 0,62 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1,53 $\pm$ 0,63 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PV	>60Kda<66	1,65 $\pm$ 0,63 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1,70 $\pm$ 0,53 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PVI	>50Kda< 60	1,55 $\pm$ 0,89 $\mu\text{g}/\text{dL}$	1,80 $\pm$ 1,18 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PVII	>40 Kda < 50	2,59 $\pm$ 0,89 $\mu\text{g}/\text{dL}$	3,18 $\pm$ 1,58 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PVIII	>40 Kda < 50	3,60 $\pm$ 0,48 $\mu\text{g}/\text{dL}$	2,92
Banda PIX	>40 Kda < 50	4,11 $\mu\text{g}/\text{dL}$	4,56 $\mu\text{g}/\text{dL}$
Banda PX	>30 Kda < 40	3,37 $\mu\text{g}/\text{dL}$	3,39 $\mu\text{g}/\text{dL}$

Conforme os dados observados na tabela 7, vale ressaltar que a proteína denominada PIII foi evidenciada em todas as amostras (Figura 4) e seu massa molecular é de aproximadamente 66 Kda, valor esse referente à albumina bovina,

que em cães apresenta valor semelhante (ALLERTON, et. al., 1962). A albumina apresentou maior concentração em relação às outras cinco proteínas presentes como proteínas padrões, com  $2,12 \pm 0,67\mu\text{g/dL OD}$  e  $2,24 \pm 0,67\mu\text{g/dL OE}$ . As proteínas PVIII, PIX e X estão presentes em apenas uma amostra, no animal 2 (Figura 5).

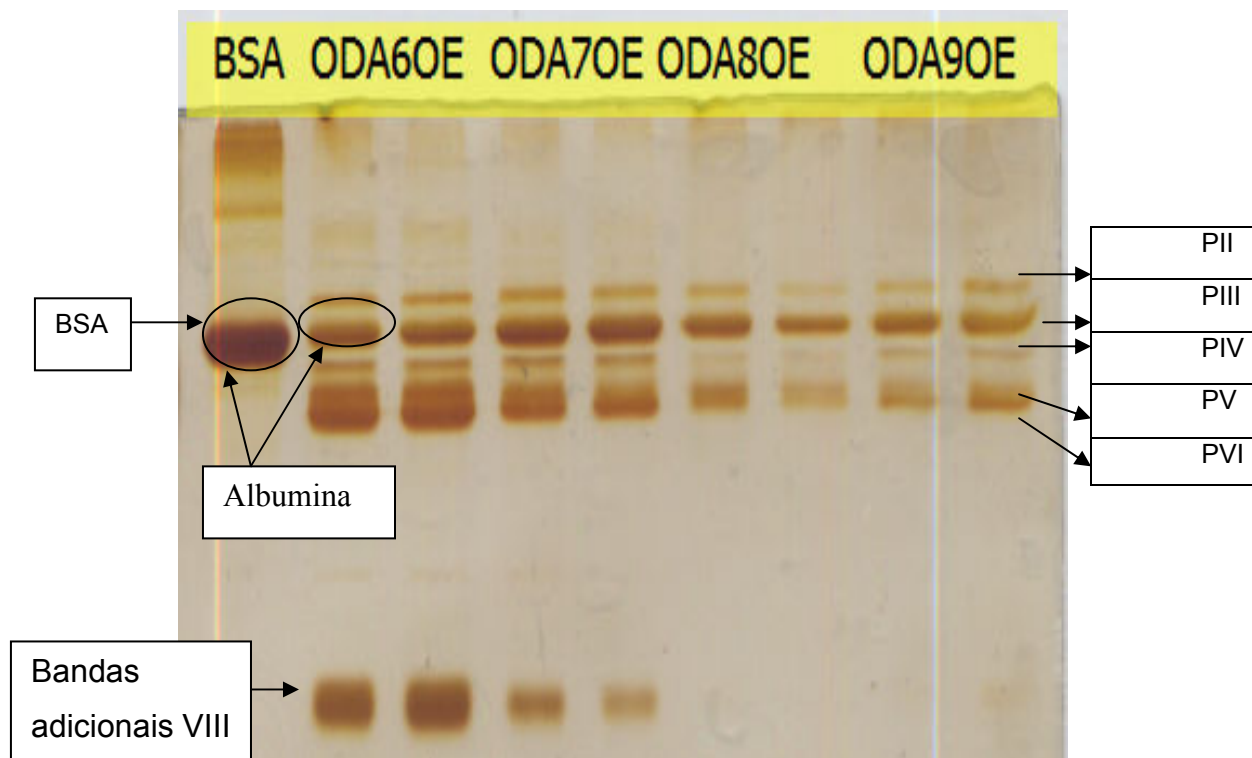


FIGURA 3 - Eletroforese em gel SDS-PAGE, corado em prata, evidenciando-se as seis bandas de proteínas presentes no Humor aquoso.

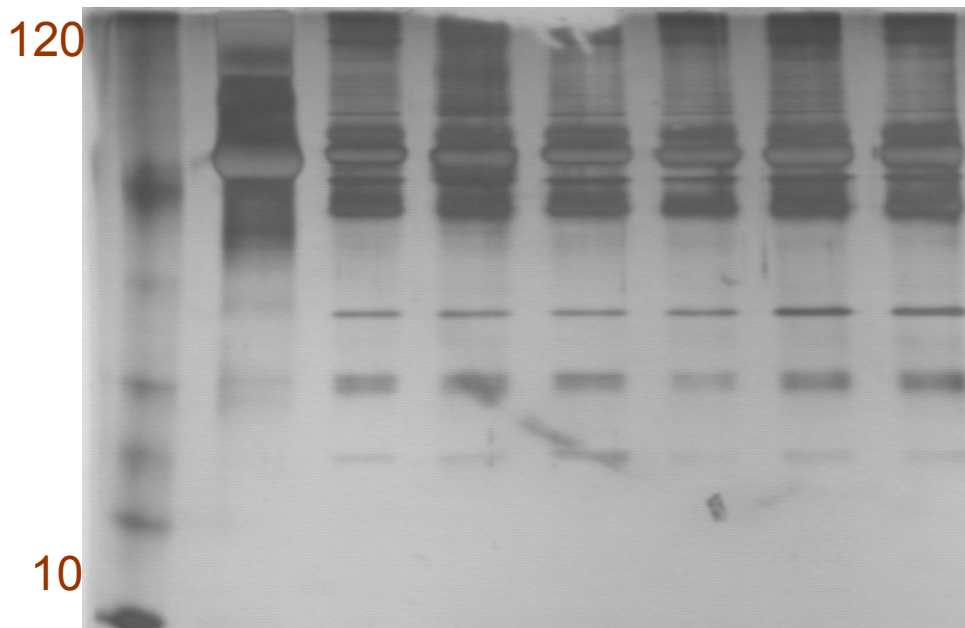


FIGURA 4- Eletroforese em gel SDS-PAGE, corado em prata, visualizado pelo foto documentador através programa Imagequant 5.2. Observa – se a localização das proteínas em relação ao marcador de massa molecular, fornecendo a amplitude da massa molecular das proteínas presentes no humor aquoso de cães hígdos.

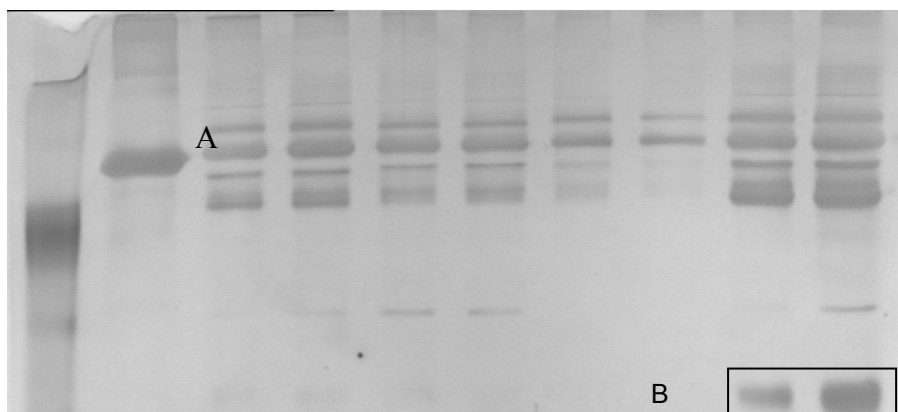


FIGURA 5- Eletroforese em gel SDS-PAGE, corado em prata, visualizado pelo foto documentador através programa Imagequant 5.2. A) Presença das seis bandas principais, demonstrando a diferença de contraste entre elas determinada pela sua concentração. B) Visualização da banda X no animal de número 2.

MM - marcador de massa molecular; BSA- Albumina de soro bovino; OD- olho direito; OE – olho esquerdo.

## DISCUSSÃO

A motivação deste estudo foi estabelecer o perfil protéico do humor aquoso por meio de um método que permitisse a repetibilidade, a fim de que os mesmos passos sejam seguidos *a posteriori*, quando se pretende analisar este fluido em cães que apresentem alterações oculares. Deparando-se com pequenas variações ou mesmo omissões na descrição do método de Bradford, sabidamente sensível ao escopo deste trabalho, preconizou-se detalhar o processo. Ainda, tendo disponível o método Sensiprot para análise de proteínas do líquor, fluido igualmente proveniente de um sítio de privilégio imunológico (GAMA, 2005), e de praticidade clínica, pretendeu-se avaliar sua sensibilidade às proteínas do aquoso.

A coleta das amostras foi realizada mediante paracentese de câmara anterior, seguido o protocolo descrito por Galera (2002). A paracentese de câmara anterior pode ser utilizada para coleta do aquoso sem provocar alterações significativas nas barreiras oculares (OKISAKA, 1976), ou ainda como modelo experimental induzindo inflamações intra-oculares (GALERA, 2002). Por via intravenosa administrou-se, em dose única, anestésico barbitúrico, tiopental sódico<sup>30</sup> (dose: 12,5mg/Kg) (FANTONNI *et al.*, 2002; GALERA, 2002). A opção pela utilização do tiopental sódico a outro anestésico geral decorreu do resultado de menor variação da pressão intra - ocular provocado por esse fármaco quando comparado, por exemplo, com o propofol, que promove um aumento da pressão intra-ocular de até 26%, como descrito por HOFMEISTER *et al.* (2008). Optou-se nesse estudo pela coleta de um volume alto de aquoso (em torno de 0,5mL de amostra) por olho, uma vez que não se tinha conhecimento prévio da alíquota precisa para padronização do estudo. Apesar do grande volume removido, o máximo descrito em literatura (GALERA, 2002; RIBEIRO, 2007), não se observou transtornos oculares provenientes da coleta, conforme descrito por Blogg e Coles (1971) e Regnier e *et al.*, 1984, quanto a influência do volume sobre os níveis protéicos. A paracentese de câmara anterior é tida como um procedimento invasivo e utilizado como modelo experimental de aquoso plasmóide (GALERA, 2002). A partir dessa padronização, o volume a ser

---

<sup>30</sup> THIOPENTAX, Cristália, São Paulo- SP



aspirado se torna baixo, minimizando a invasão do processo de coleta, podendo ser aplicado em animais com alterações oculares sem a intensificação direta do processo inflamatório.

Inicialmente estabeleceram-se os valores protéicos do humor aquoso, cujas médias obtidas foram de 33,88 mg/dL olho direito com amplitude de 16,14 - 54,72 e 36,82 mg/dL olho esquerdo com amplitude de 15,52 - 53,79. Os valores encontrados divergem dos valores médios descritos por Brito *et al.* (2006) (25,86mg/dL) e dos valores referidos por Galera (2002) (15,98 e 11,46 para olhos direito e esquerdo, respectivamente) e Ribeiro (2007) e 10,25 sem diferenciação entre o olho direito e esquerdo, todos obtidos pelo método de Bradford. Entretanto, são valores semelhantes aos encontrados por Hazel *et al.* (1985), que apresentaram amplitude de 21 - 65 mg/dL, mediante o método de fenol.

Diferenças quanto aos resultados obtidos podem ser justificadas pela variação metodológica empregada, ou seja, há um padrão metodológico para preparação da solução de Bradford, porém não existe uma padronização para o processamento das amostras, já que o volume empregado das amostras pode interferir com a quantidade e perfil protéico encontrado (GRUS *et al.*,2007). Galera (2002) refere a centrifugação das amostras antes da realização da curva padrão pelo método de Bradford. Ribeiro (2007), além da centrifugação, preconiza a diluição das amostras em 1:5 e 1:10. Alguns autores optam pela centrifugação e ou diluição do aquoso antes da sua quantificação a fim de concentrar as proteínas presentes nesse fluido. Esses processos podem implicar também na quebra e na perda de algumas proteínas, resultando em valores protéicos inferiores (BOLLAG, 1996). Como não há na literatura consenso entre a centrifugação ou não das amostras, optou-se, neste estudo, por não fazê-la. Outro fator referente à confiabilidade dos dados é relacionado à curva padrão e o seu  $r^2$  (superior a 0,96), o que demonstra a linearidade da curva. Esses valores não foram apresentados pelos autores supra mencionados. Em nosso estudo realizou-se a confecção da curva padrão em triplicata, objetivando-se maior confiabilidade de resultados, e o  $r^2$  da curva obtido foi de 0,99.

Em cães saudáveis os níveis protéicos no aquoso situam-se ao redor de 37,4 mg/dL, com amplitude entre 21-65 mg/dL (HAZEL *et al.*,1985). Brito *et al.* (2006) referem como média valores de 25,86 mg/dL, e Coolins & Moore (1991), 37,4 mg/100mL. Slatter (2005) e Townsend (2008) relacionam o valor das proteínas do

humor aquoso a 0,5% do valor das proteínas plasmáticas totais. Grus *et al.* (2007), em trabalhos realizados em seres humanos, referem valores de 0,20-0,50 mg/mL em relação aos valores do plasma sanguíneo.

Os dados obtidos pelo método do Bradford situam-se dentro dos padrões referidos por Hazel *et al.* (1985), que quantificaram a proteína total do aquoso pelo método de fenol.

A média dos valores protéicos encontrados representou o valor de 0,5% em relação à proteína plasmática total, coadunando com a literatura (SLATTER, 2005; GRUS, *et al.*, 2007; TOWNSEND, 2008), correlação que credencia os resultados encontrados. A mesma proporção não foi observada pelo método de Sensiprot®, cujos valores representaram 0,11% dos valores médios referentes à proteína plasmática total. O Sensiprot® é um método descrito por grande sensibilidade para albuminas e globulinas, o que nos faz inferir que apenas essas frações presentes no aquoso tenham sido captadas.

Observou-se, ainda, uma correlação positiva entre as proteínas do humor aquoso e as proteínas plasmáticas. Mediante aumento ou decréscimo das primeiras, o mesmo foi verificado no plasma, pelo método de Bradford. Esse fato não foi apresentado pelo método do Sensiprot®.

Descrevem-se a albumina (66 Kda), globulinas e a transferrina (80 Kda) como proteínas presentes no humor aquoso em humanos (GRUS *et al.*, 2007). Dentre as proteínas isoladas a partir do gel de eletroforese SDS-PAGE, marcador de massa molecular e mediante a comparação com a amostra de albumina bovina utilizada, pode-se confirmar a presença dessa proteína em todas as amostras testadas, definida como PIII. Proteínas plasmáticas são descritas e possuem massa molecular determinados, podendo as mesmas estar presentes no humor aquoso de cães, como as ceruloplasmina (115Kda), transferrina (80Kda), albumina (66 Kda), imunoglobulina G (55 Kda), haptoglobina (45Kda) (RIBEIRO, 2007), glicoproteína alfa-1 (42 Kda) (YUKI, 2008), a anidrase carbônica (30Kda), alfa-lactalbumina (14,4Kda), fosforilase B (94Kda) (KUCHLE *et al.*, 1993). Entretanto, faz-se necessário o seqüenciamento dessas proteínas para que se possa afirmar qual delas se faz presente no aquoso de cães hípidos e quais se apresentam aumentadas ou estão relacionadas a determinadas afecções oculares. É o que se observa, por exemplo, nos casos de glaucoma, com aumento das metaloproteinases (WEINSTEIN *et al.*, 2007). Ainda, a identificação de proteínas específicas a raças

predispostas a afecções oculares e que proporcionem um diagnóstico precoce, é um desafio que se impõe.

A eletroforese por SDS-PAGE é um método amplamente empregado para avaliação do perfil protéico, podendo ser utilizado para avaliação do humor aquoso (KUCHLE et. al., 1993; DUAN et.al., 2008). Ela fornece a separação das proteínas através da sua massa molecular. A porcentagem utilizada do gel deve ser diretamente proporcional à separação molecular obtida, captando proteínas com massa molecular de 10 a 74 Kda (BOLLAG, 1996). A massa molecular das amostras apresentou amplitude de 40 a 120 Kda, mas não podemos afirmar a massa molecular de cada banda protéica, apenas estimar os valores por comparação àqueles já descritos, pela utilização do marcador de massa molecular. As proteínas anteriormente citadas se enquadram no padrão protéico encontrado, mas o devido seqüenciamento das cadeias de aminoácidos e a utilização de gel de acrilamida bidimensional são necessários.

A proteína PI, cujo tamanho encontra-se entre 85-120 Kda, tem massa compatível com a  $\beta$ -galactamase (116kDa). A proteína PII apresenta tamanho aproximado entre 80 e 120 Kda, compatível com fosforilase (97kDa) e com a transferrina (80kDa) ( RIBEIRO, 2007). A transferrina atua de forma indireta, juntamente com outras proteínas, na manutenção da pressão intra-ocular (TRIPATHI et. al., 1992). A proteína denominada P III, verificada em todas as amostras e com massa molecular de 66 Kda, tem valor referente à albumina (ALLERTON et. al., 1962; ROHDE *et al.*, 1998). A proteína PIV apresenta massa molecular entre 60 e 66KDa, e a PV entre 60 e 66 kDa, ambas compatíveis com a miocilina, cuja massa situa-se entre 55 a 65kDa e é referida presente em olhos humanos, de macacos e de bovinos pelo SDS-PAGE (RUSSEL *et al.*, 2001). A proteína PVI apresenta valores compatíveis com a desidrogenase (55Kda) ou imunoglobulina G (55 Kda). A proteína PVIII apresenta tamanho aproximado maior que 40Kda e menor que 50Kda compatível com haptoglobina (45Kda) (RIBEIRO, 2007) e glicoproteína alfa-1 (42 Kda) (YUKI, 2008). A proteína PIX com massa molecular entre 30 e 40 KDa pode se tratar da anidrase carbônica.

As bandas adicionais presentes em alguns animais foram avaliadas isoladamente; preparou-se novo gel para aplicação de amostras com a presença das mesmas. Observou-se, através da mensuração da massa molecular das amostras, que as que apresentavam bandas adicionais possuíam concentração

maior. Na realização do novo gel aplicaram-se alíquotas das amostras de forma proporcional à sua quantidade de proteína total pelo método de Bradford. Os resultados demonstraram o aparecimento de bandas anteriormente não visualizadas, o que é justificado pelo ajuste dos volumes das amostras aplicadas, ou seja, a presença dessas bandas não caracterizou uma proteína de expressão individual ou ainda relacionada a alguma afecção ocular. Esse é um dado importante quando se deseja estudar afecções oculares. O diferencial quanto ao volume de proteína total e o aparecimento de uma banda específica podem estar relacionados ao volume aplicado e não necessariamente a uma doença ocular ou sistêmica.

Outro fator importante para realização da densitometria é a escolha da coloração a ser empregada. Neste trabalho optou-se pela coloração de nitrato de prata, devido a sua maior sensibilidade quando comparada à coloração de Comassie blue (CARVALHO *et al.*, 2005; CHIEFFI; MINUCCI, 2004). A coloração empregada possibilitou a visualização e quantificação das proteínas presentes no aquoso de forma nítida.

## CONCLUSÃO

Nas condições em que foi realizado este estudo pode-se concluir que:

- o método de Bradford é um método reprodutível e confiável para quantificação da proteína total do humor aquoso, levando em consideração a curva padrão e a metodologia utilizada;
- o método do Sensiprot®, apesar da facilidade e rapidez de execução, não se apresentou adequado na análise deste fluido, quanto a sua confiabilidade.
- evidenciou-se correlação positiva entre alterações dos níveis de concentração de proteínas do humor aquoso com proteínas plasmáticas;
- o humor aquoso de olhos de cães clinicamente sadios é acelular;
- propõe-se o estudo das proteínas do humor aquoso de cães clinicamente saudáveis a partir de gel bidimensional, bem como o

seqüenciamento das mesmas, para que sejam estabelecidos padrões de referência para tais proteínas.

- o volume de amostra aplicado e a concentração das proteínas devem ser levados em consideração na análise das bandas protéicas.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALLERTON, S. E., ELWYN, D., EDSALL, J. T., SPAHR, P.F. Isolation and amino acid composition of dog plasma albumin. **The Journal of Biological Chemistry**.v.237,n1,1962.
- BLOGG, J.R., COLES, E.H. Clinicopathological aspects of canine aqueous humor proteins. **Res. Vet. Sci**, v12, p. 95 – 98, 1971.
- BLOUIN, P. Uveitis in the dogs and cat: causes, diagnosis and treatment. **Can Vet J**. v.25,p. 315-323, 1984.
- BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M.D. In: BOLLAG, D. M., ROZYCKI, M.D. **Protein Methods**., 2ed. Editora:Wile-York, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**.1976, 72: 248-254.
- BRITO, F. L. C.; ALVES, L. C.; MAIS F. C. L.; SANTOS, E.S.C; LAUS, I. M. J. Ocular alterations in dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. In: **Veterinary medicine**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. V.58, n.5, out, 2006.
- BROOKS, D. E. Glaucoma In: HERRERA, D. **Oftalmologia Clínica em Animais de Companhia**. 1ed. - São Paulo: Med vet ,2008.cap.: 11; p.195-197.
- CAPRIOLI, J. The ciliary epithelia and aqueous humor. In: HART JR., W.M. **Adler's physiology of the eye – Clinical application**. 9° ed. S<sup>t</sup> Louis: Mosby. 1992. ch.7.p.228-247.
- CHIEFFI, P., MINUCCI, S. Environmental influence on testicular MAP kinase (ERK1) activity in the frog *Rana esculenta*. **The Journal of experimental Biology**. v.207, p. 2209-2213, 2004.
- COLLINS, B. K., MOORE, C. P. Diseases and surgery of the canine anterior úvea. In: Gellat, K. N. **Veterinary ophthalmology**.3<sup>a</sup>ed.Baltimore: Lippinoot Willians e Wilkins, 1999; 755-795.
- DUAN, X.; LU Q., XUE P., ZHANG, H., DONG.Z., YANG, F., WANG, N. Proteomic analysis of aqueous humor from patientys with myopia. **Molecular Vision** 2008, 14:370-377.

- FANTONI, D. T., CORTOPASSI, S. R. G., BERNARDI, M. M. Anestésicos intravenosos e outros parenterais. In: SPINOSA, H. S., GORNIÁK, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 3ed. Rio de Janeiro: Guanabara, Koogan, 2002, cap.:11, p. 117-128.
- FOSSUM, T. W., Cirurgia do sistema reprodutível e genital. In: Fossum, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. Editora Roca, São Paulo, 2005, cap.28.
- GALERA, P. D. **Estudo do Flunixin Meglumine (Banamine ®) após aplicação subconjuntival, em cães. 2002. 57f.** Tese (Doutora em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- GAMA, F.G. V., NISHIMORI, C. T., SOBREIRA, M. R., SANTANA, A. E. Características físico-químicas e citológicas do líquido de cães em diferentes fases da cinomose. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p. 596-601, 2005.
- GIONFRIDDO, J. R., POWELL, C. C., Traumatic glaucoma in a dog. **Vet. Med.**, v. 96, p.830-836, 2001.
- GUM, G.G.; GELATT, K.N.; OFRI, R. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 1999. ch. 3, p.151-181.
- GUM, G.G.; GELATT, K.N.; ESSON, D.W. Physiology of the eye. In: GELLAT, K.N. **Veterinary Ophthalmology**. 4<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Blackwell Publishing. 2007. ch. 3, p.149-170.
- GRUS, F. H., JOACHIM, S. C., PFEIFFER, N. Proteomics in ocular fluids. **Proteomics Clin. Appl.**, v1, p.876, 2007.
- HAKANSON, N., FORRESTER, S. D. Uveitis in the dog and cat. **Vet Clin Small Anim**, v.20, n.3, may, 1990.
- HAZEL, S.J., HULL, M. A., SEVERIN, G. A., LAUERMAN, L. H. Jr. Laboratory evaluation of aqueous humor in the healthy dog, cat, horse, and cow. **American Journal of Veterinary Research**. v. 46, n. 3, p.657-659. Mar. 1985.
- HOFMEISTER, E. H., WILLIAMS, C. O., BRAUN, C., MOORE, P. A. Propofol versus thiopental: effects on peri-induction intraocular pressure in normal dogs. **Veterinary Anaesthesia And Analgesia**, v.35, p.275-281, 2008.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5. ed. San Diego: Academic Press, 1997. 983p.

- KAUFMAN,P.L. Aqueous Humor Dynamics. **Clinical Ophthalmology**.William Tasman e Edward A.Joeger.p.1-15.
- KUCHLE, M., HO, T. S., NGUYEN, N. X., HANNAPPEL, E., NAUMANN, G. O. H. Protein quantification and electrophoresis in aqueous humor of pseudoexfoliation eyes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1994, vol.35, n.2-; p. 748 - 752.
- LLOBET, A., GASULL, X., GUAL, A. Understanding trabecular meshwork physiology: A key to the control of intraocular pressure? **News Physiol. Sci.**, 18: 205-209, 2003.
- OKISAKA, S. Effects of paracentesis on the blood-aqueous barrier: a light and electron microscopic atudy on cynomolgus monkey. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1976, vol.15, n.10; p. 824-834.
- RASKIN,R. E. Olhos e estruturas anexas.In: RASKIN,R. E.;MEYER,D.J. **Atlas de Citologia do Cão e do Gato**,2ed.Roca.2003,cp.14.
- RIBEIRO, A.P. **Estudo do meloxicam e do carprofeno administrados por diferentes vias no controle da uveíte em cães (canis familiares- LINNEAUS, 1758)**. Tese (Mestre em Cirurgia Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- RIBEIRO, C. R. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de cães sororreagentes para leishmaniose visceral, em foco de transmissão no distrito federal – DF – brasil**. Tese (Doutor em Clínica Médica Veterinária) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.
- ROHDE, E., TOMLINSON, A. J., JOHNSON, D. H., NAYLOR, S. Comparison of protein mixtures in aqueous humor by membrane preconcentration-capillary electrophoresis-mass spectrometry. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**,1998.
- RUSSEL, P., TAMM, E. R., GREHN, F. J., PICHT, G., JOHNSON,M. The presence and properties of myocilin in the aqueous humor. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 2001, vol.42, n.5; p.983 - 986.
- SLATTER ,D.Estrutura e função do olho.In :SLATTER,D.**Fundamento Da Oftalmologia Veterinária**.1ed. São Paulo:Roca,2005 cap1p.20-22.



- STADES, F. C., BOEVÉ, M. H., NEUMANN, W. & WYMAN, M. Glaucoma. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. São Paulo, Manole, 1999, p. 128-139.
- TOWNSEND, W. Canine and feline uveitis. **Vet Clin Small Anim**,2008,p.323-346.
- THRALL, M.A. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. São Paulo: Roca, 2007. 582p.
- TRIPATHI, R. C., BARISUTH, N. S. C., TRIPATHI, B. J., GOTSIST, S.S. Quantitative and qualitative analyses of transferrin in aqueous humor from patients with primary and secondary glaucomas. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 1992, vol.33, n.10; p.2867 - 2873.
- WEINSTEIN, W. L., U. M., SAPIENZA, J.S., CARMICHAEL, K. P., MOORE, P. A., KRUNKOSKY, T. M. Identification of ocular matrix metalloproteinases present within the aqueous humor and iridocorneal drainage angle tissue of normal and glaucomatous canine eyes. **Veterinary Ophthalmology**. 2007,10:108-116.
- YUKI, M., ITOH, H., TAMURA, K., NISHII, N., TAKASE, K. Isolation, characterization and quantitation of canine alpha-1-acid glycoprotein. **Vet Res commun**,2008.

## CAPÍTULO III

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise do proteoma surge como uma abordagem relevante para o exame de mecanismos múltiplos e complexos de doenças oculares. As proteínas presentes no humor aquoso desempenham papel importante na homeostase do olho, e mudanças ou degradações dessas proteínas refletem na saúde ocular. Esclarecimentos sobre o padrão da expressão protéica e suas modificações mediante diversas patologias podem revelar o mecanismo de doenças oculares ainda pouco compreendidas, auxiliando em diagnósticos e tratamentos.

O estabelecimento dos padrões de normalidade do humor aquoso de cães é de grande importância para o conhecimento da fisiologia desse fluido. De destaque para a manutenção da integridade das estruturas oculares, processos mórbidos desencadeados no bulbo ocular ou resultantes de afecções sistêmicas que desestabilizem a integridade das barreiras oculares implicam diretamente em alterações do humor aquoso. Acredita-se que a padronização de técnicas que permitam repetibilidade e confiabilidade dos dados seja o ponto de partida para que se prossigam com as investigações nesta área. O conhecimento desse complexo mecanismo trará soluções eficazes no tratamento de algumas afecções oculares, mormente aquelas que resultem em inflamação ocular, doenças auto-imunes e o

glaucoma. Ainda, outras espécies poderão ser objeto de estudos similares, que trará benefícios à oftalmologia comparada.

Os resultados obtidos nesta pesquisa abrem uma nova perspectiva na investigação deste fluido e das alterações patológicas às quais ele está sujeito.

## ANEXOS I

### **Análise Citológica e Protéica do Humor Aquoso de Cães Clinicamente Saudáveis.**

Protein and Cytologic Analysis of Aqueous Humor of Clinically Healthy Dogs.

FALCÃO, M.S<sup>1</sup>, GALERA, P.D<sup>2</sup>; ROCHA, R.V.<sup>3</sup>, FERREIRA, T.C.<sup>4</sup>, CAMPOS, E.G<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Mestrando Saúde Animal FAV/ UnB – [falcaom@yahoo.com.br](mailto:falcaom@yahoo.com.br), <sup>2</sup> Professor Adjunto II Cirurgia de Pequenos Animais FAV/ UnB, <sup>3</sup> Graduando em Medicina Veterinária FAV/ UnB, <sup>4</sup> Laboratório de Biologia Molecular/UnB.

Objetivou-se padronizar a concentração de proteína no humor aquoso pelos métodos de Bradford e Sensiprot<sup>®</sup>, estabelecer relação entre a concentração de proteínas plasmáticas e do humor aquoso, bem como determinar valores de referência para este fluido em cães clinicamente saudáveis e seus aspectos citológicos. Coletaram-se amostras de 22 cães adultos, machos ou fêmeas, sem raça definida. Previamente aprovado pelo Comitê de Ética da instituição de origem (protocolo 66064/2007). As amostras do humor aquoso foram obtidas por paracentese da câmara anterior, e as plasmáticas, por venopunção cefálica. A análise do humor aquoso foi realizada através do teste colorimétrico de Bradford em comparação ao teste Sensiprot<sup>®</sup> (colorimétrico direto). A média da concentração protéica obtida pelo método de Bradford foi de 32,48 mg/dL (amplitude: 16,14 – 54,72) com erro padrão de  $\pm 2,55$  para o olho direito e 35,55 mg/dL (amplitude: 15,52 – 53,79) com erro padrão de  $\pm 2,55$  no olho esquerdo, não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre os olhos. O método do Sensiprot<sup>®</sup> apresentou valores de 9,04 mg/dL no olho direito (amplitude de 0,4 – 27,8) e 7,56mg/dL no olho esquerdo (1 – 18,9), não demonstrando diferença estatística significativa entre os olhos. Quando ambos os testes são comparados observa-se uma diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram consideradas estatisticamente significativos. Os valores protéicos obtidos do humor aquoso foram, ainda, comparados à quantidade de proteína sanguínea plasmática total. Resultados obtidos pelo método de Bradford representaram 0,5% do valor das proteínas plasmáticas, demonstrando linearidade dos dados. Mediante aumento da proteína plasmática, segue-se aumento da

proteína no aquoso; o mesmo não foi observado pelo método do Sensiprot®. Os valores obtidos por este método representaram 0,11% do valor das proteínas plasmáticas totais. A análise citológica do humor aquoso resultou em ausência celular em todas as amostras. Conclui-se que o teste de Bradford é preciso para a análise da concentração protéica do humor aquoso de cães, contrariamente ao método Sensiprot®, idealizado para mensuração de proteínas do líquido. Os dados obtidos mediante análise citológica ressaltam a higidez dos animais examinados, corroborando com a literatura.

**PALAVRAS-CHAVE:** cães, humor aquoso, proteínas.

**KEY WORDS:** dogs, aqueous humor, proteins.

**Mensuração protéica do humor aquoso de cães clinicamente sadios através de Gel de Eletroforese Unidimensional (SDS-PAGE) com Coloração em Prata e Densitometria.**

Protein Measurement of aqueous humor of dogs clinically healthy through Gel Electrophoresis of Unidimensional (SDS-PAGE) with Colour in Silver and densitometry.

FALCÃO, M.S.<sup>1</sup>, GALERA, P.D<sup>2</sup>; ROCHA, R.V. <sup>3</sup>, FERREIRA, T.C., CAMPOS, E.G.

<sup>1</sup> Mestrando Saúde Animal FAV/ UnB – [falcaom@yahoo.com.br](mailto:falcaom@yahoo.com.br), <sup>2</sup> Professor Adjunto

II Cirurgia de pequenos animais Hospital Mestrando Saúde Animal FAV/ UnB,

<sup>3</sup> Graduando em Medicina Veterinária FAV/ UnB. Laboratório De Biologia

Molecular/UnB

Este estudo objetivou padronizar a técnica para mensuração do perfil protéico do humor aquoso de cães clinicamente saudáveis, através da diferenciação das proteínas pela massa molecular por gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética da instituição de origem (protocolo 66064/2007). Empregaram-se 23 cães, machos ou fêmeas, adultos e sem raça definida que, mediante semiotécnica de rotina e análise laboratorial foram classificados como clinicamente sadios. Obteve-se uma amostra de 0,3 mL do humor aquoso de cada olho através de paracentese da câmara anterior. Seguiu-se adição de 2 µL do tampão 5x e 3 µL de água Bidestilada em 10 µL da amostra, totalizando 15µL. O material foi centrifugado a 10000 rpm por 15 segundos, aquecido a 94°C por 10 minutos e, novamente, centrifugado a 10000 rpm por 15 segundos. As amostras foram aplicadas no gel de eletroforese e coradas com de nitrato de prata. Esta técnica permitiu a visualização de seis bandas repetidas em todos os animais e algumas bandas adicionais foram observadas de forma aleatória nos demais géis. Através do marcador de massa molecular (190-15 Kda), inferiu-se que as massas moleculares das proteínas presentes no humor aquoso de cães clinicamente saudáveis estão entre 120 e 25 Kda. Uma das bandas protéicas, presente em todas as amostras, tem massa molecular equivalente à massa molecular do BSA, inferindo tratar-se da albumina canina. Esta proteína foi a que apresentou maior massa molecular entre as proteínas, conforme relata a literatura. Concluímos que a padronização da técnica de separação por gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) seguida da densitometria é essencial para que estudos comparativos sejam conduzidos, e que os valores obtidos neste estudo possam ser usados como referência para a análise de um proteinograma do aquoso de animais que cursem com oculares.

**PALAVRAS-CHAVE:** humor aquoso, proteínas, densitometria

**KEY WORDS:** dogs, aqueous humor, proteins, densitometry.

## ANEXO II

Tabela 8 – Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 1 e 2.

A1	OD	%	OE	%	A2	OD	%	OE	%
PI	2,18	23,1	1,44	17,5	PI	1,31	6,5	1,63	11,08
PII	1,52	16,11	1,27	15,43	PII	1,34	6,65	1,07	7,27
PIII	1,86	19,7	1,96	23,82	PIII	2,34	11,63	2,35	15,97
PIV	1,44	15,25	1,57	19,07	PIV	1,13	5,62	1,17	7,95
PV	1,22	12,92	1,22	14,83	PV	1,03	5,12	1,22	8,3
PVI	1,22	12,92	0,77	9,35	PVI	0,94	4,68	1,05	7,13
PVII					PVII	1,48	7,35	1,66	11,3
PVIII					PVIII	3,08	15,3		
PIX					PIX	4,11	20,41	4,56	31
PX					PX	3,37	16,74		
TOTAL	9,44	100	8,23	100		20,13	100	14,71	100



Tabela 9 – Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 3 e 4.

A3	OD	%	OE	%	A4	OD	%	OE	%
PI	1,15	15,23	1,45	15,85	PI	2,23	20,15	2,04	21,94
PII	1,49	19,73	1,86	20,33	PII	2,66	24,03	1,42	15,26
PIII	1,29	17,1	2,18	23,82	PIII	2,31	20,86	2,44	26,25
PIV	1,48	19,6	1,64	18	PIV	1,4	12,65	1,26	13,55
PV	1,04	13,77	1,1	12	PV	1,29	11,65	0,87	9,35
PVI	1,1	14,57	0,92	10	PVI	1,18	10,66	1,27	13,65
PVII					PVII				
PVIII					PVIII				
PIX					PIX				
PX					PX				
	7,55	100	9,15	100		11,07	100	9,3	100

Tabela 10 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 5 e 6.

A5	OD	%	OE	%	A6	OD	%	OE	%
PI	1,17	8,63	1,21	8,26	PI	1,87	15,87	1,81	15,13
PII	2,52	18,57	2,14	14,61	PII	2,22	18,85	2,89	24,16
PIII	1,7	12,53	1,91	13,03	PIII	1,39	11,8	1,53	12,8
PIV	2,01	14,81	2,26	15,45	PIV	1,67	14,18	1,35	11,3
PV	2,65	19,53	1,85	12,65	PV	1,77	15,02	1,45	12,11
PVI	3,52	25,93	5,27	36	PVI	2,86	24,28	2,93	24,5
TOTAL	13,57	100	14,64	100		11,78	100	11,96	100

Tabela 11 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas percentagens, do OD e OE dos animais 7 e 8 .

A 7	OD	%	OE	%	A 8	OD	%	OE	%
PI	1,73	25,03	2,11	25,72	PI	1,85	23,03	1,96	18,13
PII	2,02	29,23	2,27	27,7	PII	2,05	25,53	3,3	30,52
PIII	1,81	26,2	2,5	30,48	PIII	1,29	16,06	2,34	21,65
PIV					PIV	1,71	21,31	1,72	15,92
PV	1,35	19,54	1,32	16,1	PV	1,13	14,07	1,49	13,78
PVI					PVI				
	6,91	100	8,2	100		8,03	100	10,81	100

Tabela 12 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 09 e 22.

A9	OD	%	OE	%	A22	OD	%	OE	%
PI	1,4	15,71	1,8	16,27	PI	1,96	18,31	1,24	12,75
PII	1,51	16,95	1,95	17,63	PII	2,38	22,25	1,87	19,22
PIII	1,34	15,03	1,76	15,92	PIII	1,78	16,64	1,58	16,24
PIV	1,31	14,7	1,59	14,37	PIV	1,63	15,24	1,15	11,81
PV	1,05	11,8	1,27	11,48	PV	0,94	8,78	1,45	14,9
PVI	2,3	25,81	2,69	24,33	PVI	2,01	18,78	2,44	25,08
TOTAL	8,91	100	11,06	100		10,7	100	9,73	100

Tabela 13 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 10 e 11.

A10	OD	%	OE	%	A11	OD	%	OE	%
PI	1,65	10,68	1,06	9,68	PI	0,83	7,89	1,41	12,9
PII	1,07	6,92	1,1	10,05	PII	1,04	9,88	1,17	10,7
PIII	2,41	15,6	2,54	23,21	PIII	2,27	21,58	2,42	22,15
PIV	1,4	9,07	1,24	11,32	PIV	1,17	11,12	1,16	10,61
PV	1,05	6,8	1,19	10,86	PV	1,21	11,5	1,35	12,35
PVI	1,1	7,12	1,1	10,04	PVI	1,24	11,79	1,34	12,26
PVII	2,55	16,5	2,72	24,84	PVII	2,76	26,24	2,08	19,03
PVIII	4,22	27,31			PVIII				
TOTAL	15,45	100	10,95	100		10,52	100	10,93	100

Tabela 14 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 12 e 13.

A12	OD	%	OE	%	A13	OD	%	OE	%
PI	1,32	14,53	0,88	8,52	PI	1,2	14,72	1,09	12,92
PII	1,27	13,98	1,47	14,23	PII	1,56	19,14	1,15	13,62
PIII	1,534	16,85	2,04	19,75	PIII	2,35	28,83	1,14	13,5
PIV	1,12	12,33	1,46	14,13	PIV				
PV	2,47	27,21	2,49	24,11	PV	1,89	23,2	2,32	27,5
PVI	1,37	15,1	1,99	19,26	PVI	1,15	14,11	2,74	32,46
PVII					PVII				
PVIII					PVIII				
	9,084	100	10,33	100		8,15	100	8,44	100

Tabela 15 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 14 e 15.

A14	OD	%	OE	%	A15	OD	%	OE	%
PI	2,1	12,4	2,21	13,13	PI	1,39	6,9	1,79	12,15
PII	1,51	8,91	1,6	9,5	PII	2,51	12,47	1,53	10,4
PIII	2,83	16,7	2,12	12,59	PIII	3,46	17,19	2,7	18,34
PIV	1,98	11,7	1,81	10,75	PIV	2,9	14,41	2,78	18,89
PV	1,95	11,51	2,16	12,82	PV	2,85	14,16	2,22	15,08
PVI	1,61	9,5	1,92	11,4	PVI	1,81	8,99	1,27	8,63
PVII	1,59	9,38	2,1	12,47	PVII	1,53	7,6	2,43	16,51
PVIII	3,37	19,9	2,92	17,34	PVIII	3,68	18,28		
TOTAL	16,94	100	16,84	100		20,13	100	14,72	100

Tabela 16 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 16 e 17.

A16	OD	%	OE	%	A17	OD	%	OE	%
PI	2,41	15,75	2,73	16,21	PI	2,4	16,87		
PII	2,39	15,6	2,54	15,09	PII	2,3	16,16	2,84	20,27
PIII	2,38	15,5	3,51	20,85	PIII	3,85	27,05	4,28	30,55
PIV	1,69	11,02	2,22	13,18	PIV	1,5	10,55	1,98	14,14
PV	2,57	16,7	2	11,87	PV	2,73	19,18	2,94	20,98
PVI	1,5	9,8	1,52	9,02	PVI	1,45	10,19	1,97	14,06



PVII	2,4	15,63	2,32	13,78	PVII				
PVIII					PVIII				
	15,34	100	16,84	100		14,23	100	14,01	100

Tabela 17 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 18 e 19.

A 18	OD	%	OE	%	A19	OD	%	OE	%
PI	1,51	10,75	2,3	14,59	PI	1,78	15,93	1,89	14,53
PII	1,92	13,7	1,86	11,78	PII	1,48	13,25	2,36	18,15
PIII	2,35	16,75	2,3	14,59	PIII	2,42	21,66	2,21	17
PIV	0,94	6,7	1,52	9,64	PIV	1,51	13,52	2,29	17,62
PV	1,78	12,69	1,53	9,7	PV	1,3	11,65	1,6	12,3
PVI	1,73	12,33	2,53	16,05	PVI	2,68	23,99	2,65	20,4
PVII	3,8	27,08	3,72	23,65	PVII				
TOTAL	14,03	100	15,76	100	TOTAL	11,17	100	13	100

Tabela 18 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE dos animais 20 e 21.

A20	OD	%	OE	%	A21	OD	%	OE	%
PI	1,33	15,51	3,16	28,5	PI	1,99	11,78	1,87	10,5
PII	2,28	26,6	2,11	19,02	PII	2,21	13,1	2,04	11,44
PIII	1,76	20,54	1,31	11,81	PIII	2,24	13,28	2,02	11,32
PIV	1,61	18,8	2,19	19,75	PIV	2,34	13,86	2,1	11,77
PV	1,59	18,55	2,32	20,92	PV	1,85	10,96	2,14	11,99
PVI					PVI	2,05	12,14	1,1	6,16
PVII					PVII	4,2	24,88	6,57	36,82
TOTAL	8,57	100	11,09	100	TOTAL	16,88	100	17,84	100

Tabela 19 - Valores das concentrações das proteínas e as suas respectivas porcentagens, do OD e OE do animal 23.

A23	OD	%	OE	%
PI	1,4	15,3	1,26	13,68
PII	1,84	20,11	1,49	16,18
PIII	1,18	12,89	1,66	18,02
PIV	1,34	14,65	1,11	12,05
PV	0,84	9,18	1,4	15,21
PVI	2,55	27,87	2,29	24,86
	9,15	100	9,21	100

Tabela 20 - Valores de Proteína total de OD e OE pelo método de Sensiprot®.

<b>ANIMAL</b>	<b>SENSIPROT OD (mg/dl)</b>	<b>SENSIPROT OE (mg/dl)</b>
1	8,1	10
2	7,6	10,6
4	27,8	9,9
5	2,6	3,4
6	9,9	1
7	0,8	1,4
9	0,4	3,2
10	17,6	5,9
11	2	1,6
12	8,4	8,4
13	10,2	9,3
14	5,4	5,7
15	7,9	7,3
16	8,4	7
17	11,5	10,7
18	8,2	7,9
19	13,6	11,8
20	19,5	18,9
21	12,8	11,5
22	7,6	6,9
23	8,8	7,2
24	7,6	7,8
25	9,9	10,5
<b>MÉDIA</b>	<b>9,42</b>	<b>7,73</b>

Tabela 21- Valores de Proteína total de OD e OE pelo método de Bradford.

<b>ANIMAL</b>	<b>OD(mg/dl)</b>	<b>OE(mg/dl)</b>
1	36,2	37,12
2	41,14	39,59
3	43,3	33,42
4	35,27	35,89
5	30,64	32,19
6	25,09	25,4
7	16,14	15,52
8	52,25	53,79
9	23,85	36,82
10	27,56	31,88
11	29,72	48,85
12	16,14	21,08
13	34,35	29,41
14	26,32	49,16
15	30,33	27,25
16	31,57	51,32
17	49,78	46,08
18	64,59	64,59
19	54,72	52,87
20	28,17	26,32
21	29,72	27,25
22	21,38	24,78
23	30,95	36,2
<b>MÉDIA</b>	<b>33,8773913</b>	<b>36,81652174</b>