

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Diretor: Prof. Dr. Oziel Bizutti

ELETOFEROGRAMA DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DA ÉGUA
PURO SANGUE INGLÊS (p.s.i.) DURANTE
A PREENHEZ E O PÓS-PARTO

(ELECTROPHORETIC PATTERNS OF THE BLOOD SERUM PROTEINS OF
THOROUGHbred MARE DURING PREGNANCY AND
POST PARTUM PERIODS)

O. BIZUTTI
Prof. Assistente Doutor

J. F. TABARELLI NETO
Prof. Catedrático

F. GACEK
Prof. Assistente

M. E. M. OLIVEIRA
Prof. Assistente

A prenhez, como condição fisiológica, ocasiona aumento considerável nas necessidades nutricionais da gestante, principalmente na sua segunda fase de desenvolvimento. Conforme a teoria da partição dos nutrientes de HAMMOND (12), um estado carencial de nutrição, ao determinar queda nas taxas dos princípios específicos do sangue, mobiliza nutrientes dos próprios tecidos maternos a fim de garantir o desenvolvimento do produto e assegurar a manutenção da gestante.

Todavia, dentro de certos limites, o feto é considerado parasita do ser que o alberga e, se as reservas lábeis dos nutrientes da gestante caírem aquém desses limites, seu desenvolvimento e crescimento serão inibidos; por outro lado, o suprimento em excesso dos nutrientes requeridos não determinará qualquer desenvolvimento adicional do feto. De qualquer forma, a importância de um consumo protéico adequado é reconhecido como fator necessário para a manutenção de uma prenhez normal, embora a patogenia da deficiência protéica durante a prenhez seja incompletamente conhecida.

Muito embora a concentração total das proteínas séricas dê alguma informação referente ao estado nutricional do animal, co-

nhecimentos acêrca da distribuição das diferentes frações protéicas é de muito valor, pois que a mesma pode refletir, caso alterada, disproteinemia, seja qualitativa, seja quantitativa, ainda que permaneça inalterado, no sôro, o nível total das proteínas.

No presente trabalho, procurou-se analisar o comportamento do eletroferograma das proteínas séricas da égua puro sangue inglês (p.s.i.) no decorrer da gestação e no após parto.

LITERATURA

Com relação às proteínas séricas, estudadas no presente trabalho, há na literatura série grande de pesquisas com a maioria das espécies de animais domésticos, procurando não só determinar os valores normais dos elementos aludidos frente a fatores vários, como também detectar possíveis alterações em suas taxas quando da ocorrência de diferentes processos patológicos.

Todavia, é escassa a bibliografia referente a êsses elementos do sangue no que tange à égua puro sangue inglês no decurso da gestação. Pela análise da literatura especializada podemos citar os trabalhos de FUJIOKA e MATSUSHITA (7) e STANKIEWICZ e cols. (19).

FUJIOKA e MATSUSHITA (7) verificaram, entre o 45^o e o 80^o dia da gestação na égua, aumento na taxa de gama globulina, com diminuição paralela, tanto na fração albumina como na porcentagem de proteína total, admitindo que a queda na proteína seria determinada por um certo desvio aparente em alguma outra fração. Durante o mesmo período de observações assinalado, não foram anotadas modificações nas frações alfa e beta globulinas.

STANKIEWICZ e cols. (19), num estudo sôbre o quadro hemático, proteína sérica total e respectivas frações, em cavalos das raças puro-sangue e FIORDING, separaram, dentro de cada raça, dois grupos de fêmeas com diferentes idades: um de éguas entre o 3^o e o 6^o mês de gestação, e outro de fêmeas não prenhes. Não houve diferença significativa entre os valores observados nos dois grupos de animais.

MATERIAL E METODO

1. *Animais utilizados*

As 12 éguas utilizadas no presente trabalho pertenciam ao mesmo haras localizado nas proximidades da cidade de Campinas,

no Estado de São Paulo, e eram da raça puro sangue inglês de corrida (p.s.i.). Tinham assistência veterinária permanente, sendo consideradas clinicamente sadias, dentro das garantias que o exame clínico oferece. Recebiam tratamento semelhante quanto ao manejo, sobretudo no referente à alimentação e ao número de horas de pastejo por dia. Eram mantidas em seus boxes durante a noite e soltas no pasto pela manhã.

2. *Coleta do material e tratamento subsequente*

Por ocasião da coleta do sangue, material que utilizamos no presente estudo para a realização das diferentes técnicas abaixo descritas, os animais eram trazidos do pasto para os boxes, lugar onde eram sangrados imediatamente.

A coleta realizou-se sempre no período da manhã entre: 9:30 e 12:00 horas, por punção da veia jugular, com agulha 40x20.

As éguas eram sangradas pela primeira vez ao redor do 30.º dia da suposta prenhez, sendo as coletas subsequentes efetuadas a intervalos de 20 dias, até 10 a 30 dias após o parto.

O sangue, armazenado em frascos de boca larga, era imediatamente colocado em geladeira portátil e transportado para o laboratório, sendo o soro recolhido após coagulação e descolamento do coágulo.

3. *Dosagem das proteínas*

Para a dosagem das proteínas séricas totais, o soro foi centrifugado a 1000 r. p. m. durante 15 minutos e, em seguida, colocado em "freezer" a -10°C para conservação, sendo utilizado à medida que as corridas eletroforéticas iam se processando.

O método empregado na dosagem das proteínas totais foi o de GORNALL e cols. (10), sendo as leituras efetuadas em espectrofotômetro COLEMAN JR., com comprimento de onda igual a 540 milimicrons.

4. *Análise eletroforética*

A migração eletroforética, para a separação das frações protéicas do soro, foi efetuada em aparelho JOUAN, sobre papel de filtro WHATMANN n° 1, usando-se também veronal-acetado, com força iônica igual a 0,1 e pH igual a 8,6.

O sôro, com volume variável de 0,004 a 0,008 ml, de acôrdo com o teor de proteínas totais, foi aplicado sôbre a tira de papel a 15 cm de uma das extremidades. Foi utilizada corrente elétrica cuja intensidade correspondia a 2 mA por tira, deixando-se atuar por 16 horas. A seguir, eram as tiras levadas à estufa a 70-80°C, para secagem.

A coloração foi realizada com Amidoschwarz 10 B, de acôrdo com a técnica de GRASSMANN e HANNIG, modificada por FERRI e cols. (6). Após coloração as frações eram diferenciadas, procedendo-se, a seguir, à nova secagem das tiras.

Para o estabelecimento das porcentagens relativas de cada fração protéica, procedeu-se à diafanização das tiras com vaselina líquida, efetuando-se a leitura fotométrica, bem como à integração da curva, em densitômetro e integrador JOUAN, respectivamente.

5. *Análise estatística*

Realizou-se, para cada grupo de resultados, a análise da variância, conforme GOMES (9).

No referente à análise comparativa das diversas frações, não consideramos a fração alfa₁ globulina, uma vez que os valores são calculados em termos percentuais, não sendo, portanto, independentes, perdendo-se um grau de liberdade.

RESULTADOS

Para a interpretação dos resultados, o período de gestação foi agrupado em 6 classes dispostas com intervalo de 50 dias, partindo-se do 30º e encerrando-se no 330º dia. Nova classe foi constituída pelas coletas efetuadas entre 10 e 30 dias após o parto.

Foram considerados tão somente os resultados obtidos com amostras colhidas nos dias de gestação correspondentes, aproximadamente, ao valor médio de cada classe, isto é, com 55, 105, 155, 205, 255, 305 e 20 dias respectivamente.

Os resultados referentes às variações nas taxas das proteínas totais e respectivas frações, durante a prenhez das éguas em observação, encontram-se nas tabelas de n°s I a VII.

Às tabelas seguem-se as figuras de n°s 1 a 3 relativas a cada um dos elementos estudados no presente trabalho.

Para análise da variância de todos os resultados obtidos o nível de rejeição adotado foi sempre de 5%, não se obtendo significância nos resultados.

Tabela I — Proteína total: no soro de éguas p.s.i. durante a gestação e após parto. Os valores indicados representam \bar{x} .

Animal Dias após cobertura	Animal												To- tal	\bar{x}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
30 - 20	7,8	7,4	7,8	7,8	8,4	7,4	6,7	8,4	7,8	7,1	8,8	7,8	93,2	7,766
80 - 130	7,3	7,4	8,1	7,8	7,4	7,4	6,4	8,4	7,1	7,1	7,8	6,7	89,4	7,450
130 - 180	8,1	7,4	7,8	8,4	8,4	8,4	6,7	7,4	6,7	6,4	8,1	7,8	91,6	7,633
180 - 230	7,4	8,1	7,8	6,7	8,1	8,4	6,7	8,1	6,4	7,1	8,8	7,4	91,0	7,583
230 - 280	8,1	7,8	7,8	7,8	8,1	8,1	7,4	8,1	7,1	7,2	7,4	8,1	93,0	7,750
280 - 330	6,7	7,1	7,4	8,1	8,4	8,1	7,1	7,8	7,1	7,4	8,1	7,8	91,1	7,591
Dias após parto:														
10 - 30	6,7	8,4	7,2	7,4	7,8	8,8	8,1	7,8	7,1	6,5	8,4	7,1	91,3	7,608

ANALISE DA VARIANCIA

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	0,83	0,1383	0,35
Resíduo	77	29,69	0,38558	
Total	83	30,52		

Tabela 11 — Albumina: no soro de éguas p. s. i. durante a gestação e após parto.
Os valores indicados representam g.

Animal Dias após cobertura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	To- tal	\bar{x}
30 - 80	3,26	3,13	3,57	3,51	3,42	2,62	2,73	3,30	3,72	3,62	3,58	2,98	39,44	3,286
80 - 130	3,17	2,40	3,51	2,92	3,16	3,36	2,94	3,84	3,55	3,19	3,99	2,94	38,99	3,249
130 - 180	3,19	3,47	3,54	3,66	3,15	3,75	2,62	3,59	2,90	2,82	3,06	2,55	38,30	3,191
180 - 230	3,65	3,18	3,48	3,06	2,66	3,43	2,97	3,12	2,73	3,50	3,79	2,77	39,36	3,280
230 - 280	4,05	3,34	3,26	3,21	3,62	3,40	3,30	3,36	3,41	3,08	2,96	3,64	40,63	3,385
280 - 330	3,30	3,04	3,13	3,35	3,49	3,30	3,33	3,31	2,89	3,13	3,51	3,17	38,95	3,245
Dias após parto:														
10 - 30	2,94	3,29	2,94	2,90	2,98	3,27	3,12	3,40	3,30	2,75	3,06	3,02	36,97	3,080

ANALISE DA VARIANCA

Fonte de variação	g. l.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamentos	6	0,63	0,1050	0,95
Resíduo	77	8,48	0,11012	
Total	83	9,11		

Tabela III — m — globulina: no soro de éguas p. s. i. durante a gestação e apos parto. Os valores indicados representam g%.

Dias após colertura	Animal												To- tal	x
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
30 - 80	0,42	0,40	0,42	0,39	0,54	0,34	0,29	0,30	0,36	0,43	0,41	0,50	5,10	0,425
80 -130	0,34	0,28	0,45	0,19	0,60	0,21	0,30	0,24	0,27	0,46	0,43	0,26	4,03	0,335
130 -180	0,56	0,40	0,28	0,30	0,28	0,45	0,36	0,28	0,40	0,30	0,33	0,41	4,35	0,362
180 -230	0,39	0,46	0,42	0,33	0,59	0,35	0,38	0,45	0,34	0,35	0,61	0,42	5,10	0,425
230 -280	0,50	0,39	0,29	0,41	0,38	0,38	0,40	0,40	0,23	0,47	0,49	0,46	4,80	0,400
280 -330	0,36	0,40	0,28	0,54	0,32	0,43	0,42	0,32	0,33	0,40	0,27	0,44	4,51	0,375
Dias após parto 10-30	0,31	0,52	0,25	0,34	0,41	0,31	0,23	0,44	0,40	0,47	0,42	0,35	4,45	0,370

Tabela IV — α_2 — globulina: no soro de éguas p. s. l. durante a gestação e após parto. Os valores indicados representam g%.

Dias após cobertura	Animal												Total	x
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
30 - 80	0,71	1,08	1,19	0,78	0,84	1,31	0,72	1,08	0,96	0,85	1,52	0,99	12,03	1,002
80 - 130	1,12	0,83	0,99	1,07	1,07	0,63	0,98	1,58	0,98	1,06	0,87	0,77	11,95	0,995
130 - 180	1,16	0,74	0,71	0,99	0,91	0,64	0,79	1,02	0,94	0,81	0,83	1,19	10,73	0,894
180 - 230	0,99	0,98	0,72	0,91	1,18	1,05	0,96	1,27	0,72	0,81	1,08	0,97	11,64	0,970
230 - 280	0,93	0,95	0,83	0,92	1,03	1,13	1,14	1,27	1,02	1,09	0,99	0,87	12,17	1,014
280 - 330	0,72	0,51	0,85	0,86	1,23	1,00	1,11	1,04	0,82	0,85	0,81	0,78	10,58	0,881
Dias após parto 10 - 30	0,82	1,23	0,86	0,85	1,33	1,57	0,98	1,06	0,86	1,16	1,26	0,75	12,73	1,060

ANALISE DA VARIANCA

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	0,30	0,05	1,21
Resíduo	77	3,18	0,04129	
Total	83	3,48		

Tabela V — β_1 — globulina: no soro de éguas p.s.l. durante a gestação e após parto. Os valores indicados representam g%.

Animal Dias após cobertura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	To- tal	\bar{x}
30 - 80	1,06	1,19	0,47	1,11	0,84	1,08	0,67	1,14	1,02	0,92	0,76	1,35	11,61	0,967
80 - 130	0,97	1,20	0,99	0,92	0,94	0,74	0,90	0,60	0,60	1,11	0,87	1,08	10,92	0,910
130 - 180	1,01	0,85	0,57	1,14	1,19	0,97	0,61	0,68	0,45	0,77	1,17	1,19	10,60	0,883
180 - 230	0,79	1,21	0,60	0,72	1,03	1,26	0,81	0,98	0,68	0,86	0,88	0,60	10,42	0,868
230 - 280	0,93	0,78	0,78	0,55	0,86	0,92	0,85	0,98	0,57	0,76	1,04	0,81	9,83	0,819
280 - 330	0,77	0,81	0,68	0,86	1,03	1,18	1,16	0,91	0,55	0,74	1,15	0,53	10,57	0,880
Dias após parto: 10 - 30	0,82	0,64	0,61	0,74	1,01	1,13	0,69	0,72	0,66	0,63	0,96	0,89	9,50	0,791

ANALISE DA VARIANCIA

Fonte de variação	g.l	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	0,24	0,0400	0,910
Resíduo	77	3,37	0,04376	
Total	83	3,61		

Tabela VI — β_2 — globulina: no soro de éguas p.s.i. durante a gestação e após parto. Os valores indicados representam g%.

Animal Dias após cobertura	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	To- tal	\bar{x}
30 - 80	0,50	0,57	0,83	0,58	0,96	0,63	1,10	1,02	0,66	0,28	0,82	0,57	8,52	0,710
80 - 130	1,12	0,74	0,81	0,78	0,67	0,74	0,38	0,60	0,49	0,40	0,52	0,41	7,66	0,638
130 - 180	0,60	0,53	1,20	0,61	0,98	0,90	0,97	0,80	0,80	0,51	0,83	0,88	9,71	0,809
180 - 230	0,59	1,04	1,08	0,62	0,74	0,70	0,48	0,87	0,77	0,66	1,15	1,71	10,41	0,867
230 - 260	0,62	0,83	0,73	0,64	0,81	0,59	0,68	0,64	0,97	0,71	0,79	1,10	9,11	0,759
280 - 330	0,51	0,76	0,74	0,92	0,97	0,62	0,63	0,71	0,71	0,91	0,94	1,75	10,17	0,847
Dias após parto: 10 - 30	0,62	0,97	0,76	0,85	0,73	1,07	1,21	0,83	0,81	0,90	1,08	1,15	10,98	0,915

ANÁLISE DA VARIANÇIA

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	0,66	0,11	1,85
Resíduo	77	4,57	0,05935	
Total	83	5,23		

Tabela VII — δ — globulina: no soro de éguas p.s.i. durante a gestação e após parto. Os valores indicados representam g%.

Animal Dias após cobertura	Animal												To- tal	\bar{x}
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
30 - 80	1,84	1,02	1,72	1,43	1,80	1,42	1,20	1,26	1,08	1,00	1,70	1,42	16,89	1,407
80 - 130	1,07	1,94	1,35	1,90	0,94	1,69	0,90	1,56	1,20	0,86	1,13	1,24	15,78	1,315
130 - 180	0,72	1,31	1,49	1,68	1,89	1,68	1,34	1,02	1,21	1,19	1,56	1,56	16,65	1,387
180 - 230	0,99	1,21	1,50	1,05	0,88	1,61	1,10	1,39	1,15	0,91	1,28	1,71	14,78	1,231
230 - 280	1,06	1,50	1,90	2,06	1,50	1,67	1,02	1,45	1,19	0,99	1,13	1,10	16,57	1,380
280 - 330	1,03	1,57	1,71	1,56	1,36	1,56	0,74	1,49	1,69	1,37	1,42	1,75	17,25	1,437
Dias após parto: 10 - 30	1,18	1,74	1,67	1,71	1,33	1,44	1,85	1,34	1,06	1,48	1,62	1,15	17,57	1,464

ANÁLISE DA VARIÂNCIA

Fonte de variação	g.l.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamentos	6	0,45	0,0750	0,75
Resíduo	77	7,64	0,09922	
Total	83	8,09		

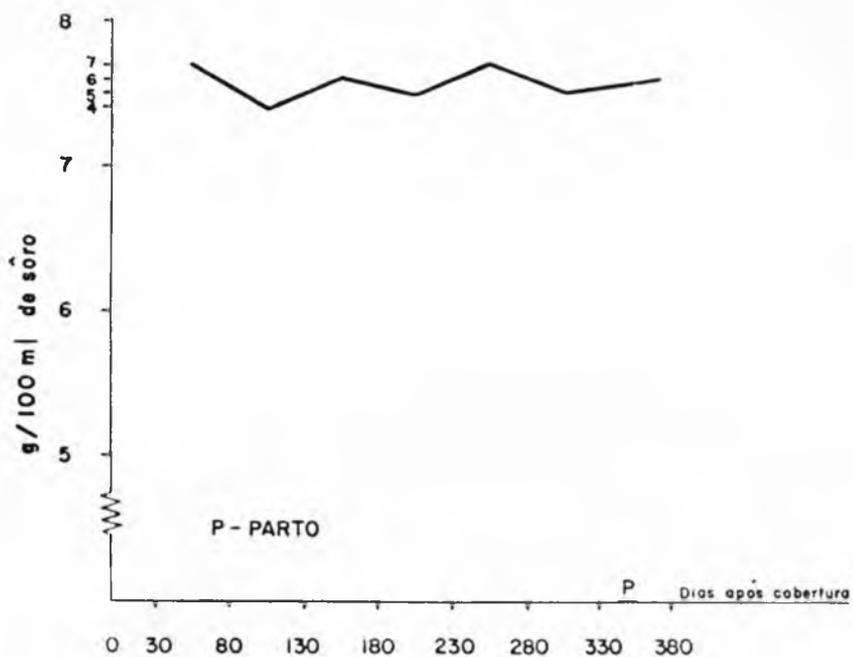


Fig. 1 — Proteína total no soro de éguas p.s.i durante a gestação e após parto. Gráfico obtido com os valores médios, registrados na tabela I.

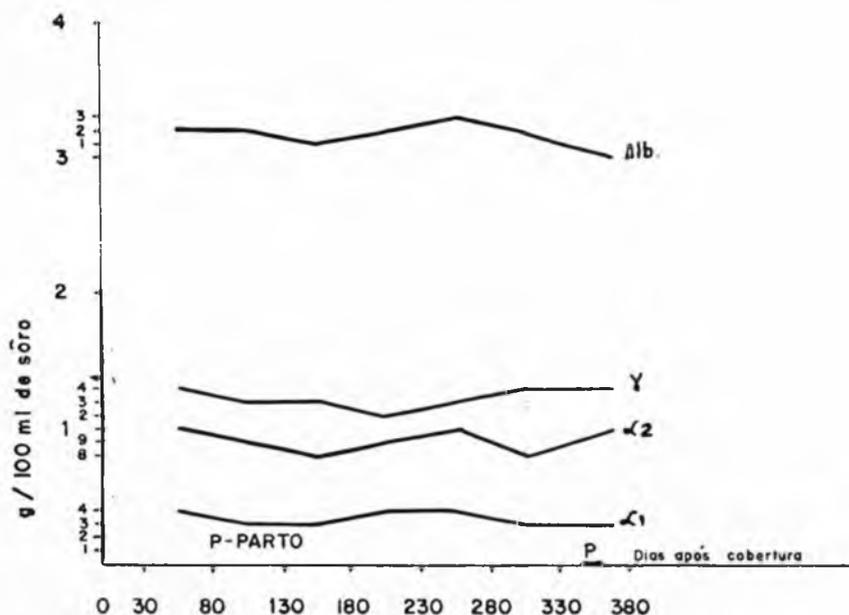


Fig. 2 — Albumina e α_1 , α_2 e γ globulinas no soro de éguas p.s.i. durante a gestação e após parto. Gráfico obtido com os valores médios registrados nas tabelas II, III, IV e VII.

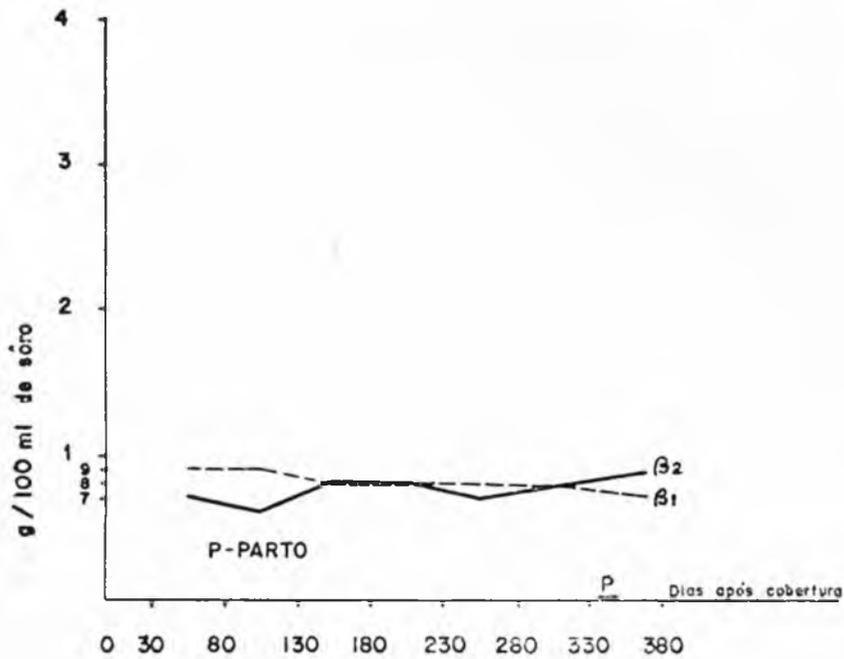


Fig. 3 — β_1 e β_2 globulinas no soro de éguas p. s. i. durante a gestação e após parto. Gráfico obtido com os valores médios registrados nas tabelas V e VI

DISCUSSÃO

Pela análise da literatura especializada, verifica-se que há dificuldade em se procurar estabelecer relação entre as observações colhidas no presente trabalho com outras pesquisas efetuadas a esse respeito na égua p. s. i. Acresce, ainda, segundo GEINITZ (8), no referente às taxas de proteínas do soro, a necessidade de cautela ao se relacionar dados obtidos por diferentes autores. Uma comparação somente é possível quando os métodos forem estritamente iguais e quando o material (animal e seu meio) forem exatamente os mesmos.

Assim, ao compararmos os dados ora apresentados com os estabelecidos, como níveis normais, por CAMPELLO e cols. (3) em eqüinos p. s. i. em treinamento, verificamos serem eles inferiores aos nossos.

Durante toda a prenhez da égua p.s.i. assinalamos níveis constantes, tanto para a proteína sérica total, bem como para suas diferentes frações, não se registrando modificações em qualquer dos períodos analisados, quer antes quer depois do parto.

Contudo, considerando-se que o potro recém-nascido somente receberá a primeira dose de anticorpos através do colostro, já que o tipo epitélio-corial da placenta da égua é impermeável às gama globulinas, (SOVA e KOMAREK (18), POLSON (17) e EARLE (5)), poder-se-ia esperar queda no teor da citada fração no soro da fêmea gestante, pelo menos nos períodos que antecedem e procedem o parto, à medida que a mesma fôsse sendo fornecida ao colostro. Todavia, tal fato não foi observado nas fases em que as coletas de sangue, para esta série de observações, foram protocoladas.

Não há dúvida, entretanto, que tal ocorrência faz por merecer estudos mais aprofundados, principalmente a julgar pelos resultados obtidos por outros investigadores, ainda que em espécies animais diferentes, como se assinalará a seguir.

Durante o desenvolvimento fetal, dada as características do metabolismo protéico orgânico, modificações nas proteínas plasmáticas da gestante são esperadas. Diferentes autores têm obtido proteinogramas com resultados variáveis durante a gestação normal, conforme a espécie animal estudada.

Assim, na espécie bovina, LARSON e KENDALL (15), LARSON (13), LARSON e HAYS (14), estudando as alterações que ocorrem nos níveis das proteínas séricas antes do parto, encontraram diminuição de 10 a 30% na concentração das proteínas totais. Esta diminuição foi devida à perda de β_2 e gama₁ globulina e, em menor extensão, à alfa globulina. Os resultados indicam que, as imuno-globulinas β_2 e gama₁ saem do sangue circulante várias semanas antes do parto, quando o colostro começa a formar-se na glândula mamária.

Por outro lado, as concentrações de albumina, β_2 e gama₁ globulinas, não sofreram alterações.

BUONACCORSI (2) assinalou, também, em bovinos, durante o período de gestação, taxa inferior de proteínas séricas totais, quando comparada com a de vacas contrôles; a hipoproteïnemia se mostrou mais acentuada no 4º mês da prenhez.

Em bovinos, DUNLAP e DICKSON (4) encontraram diminuição da albumina durante a primeira metade da prenhez, sendo que esta fração retornou ao nível normal no final da gestação; a concentração das globulinas, durante a segunda fase da gestação, caiu bastante, devido a produção de colostro, rico em globulinas.

Na mulher gestante, ALHA (1), NEUWEILER (16) verificaram hipoproteïnemia acompanhada de hipoalbuminemia e aumento das globulinas, e LAGERQRANTZ, citado por GRAS (11), encontrou diminuição da proteína total e da albumina, ora para menos, na gama globulina. Por sua vez, MACY e MACK, ainda referidos por GRAS (11), confirmaram hipoalbuminemia, aumento da alfa e beta globulinas, do fibrinogênio e diminuição da gama globulina.

Por outro lado, no referente, à taxa protéica total e suas frações no soro sanguíneo da égua p.s.i. nossos resultados concordam com os de STANKIEWICZ e cols. (19), que não encontraram diferenças entre éguas prenhez (do 3º ao 6º mês) e éguas vazias. Contudo, não confirmam as observações de FUJIOKA e MATSUSHITA (7), que assinalaram aumento da gama globulina entre o 45º e o 80º dia da gestação, com simultânea diminuição da fração albumina e das proteínas totais. Todavia, faz-se necessário lembrar que as observações dos autores citados prendem-se a um único e restrito período da prenhez.

SUMMARY

The electrophoretic patterns of the blood serum proteins of thoroughbred mare during pregnancy and post partum periods have been carried out.

The data obtained have not shown statistical significance.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALHA, A. L. — Serum protein fractionation in normal and in toxæmic pregnancy. *Ann. Chir. Gynec. Fenn., Helsinki*, 39 supl. 4:3-99, 1950.
2. BUONACCORSI, A. — Alcuni aspetti umorali della gravidanza fisiologica in bovine lattifere. *Ann. Fac. Med. Vet. Pisa*, 14:212-221, 1961.
3. CAMPELLO, A. P.; CARDOSO, T. T. & FARIA, A. M. — Perfil eletroforético do soro de cavalos p.s.i de corrida. *An. Fac. Med. Paraná* 3:3-16, 1960.
4. DUNLAP, J. S. & DICKSON, W. M. — The effect of age and pregnancy on ovine blood protein fractions. *Amer. J. vet. Res.*, Chicago, 16:91-95, 1955.
5. EARLE, I. P. — Influence of the ingestion of colostrum on the proteins of the blood sera of young foals, kids, lambs and pigs. *J. agric. Res.*, Washington, 51:479-490, 1935.
6. FERRI, R. G.; MENDES, E.; CARDOSO, T. Y. B. & TUTIYA, T. — Electrophoresis of serum protein in Asthma. Preliminary Report. *J. Allergy*, St. Louis, 27:494-503, 1956.
7. FUJIOKA, F. & MATSUSHITA, H. — The electrophoretic studies of serum protein II — On pregnant mare serum. *Bull. Azabu vet. Coll.*, Kanagawa-Ken, 10:75-79, 1962.
8. GEINITZ, W. — Über Serumeweisse von Tieren. Die Häufig als Versuchstiere oder zur Gewinnung von Heilseren Dienen. *Klin. Wschr.*, Berlin, 32:1108-1111, 1954.
9. GOMES, F. P. — Curso de Estatística Experimental. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós", 1963.

10. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. — Determination of serum protein by means of the Biuret reaction. *J. biol. Chem.*, Baltimore, 177:751-766, 1949.
11. GRAS, J. — *Proteínas Plasmáticas*. 3ª ed. Barcelona. Editorial Jims, 1967.
12. HAMMOND, J. — *Progress in the Physiology of Farm Animals*. v.3. London, Butterworths Scientific Publications, 1957.
13. LARSON, B. L. — Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition. *J. Dairy Sci.*, Illinois, 41:1033-1044, 1958.
14. LARSON, B. L. & HAYS, R. L. — An explanation for bovine parturition edema and treatment with blood protein replacements. *J. Dairy Sci.*, Illinois, 41:995-997, 1958.
15. LARSON, B. L. & KENDALL, K. A. — Changes in specific blood serum protein levels associated with parturition in the bovine. *J. Dairy Sci.*, Illinois, 40:659-666, 1957.
16. NEUWEILER, VON W. — Serumproteine in der Schwangerschaft. *Gynaecologia, Basel*, 126:235-242, 1948.
17. POLSON, A. — Variation of serum composition with the age of horses as shown by electrophoresis. *Nature, London*, 152:413-414, 1943.
18. SOVA, Z. & KOMAREK, J. — Die Papierelektrophorese in der Diagnostik innerer Krankheiten bei Pferden mit besonderer Berücksichtigung der Hepatopathien. *Arch. exp. Vet. Med.*, Leipzig, 18:869-881, 1964.
19. STANKIEWICZ, W.; MARKIEWICZOWA, Z. & MALINOWSK, W. — Hematologiczne Badania Konf Pełnej Krwi I Rasy Fiording. *Med. weteryn.*, Varsovia, 16:594-598, 1960.