

AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA EM CADELAS COM E SEM PIOMETRA E SUA RELAÇÃO COM FIBRINOGENIO E LEUCOGRAMA

CARVALHO, C.C.D.¹; RÊGO, E.W.²; QUEQUE, M.³; SOARES, P.C.^{2*}

Introdução

A piometra canina é uma enfermidade que ocorre mais comumente em cadelas adultas, de grande importância e de prevalência considerável. Os efeitos sistêmicos da piometra podem ser refletidos em exames laboratoriais, onde a contagem de células brancas em cadelas com piometra pode chegar a uma neutrofilia absoluta com graus variáveis de imaturidade celular, secundária à infecção, e septicemia. Se a infecção for severa ou crônica pode haver um desvio regenerativo para a esquerda, com presença de neutrófilos tóxicos (ETTINGER, 1997).

Diante das infecções microbianas, lesões teciduais, reações imunológicas e processos inflamatórios, com o objetivo de eliminar o agente infeccioso e/ou auxiliar no reparo tecidual, o organismo animal desenvolve um conjunto de alterações denominado “Resposta de Fase Aguda”. Esta resposta induz às respostas localizadas e sistêmicas, que envolvem mudanças nas funções metabólicas, endócrinas, neurológicas, imunológicas e alterações nos níveis de algumas proteínas plasmáticas (DABROWSKI et al., 2007)

Vários trabalhos científicos indicam como principais proteínas de fase aguda, a proteína amilóide sérica (PAS), a proteína C reativa (PCR), o fibrinogênio, a proteína ligante de manose (PLM), a haptoglobina (Hp), a ceruloplasmina (Cp), a a-1-antitripsina, e a a-1-glicoproteína sérica. Dessas proteínas, as mais investigadas na medicina veterinária são as proteínas C reativa em cães, a a-1-glicoproteína e a haptoglobina em felinos, a haptoglobina em ruminantes e em suínos a PCR e Hp (YAMAMOTO et al., 1992).

A determinação da concentração plasmática de algumas dessas proteínas permite fornecer informações sobre a ocorrência de danos teciduais e para o monitoramento da recuperação da inflamação. Em caninos algumas de suas propriedades têm sido caracterizadas somente recentemente (CASPI et al., 1984). Métodos para quantificação da PCR em cães (ECKERSALL et al 1991) têm sido introduzidos. O fibrinogênio plasmático é outro bom indicador de resposta a uma infecção aguda, cujo aumento é frequentemente observado em processos inflamatórios e infecciosos de cães (KANEKO, et al., 1997), pois uma de suas funções é limitar a invasão do agente infeccioso.

Desta forma, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os níveis sanguíneos de proteína C reativa, fibrinogênio e o leucograma em cadelas com e sem piometra, além de avaliar a aplicação do teste turbidimétrico quantitativo da proteína C reativa como método indicador de reação inflamatória em cadelas com e sem piometra.

¹ Médico Veterinário, Hospital Geral do Exército, Recife, Brasil. (cleytondantas@bol.com.br)

² Professores do Departamento de Medicina Veterinária, UFRPE, Recife, Brasil.

³ Engenheiro Químico, Magglab, Recife, Brasil.

Material e Métodos

Foram utilizadas 45 cadelas (*Canis familiaris*), com faixa etária de dois a doze anos, de diferentes raças e pesos. Todos os animais foram oriundos de uma unidade clínica particular. Foram formados dois grupos de animais, sendo um controle (n = 15) e outro com animais apresentando diagnóstico de piometra (n = 30). Os animais foram submetidos a exame clínico e laboratorial e, quanto aos que se encontravam com suspeita de piometra, estes foram encaminhados ao bloco cirúrgico para serem submetidos à ovariosalpingohisterectomia (OSH) para confirmação da enfermidade. Para critério de inclusão do grupo com piometra, foram considerados os animais com diagnóstico confirmativo de piometra pelo conjunto de dados, principalmente pela OSH; já em relação ao grupo controle, foram considerados animais em condição de hígidez após análise clínica e laboratorial.

Amostras de sangue foram obtidas por meio da venopunção da jugular externa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo, para determinação do leucograma e fibrinogênio, enquanto que para a quantificação da PCR utilizaram-se tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro. A contagem do número total de leucócitos foi efetivada em hemocítmetro utilizando a câmara de Neubauer, e a contagem diferencial de leucócitos (100 células) foi realizada em amostras de sangue distendidas sobre lâminas de microscopia e coradas pelo método de May-Grunwald Giemsa e leitura em microscópio óptico em objetiva de imersão (Jain, 1993),

A determinação do fibrinogênio foi realizada pela técnica precipitação a 56° C, segundo Jain, (1993), enquanto que a proteína C reativa foi determinada pelo método PCR - Ultra-Sensível Turbidimétrico, utilizando-se kit comercial Biotécnica – (Biotécnica Indústria e Comércio, Varginha, MG, Brasil), (CAT BT – 20.017.00). As amostras foram analisadas em analisador bioquímico TARGA 3000 (Random Access Chemistry Analyser Biotecnica Instruments).

Os dados foram submetidos à análise de variância (Teste F), e, nos casos de significância no teste F, as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa (d.m.s.) do teste de Duncan. Estatística de associação entre pares de variáveis foi realizada com a determinação do coeficiente de Pearson. Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2000). Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível de significância (p) de 5%.

Resultados

Os resultados do leucograma, PCR e fibrinogênio plasmático encontram-se na Tabela 1. Observa-se que em relação ao leucograma, os valores observados do número total de leucócitos, metamielócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos foram maiores para o grupo de animais com piometra, enquanto que os valores de eosinófilos foram menores para este mesmo grupo ($P < 0,0398$). Os valores de mielócitos e basófilos apresentaram-se análogos.

Verificam-se, na Tabela 1, que os valores médios do fibrinogênio plasmático e PCR foram maiores para o grupo de animais com piometra em relação aos que não apresentavam tal condição clínica ($P < 0,0001$).

Na Tabela 2 estão exibidos os coeficientes de correlação e seus respectivos níveis de significância entre as variáveis estudadas. Verifica-se que é digno de nota citar as altas correlações positivas da PCR com os leucócitos, neutrófilos segmentados, bastonetes e fibrinogênio; leucócitos com bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos; bastonetes com neutrófilos segmentados e monócitos; neutrófilos segmentados com linfócitos e monócitos. Citam-se, ainda,

média correlação positiva entre o fibrinogênio com os leucócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos; bastonetes com linfócitos e estes últimos com os monócitos.

Discussão

No presente estudo ficou evidente que cadelas acometidas de piometra tiveram alterações marcantes de indicadores de avaliação hematológica e de reação inflamatória. Marcadores inflamatórios, como a proteína C-reativa e fibrinogênio e o comportamento de células do sangue periférico envolvidas na inflamação, como visto no leucograma, vêm sendo estudados (SANTOS, et al., 2003), embora muito pouco ainda esteja sendo utilizado na rotina clínica.

A leucocitose teve um perfil característico e compatível com as observações de Santos et al. (2003), os quais retratam que os leucócitos podem ser ativados por meio de lesão tecidual, pela presença de LDL-colesterol oxidada, de agente infeccioso na parede vascular ou em qualquer sítio orgânico. As cadelas com piometra tiveram um considerável aumento deste indicador, entendendo-se que esta patologia define um quadro clínico grave e digno de atenção quanto ao restabelecimento da condição clínica dos animais.

A alteração dos valores absolutos dos neutrófilos, bastonetes como ocorrido no grupo com piometra, pode ser explicada como resposta ao processo infeccioso provocado pela enfermidade, concordando com Ettinger (1997), o qual relata que geralmente ocorrer uma neutrofilia absoluta com graus variáveis de imaturidade celular, secundária à infecção ou septicemia. A neutrofilia inflamatória, frequentemente causadora da leucocitose, é a principal característica laboratorial das infecções agudas, especialmente causadas por germes piogênicos, comumente isolados na piometra (NAVARRO et al., 1994).

Considerando o aumento dos linfócitos nos animais com piometra, entende-se que o seu aparecimento ocorreu secundariamente ao surgimento dos neutrófilos circulantes, que, em seqüência migraram para o foco inflamatório. Sua ação é diferenciada em relação aos outros leucócitos, pois estas células são mobilizadas de acordo com o antígeno específico (NAVARRO, 1994).

Com relação à eosinopenia observada, esta ocorreu provavelmente pela diminuição do influxo de células da medula óssea e diminuição do efeito quimiotático da histamina para os eosinófilos (JAIN, 1993). Já o aumento dos monócitos encontrados no grupo com piometra pode ser explicado, segundo Matos et al. (1995), pelo semelhante comportamento dos neutrófilos, uma vez que estas células constituem a primeira linha de defesa do organismo, e que seu papel principal é desencadeado pela incapacidade dos neutrófilos em fagocitar grande quantidade de microorganismos ou partículas excessivamente grandes.

Na análise comparativa do fibrinogênio plasmático nos grupos estudados, foi possível observar uma hiperfibrinogemia, o qual teve um aumento quase duas vezes maior quando comparado com os animais do grupo controle. A justificativa deste aumento está associada ao processo inflamatório característico da enfermidade. Segundo Jain (1993), os valores de normalidade para o fibrinogênio nesta espécie estão compreendidos entre 100 a 400 mg/dL. Este aumento está próximo do encontrado por Benjamin (1978), o qual avaliou animais com piometra e obteve valores em torno de 600 mg/dL.

Evidenciou-se um aumento exponencial da PCR, como visto na Tabela 1. A concentração sérica desta proteína foi quase nove vezes maior quando comparadas aos animais controle.

Eckersall et al. (1991) relatam em seus estudos que valores séricos da PCR em cães, baixos ou indetectáveis, são indicativos de ausência de processos patológicos. Esta observação é corroborada com a verificada nos animais do grupo controle.

Esta proteína produzida no organismo das cadelas foram resultado de alterações imunológicas, bem como neuroendócrinas e metabólicas (DABROWSKI et al., 2007), como consequência da infecção uterina mediada pela presença de agentes infecciosos. Vale salientar que esta resposta é uma condição de imunidade não específica (DABROWSKI et al., 2007). O presente resultado evidencia, também, o potencial uso deste indicador na avaliação de cadelas com piometra.

Poucos trabalhos relatam a associação da PCR com a piometra em cadelas (DABROWSKI et al., 2007) e são inexistentes trabalhos relacionando esta enfermidade com o fibrinogênio. Nenhum trabalho fora encontrado evidenciando a relação existente entre estes indicadores com o leucograma, uma vez que estes são rotineiramente utilizados na avaliação de animais com tal condição clínica e outras infecções e inflamações.

Com base nos resultados, a associação encontrada na matrix de correlação permite grande possibilidade de utilizar estes diferentes indicadores de reação inflamatória como parâmetro complementar na avaliação clínica. Assim sendo, a medida do fibrinogênio, bem como da PCR como marcadores de inflamação deveria ser encorajada na rotina clínica de cadelas com piometra.

Conclusão

Análises do leucograma, fibrinogênio e proteína C reativa podem ser recomendadas como exames coadjuvantes para o diagnóstico de cadelas com piometra. Julgando-se pela facilidade e praticidade da realização destes diferentes testes, recomenda-se tanto o fibrinogênio quanto a PCR para o diagnóstico desta condição clínica.

Referências Bibliográficas

- CASPI, D.; BALTZ, M.; SNEL, F.; GRUYS, E.; NIV, D.; BATT, R. M.; MUNN, E. A.; BUTTRES, N.; PEPYS, M. B. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. **Immunology**, v.53, p.307-313, 1984.
- DABROWSKI, R.; WLADYSLAW W. W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with piometra. **Theriogenology**, v.67, p.321–327, 2007.
- ECKERSALL, P.D.; CONNER, J.G.; HARVIE, J. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. **Veterinary Research Communication**, v.15, p.17-24, 1991.
- ETTINGER, J.S. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. São Paulo: Manole, 1997. 840p.
- JAIN, N.C. **Essentials of veterinary haematology**. Pnnsylvania: Lea & Febiger, 1993. 989p.
- KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5. ed. Philadelphia: Academic Press, 1997. 932p.
- NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo: Varela, 1994. p.35-50.

SANTOS, W.B.; MESQUITA, E. T.; VIEIRA, R.M. R.; OLEJ, B.; COUTINHO; AVEZUM, A. proteína C-Reativa e Doença Cardiovascular. As Bases da Evidência Científica. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.80, n.4, p.452-6, 2003.
 SAS INSTITUT. **SAS User's Guide**: Statistics Cary, 2000.
 YAMAMOTO, S.; TAGATA, K.; NAGAHATA, H.; ISHIKAWA, Y.; MORIMATSU, M.; NAIKI, M. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.329–339, 1992.

Tabela 1 - Valores médios, desvios-padrão, medianas, percentis (P₂₅ e P₇₅) e nível de probabilidade do leucograma e indicadores de reação inflamatória (fibrinogênio plasmático e proteína C reativa sérica) de cadelas com e sem piometra.

Parâmetros	Condição Clínica		Pr > F
	Sem Piometra	Com Piometra	
Leucócitos (/μL)	11720,0±2391,71	24415,0±9141,51	<0,0001
Mielócitos* ¹ (/μL)	0,0 (0;0)	0,0 (0;0)	
Metamielócitos* ¹ (/μL)	0,0 (0;0)	0,0 (0;832)	0,0090
Bastonetes* ¹ (/μL)	0,0 (0;0)	1398,00(0;5520)	<0,0001
Neutrófilos Segmentados (/μL)	8513,0±1974,66	17546,0±6329,83	<0,0001
Eosinófilos* ¹ (/μL)	270,0 (0;480)	0,0 (0;1380)	0,0398
Basófilos* ¹ (/μL)	0,0 (0;0)	0,0 (0;0)	
Linfócitos** ¹ (/μL)	2672,4±490,88	4025,3±1386,26	0,0040
Monócitos** ¹ (/μL)	316,0 (82;720)	589,0 (74;2300)	0,0034
Fibrinogênio (mg/dl)	326,67±96,12	630,00±203,67	<0,0001
PCR (mg/L)***	0,11±0,08	0,91±0,21	<0,0001

* Estatística de dados transformados em Raiz (x + 1);

** Estatística de dados transformados em Log x; ¹Medianas e Percentis (P₂₅ e P₇₅).

*** Proteína C Reativa

Tabela 2 - Matriz de correlação linear do leucograma, fibrinogênio e proteína C – reativa de cães com e sem piometra.

	Leuc.	Bast.	Neutr. Seg.	Linf.	Mon.	Fibr.	PCR*
Leucócitos (/ μ L)	1	0,83** 0,0001***	0,99 0,0001	0,81 0,0001	0,80 0,0001	0,53 0,0002	0,65 0,0001
Bastonetes (/ μ L)		1	0,78 0,0001	0,50 0,0005	0,78 0,0001	0,53 0,0002	0,60 0,0001
Neut. Seg. (/ μ L)			1	0,79 0,0001	0,76 0,0001	0,54 0,0002	0,67 0,0001
Linfócitos (/ μ L)				1	0,54 0,0001	0,36 0,0161	0,50 0,0005
Monócitos (/ μ L)					1	0,40 0,0068	0,43 0,0068
Fibrinogênio (mg/dL)						1	0,70 0,0001
PCR (mg/L) ¹							1

PCR = Proteína C – Reativa

** Valor do “r” da correlação de Pearson

*** Nível de significância da correlação