

CLEYTON CHARLES DANTAS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA, FIBRINOGENIO E
LEUCOGRAMA EM**

CADELAS COM PIOMETRA

Recife – PE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

CLEYTON CHARLES DANTAS CARVALHO

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA, FIBRINOGENIO E
LEUCOGRAMA EM**

CADELAS COM PIOMETRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Clínica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Eneida Willcox Rego

Recife - PE

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

CDD 636.76075

1. Proteínas de fase aguda
 2. Proteína C reativa (PCR)
 3. Diagnóstico
- I. Soares, Pierre Castro
 - II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA, FIBRINOGENIO E
LEUCOGRAMA EM**

CADELAS COM PIOMETRA

Dissertação elaborada e defendida por:

CLEYTON CHARLES DANTAS CARVALHO

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

.....

Prof. Dr. Pierre Castro Soares

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

.....

Prof^a. Dr^a. Eneida Willcox Rêgo

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

.....

Prof^a. Dr^a. Carla Lopes de Mendonça

Clínica de Bovinos de Garanhuns da UFRPE

.....

Prof^a. Dr^a. Silvana Suely de Assis Rabelo

Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Entre a Medicina humana e a dos animais não há linha divisória - nem pode haver. O objetivo pode parecer diferente, mas a experiência conseguida constitui a base de toda a Medicina.

RUDOLF WIRCHOW

DEDICATÓRIA

A Deus, que me escutou, nos meus ínfimos pensamentos, amparando-

me e dando-me energia para caminhar, prosseguir nos meus ideais de vida e na minha concepção de cidadão. Acredito que nada acontece por acaso, tudo tem um pouco de luz cósmica que nos faz prosseguir. Sinto-me grato e feliz no final desta jornada.

À minha mãe, Maria Alice Dantas Carvalho pela vida, e pelo que sou.

À minha irmã, Cleytiane Dantas Carvalho, à minha orientadora Eneida Willcox Rêgo e parentes pelo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente em minha vida; pelo dom da vida e oportunidade para realizar meus sonhos;

À minha família, especialmente a minha mãe que sempre

compartilhou comigo alegrias e tristezas;

À professora Dra. Eneida Willcox Rêgo por ter-me acompanhado com carinho durante a minha pós-graduação, ajudando-me a crescer como pessoa e profissionalmente, auxiliando-me e orientando-me em tudo;

Ao Professor Pierre Castro Soares, pela a sua valiosa cooperação nas sugestões e correções deste trabalho;

Ao Médico Veterinário Dr. João Emílio Cruz, homem de notória sabedoria, simples e sempre amigo.

Aos Médicos Veterinários Josinaldo Macedo, Andréia Cruz e Ana Luiza da Clínica Veterinária de Olinda – PE, pelo apoio e contribuição nas atividades realizadas;

À professora Maria do Carmo de Souza Batista (Carminha), pela contribuição no processo de formação acadêmico;

Ao professor Mestre Antonio Francisco de Sousa por pelo apoio e incentivo a estagiar no Hospital Veterinário da UFPI na área de Patologia Clínica Veterinária;

Ao Professor Dr. Marcelo Campos Rodrigues pelo incentivo e motivação aos alunos frente satisfação de fazer parte de um dos melhores cursos de graduação em Medicina Veterinária do Brasil;

Ao Professores Manoel Henrique e Roselir Klein e Socorro pelo incentivo e apoio durante o período de estágio extracurricular na Universidade Paulista São Paulo, Botucatu;

A laboratorista Paula Francinete, que ofereceu valiosa cooperação em atividades realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Piauí;

A Universidade Federal Rural de Pernambuco por ter me proporcionado às condições necessárias à minha formação de mestre;

Estes agradecimentos são extensivos aos demais colegas, professores e funcionários do curso de Medicina Veterinária pela simpatia, cordialidade e disponibilidade para prestar auxílio sempre que necessário.

RESUMO

CARVALHO, C. C. D. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com piometra [Assessment of C-reactive protein, fibrinogen and leukogram in bitches with pyometra]. 2008. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.

Com o objetivo de avaliar o perfil sanguíneo do fibrinogênio, da proteína C reativa (PCR) e do leucograma, além verificar as possíveis correlações entre estes indicadores clínicos em cadelas clinicamente saudáveis e com piometra, foram constituídos dois grupos, sendo um sem piometra (n=15) e outro com piometra (n=30). Coleta de sangue foi obtida por venopunção, para obtenção de soro, plasma e sangue total, sendo estes utilizados na determinação das variáveis. A PCR quantitativa foi determinada pelo método ultra-sensível turbidimétrico. Observou-se que o número total de leucócitos, metamielócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos, além do fibrinogênio e PCR foram maiores para o grupo de animais com piometra, enquanto que os valores de eosinófilos foram menores para este mesmo grupo. Alta correlação positiva foi observada entre o fibrinogênio e PCR e este último com parâmetros do leucograma. Pode-se concluir que análises leucométrica, do fibrinogênio e proteína C reativa podem ser recomendadas como exames coadjuvantes no diagnóstico do processo inflamatório de cadelas com piometra. Julgando-se pela facilidade e praticidade da realização destes diferentes testes, recomenda-se o fibrinogênio seguido da PCR para o diagnóstico desta condição clínica.

Palavras-chave: Proteínas de Fase Aguda, Proteína C Reativa (PCR), Diagnóstico.

ABSTRACT

CARVALHO, C. C. D. **Assessment of C-reactive protein, fibrinogen and leukogram in bitches with pyometra** [Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com piometra]. 2008. 39f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária,

To evaluate the profile of blood fibrinogen, serum C-reactive protein (CRP) and leukogram, besides checking the possible correlations loved these indicators laboratory in bitches clinically healthy and without pyometra, two groups were formed, one without pyometra (n = 15) and another with pyometra (n = 30). Collection of blood was obtained by venous puncture to obtain serum, plasma and whole blood, which are used in determining the variables. The quantitative PCR was determined by ultra-sensitive turbidimetric method. It was observed that the total number of leukocytes, metamyelocytes, band cells, segmented neutrophils, lymphocytes, and monocytes, in addition to fibrinogen and CRP were higher for the group of animals with pyometra, while the values of eosinophils were lower for the same group. High positive correlation was observed between CRP and fibrinogen and the latter with parameters of leukogram. It can be concluded that leukocytes analysis of fibrinogen and C-reactive protein may be recommended as coadjutants examination in the diagnosis of the inflammatory process of bitches with pyometra. Judging by the ease and practicality of holding these different tests, it is recommended the fibrinogen followed by PCR for the clinical diagnosis of this condition.

Works-Key: Acute Phase Proteins, C-Reactive Protein (CRP), Diagnosis

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1	Valores médios, desvios-padrão, medianas, percentis (P ₂₅ e P ₇₅) e nível de probabilidade de parâmetros do leucograma de cadelas com e sem piometra	25
TABELA 2	Valores médios e desvios-padrão e nível de probabilidade de indicadores de reação inflamatória (fibrinogênio plasmático e proteína C reativa sérica) de cadelas com e sem piometra	

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1	Valores médios e de medianas de parâmetros do leucograma de cadelas com e sem piometra.....	26
FIGURA 2	Valores médios quantitativos da proteína C reativa e fibrinogênio de cadelas com e sem piometra.....	27

LISTAS DE ABREVIATURAS

ANIT-PCR	Anticorpo- Proteína C-Reativa
CP	Ceruloplasmina
EDTA	Acido Etileno Diamino Tetra Acético
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
F	Fibrinogênio
FP	Fibrinogênio Plasmático
HCE	Complexo de Hiperplasia Cistica Endometrial
HP	Haptoglobulina
IL – 6	Interleucina - 6
mg/L	miligrama por litro
mg/mL	miligrama por mililitro
mg/dl	miligrama por decilitro
mL	mililitro
ng/mL	nanograma por mililitro
OSH	Ovariosalpingehisterectomia

PAS	Proteína Amiloide Sérica
PCR	Proteína C-Reativa
PLM	Proteína Ligante de Manose
PPT	Proteína Plasmática Total
RPLA	Aglutinação Reversa em Látex
SDS-PAGE	Gel de Policrilamida Sulfato Duodecil Sódio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO E REVISAO DE LITERATURA.....	14
1.1	Piometra	14
1.2	Proteína C Reativa.....	16
1.3	Características Bioquímicas.....	17
1.4	Alterações na Concentração da PCR Canina.....	19
1.5	Diagnóstico de Doenças.....	19
1.6	Fibrinogênio	19
1.7	Leucograma.....	20
2	OBJETIVOS.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1	Animais.....	24
3.2	Coleta das amostras de Sangue.....	24
3.3	Determinação do Leucograma.....	25
3.4	Determinação do Fibrinogênio.....	25
3.5	Determinação do Proteína C Reativa	25
3.6	Análise Estatística.....	25
4	RESULTADOS.....	26
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÕES.....	34

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Piometra

A piometra canina, também denominada complexo hiperplasia cística endometrial (HCE) – é uma enfermidade da cadela adulta caracterizada pela inflamação do útero com acúmulo de exsudatos, que ocorre na fase lútea do ciclo estral e que pode ser disseminada para vários sistemas do organismo (HIDALGO et al., 1986; SMITH, 2006; BARTOSKOVA et al., 2007).

É uma síndrome aguda ou crônica (JOHNSTON et al., 2001), cuja patogenia ainda não é completamente entendida, apesar de décadas de estudo direcionados à etiologia da doença (HIDALGO et al., 1986). Esta enfermidade ocorre devido a alterações hormonais e, geralmente, está associada a infecções bacterianas (GOBELLO, 2006). Também é mediada por uma resposta exagerada ao estímulo da progesterona, que resulta em uma invasão bacteriana e em conseqüentes anormalidades no endométrio (GANDOTRA et al., 1994). A sua fisiopatogenia é distinta de outras infecções uterinas, como a metrite pós-parto, que ocorrem em outros estágios do ciclo reprodutivo. Acredita-se que as bactérias sejam microorganismos oportunistas que ascendem desde a vagina (SMITH, 2006).

A *Escherichia coli* é a principal bactéria isolada associada à piometra, sendo em 59% a 96% dos casos (FRANSSON e RAGLE, 2003; TSUMAGARIA et al., 2005; SMITH, 2006). Esta patologia ocorre mais comumente em cadelas adultas, de sete a oito anos de idade. Após nove anos, a prevalência da infecção pode chegar a mais de 60 % em cadelas

inteiras (GOBELLO et al., 2003). Em cadelas com idade inferior a seis anos, o aparecimento da enfermidade esta associado com a administração exógena de estrógenos para prevenir a gestação (FERREIRA e LOPES, 2000; GOBELLO et al., 2003).

Os sinais clínicos variam de acordo com a competência da cérvix. O sintoma característico da piometra de cérvix aberta é uma descarga vulvar inodora de consistência mucosa a purulenta a coloração variável (JOHNSTON et al., 2001; WANKE e GOBELLO, 2006). Na forma fechada, não há presença de corrimento vaginal havendo, portanto acúmulo de material no útero, caracterizando por um e abdômen abaulado (FRANSSON e RAGLE, 2003; WANKE e GOBELLO, 2006).

O diagnóstico é sugestionado pela história clínica e pelos achados físicos. O aumento de volume pode ser papável, mais se preconiza sua comprovação por radiografia ou ultra-sonografia (FOSSUN, 2001). Os efeitos sistêmicos da piometra podem ser refletidos em exames laboratoriais, de acordo com Ettinger (1997), onde a contagem de células brancas em cadelas com piometra é variável, geralmente uma neutrofilia absoluta (usualmente acima de 25.000 células/mm³) 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. Entretanto, alguns resultados demonstram que nem sempre há leucocitose, e que o diagnóstico definitivo pode não ser correto, se depender exclusivamente do achado de leucocitose e da contagem diferencial dos leucócitos (FALDYMA et al., 2001).

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” (DINARELLO, 1984). A resposta de fase aguda induz às respostas localizadas e sistêmicas (BENJAMINI et al., 2002), que envolvem mudanças nas funções metabólicas, endócrinas, neurológicas, imunológicas e alterações nos níveis de algumas proteínas plasmáticas (DABROWSKI et al., 2007). Essas proteínas são produzidas no fígado e têm sua síntese diminuída ou aumentada durante a resposta inflamatória (ECKERSALL et al., 1989).

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 α -1-antitripsina, e a α -1-glicoproteína sérica. Dessas proteínas, as mais investigadas na medicina veterinária são as proteínas C-Reativa em cães, a α -1-glicoproteína e a haptoglobina em felinos, a haptoglobina em ruminantes e em suínos a PCR e Hp (YAMAMOTO, et al., 1992).

De acordo com Eckersall (1989), a determinação da concentração plasmática de algumas dessas proteínas de fase aguda ajuda, clinicamente, visa 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) tem sido introduzido. De acordo com Yamamoto et al. (1992) a dosagem da PCR é um método de análise específico e viável para cães.

O fibrinogênio plasmático é outro bom indicador de resposta a uma infecção aguda, cujo aumento é freqüentemente observado em processos inflamatórios e infecciosos de cães (KANEKO, et al., 1997), pois uma de suas funções é limitar a invasão do agente infeccioso.

1.2. Proteína C Reativa

A PCR tem sido utilizada rotineiramente em medicina humana no diagnóstico de processos inflamatórios ativos. A identificação de sua similaridade em cães (DILLMAN E COLES 1996) gerou algumas publicações científicas quanto às suas características também em outras espécies (ECKERSALL et al. 1991).

Sua determinação é usada como indicador de processos inflamatórios agudos de origem bacteriana ou ainda de destruição tecidual (BENJAMINI et al., 2002). Em humanos a PCR é uma proteína típica de fase aguda, os seus níveis plasmáticos aumentam drasticamente em resposta a uma injúria tecidual, infecção ou reação inflamatória e diminui com a

recuperação do paciente (YAMAMOTO, et al., 1992). Sugere importante papel da PCR na defesa inespecífica do hospedeiro, devido à remoção dos restos necróticos ou danificados no processo inflamatório, tanto de microorganismos como do próprio hospedeiro, permitindo, assim, a reparação tecidual. É interessante observar que a ligação da PCR às membranas celulares se dá apenas após a ruptura destas (KUSHNER, 1991).

A PCR foi originalmente detectada no soro humano por sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo C do pneumococo na presença da Ca^{++} . Essa proteína parece desempenhar importante papel biológico, pois é uma proteína conservada entre vertebrados e apresenta rápida e intensa elevação durante a reação de fase aguda. Além disso, ainda não foram descritos indivíduos com deficiência dessa proteína (BAUMANN, 1994).

O papel da proteína de fase aguda, como a PCR, é limitar a inflamação, remover fatores ocasionais de danos celulares e restaurar a homeostase (BIGOSZEWSKI et al, 2001). Poucos são os relatos científicos designados a avaliar a utilidade da determinação da PCR para monitorar cadelas com piometra, visto que se verifica uma escassez de informações a respeito deste indicador bioquímico sendo utilizado no diagnóstico e monitoramento clínico de cadelas com piometra, retificando-se, portanto, a importância de se estudar e avaliar sua viabilidade em termos de praticidade e custo-benefício no diagnóstico de cadelas com esta condição clínica.

1.3. Características Bioquímicas

A PCR é uma globulina que devido a sua concentração normal encontra-se dentro dos chamados componentes menores do plasma, migrando na fração beta. Essa proteína é capaz de reagir com substâncias como ácido desoxirribonucléico (DNA), nucleotídeos, vários lipídios e polissacarídeos (HENRY, 1996).

É possível que um dos primeiros estudos realizados sobre a PCR em cães tenha sido feito por Dillman e Coles (1996). Esses autores submeteram alguns animais a vários estímulos inflamatórios e utilizando a técnica de aglutinação em látex, com anticorpo anti-PCR humana, e

perceberam um comportamento similar àquele observado em humanos.

Isolando a PCR canina em coluna de Sephacryl S-300 e através de cromatografia de filtração em gel, Caspi et al. (1984) determinaram pesos moleculares mais elevados, de aproximadamente 155 a 157 Kda, utilizando as técnicas de filtração em gel de eletroforese em gel de poliacrilamida sulfato duodecil sódio (SDS-PAGE), respectivamente.

Outros pesquisadores a estudarem essa proteína na espécie canina foram Fujise et al. (1992), que isolaram utilizando a técnica de filtração em gel após cromatografia de afinidade com fosforicolina, obtendo resultado de isolamento superior ao encontrado por Yamamoto et al. (1992). Através da técnica de SDS-PAGE, os primeiros autores identificaram, no principal padrão eletroforético, a presença de duas diferentes subunidades com 21,5 e 25,8 kDa cada e utilizando a técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) verificaram que a maior das subunidades eram glicolizadas.

Algumas técnicas já foram utilizadas na determinação da PCR, como a imunodifusão (RILEY e ZONTINE, 1972) e o eletroimunoensaio (CASPI et al. 1984) e, a partir dos inúmeros trabalhos que começaram a ser realizados sobre essa proteína, outras técnicas passaram a ser criadas ou modificadas.

Eckersall et al. (1989) desenvolveram uma técnica de ELISA sensível, precisa e prática que possibilitava o processamento de várias amostras ao mesmo tempo, o que tornava essa técnica mais efetiva que as demais anteriormente utilizadas. Uma outra vantagem corresponde a possível utilização em outras espécies bastando, no entanto, substituir o anticorpo utilizado por um específico. A sensibilidade desta técnica era de no mínimo 2,5 ng/mL de soro.

Com o objetivo de criar uma técnica automática e que pudesse ser utilizada na rotina da PCR canina, Eckersall et al. (1991) adaptaram o ensaio imunoturbidimétrico utilizado em humanos para a sua aplicação em cães e outros animais. Quando comparado ao ELISA esse método obteve uma correlação significativa de 0,88 ($p < 0,001$), com a conveniência de consumir menos tempo para a sua realização. Porém, o mesmo problema quanto às amostras séricas e imobilizadas e amostras plasmáticas com heparina foram encontrados. A sensibilidade deste teste foi de 1mg/L.

Yamamoto et al. (1993) investigaram a possível utilização da técnica de aglutinação reversa em látex (RPLA), como um ensaio semi-quantitativo, considerando-a mais rápido que o teste de ELISA.

Apesar das técnicas estarem desenvolvidas, Fujise et al. (1992) julgaram que os Kits comerciais disponíveis, todos fabricados a partir da PCR humana, dificultavam a determinação da proteína C reativa na rotina laboratorial veterinária uma vez que ocorria reação parcial entre soro anti-PCR humana e a PCR canina.

Isso foi avaliado também por Yamamoto et al. (1993), que testando soros anti-PCR canina com a PCR humana e soros anti-PCR humana com a PCR canina, através das técnicas de imunofluorescência e Western Blotting, verificaram que a PCR canina e a humana não compartilhavam dos mesmos determinantes antigênicos apesar de semelhantes. Assim, estes autores concluíram que para a obtenção dos valores reais na determinação da PCR canina era necessário isolá-la e desenvolver soro anti-PCR específico, com exceção das técnicas de eletroimunodifusão e ELISA desenvolvidas com a PCR humana, as quais não sofriam alterações significativas.

1.4. Alterações na Concentração da PCR Canina

Em cães, valores séricos da PCR baixos ou indetectáveis são indicativos de ausência de processos patológicos. Contudo, em uma variedade de casos clínicos e em animais aparentemente normais, a ocorrência de concentração alta dessa proteína pode indicar ao clínico a presença de processos inflamatórios ocultos (ECKERSALL, et al., 1989; DABROWSKI et al., 2007).

1.5. Diagnóstico de Doenças

A avaliação da PCR canina no monitoramento e na determinação de recuperação à infecção por *Leptospira spp.*, foram investigadas por Caspi et al. (1987) que constataram um aumento rápido da concentração dessa proteína na infecção. Yamamoto et al. (1993) utilizaram da PCR em outras doenças infecciosas como parvovirose e a enterite bacteriana. Esses autores

ainda observaram que cães com doenças dérmicas e outros com gengivite, tiveram leves aumentos nas concentrações séricas da PCR, enquanto aqueles com gastroenterites, doenças oculares, raquitismo ou nefrites, obtiveram aumentos bem mais severos nas suas concentrações.

1.6. Fibrinogênio Plasmático

O fibrinogênio plasmático é um polipeptídeo complexo produzido pelo fígado e constituído por três diferentes pares de cadeias. Sua meia vida na circulação aumenta por vários dias, atingindo um pico entre o quinto e sétimo dia (SCHALM et al., 1975) tendo um gene que codifica no cromossomo quatro (SAITO, 1996). Além de sua importância primária como proteína de coagulação, é também uma proteína de fase aguda da inflamação. Sua síntese pode aumentar até 20 vezes com um grande estímulo inflamatório (ALMEIDA, 2006).

A concentração plasmática desta proteína eleva-se sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e 6) e do fator de necrose tecidual liberado pelo processo inflamatório (ANDREWS et al., 1994; ALMEIDA, 2006).

Esta proteína não é afetada pela idade, sexo, exercício ou hemorragia, e sim por estados inflamatórios moderados e processos supurativos (JAIN, 1993). Segundo Schalm et al., (1970) o grau de hiperfibrinogenemia pode refletir o grau de severidade da inflamação. O fibrinogênio plasmático é um bom indicador de resposta a uma infecção aguda, cujo aumento é freqüentemente observado em processos inflamatórios e infecciosos de cães, pois uma de suas funções é limitar a invasão do agente infeccioso (KANEKO et al., 1997).

Para cães, o valor de normalidade é compreendido entre 100 e 500 mg/dL (SCHALM et al., 1975). Valores superiores podem indicar processo inflamatório desde que a hemoconcentração não esteja presente (SUTTON e JOHNSTONE, 1977). Para se detectar um aumento absoluto do fibrinogênio recomenda-se o cálculo da relação proteína plasmática e fibrinogênio (PPT:F) (SUTTON e HOBMAN, 1975).

Em função da relevância dos níveis plasmáticos de fibrinogênio,

importante é considerar o estudo da sua concentração em cadelas com e sem piometra, em associação com a proteína C reativa, a qual é considerada um marcador sensível de fase aguda de processos inflamatórios subjacentes.

1.7. Leucograma

Os exames hematológicos estão entre os mais práticos, econômicos e de maior utilidade na prática clínica. Isto porque o tecido sanguíneo tem por função principal manter a homeostase corpórea; deste modo é um “espelho” do animal no momento da coleta (LOPES et al., 1996). Na hematologia clínica o leucograma destaca-se como importante recurso auxiliar no estabelecimento do diagnóstico, na dedução do prognóstico e na conduta clínica, permitindo inclusive a avaliação das enfermidades e orientação de tratamentos (RADOSTITS et al., 2002).

O estudo da disposição leucocitária é muito importante nas investigações da reação do organismo animal, principalmente quando relacionados com agentes tóxicos e infecciosos (MATOS et al., 1995). A análise do resultado leucocitário dá-nos idéia da evolução e gravidade de um processo patológico, sistêmico ou localizado, nos animais domésticos (MEYER et al., 1995), pois refletem o estado de saúde do animal, como nos processos infecciosos bacterianos ou viróticos, além dos processos neoplásicos e traumas teciduais (VIEIRA, 1982).

Há uma grande variação na resposta leucocitária nas espécies animais. O cão responde violentamente às infecções e às demais condições de “estresse” (VIEIRA, 1982).

Matos et al. (1995) relatam que cães e gatos respondem com mais intensidade aos processos infecciosos. Assim, freqüentemente encontram-se valores de 30.000 leucócitos/ μ L de sangue ou mais, havendo citações de achados de até 100.000 leucócitos/ μ L de sangue. O leucograma ainda pode ser utilizado para estabelecer a necessidade de testes adicionais, como por exemplo, à biopsia de medula óssea, monitoramento de resposta à quimioterapia, radioterapia ou outros tipos de terapia (BIRGEL, 1982).

Sem dúvida, as leucometrias globais e específicas, se interpretadas adequadamente, são elementos valiosos para a confirmação ou

afastamento de diagnóstico presuntivo e também ajudam na elaboração de um prognóstico mais acurado, no entanto é importante salientar que ao eleger o hemograma como recurso auxiliar para elucidação de um caso clínico, é necessário entender-se que esta ou qualquer outra análise laboratorial, nunca deverá substituir o exame clínico (COLLES, 1984).

Alterações quantitativas encontradas são indicativas de resposta leucocitária à inflamação (NAVARO et al., 1994). Essa resposta varia com a causa, intensidade, localização da inflamação, espécie e idade do animal. Após a medula sofrer estímulos durante um processo inflamatório, o leucograma é caracterizado por leucocitose por neutrofilia, aumento da relação neutrófilos: linfócitos e desvios à esquerda dentro de aproximadamente três dias. (SCHULTZE, 2000). Entretanto, a leucocitose por neutrofilia de origem inflamatória deve ser diferenciada da leucocitose fisiológica e por estresse (SCHULTZE, 2000), uma vez que um simples estado de agitação poderia aumentar drasticamente os neutrófilos em cães saudáveis e isso não implicaria necessariamente numa doença (COLLES, 1984).

Na leucocitose fisiológica ocorre neutrofilia transitória sem desvio à esquerda devido à mobilização do pool marginal de neutrófilos com resposta à liberação da epinefrina. Um aumento do número de leucócitos por estresse induz um quadro caracterizado por neutrofilia sem desvio à esquerda, linfopenia e/ou eosinopenia e/ou monocitose. A neutrofilia de origem inflamatória ocorre pela mobilização da reserva da medula óssea e diminuição da diapedese. A linfopenia pelo seqüestro de linfócitos e linfólise de linfócitos T e no tecido linfóide, a eosinopenia ocorre pela diminuição do influxo de células da medula óssea e diminuição do efeito quimiotático da histamina para os eosinófilos (JAIN, 1993; SCHULTZE, 2000).

2. OBJETIVOS

2.1. Avaliar os níveis plasmáticos de fibrinogênio em cadelas com e sem piometra;

2.2. Avaliar quantitativamente a proteína C reativa em cadelas com e sem piometra;

2.3. Caracterizar o perfil leucométrico de cadelas com piometra;

2.4. Verificar as possíveis correlações entre os níveis plasmáticos de fibrinogênio, séricos da PCR e parâmetros do leucograma de cadelas com e sem piometra.

2.5. Avaliar a aplicação do teste Turbidimétrico quantitativo da proteína C reativa como método rápido e eficaz, a fim de indicá-lo como eficaz indicador bioquímico de reação inflamatória em cadelas com piometra.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizadas 45 cadelas (*Canis familiaris*), procedentes de diferentes Municípios do Estado de Pernambuco, com faixa etária de dois a doze anos, de diferentes raças e pesos. Todos os animais foram oriundos de uma unidade clínica particular sediada no Município de Olinda – PE.

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 higidez após análise clínica e laboratorial.

3.2. Coleta das Amostras de Sangue

Amostras de sangue foram obtidas por meio da venopunção da jugular externa, utilizando-se sistema de coleta a vácuo. Para a determinação do leucograma e fibrinogênio, o sangue foi coletado em tubos contendo solução a 10 % de EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetra Acético), enquanto que para a quantificação da PCR utilizaram-se tubos sem anticoagulante para a obtenção do soro.

As amostras sem anticoagulante foram mantidas a temperatura ambiente e aproximadamente dez minutos da coleta foram centrifugadas por seis minutos a 3.000 rpm, para obtenção do soro. Posteriormente este foi aliquotado e armazenado à -20°C, em tubos plásticos até a realização das análises da PCR.

3.3. Determinação do Leucograma

A contagem do número total de leucócitos foi efetivada em hemocítômetro utilizando a câmara de Neubauer, segundo técnica descrita por Jain (1993), 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 (MATOS et al., 1995) e leitura em microscópio óptico em objetiva de imersão.

3.4. Determinação do fibrinogênio

A determinação do fibrinogênio plasmático foi realizada pela técnica precipitação a 56° C, segundo Jain, (1993).

3.5. Determinação da Proteína C Reativa

Foram determinadas 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 Biotecnia Instruments).

3.6. Análise Estatística

Os dados foram tabulados e avaliados, inicialmente, quanto à sua distribuição normal, utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis sem distribuição normal foram transformadas pela raiz quadrada de $X + 1$. Por conseguinte, os dados normais ou transformados 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, segundo Sampaio (1998). 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%.

4. RESULTADOS

Os resultados do leucograma, PCR e fibrinogênio plasmático encontram-se nas Tabelas 1 e 2. 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.

Tabela 1 – Valores médios, desvios-padrão, medianas, percentis (P_{25} e P_{75}) e nível de probabilidade do leucograma de cadelas com e sem piometra

em piometra

s	o	Co
	Clínica	Sem Pio
Com Piometra		/
$\pm 9141,51$	Leucócitos (μL)	$11720,0 \pm 239$
$< 0,0001$	Mielócite	$s^{*1} (/ \mu\text{L})$
$0; 0$	tamielócite	$s^{*1} (/ \mu\text{L})$
$0 (0; 832)$	Bastonete	$s^{*1} (/ \mu\text{L})$
$0 (0; 5520)$	os Segmentados	$8513,0 \pm 197$
$\pm 6329,83$	Eosinófilos ^{*1}	$(/ \mu\text{L})$
$< 0,0001$	Basófil	$s^{*1} (/ \mu\text{L})$
$0; 1380$	Linfócitos ^{**1}	$(/ \mu\text{L})$
$0,0398$	Monócitos ^{**1}	$(/ \mu\text{L})$
$0; 0$		
$0 (0; 0)$		
$3 \pm 1386,26$		
$0,0040$		

0 (74;2300) $< 0,0034$ * Estatística de dados transformados em Raiz (x + 1) ** Estatística de dados transformados em Log x¹ Medianas e P

e
r
c
e
n
t
i
s

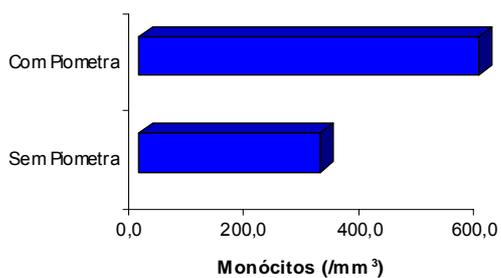
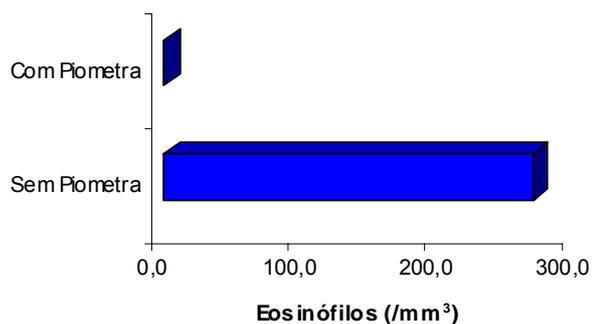
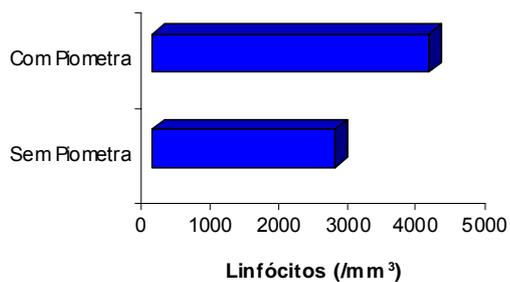
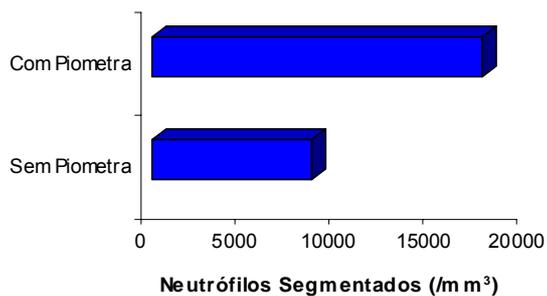


Figura 1 - Valores médios e de medianas do leucograma de cadelas com e sem piometra.

Verifica-se, na Tabela 2, 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 ($P < 0,0001$; Figura

2).

Tabela 2 – Valores médios e desvios-padrão e nível de probabilidade de indicadores de reação inflamatória (fibrinogênio plasmático e proteína C reativa sérica) de cadelas com e sem piometra

Condição Clínica	em piometra		s
	etra	piometra	
ndição Clínica	Sem Piome	tra	Com Piomera
a sérica) de	caelas c	om e sem p	iometra

s
e

m

p
iometra Condição Clínica Sem Piometra Com Pio

metra

e

Na Tabela 3 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 este últimos com os monócitos.

	Neutrófilos				
	Leucócitos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Mo
Leucócitos (/μL)	1	0,83** 0,0001***	0,99 0,0001	0,81 0,0001	
Bastonetes (/μL)		1	0,78 0,0001	0,50 0,0005	
Neut. Segmentados (/μL)			1	0,79 0,0001	
Linfócitos (/μL)				1	
Monócitos (/μL)					
Fibrinogênio (mg/dL)					
PCR (mg/L)*					

Tabela 3 – Matriz de correlação linear do leucograma, fibrinogênio e proteína C – reativa de cães com e sem piometra.

* PCR = Proteína C – Reativa

** Valor do “r” da correlação de Pearson

***Nível de significância da correlação

5. DISCUSSÃO

Com base na condição clínica de piometra aqui estudado, um aspecto importante a ser considerado é a resposta inflamatória, a qual está presente em infecções graves e processos inflamatórios que produzem ou liberam mediadores da inflamação, podendo causar alterações sistêmicas (HARDIE et al., 1990; HAGMAN et al., 2006).

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, pela presença 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).

Jain (1993) e Schultze (2000) afirmaram que o aumento do número de células imaturas na circulação sanguínea, como o aumento dos bastonetes que foram registrados neste estudo, ocorre na fase aguda ou crônica dos processos inflamatórios, devido a uma liberação mais acelerada dessas células pela medula e diminuição da diapedese, dados que são análogos ao perfil encontrado nos animais aqui estudados.

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. Uma outra particularidade é que estas células podem entrar e sair da corrente sanguínea devido a sua vida mais longa, além de poderem sofrer alterações blásticas e voltarem a se dividirem, aumentando, assim, a sua população (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; SCHULTZE, 2000). 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.

A justificativa do aumento desta proteína também pode ser associada ao aumento da síntese do fibrinogênio no fígado, após sofrer a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e IL-6) e do fator de necrose tecidual liberado pelo processo inflamatório no útero, o qual propiciou um estímulo aos hepatócitos a produzirem RNAm, induzindo a produção desta proteína de fase aguda, como já demonstrado por Andrews et al. (1994) e Almeida, (2006), os quais relataram a produção não só do fibrinogênio, mas também da PCR e amilóide sérica A.

A PCR reflete ativação do sistema imunológico e pode ser usado para avaliar a saúde de animais (DABROWSKI et al., 2007), como confirmado neste estudo, avaliando-se a condição clínica de piometra. Evidenciou-se um aumento exponencial deste indicador bioquímico, como visto na Tabela 2. A concentração sérica desta proteína foi quase nove vezes maior quando comparadas aos animais controle.

Eckersall e Conner (1989) 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 (BICKEL et al., 2002; DABROWSKI et al., 2007), como conseqüência 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.

A decisão de usar a análise do fibrinogênio e PCR como teste de rotina deve ser baseada em custo e eficácia, considerando também que estudos podem ser conduzidos no sentido de avaliar estes indicadores nas diferentes fases de evolução clínica.

Como os níveis plasmáticos de fibrinogênio e PCR aumentam em condições associadas a processo de inflamação, todos os animais do grupo com piometra manifestaram um aumento significativo destes indicadores. Seguramente não foi possível averiguar o momento característico da evolução clínica dos pacientes, porém considerando-se que esta patologia geralmente é diagnosticada em evolução bem avançada do processo, com sintomas bem característicos, verifica-se que os maiores desvios padrão foram encontrados para o indicador fibrinogênio quando comparado com o grupo de animais controle.

È fato considerar que a interpretação dos resultados laboratoriais também requer cuidadosa correlação com a história clínica e exames físicos do paciente, uma vez que processos inflamatórios ou infecciosos elevam os níveis basais de certos indicadores bioquímicos importantes na avaliação clínica, além de considerar, também, que mais de uma determinação pode ser necessária para uma correta avaliação do risco relativo de um paciente.

6. CONCLUSÕES

6.1. 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.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALMEIDA, M. A .C.; **Fibrinogênio como marcador de trombose**. São Paulo, 2006. 13 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade São Paulo (USP).

ANDREWS, D.A., REAGAN, W. J.; DeNICOLA, D.B. plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. **Continuing education for the practicing veterinarian**, v. 16, n.10, p.1349-1357, 1994.

BARTOSKOVA, A., R. VITASEK, R., L. LEVAY, R., FALDYNA, D.M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with piometra. **Journal of Small Animal Practice**, v. 48, p. 564–568, 2007.

BAUMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol Today**. p. 74-80, 1994.

BENJAMIN, M. M. **Manual de Patologia Clínica em Veterinária**. México: Limusa, 1978. 421p.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G. **Imunologia**. 4ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p. 13-139.

BICKEL, C.H., RUPPRECHT, H.J., BLANKENBERG, S., ESPINIOLA-KLEIN, C.H., SCHLITT, A., RIPPIN, G., et al. Relation of markers of inflammation (C-reactive protein, fibrinogen, von Willebrand factor, and leukocyte count) and strain therapy to long-term mortality in patients with angiographically proven coronary artery disease. **American Journal of Cardiology**, v. 89, p. 901–908, 2002.

BIGOSZEWSKI, M., RYCHLIK, A., DEPTA, A. Białka ostrej fazy u zwierząt (Acute phase proteins in domestic animals). **Med Wet**, v. 57, p. 151–154, 2001.

BIRGEL, E. H. Técnicas hematológicas de uso corrente em patologia clínica veterinária. Patologia Clínica Veterinária. **Sociedade Paulista Veterinária**, São Paulo, p. 7-23, 1982.

CASPI, D., BALTZ, M., SNEL, F., GRUYS, E., NIV, D., BATT, R. M., MUNN, E. A., BUTTRES, N. and PEPYS, M. B., 1984. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. **Immunology**, v. 53, p. 307-313, 1984.

CASPI, D.; SNEL, F. W. J. J.; BATT, R. M.; BENNETT, D.; RUTTEMAN, G. R.; HARTMAN, E. G.; BALTZ, M. L.; GRUYS, E.; PEPYS, M. B. C-reactive protein in dog. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n. 6, p. 919-621, 1987.

COLES E. H. **Patologia Clínica Veterinária**. 3ª ed. São Paulo, Manole, 1984, 469p.

DABROWSKI, R., WŁADYSŁAW WAWRON, W., KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with piometra. **Theriogenology**, v. 67p. 321–327, 2007.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response. **The New England Journal of Medicine**, v. 311, n. 22, p. 1413-1418, 1984.

DILLMAN , R. C; COLES, E. H. A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. **American Journal of Veterinary Research**, v. 27, n. 121, p. 1769-1775, 1996.

ECKERSALL, P. D., CONNER, J. G. and PATTON, H. An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. **Veterinary Record**, p. 490-491, 1989.

ECKERSALL, P.D., CONNER, J.G. and 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.

FALDYMA, M.; LAZNICKA, A.; TOMAN, M. Immunosuppression in the bitches with piometra. **Journal of Small Animal Practice**, v.45, n.1, p. 5-10, 2001.

FERREIRA, C. R.; LOPES, M. D. **Clínica Veterinária**, v. 7, p. 36-42, 2000.

FRANSSON, B. A; RAGLE, C. A. Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. **Compendium, Washington**, v. 25, n. 8, p. 602-612, 2003.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**, São Paulo, Roca, 2001, 1355p.

FUJISE, H., TAKANAMI, H., YAMAMOTO, H., OHTA, I., YAMAMOTO, S., FUKASE, T., NAIKI, M., AKI-HAMA, S., OGAWA, E. and TAKAHASHI, R. Isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 54, p. 167-169, 1992.

GANDOTRA, V. K. SINGLA, V.K.; KOCHHAR, H. P. S.; CHAUHAN. F. S.; DWIVEDI, D. Haematological and bacteriological studies in canine pyometra. **Indian Veterinary Journal**, v. 71, p. 816-818, 1994.

GOBELLO, C.; CASTEX, G.; RODRÍGUEZ, R.; CORRADA, Y. A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix piometra in the bitch. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 901-908, 2003.

HAGMAN, R., KINDAHL, H., LAGERSTEDT, A.S. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F₂ metabolite levels.

Acta Veterinary scandinavica, v. 47, n. 1, p.55-68, 2006

HARDIE, E. M.; ELLIOT, K. K. Endotoxic shock. Part I. Review of causes.
Journal Veterinary Internal Medicine, v.4, n.5, p. 256-266, 1990.

HENRY, J. B. Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.
19ª ed. EUA, **Saunders**, 1996, 1556p.

HIDALGO, C. G. COHEN, A. S., MENDES, J. V. **Reproducción de animales domésticos**. México, Editorial Limusa, 1986, 375p.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary haematology**. Pnnsylvania, Lea & Febiger, 1993, 989p.

JOHNSTON, J. R; DELAVARI, P.; KUSKOWSKI, M.; CAASTRA, W.
Phylogenetic and pathotypic similarities betewen *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in dogs and extraintestinal infections in humans.
Journal of Infection Disease. Misesota, v.15, n 183, p. 897-906, 2001.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W. & BRUSS, M. L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5ª ed. Philadelphia, Academic Press, 1997. 932p.

KUSHNER, I. C - reactive protein in rheumatology. **Arthiritis Kheum**, v. 34, p. 1065- 1068, 1991.

LOPES, S. T. A. et al.; SONIA T. A. et al. **Patologia Clínica Veterinária**. Santa Maria, RS, Universidade Federal de Santa Maria, 1996, p. 1-30.

MATOS, M. S; MATOS, P. F. **Laboratório Clínico Veterinário Médico Veterinário**. 2ª ed. São Paulo, Editora Atheneu, 1995, p. 69-218.

MEYER, D. J.; COLES, E. D.; RICH, L. J. **Medicina de laboratório veterinária: interpretação e diagnóstico**. São Paulo, Roca, 1995, 308p.

NAVARRO, C. E. K.; PACHALY, J. R. **Manual de hematologia veterinária**. São Paulo, Varela, 1994, p. 35-50.

NORDIN, G.; SAMUELSSON, I.; ANDERSON, B.; BORJESON, J. c-reactive protein: the difference between quantitation in serum and EDTA plasma. **Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation**, v. 56, p. 123-127, 1996.

RADOSTITIS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Um trabalho de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. 9ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002, p. 24.

RILEY , R. F.; ZONTINE, W. Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. **Journal of Laboratory and clinical Medicine**, v. 80, n.5, p. 698-703, 1972.

RIKIHISA, Y.; YAMAMOTO, S.; KWAK, I.; IQBAL, Z.; KOCIB, G.; MOTT, J.; CHICHANASIRIWITHAYA, W. C-reactive protein and α -1- acid glycoproteína levels in dogs infected with Ehrlichia canis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 912-917, 1994.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada à Experimentação Animal**. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998 , p. 221.

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.

SCHULTZE, D. R.; ARNOLD, P. I. Properties of four acute phase proteins: C – reactive protein, serum amyloid A protein, alfa1 – acid glycoprotein, and

fibrinogen. **Arthirits Rheum**, v. 20, p. 129 – 147, 2000.

SAITO, H. **Normal Hemostatic Mechanisms**. In: Ratnoff OD & Forbes CD, Disorders of Hemostasis, 3^a ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1996, p.23-52.

SMITH, F.O. Canine piometra. **Theriogenology**, v. 66 p. 610–612, 2006.

SCHALM, O. W. JAIN, N. C.; CARROL, E. J. **Veterinary hematology**. 3^a ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1975, 19-22p.

TSUMAGARIA, S., ISHINAZAKAA, T., KAMATAA, H., OHBAA, S., TANAKAA, S., ISHIIB, M., MEMONC, M.A. Induction of canine pyometra by inoculation of Escherichia coli into the uterus and its relationship to reproductive features. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 301–308, 2005.

VIEIRA, D. **Patologia Clínica Veterinária. Minas Gerais**. Universidade Federal de Viçosa, p. 28-33, 1982.

WANKE, M. M., GOBELLO, C. **Reproduction en Caninos y Felinos domesticos**. Buenos Aires, Intermedica editorial, 2006, p. 309-315.

YAMAMOTO, S., TAGATA, K., NAGAHATA, H., ISHIKAWA, Y., MORIMATSU, M. and NAIKI, M. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p. 329–339, 1992.

YAMAMOTO, S., SHIDA, T., MYAJI, S., SANTSUKA, H., FUJISE, H., MUKAWA, K., FURUKAWA, E., TUAGAE, T., NAIKI, M. Changes en serum C-reactive proteins levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communications**, v.17, p. 230-239, 1993.

a