

**CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE PROTEÍNA C-REATIVA EM CADELAS
HÍGIDAS, GESTANTES OU COM PIOMETRA**

SERUM CONCENTRATION OF C-REACTIVE PROTEIN IN HEALTHY,
PREGNANT AND BITCHES WITH PYOMETRA

SQUASSONI, Guilherme Fernando

Médico veterinário graduado pela UNESP/Jaboticabal

MOTHEO, Thatiana Ferguson

Doutoranda em Medicina Veterinária UNESP/Jaboticabal

FELICIANO, Marcus Antonio Rossi

Pós-doutorando em Medicina Veterinária UNESP/Jaboticabal

marcusfeliciano@yahoo.com.br

VICENTE, Wilter Ricardo Russo

Professor Titular Doutor do Departamento de Reprodução Animal UNESP/Jaboticabal



RESUMO

O objetivo foi determinar a concentração sérica de proteína C-reativa em cadelas hígdas, gestantes e com piometra, para auxílio diagnóstico. Coletaram-se amostras de 29 cadelas, divididas em três grupos: Grupo 1 - saudáveis em diestro (10); Grupo 2 - gestantes (9); e grupo 3 - com piometra (10). A concentração sérica da proteína C-reativa foi mensurada por reação de aglutinação, com o kit específico. Não houve diferença entre grupos ($p < 0,05$). Pôde-se concluir que a utilização da concentração de proteína C-reativa para o diagnóstico gestacional precoce e de piometra em cadelas não apresentou eficácia diagnóstica.

Palavras-chave: cadela, proteína C-reativa, obstetrícia

ABSTRACT

The objective was to determine serum concentrations of C-reactive protein in healthy dogs, pregnant and with pyometra, to aid diagnosis. Samples were collected from 29 dogs were divided into three groups: Group 1 - healthy in diestrus (10), Group 2 - women (9) and group 3 - with pyometra (10). The serum concentration of C-reactive protein was measured by agglutination reaction with the specific kit. There was no difference between groups ($p < 0.05$). It was concluded that the use of the concentration of C-reactive protein for diagnosis of early pregnancy and pyometra in dogs showed no diagnostic efficacy.

Key words: bitch, C-reactive protein, obstetrics

INTRODUÇÃO

As proteínas de fase aguda (APPs) são uma classe de moléculas liberadas em condições fisiológicas normais, tais como na gestação, e na presença de doenças inflamatórias. Dentre as APPs positivas, ou seja, aquelas que se elevam durante a resposta de fase aguda, a proteína C-reativa (CRP) age semelhante ao anticorpo promovendo a ativação do sistema complemento e permitindo a captação de patógenos por meio de fagócitos (TIZARD, 2002; CERÓN et al., 2005). Ainda, esta proteína

Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária é uma publicação semestral da Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Garça - FAMED/FAEF e Editora FAEF, mantidas pela Associação Cultural e Educacional de

Garça ACEG. CEP: 17400-000 - Garça/SP - Tel.: (0**14) 3407-8000
www.revista.inf.br - www.editorafaef.com.br - www.faeff.edu.br.

possui ações antiinflamatórias como inibição da produção de superóxido, degranulação neutrofílica e diminuição do acúmulo de neutrófilos em sítios inflamatórios (MARNELL et al., 2005).

Em cães, o aumento dos níveis séricos de CRP tem sido descrito em doenças infecciosas como leptospirose, babesiose e parvovirose, assim como em traumas cirúrgicos, tumores (linfoma e hemangiossarcoma), pancreatite aguda, anemia imunomediada, artrite, glomerulonefrite e inflamações experimentais (NAKAMURA et al., 2008). Sugere-se que cadelas com piometra apresentam a concentração de CRP aproximadamente nove vezes maior ao comparar com animais sadios e os valores para este mediador podem ser utilizados para averiguar a severidade do processo inflamatório nos animais acometidos por piometra antes e após o tratamento cirúrgico (DABROWSKY, 2007; CARVALHO, 2008).

Em cadelas, a ocorrência de doença inflamatória uterina durante o diestro gera dúvidas quanto ao diagnóstico diferencial entre gestação e piometra. Alguns autores comentam sobre possíveis alterações nas concentrações séricas de várias proteínas de fase aguda nessa fase do ciclo estral, incluindo a CRP (CONCANNON, 1997; KUSTRITZ, 2005). Eckersall et al. (1993), propuseram a determinação da concentração plasmática de CRP como método de diagnóstico precoce de gestação (a partir da terceira semana de gestação), baseado em sua elevação no período de implantação e desenvolvimento placentário decorrente da reação inflamatória induzida pela invasão embrionária do endométrio.

O objetivo do presente estudo foi determinar a concentração sérica de CRP em cadelas híginas, gestantes e com piometra, comparando os valores obtidos nos diferentes grupos experimentais. Também, o trabalho visa avaliar o potencial e a capacidade diagnóstica da CRP na detecção precoce da gestação e/ou a diferenciação deste processo com piometra.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas neste estudo 29 cadelas de diferentes idades e raças, pacientes do Setor de Obstetrícia da UNESP/Jaboticabal. Os animais foram submetidos à

anamnese, avaliação clínica e citologia vaginal para determinação da fase do ciclo estral. Após as avaliações, as cadelas foram divididas em três grupos experimentais:

Grupo 1 – controle: foram utilizadas dez cadelas da raça Beagle, híginas, e em início de diestro, pertencentes ao canil experimental da UNESP/Jaboticabal.

Grupo 2 – cadelas gestantes: foram utilizadas nove cadelas, provenientes de criadores comerciais das cidades da região de Jaboticabal. A confirmação da gestação foi realizada somente após nascimento dos filhotes.

Grupo 3 – cadelas com piometra: utilizaram-se dez cadelas com quadro clínico de piometra.

Todos os animais foram submetidos à punção da veia jugular externa para coleta de 4 ml de sangue. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente por aproximadamente dez minutos e posteriormente centrifugadas a 3000 rpm para a separação do soro, sendo então armazenadas em tubo tipo *ependorf* e mantidas congeladas a temperatura de - 20°C até o momento da análise.

Quantificação da concentração sérica da proteína C-reativa

A quantificação sérica da CRP foi realizada por reação de aglutinação em látex utilizando kit comercial¹. O kit tem sensibilidade para detectar concentrações de CRP de no mínimo 6,0 mg/L utilizando partículas de poliestireno de aproximadamente 0,2 micra de diâmetro, estabilizadas em tampão de pH 8,2 e sensibilizadas com anti-proteína C-reativa humana.

Para o método qualitativo, o qual foi realizado antes do semiquantitativo, utilizou-se placa quadriculada de fundo preto incluída no próprio kit. Adicionou-se, com o auxílio de uma pipeta automática, nas áreas delimitadas da placa, 0,05 mL da amostra de soro e uma gota de cada controle (negativo e positivo) em outras áreas para comparação. Em seguida, colocou-se uma gota (aproximadamente 0,05 mL) do reagente “látex PCR” previamente homogeneizado nas áreas da amostra e dos controles, procedendo-se a mistura em forma de círculo com bastão. Após dois minutos de movimentos oscilatórios realizou-se a leitura, verificando a presença ou não de

¹ Serolátex PCR – Labtest®, Ref.: 121; MS:10009010032

aglutinação macroscópica. Em caso de aglutinação, a amostra foi considerada positiva, ou seja, com concentração maior do que 6mg/L.

Em caso de amostras positivas para o teste qualitativo, realizou-se o método semiquantitativo, o qual foi feito com o preparo de diluições seriadas dessas amostras, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$ em tubos de ensaio utilizando solução salina a 0,85%. Em seguida, adicionou-se a cada área da placa 0,05 mL de cada diluição e acrescentou-se o reagente “Látex PCR” a estas, sendo considerado como título a maior diluição da amostra que apresentou aglutinação macroscópica. Para expressar o valor da concentração em mg/L, multiplicou-se o título obtido no método semiquantitativo pela sensibilidade do teste (6 mg/L).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da concentração sérica da CRP nos diferentes grupos encontram-se descritos na Tabela 1. Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo teste qui-quadrado com $p < 0,05$. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,29$).

Os resultados obtidos diferem com Kuribayashi *et al.* (2003) que constataram aumento da CRP em cadelas gestantes em relação a cadelas saudáveis de diferentes idades. Esses autores determinaram dois picos de CRP, aos 30 e 45 dias pós ovulação, variando entre 70.2 e 90.4 mg/L, entretanto não mensuraram as concentrações logo no início da gestação.

Carvalho *et al.* (2008), relataram valor médio de CRP maior em animais com piometra quando comparado a indivíduos sadios. Pesquisas anteriores demonstraram concentrações médias de CRP de 26,4 a 378,9 mg/L em cadelas acometidas pela enfermidade (FRANSSON *et al.*, 2006). No presente trabalho, somente três animais do grupo 3 apresentaram-se positivos para CRP, e apesar dos valores médios encontrados variarem de 6 a 12 mg/L, esses foram inferiores ao descritos pelos autores.

Tabela 1: Valores da concentração sérica da proteína C-reativa nos diferentes grupos.

Animal	Grupo 1 (diestro)	Grupo 2 (gestantes)	Grupo 3 (piometra)
1	Negativo*	Negativo	Negativo
2	Negativo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo
5	Negativo	Negativo	12 mg/L
6	Negativo	Negativo	Negativo
7	Negativo	Negativo	6 mg/L
8	Negativo	6 mg/L	Negativo
9	Negativo	Negativo	Negativo
10	Negativo	-	6 mg/L

*concentração sérica da proteína C-reativa inferior a 6mg/L.

Fransson (2006) e Carvalho (2008) utilizaram kits específicos para dosagem de CRP canina, por meio de teste ELISA do tipo “sanduíche sólido”, diferindo da metodologia empregada do presente estudo. Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que o teste empregado, apesar de apresentar sensibilidade para CRP, é inadequado na determinação da concentração desta proteína nas fases avaliadas, uma vez que ela pode apresentar valores inferiores a 6 mg/L. Por outro lado, Veiga et al. (2009), em estudo comparativo para a quantificação de CRP de cães utilizando o método de aglutinação em látex específico para humanos e o ELISA para cães (gold standard) demonstrou que há correlação positiva significativa entre as técnicas, concluindo que a aglutinação em látex mostrou ser um teste eficaz e clinicamente útil para a determinação semiquantitativa dos níveis de CRP na espécie canina.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a mensuração da concentração de CRP pelo teste empregado no presente estudo não apresentou resultados que permitam sua utilização como ferramenta para diagnóstico precoce de gestação e como método de diagnóstico complementar de piometra.

REFERÊNCIAS

CARVALHO, C.D.D.; RÊGO, E.W.; QUEQUE M. et al. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. **Medicina Veterinária**, Recife, v.2, p. 1-8, 2008.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; SUBIELA, S.M. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p. 85-99, 2005.

CONCANNON, P.W. A review for breeding management and artificial insemination with chilled or frozen semen. In: Proceedings of the Canine Male Reproduction Symposium Montreal, 1997, Quebec, Canada. **Proceedings...** Quebec: Society for Theriogenology, 1997. p.1-17.

DABROWSKY, R.; WAWRON, 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.; HARVEY, M.J.; FERGUSON, J.M. et al. Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.47, p. 159-164, 1993.

FRANSSON, B.A.; LAGERSTEDT, A-S.; BERGSTROM, A. et al. C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with piometra and SIRS. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 17, n. 4, p.373-381, 2006.

KURIBAYASHI, T., SHIMIDA, T.; MATSUMOTO, M. et al. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals**, v.52, n.5, p.387-390, 2003.

KUSTRITZ, M.V.R. Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. **Theriogenology**, v. 64, p.755-765, 2005.

MARNELL, L.; MOLD, C.; CLOS, T.W.D. C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. **Clinical Immunology**, v.117, n.2, p.104-111, 2005.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K. et al. C-Reactive Protein Concentration in Dogs with Various Diseases. **The Journal of Veterinary Medicine Science**, v.70, n.2, p.127-131, 2008.

TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**: uma introdução. 6 ed. São Paulo: Roca, 2002. 532p.

VEIGA, A. P. M.; OLIVEIRA, S. T.; ESTEVES V. et al. Utilização de técnica rápida de aglutinação em látex para determinação semiquantitativa dos níveis séricos de proteína C reativa em cães. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p.151-155, 2009.

