

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA LAURA PINTO D'AMICO FAM

**ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE CÃES COM NEUTRÓFILOS
TÓXICOS**

CURITIBA

2012

ANA LAURA PINTO D'AMICO FAM

**ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE CÃES COM NEUTRÓFILOS
TÓXICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich

CURITIBA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “**ASPECTOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS**” apresentada pela Mestranda **ANA LAURA PINTO D'AMICO FAM** declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata APTA para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 20 de março de 2012

Professora Dra. Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professora Dra. Elizabeth Moreira dos Santos Schmidt

Membro

Professor Dr. Ricardo Guilherme D'Otaviano de Castro Vilani

Membro

Dedico este trabalho àqueles que tentam
sempre me proporcionar de maneira fácil
o que tiveram que conquistar com tanta dificuldade:

Pai e Mãe!

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Luiz D'Amico Fam** e **Marta Maria Pinto D'Amico Fam** por compreenderem a vontade de um filho em continuar seus estudos antes da vida profissional com tanta paciência e sapiência.

Ao meu querido e amado namorado, **Tiago Augusto Souza Stella**, por se dispor a agüentar a distância e a saudade em prol de um futuro melhor e feliz, juntos.

A todos os membros da minha família que participaram deste trabalho de maneira indireta, ajudando a manter o meu psicológico no lugar através de muitas reuniões e boas risadas.

A minha orientadora, professora **Rosangela Locatelli Dittrich**, pela paciência em ler e responder inúmeros e-mails enviados ao longo desses dois anos e pela sabedoria ao transmitir seus conhecimentos. Aos demais professores, agradeço todos os ensinamentos e a amizade oferecida. Ao professor **Felipe Caron**, obrigada por tudo que me ensinou e pelas conversas sobre a vida.

A todos os meus colegas mestrandos e doutorandos. Quantas risadas, quantos choros de raiva, quantas pizzas, quantos... tudo! Um obrigado especial à **Andrea Meirelles**, **Michelly Battisti**, **Angela Coraiola** e **Raquel Cantarella**.

Aos residentes do hospital veterinário da UFPR, obrigada por devolverem as fichas pra recepção e por coletarem materiais pra pesquisa. **Amália Turner**, **Leonardo Tavernezzi**, **Daniele Mattos**, **Arícia Sprada** e **Nathália Leite**, vocês foram 10! Porém, muito mais do que 10 foi o meu amigo e residente do laboratório, **Bruno Castilhos**. Sua ajuda foi muito importante para finalizar este trabalho.

Aos funcionários da UFPR que ajudam a manter a rotina do hospital e do laboratório, como o **Olair Beltrame**, sempre tão calmo e prestativo. E à **Maria José**, obrigado por não ter brigado comigo nesses dois anos.

A **UNESP** – Jaboticabal, por ter sido acolhida e poder conhecer um pouco seus profissionais e suas pesquisas.

Um agradecimento especial àquela que me ensinou tudo sobre a melhor especialidade da Medicina Veterinária, tornando-se responsável pelos rumos que minha vida profissional tem tomado: professora **Rita Maria Venancio Mangrich Rocha**, mãezinha!

A todos os animais que participaram deste experimento. O sofrimento de vocês hoje será capaz de evitar a agonia de outros se as pesquisas continuarem em prol de um diagnóstico mais avançado!

*Quero melhorar em tudo! **Sempre!***

Ayrton Senna

RESUMO

Durante o processo de injúria tecidual, os leucócitos são recrutados para os tecidos. Quando a demanda de leucócitos ultrapassa a capacidade de armazenamento da medula óssea, aumenta a produção e maturação de neutrófilos, principal célula de defesa. Os neutrófilos com imaturidade de organelas citoplasmáticas são liberados na circulação precocemente. Estes neutrófilos são chamados de “neutrófilos tóxicos”. O capítulo I descreve as doenças que causam o aparecimento dos neutrófilos tóxicos circulantes; caracteriza os tipos de bactérias nas causas infecciosas; descreve a quantificação e graduação das alterações tóxicas, associando à taxa de mortalidade e às alterações hematológicas e bioquímicas. Observou-se que doenças de diversas origens etiológicas podem levar ao aparecimento de neutrófilos tóxicos circulantes, inclusive infecções bacterianas, principalmente aquelas causadas por bacilos Gram negativos e *Staphylococcus* sp. A quantificação e graduação dos neutrófilos tóxicos não demonstraram correlação com a doença de base, mas teve com a taxa de mortalidade. O capítulo II descreve as alterações hematológicas e bioquímicas em cães com neutrófilos tóxicos, comparando com os parâmetros obtidos de 60 cães doentes sem neutrófilos tóxicos circulantes. Cães com neutrófilos tóxicos têm diminuição dos parâmetros eosinófilos, linfócitos, albumina e ferro; aumento de leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes, monócitos, fosfatase alcalina, uréia e glicose. Os demais parâmetros não sofreram alterações e cães com neutrófilos tóxicos podem ter parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos valores de referência. O capítulo III abrange as proteínas séricas identificadas por eletroforese com gel de poliacrilamida de cães com neutrófilos tóxicos e cães doentes sem neutrófilos tóxicos, comparados aos cães saudáveis. Identificou-se, pela primeira vez, as alterações no perfil protéico de cães com neutrófilos tóxicos. Observou-se elevação das proteínas haptoglobina, proteína C reativa, α 1-glicoproteína ácida e proteína com peso molecular 34.000 Da; diminuição das proteínas albumina, transferrina e imunoglobulina A; não houve alteração nas demais proteínas avaliadas. As conclusões finais são que cães com neutrófilos tóxicos podem apresentar alterações hematológicas, bioquímicas e protéicas mais evidentes que cães doentes sem neutrófilos tóxicos; outras doenças além das bacterianas levam ao aparecimento de neutrófilos tóxicos, a quantificação e graduação dos neutrófilos tóxicos pode auxiliar na avaliação do prognóstico em cães.

PALAVRAS-CHAVE: basofilia, vacuolização, granulação, corpúsculos de Döhle, canino

ABSTRACT

During the process of tissue damage, leukocytes are recruited to the tissues. When demand exceeds the capacity of leukocytes from the bone marrow storage, enhances the production and maturation of neutrophils, the main defense cells. Neutrophils with immature organelles are released early into the circulation. These neutrophils are called "toxic neutrophils". Chapter I describes the diseases that caused the appearance of toxic circulating neutrophils; characterizes the types of bacteria in infectious causes; describes the quantification and grading of toxic changes, associating with mortality rate and hematological and biochemical changes. It was observed that various etiological diseases can lead to the appearance of toxic circulating neutrophils, including bacterial infections, particularly those caused by Gram negative bacilli and *Staphylococcus* sp. The quantification and ranking of toxic neutrophils had no correlation with the underlying disease, but had with the mortality rate. Chapter II describes the hematological and biochemical changes in dogs with toxic neutrophils, compared with the parameters obtained from 60 sick dogs without toxic circulating neutrophils. Dogs with toxic neutrophils had decreased eosinophils, lymphocytes, albumin and iron, increase in total leukocytes, segmented neutrophils and band cells, monocytes, alkaline phosphatase, urea and glucose. Others parameters were unchanged and dogs with toxic neutrophils may have hematological and biochemical parameters within the reference values. Chapter III include serum protein identified by polyacrylamide gel electrophoresis of sick dogs without toxic neutrophils and dogs presenting toxic neutrophils, compared to healthy animals. It was identified, for the first time, changes in the protein profile of dogs with toxic neutrophils. Were observed increases in haptoglobin, C reactive protein, α 1-acid glycoprotein and protein with molecular weight of 34.000Da; decreases in transferrin, albumin and immunoglobulin A; no changes in the other proteins evaluated. The final conclusions are that dogs with toxic neutrophils may have hematological, biochemical and proteins alterations more evident than sick dogs without toxic neutrophils; others diseases leads to the appearance of toxic neutrophils; and quantification and ranking of toxic neutrophils may assist in the evaluation of prognosis in dogs.

KEY-WORDS: basophilia, vacuolation, granulation, Döhle bodies, canine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Neutrófilo bastonete com basofilia citoplasmática moderada e neutrófilo segmentado sem alteração tóxica. Coloração: Panótico. 100x.	25
Figura 2 – Neutrófilo com basofilia citoplasmática moderada e um corpúsculo de Döhle. Coloração: Panótico. 100x.	25
Figura 3 – Neutrófilos com basofilia citoplasmática moderada e vacuolização tóxica moderada. Coloração: Panótico. 100x.....	26
Figura 4 – Neutrófilos bastonetes apresentand basofilia citoplasmática leve, moderada e acentuada. Coloração: Panótico. 100x.....	26
Figura 5 – Neutrófilo em morte celular (cariorréxis) circulante em cão com neutrófilo tóxico. Coloração: Panótico. 100x.	27
Figura 6 – Presença de neutrófilo segmentado com basofilia citoplasmática e corpúsculo de Döhle e neutrófilo bastonete fificante com acentuada basofilia citoplasmática. Coloração: Panótico. 100x.....	28
Figura 7 – Neutrófilo tóxico com núcleo em forma de donut e basofilia citoplasmática moderada. Coloração: Panótico. 100x.	28
Figura 8 – Bandas de proteínas de interesse identificadas em gel de poliacrilamida, em cães com neutrófilos tóxicos, por eletroforese e densitometria.....	69
Gráfico 1 - Relação entre a taxa de sobrevivência com a quantidade de neutrófilos tóxicos em cães	21
Gráfico 2 - Quantidade de hemácias em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em Cães.....	22
Gráfico 3 – Quantidade de hemoglobina em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães.....	22
Gráfico 4 – Hematócrito em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães.....	23
Gráfico 5 – Quantidade de neutrófilos bastonetes em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães	23
Gráfico 6 – Quantidade de proteína plasmática em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães	24
Gráfico 7 – Quantidade de albumina em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães.....	24
Gráfico 8 – Quantidade de uréia em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães.....	24
Gráfico 9 – Comparação entre as idades dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	44
Gráfico 10 – Número de hemácias dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	46
Gráfico 11 – Concentração de hemoglobina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	46
Gráfico 12- Hematócrito dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	46
Gráfico 13 – Número de leucócitos totais dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	47
Gráfico 14 – Número de neutrófilos segmentados dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	47

Gráfico 15 – Número de neutrófilos bastonetes dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	47
Gráfico 16 – Número de linfócitos dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	47
Gráfico 17 – Número de monócitos dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	48
Gráfico 18 – Número de eosinófilos dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	48
Gráfico 19 – Número de plaquetas dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	48
Gráfico 20 – MPV dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	49
Gráfico 21 – PDW dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	49
Gráfico 22 – PCT dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	49
Gráfico 23 – ALT dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	50
Gráfico 24 – FA dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	50
Gráfico 25 – Creatinina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	51
Gráfico 26 – Uréia dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	51
Gráfico 27 – Albumina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	51
Gráfico 28 – Glicose dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	51
Gráfico 29 – Ferro dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	52
Gráfico 30 – Proteína total dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	69
Gráfico 31 – Imunoglobulina A dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	70
Gráfico 32 – Albumina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	70
Gráfico 33 – Transferrina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	71
Gráfico 34 – α 1-antitripsina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	71
Gráfico 35 – Haptoglobina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	71
Gráfico 36 - α 1-glicoproteína ácida dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	71
Gráfico 37 – Proteína com peso molecular 34.000 Da dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	72
Gráfico 38 –Imunoglobulina G dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	72
Gráfico 39 – Ceruloplasmina dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	72
Gráfico 40 – Proteína com peso molecular 23.000 Da dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	73
Gráfico 41 – Proteína C reativa dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	73
Gráfico 42 – Taxa de sobrevivência de cães com neutrófilos tóxicos de acordo com a mensuração de proteína C reativa.....	74
Quadro 1 – Bactérias isoladas de diferentes locais de cães relacionadas ao número, tipos e graduação de neutrófilos tóxicos.....	29
Quadro 2 – Porcentagem de cães sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3) que apresentam diminuição, aumento ou normalidade nos parâmetros hematológicos.....	52
Quadro 3 – Porcentagem de cães sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3) que apresentam diminuição, aumento ou normalidade nos parâmetros bioquímicos.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Doenças dos cães sem neutrófilos tóxicos (controle) e com neutrófilos tóxicos (grupo tóxico).....	20
Tabela 2 – Porcentagem de neutrófilos tóxicos e número de óbitos em cães do grupo tóxico	21
Tabela 3 – Médias e desvios padrão dos parâmetros hematológicos dos cães dos grupos 1, 2 e 3	45
Tabela 4 – Médias e desvios padrão dos parâmetros bioquímicos dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	50
Tabela 5 – Médias e desvios padrão das proteínas identificadas pelas eletroforese nos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	70
Tabela 6 – Médias e desvios padrão dos parâmetros leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes dos cães dos grupos 1, 2 e 3.....	74

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO I – DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE DOENÇAS EM CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3. RESULTADOS.....	19
4. DISCUSSÃO.....	29
5. CONCLUSÃO.....	34
6. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO II – ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS	39
1. INTRODUÇÃO.....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3. RESULTADOS.....	44
4. DISCUSSÃO.....	53
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS.....	58
CAPÍTULO III – PERFIL DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS.....	63
1. INTRODUÇÃO.....	65
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3. RESULTADOS.....	68
4. DISCUSSÃO.....	74
5. CONCLUSÃO.....	78
6. REFERÊNCIAS.....	79
ANEXOS.....	84

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os neutrófilos tóxicos são células liberadas da medula óssea antes de completarem sua maturação, apresentando quantidades anormais de organelas citoplasmáticas (WEISER, 2007). Ao avaliar o esfregaço sangüíneo, os neutrófilos tóxicos são identificados quando apresentam: vacuolização, basofilia ou granulação citoplasmáticas, corpúsculos de Döhle (LATIMER et al., 2003), tamanho celular grande (AROCH et al., 2005) ou núcleo em forma de anel (WALKER, 2009).

A quantidade e o tipo de toxicidade parecem ter relação com a severidade da doença e dos sinais clínicos em cães, segundo estudo retrospectivo realizado por Aroch et al. (2005). Porém, não se sabe se há correlação entre a quantificação e graduação de neutrófilos tóxicos e o diagnóstico.

A presença de neutrófilos tóxicos é associada às infecções bacterianas (SCHULTZE, 2010), severos processos inflamatórios (LATIMER & RAKICH, 1989) e toxicidade à drogas (SCHULTZE, 2010; GIEGER et al, 2000; GOSSETT e MacWILLIAMS, 1982). Porém, causas não infecciosas precisam ser avaliadas como causadoras de neutrófilos tóxicos em cães. Quando a causa é bacteriana, não existem estudos mostrando as principais bactérias relacionadas ao aparecimento de neutrófilos tóxicos.

A mensuração de proteínas de fase aguda (PFA) pode ser considerada como um marcador bioquímico para inflamação (MURATA, 2004). As principais PFA em cães são a proteína C reativa (PCR), α -1-glicoproteína ácida, amilóide sérica A, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e albumina. Além das PFA, a eletroforese detecta outras proteínas, como imunoglobulinas, lipoproteínas, antiproteases e proteínas carreadoras, como a transferrina (ECKERSALL, 2008). Há, até o presente, escassez de estudos sobre a dinâmica das proteínas séricas de cães que apresentam neutrófilos tóxicos circulantes.

Este trabalho foi dividido em três capítulos, sendo o capítulo I intitulado “Diagnóstico e prognóstico de cães com neutrófilos tóxicos”, o capítulo II de “Alterações hematológicas e bioquímicas em cães com neutrófilos tóxicos” e o capítulo III de “Perfil das proteínas séricas de cães com neutrófilos tóxicos”.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Estabelecer os perfis clínicos e laboratoriais de cães com neutrófilos tóxicos

2.2. Objetivos Específicos

- Estabelecer as alterações hematológicas e bioquímicas de cães com neutrófilos tóxicos.
- Identificar as doenças que causam o aparecimento de neutrófilos tóxicos.
- Correlacionar o grau e a quantidade de neutrófilos tóxicos com o diagnóstico clínico dos pacientes
- Avaliar se a graduação e quantificação de neutrófilos tóxicos podem prever prognóstico.
- Identificar as principais bactérias envolvidas no aparecimento de neutrófilos tóxicos.
- Avaliar se existe relação entre a presença de neutrófilos tóxicos e proteínas de fase aguda da inflamação.
- Compreender o mecanismo que induz a produção de neutrófilos tóxicos

CAPÍTULO I

DIAGNÓSTICO E PROGNÓSTICO DE DOENÇAS EM CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS

DIAGNOSIS AND PROGNOSIS OF DISEASES IN DOGS WITH TOXIC NEUTROPHILS

RESUMO

Os neutrófilos tóxicos são liberados da medula óssea antes de completarem sua maturação, aparecendo na circulação com alterações morfológicas como basofilia citoplasmática, vacuolização, granulação ou corpúsculos de Döhle. O aparecimento dessas alterações tem sido relacionado com severos processos inflamatórios e infecciosos. Os objetivos do presente estudo foram realizar o diagnóstico das doenças em cães com neutrófilos tóxicos, identificar as bactérias envolvidas, quantificar e graduar as alterações tóxicas, associando ao prognóstico e às alterações hematológicas e bioquímicas. Foram avaliados cães doentes com neutrófilos tóxicos (n=100) e sem neutrófilos tóxicos (n=60). Foram realizados hemogramas, exames bioquímicos e bacteriológicos (n=20), quantificação e graduação dos neutrófilos tóxicos. Foram diagnosticadas doenças inflamatórias, infecciosas, degenerativas, neoplásicas, autoimunes, traumáticas, hormonais, tóxicas e alérgicas. A quantidade de neutrófilos tóxicos variou de 2 a 93% ($17 \pm 21,72$). A taxa de sobrevivência foi inversamente proporcional à quantidade de NT. Hemácias, hemoglobina, hematócrito, proteína plasmática e albumina tiveram relação negativa com a quantidade de neutrófilos tóxicos. Neutrófilos bastonetes e uréia tiveram relação positiva. Basofilia citoplasmática foi observada em 95% dos cães, corpúsculos de Döhle em 54%, vacuolização em 44% e granulação tóxica em 43%. As bactérias isoladas com maior frequência foram bacilos gram negativos e *Staphylococcus* coagulase negativo. Várias doenças causam o aparecimento de neutrófilos tóxicos e a sua quantificação é importante para avaliar o prognóstico e a severidade das alterações hematológicas e bioquímicas.

PALAVRAS-CHAVE: basofilia, granulação, vacuolização, corpúsculo de Döhle.

ABSTRACT

Toxic neutrophils are released from the bone marrow before reach their maturity, appering in the circulation with morphological alterations such as cytoplasmic basophilia, vacuolation, granulation or Döhle bodies. The appearance of these changes has been associated with severe inflammatory and infectious processes. The objectives of this study was to diagnose the diseases in dog with toxic neutrophils, identify the bacterias involved, quantify and grade the toxic changes, associating to the prognosis and hematological and biochemical changes. Were evaluated dogs with toxic neutrophils (n=100) and without toxic neutrophils (n=60). Blood counts were performed, biochemical and bateriological (n=20), quantification and ranking of NT. Were diagnosed inflammatory, infectious, degenerative, neoplastic, autoimmune, traumatic, hormonal, toxic and allergic reactions. The amount of TN ranged from 2 to 93% (17 ± 21.72). The survival rate was inversely proportional to the amount of TN. Erythrocytes, hemoglobin, hematocrit, plasma protein and albumin had negative correlation with the amount of TN. Band neutrophils and urea had positive relationship. Basophily was observed in 95% of dogs, Döhle bodies in 54%, vacuolation in 44% and granulation in 43%. The bacterias most frequently isolated were gram negative bacilli and *Staphylococcus* coagulase negative. Several diseases cause the appearance of toxic neutrophils and its quantification is important for assessing the prognosis and severity of some hematological and biochemical changes.

KEY-WORDS: basophilia, vacuolation, granulation, Döhle bodies.

1. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos tóxicos são neutrófilos liberados da medula óssea antes de completarem sua maturação. Normalmente, eles migram aos vasos sanguíneos quando a demanda tecidual de neutrófilos é alta. Pelo fato de ainda não estarem completamente bem formados, são liberados com quantidades anormais de organelas citoplasmáticas (WEISER, 2007).

Ao avaliar o esfregaço sanguíneo de pacientes doentes, os neutrófilos tóxicos são identificados quando apresentam: vacuolização, basofilia ou granulação citoplasmáticas, corpúsculos de Döhle (LATIMER et al., 2003), tamanho celular grande (AROCH et al., 2005) ou núcleo em forma de anel (WALKER, 2009). A quantidade e o tipo de toxicidade parecem ter relação com a severidade da doença e dos sinais clínicos em cães e gatos, segundo estudos retrospectivos realizados por Aroch et al. (2005) e Segev et al. (2006), respectivamente.

Quando são encontrados neutrófilos tóxicos, é possível quantificar a sua porcentagem e graduar a severidade das alterações. Segundo Weiss e Tvedten (2004), considera-se insignificante quando há de 0 a 4% de neutrófilos tóxicos; poucos de 5 a 10%; moderado de 11 a 30%; e muitos quando há mais do que 30%.

Quantidade leve a moderada de neutrófilos tóxicos em cães e gatos parece estar associada com prognóstico melhor, enquanto que quantidade alta é observada em casos piores e fatais (AROCH et al., 2005; SEGEV et al., 2006). Portanto, a quantificação dos neutrófilos tóxicos pode servir como valor prognóstico na clínica do paciente.

A presença destas alterações tóxicas nos neutrófilos de cães está mais associada com inflamações de caráter sistêmico do que localizado e na maioria dos casos devido às infecções bacterianas, bacteremia, abscessos e septicemia (SCHULTZE, 2010; MARCHEVSKY e READ, 1999); severos processos inflamatórios (LATIMER & RAKICH, 1989) e toxicidade à drogas (SCHULTZE, 2010; GIEGER et al., 2000; GOSSETT e MacWILLIAMS, 1982).

A prevalência de bactérias em alguns tipos de infecções específicas em cães é relatada, como nas osteomielites, o *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Enterococcus* sp (SIMIONATO et al, 2003); em placa dentária, o *Actinomyces* sp e o *Streptococcus* sp (EURIDES et al, 1996); e na piometra, a *Escherichia coli*, a *Klebsiella pneumoniae* e a *Citrobacter diversus* (COGGAN, 2005). Apenas um estudo demonstrou, de maneira geral, as principais bactérias encontradas em cães e gatos doentes, independente do local da infecção (SANTOS et al, 2005). Entre todos os tipos de infecções, o *Staphylococcus* sp foi encontrado em maior frequência. Entretanto, não existem estudos correlacionando o aparecimento de neutrófilos tóxicos com as possíveis bactérias.

As doenças que levam ao aparecimento de quantidades maiores de neutrófilos tóxicos são desconhecidas e existem poucas informações sobre a quantidade de neutrófilos tóxicos e a relação com a taxa de sobrevivência.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar as principais doenças e bactérias envolvidas no aparecimento de neutrófilos tóxicos, quantificar e graduar a presença de alterações tóxicas, associando com a taxa de mortalidade e com as alterações hematológicas e bioquímicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com cães atendidos na rotina clínico-cirúrgica do Hospital Veterinário (HV) da UFPR. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (certificado em anexo).

Critérios de Inclusão

Foram inclusos animais da espécie canina, independente da idade, sexo e raça. Foram avaliados cães clinicamente doentes, divididos em dois grupos: grupo controle, composto por 60 cães (35 fêmeas e 25 machos) com alteração em quantidade de leucócitos, mas sem neutrófilos tóxicos; grupo tóxico, composto por 100 cães (58 fêmeas e 42 machos) com neutrófilos tóxicos. O diagnóstico final foi obtido pelo médico veterinário responsável pelo exame clínico e exames auxiliares (ultra-som, raio-x, exame microbiológico, histopatológico, sorologia, citologia de medula óssea, entre outros), conforme o clínico julgou necessário.

Coleta de dados

Foram avaliadas as fichas clínicas dos pacientes para obtenção de dados como raça, sexo, idade e diagnóstico. A evolução do caso foi obtida por meio de contato telefônico com os proprietários e por acompanhamento direto.

Hemograma

Amostras de sangue para realização do hemograma foram colhidas em tubos a vácuo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por meio da punção de veia cefálica ou jugular. As amostras foram analisadas dentro de 30 minutos após coleta com a utilização de

analisador automático (BC-2800, Mindray®, Nanshan, China), calibrado para sangue de cães. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), índice de distribuição de células vermelhas (RDW), número de leucócitos totais, número de plaquetas, volume médio de plaquetas (MPV), grau de distribuição de plaquetas (PDW) e o plaquetócrito (PCT). O hematócrito foi confirmado após centrifugação do sangue total em tubo capilar durante cinco minutos em microcentrífuga a 11.000 rpm. Após centrifugação, a proteína plasmática foi obtida por refratometria. Os diferenciais leucocitários foram realizados por contagem de 100 leucócitos em esfregaços sanguíneos corados com Panótico®. Nos valores de leucócitos totais superiores a 25.000 células/ μL , realizou-se a contagem de 200 células e, acima de 35.000 células/ μL , fez-se contagem de 300 células, calculando-se a média.

Avaliação dos Neutrófilos Tóxicos

Foram avaliadas alterações morfológicas como: basofilia, vacuolização e granulação citoplasmáticas, presença de corpúsculos de Döhle, células gigantes, núcleo em forma de rosca e estágios da morte celular (picnose, cariorréxis). Cem neutrófilos foram contados, obtendo-se a porcentagem (%) de neutrófilos tóxicos para cada paciente e a porcentagem das alterações tóxicas visualizadas. A toxicidade dos neutrófilos foi graduada em leve, moderada e acentuada por comparação entre as lâminas. Granulação e vacuolização foram classificadas de acordo com o número médio de grânulos (g) ou vacúolos (v) presentes nos neutrófilos, como: leve – em média, um a quatro; moderada – cinco a nove; acentuada – dez ou mais.

Exames Bioquímicos

Para realização dos exames bioquímicos, amostras de sangue foram colhidas em tubo à vácuo sem anticoagulante e o soro foi obtido por centrifugação em macrocentrífuga durante 5 minutos a 4.500 rpm. Os exames foram realizados através de espectrofotometria automática (BS-200, Mindray®, Nanshan, China). Foram mensurados os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT – método cinético UV), fosfatase alcalina (FA – método cinético colorimétrico), albumina (método verde Bromocresol), uréia (método da urease GLDH), creatinina (método do Jaffé), proteína total (métodos de Biureto), globulina (proteína total – albumina), glicose (método colorimétrico enzimático) e ferro sérico (colorimétrico utilizando Ferene).

Exame Bacteriológico

Os exames bacteriológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Professor Yasuyoshi Hayashi, da UFPR. Foram colhidas amostras de foco possivelmente infeccioso de 20 animais com neutrófilos tóxicos no hemograma. A colheita foi realizada de diferentes locais, com auxílio de *swabs* ou frascos estéreis contendo meio de conservação. As amostras foram mantidas sob refrigeração de 4°C por no máximo 24 horas para posterior semeadura em placas de Agar sangue e McConkey. As placas então foram colocadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após avaliação do crescimento de colônias bacterianas, uma amostra de cada tipo de colônia foi colocada em lâmina de vidro para coloração com Gram. Nas bactérias cocos gram positivos, realizou-se o teste de Catalase (Água Oxigenada) para diferenciar *Staphylococcus* de *Streptococcus*. Se determinado *Staphylococcus*, realizou-se posteriormente prova de Coagulase (plasma de coelho liofilizado). Nos bacilos gram negativos foram realizadas provas bioquímicas, para determinação da bactéria, como: sacarose, VM/VP, lactose, manitol, indol, citrato, urease, motilidade, gás sulfídrico, glicose e nitrato, seguindo técnica descrita por Carter (1988).

Exame Histopatológico

As amostras dos tecidos foram colhidas através de biópsia cirúrgica e, após fixação em formol 10% tamponado, encaminhadas ao processamento histológico no Laboratório de Patologia Veterinária do HV da UFPR. O processamento das amostras incluiu a inclusão em parafina, secção em cortes de 3 a 5 µm de espessura e coloração por hematoxilina e eosina.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows®, onde foram empregados testes de Regressão Linear e de Sobrevivência, considerando o nível de significância $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

As doenças de base dos cães do grupo controle e com neutrófilos tóxicos estão apresentadas na tabela 1.

TABELA 1 – DOENÇAS DOS CÃES SEM NEUTRÓFILOS TÓXICOS (CONTROLE) E COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS (GRUPO TÓXICO).

Diagnóstico	Tóxico	Controle
	n = 100	n= 60
Neoplasias	19	14
Piometra	11	4
Fratura	7	2
Hiperadrenocorticismo	7	1
Doença Periodontal	6	10
Erliquiose	5	2
Gastroenterite	3	4
Cistite bacteriana	3	1
Doença de disco intervertebral	3	0
Gastrite	3	1
Dermatite Alérgica	2	1
Pneumonia	2	1
Peritonite Séptica	2	1
Artrite auto-imune	2	0
Pancreatite	2	0
Necrose	2	0
Diabetes Mellitus	2	0
Envenenamento	2	0
Trauma Cirúrgico	1	2
Luxação	1	2
Cinomose	1	1
Displasia coxo-femoral	1	1
Escoriação cutânea	1	1
Ruptura de Ligamento	1	1
Maceração fetal	1	1
Abscesso	1	0
Leishmaniose	1	0
Obstrução uretral	1	0
Atrofia de retina	1	0
Hérnia diafragmática	1	0
Corpo estranho	1	0
Miíase	1	0
Discoespondilite	1	0
Pseudociese	1	0
Torção gástrica	1	0
Pênfigo foliáceo	1	0
Bronquite	0	2
Prolapso Retal	0	1
Prolapso de Vagina	0	1
Pielonefrite	0	1
Doença Renal Crônica	0	1
Conjuntivite	0	1
Descemetoccele	0	1
Fecaloma	0	1
Otite	0	1

As neoplasias do grupo tóxico foram: carcinoma maligno (n=3); carcinoma inflamatório (n=2); leucemia mielóide crônica (n=2); carcinoma simples (n=2); neoplasia indiferenciada (n=2); adenocarcinoma papilífero-cístico (n=1); leiomioma (n=1); linfoma (n=1); carcinoma de células escamosas (n=1); mastocitoma (n=1); inconclusivo (n=2).. As localizações destas neoplasias foram: mama (n=9), pele (n=2), medula óssea (n=2), prepúcio

(n=1), c ervix (n=1), ov ario (n=1), mandíbula (n=1), linfonodos (n=1) e em v arios órgãos (n=1).

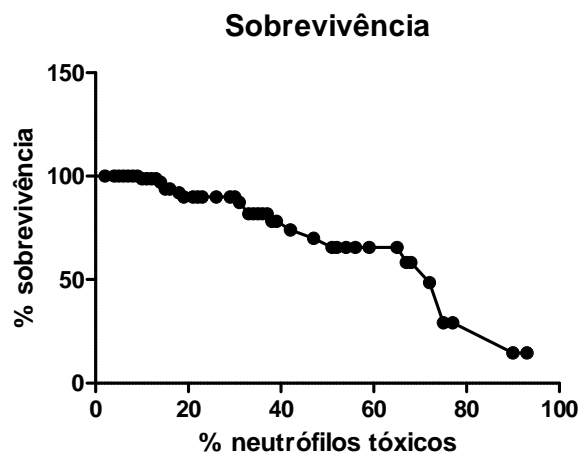
No grupo não tóxico as neoplasias foram: melanoma (n=3); carcinoma simples (n=3); mastocitoma (n=2); carcinoma maligno (n=2); adenocarcinoma papilífero-cístico (n=1); tvt (n=1); adenoma (n=1); tumor misto benigno (n=1). As localiza es destes tumores foram: mama (n=5), pele (n=4), boca (n=3) e pulmão (n=1).

No grupo tóxico, a quantidade de neutrófilos tóxicos variou de 2 a 93% ($17 \pm 21,72$). Na tabela 2 está apresentado o número de cães de acordo com a quantidade de neutrófilos tóxicos e o número de  bitos. Cinco animais do grupo controle evoluíram   óbito (8,33%), enquanto que no grupo tóxico ocorreram 18  bitos (18%).

TABELA 2 – PORCENTAGEM DE NEUTRÓFILOS TÓXICOS E NÚMERO DE ÓBITOS EM CÃES DO GRUPO TÓXICO

Número de cães	Prevalência de neutrófilos	Numero de
	tóxicos	óbitos
06	0 a 5%	0
38	5 a 15%	4
21	15 a 30%	2
18	30 a 50%	6
13	50 a 75%	5
03	75 a 100%	1

No gráfico 1 está apresentada a rela o entre a quantidade de neutrófilos tóxicos e o número de  bitos.



Gráfico 1 – Relac o entre a taxa de sobrevivência com a quantidade de neutrófilos tóxicos em cães.

As doenças diagnosticadas nos cães do grupo tóxico com 0 a 5% de neutrófilos tóxicos foram: cistite, fratura, doença de disco intervertebral, neoplasia, atrofia de retina, gastrite e hiperadrenocorticismo.

Nos cães com 0 a 15% de neutrófilos tóxicos, os principais diagnósticos foram: neoplasia, pancreatite, fratura, miíase, pneumonia, discoespondilite, hiperadrenocorticismo, piometra, dermatite alérgica, cistite, gastroenterite, diabetes, envenenamento, abscesso, doença periodontal, ruptura de ligamento, erliquiose, obstrução uretral, luxação de patela e dilatação gástrica.

Nos cães com 15 a 30% de neutrófilos tóxicos as doenças foram: hemoparasitose, doença de disco intervertebral, piometra, trauma, dermatite alérgica, maceração fetal, peritonite séptica, neoplasia, doença periodontal, leishmaniose, artrite auto-imune e cinomose.

As doenças dos cães com 30 a 50% de neutrófilos tóxicos foram: gastroenterite, hérnia diafragmática, piometra, neoplasia, doença de disco intervertebral, peritonite séptica, piometra, hiperadrenocorticismo, diabetes, pênfigo, doença periodontal, artrite auto-imune e escoriações cutâneas.

Nos cães com 50 a 75% de neutrófilos tóxicos os principais diagnósticos foram: necrose, neoplasia, pancreatite, erliquiose, fratura, pneumonia e trauma pós-cirúrgico.

Os cães com 75 a 100% de neutrófilos tóxicos apresentaram: gastrite, piometra e neoplasia.

Os parâmetros hemácias ($p=0,0002$), hemoglobina ($p=0,0051$) e hematócrito ($p=0,0002$) foram menores nos cães do grupos tóxico quanto maior a quantidade de neutrófilos tóxicos (Gráficos 2, 3 e 4).

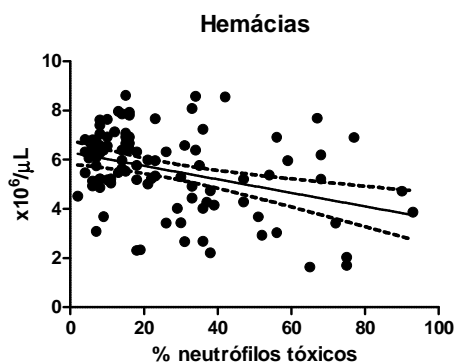


Gráfico 2– Quantidade de hemácias em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

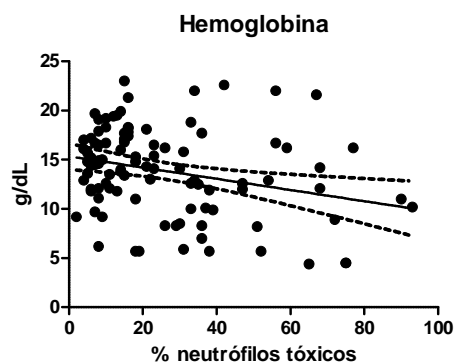


Gráfico 3 – Quantidade de hemoglobina em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

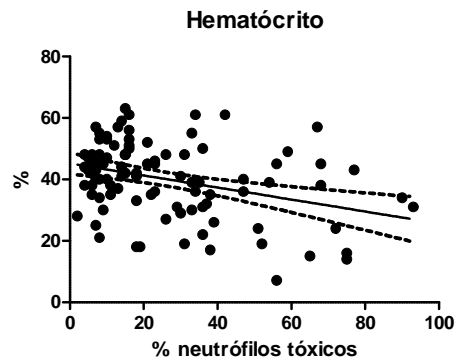


Gráfico 4 – Hematócrito em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

O número de neutrófilos bastonetes variou com a quantidade de neutrófilos tóxicos, aumentando de maneira diretamente proporcional ($p=0,0008$) (Gráfico 5).

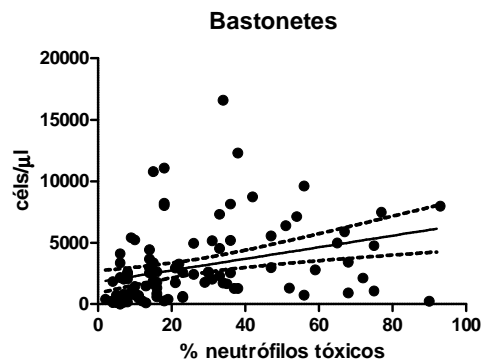


Gráfico 5 – Quantidade de neutrófilos bastonetes em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

Nos parâmetros proteína plasmática ($p=0,0114$) e albumina ($p<0,0001$) observou-se diminuição conforme o aumento da quantidade de neutrófilos tóxicos (Gráfico 6 e 7).

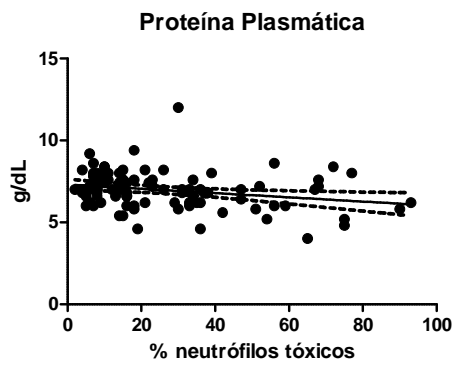


Gráfico 6 – Quantidade de proteína plasmática em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

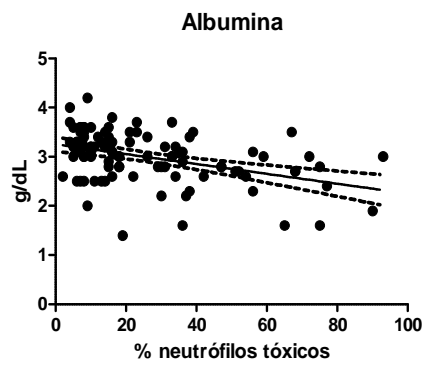


Gráfico 7 – Quantidade de albumina em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

Os valores da uréia foram maiores conforme o aumento na quantidade de neutrófilos tóxicos ($p=0,0036$) (Gráfico 8).

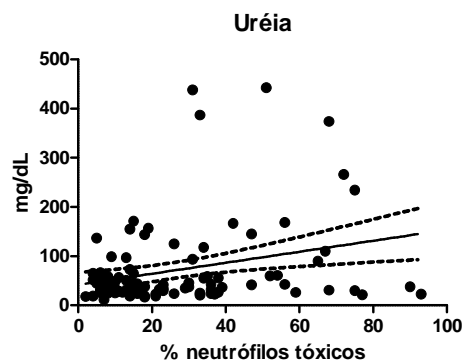


Gráfico 8 – Quantidade de uréia em relação à quantidade de neutrófilos tóxicos em cães

Não foi verificada relação entre a quantidade de neutrófilos tóxicos e os parâmetros leucócitos, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, eosinófilos, plaquetas, ALT, FA, creatinina, glicose, proteína total, globulina e ferro.

Os números de alterações tóxicas analisadas, basofilia, vacuolização e granulação citoplasmáticas e corpúsculos de Döhle, nos cães do grupo tóxico foram: uma alteração ($n=20$), duas ($n=32$), três ($n=32$) e quatro alterações tóxicas concomitantes ($n=16$).

As frequências das alterações tóxicas nos cães foram: 95% com basofilia citoplasmática (Figura 1), 54% com corpúsculos de Döhle (Figura 2), 44% com vacuolização citoplasmática (Figura 3) e 43% com granulação tóxica. Todas as vacuolizações citoplasmáticas foram visualizadas concomitante ao aumento de basofilia citoplasmática.



Figura 1 – Neutrófilo bastonete com basofilia citoplasmática moderada (seta) e neutrófilo segmentado sem alteração tóxica. Coloração: Panótico. 100x.

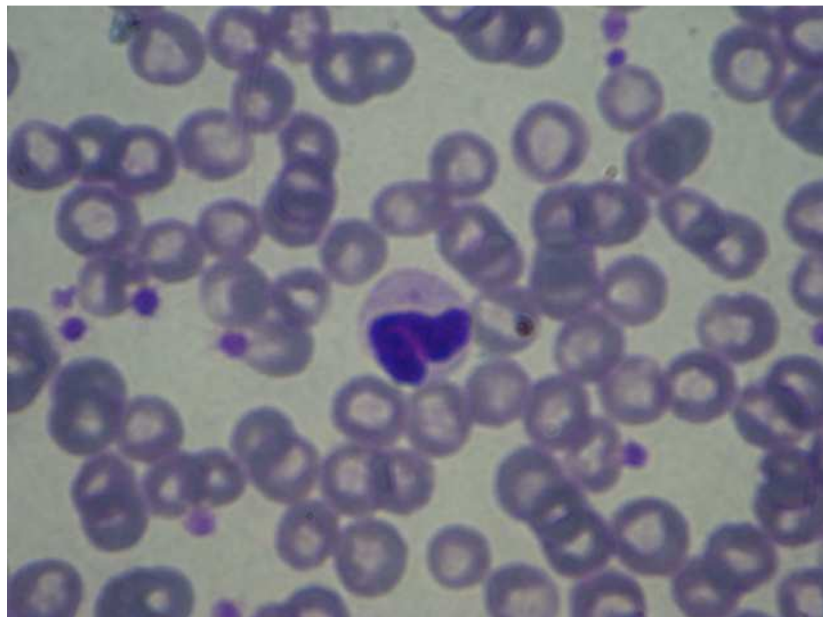


Figura 2 – Neutrófilo com basofilia citoplasmática moderada e um corpúsculo de Döhle. Coloração: Panótico. 100x.



Figura 3 – Neutrófilo com basofilia citoplasmática moderada e vacuolização tóxica moderada. Coloração: Panótico. 100x.

As distribuições por alteração tóxica foram: (a) basofilia citoplasmática: 42 leves, 38 moderadas e 15 acentuadas; (b) vacuolização citoplasmática: 21 leves, 17 moderadas e seis acentuadas; (c) granulações citoplasmáticas: 24 leves, 15 moderadas e quatro acentuadas. A figura 4 exemplifica como foi classificada basofilia citoplasmática em leve, moderada ou acentuada.

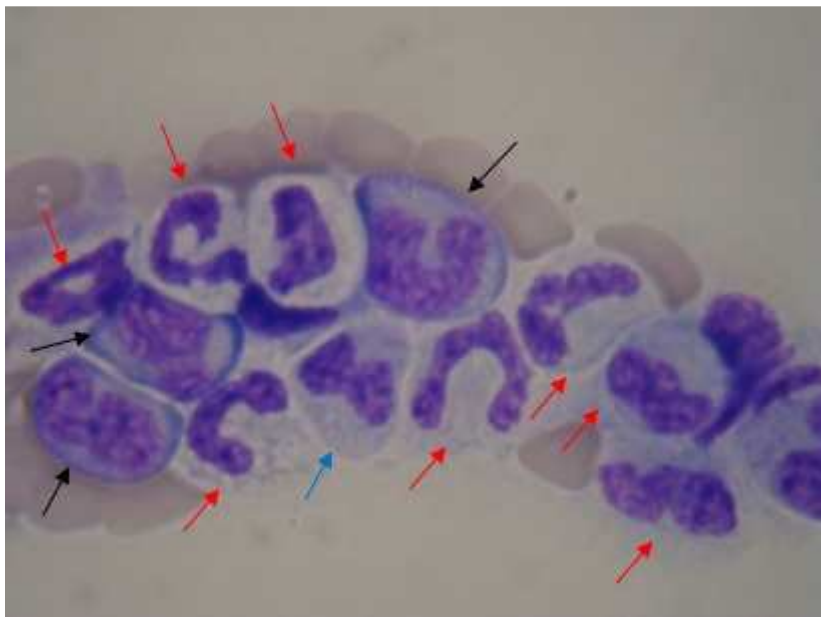


Figura 4 – Neutrófilos bastonetes apresentando basofilia citoplasmática leve (seta vermelha), moderada (seta azul) e acentuada (seta preta). Coloração: Panótico. 100x.

As doenças associadas à toxicidade acentuada (n=20), independente do tipo de toxicidade observada, foram: cistite bacteriana, piometra, necrose, neoplasia, hemoparasitose, peritonite séptica, doença periodontal, hiperadrenocorticismo, fratura e pneumonia. Quatro destes animais foram à óbito (20%). As doenças associadas à moderada toxicidade (n=40) foram: gastroenterite, gastrite, doença de disco intervertebral, corpo estranho, fratura, piometra, hiperadrenocorticismo, hérnia diafragmática, neoplasia, diabetes, abscesso infra-orbitário, peritonite, pancreatite, doença periodontal, enterite, pênfigo foliáceo, leishmaniose, trauma pós-cirúrgico, escoriações cutâneas e artrite auto-imune. Onze destes animais foram à óbito (27,5%). A toxicidade leve (n=40) foi associada com doenças como: erliquiose, necrose, pancreatite, fratura, miíase, pneumonia, discoespondilite, pseudociese, neoplasia, piometra, dermatite alérgica, maceração fetal, cistite, gastroenterite, hiperadrenocorticismo, envenenamento, diabetes, doença de disco intervertebral, displasia coxo-femoral, doença periodontal, obstrução uretral, atrofia de retina, luxação de patela, dilatação gástrica, cinomose e ruptura de ligamento cruzado cranial. Três destes animais foram à óbito (7,5%).

Morte celular de neutrófilos circulantes foi verificada em três animais (Figura 5), assim como células gigantes (Figura 6), e neutrófilo com núcleo em forma de *donut* em apenas um (Figura 7).

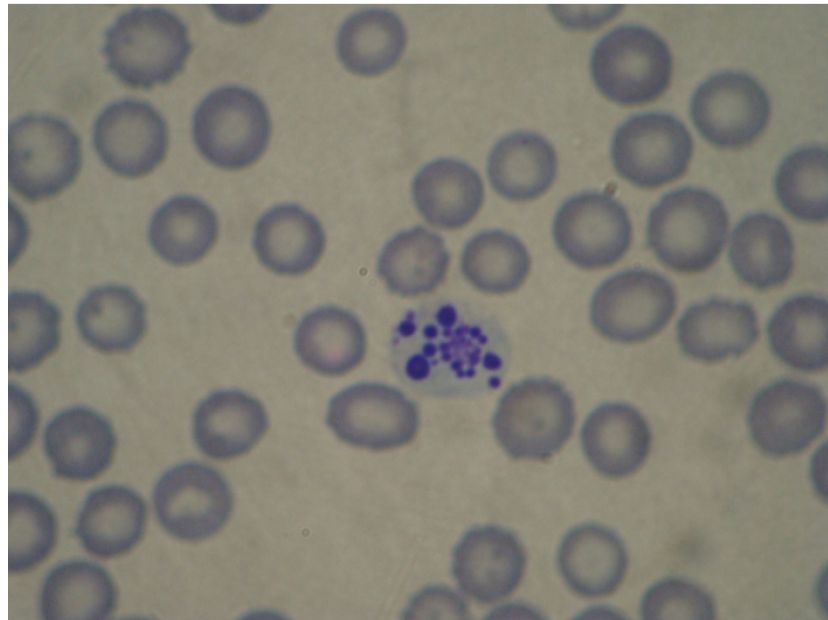


Figura 5 – Neutrófilo em morte celular (cariorrhexis) circulante em cão com neutrófilos tóxicos. Coloração: Panótico. 100x

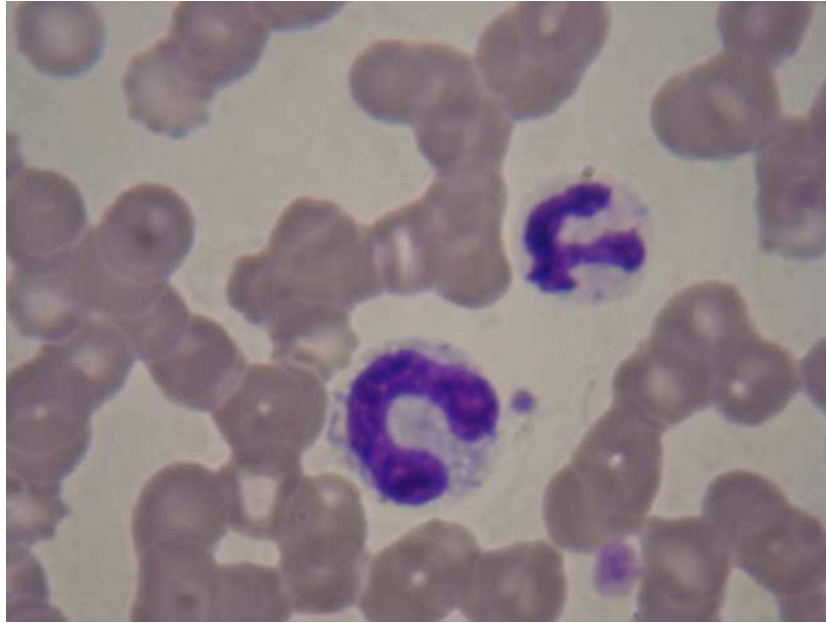


Figura 6 – Presença de neutrófilo segmentado (à direita) com basofilia citoplasmática e corpúsculo de Döhle e neutrófilos bastonete gigante (à esquerda) com acentuada basofilia citoplasmática. Coloração: Panótico. 100x

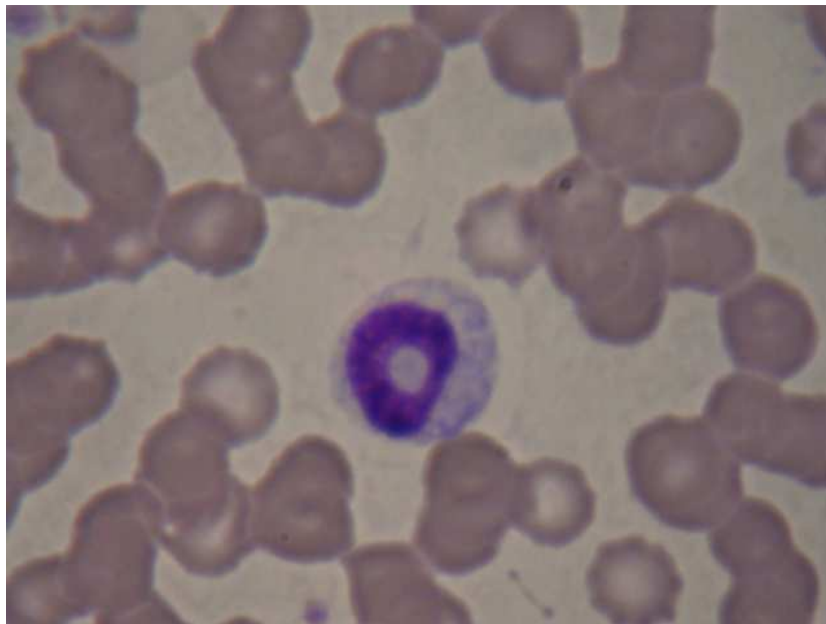


Figura 7 – Neutrófilo tóxico com núcleo em forma de *donut* e basofilia citoplasmática moderada. Coloração: Panótico. 100x

Os materiais colhidos para cultura bacteriana dos cães foram: líquido ascítico (n=6), fragmento uterino (n=4), *swab* vaginal (n=2), urina (n=2), sangue (n=2), *swab* oral (n=2), abscesso infra-orbitário (n=1), *swab* de pele (n=1), *swab* nasal (n=1). Das 21 amostras, houve crescimento bacteriano em 16. Não houve crescimento em quatro amostras de líquido abdominal uma de sangue. No quadro 1 estão listadas as bactérias isoladas de diferentes locais

dos cães, a porcentagem de neutrófilos tóxicos, a quantidade e o grau das alterações tóxicas observadas.

Amostra	Cão	Bactéria	% de Neutrófilos Tóxicos	Alterações tóxicas				Grau das alterações tóxicas	Evolução
				B	V	G	CD		
Fragmento uterino	1	<i>Escherichia coli</i>	34	x		x		Leve	viveu
	2	<i>Escherichia coli</i>	10	x			x	Leve	viveu
	3	<i>Escherichia coli</i>	77	x	x	x	x	moderada	viveu
	4	<i>Escherichia coli</i>	8	x			x	moderada	viveu
Líquido ascítico	5	<i>Staphylococcus coagulase -</i>	42	x		x		moderada	óbito
	6	<i>Enterobacter aerogenes</i>	18	x	x		x	acentuada	óbito
Swab vaginal	7	<i>Staphylococcus coagulase - Pseudomonas aeruginosa</i>	7	x			x	Leve	viveu
	8	<i>Staphylococcus coagulase -</i>	38	x	x			acentuada	viveu
Urina	9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	x				Leve	viveu
	10	<i>Staphylococcus coagulase +</i>	8	x				Leve	viveu
Swab Oral	11	<i>Staphylococcus coagulase -</i>	16	x	x		x	moderada	viveu
	12	<i>Staphylococcus coagulase -</i>	14	x				acentuada	viveu
Abscesso infra-orbitário	13	<i>Staphylococcus coagulase - Pseudomonas aeruginosa</i>	6	x	x	x		moderada	viveu
Swab de pele	14	<i>Staphylococcus coagulase - Klebsiella pneumoniae</i>	37	x	x	x	x	moderada	viveu
Swab nasal	15	<i>Staphylococcus coagulase -</i>	68	x	x			acentuada	viveu
Sangue	16	<i>Staphylococcus coagulase +</i>	12	x				moderada	viveu

B – Basofilia; V – Vacuolização; G – Granulação; CD – Corpúsculo de Döhle

Quadro 1 – Bactérias isoladas de diferentes locais de cães relacionadas ao número, tipos e graduações de neutrófilos tóxicos e ao prognóstico.

4. DISCUSSÃO

O grupo controle deste estudo foi formado por cães com doenças semelhantes às do grupo testado, porém, sem o aparecimento de neutrófilos tóxicos. Estes resultados indicam que uma mesma doença pode gerar respostas diferentes em animais diferentes. Isto pode ocorrer por fatores fisiopatológicos da doença de base para cada animal, como: tempo de instalação da doença, cepa da bactéria, imunidade do paciente, entre outros. Portanto, possivelmente, o que determina o aparecimento de neutrófilos tóxicos são as características da doença para um determinado animal, e não para o todo.

Por essa mesma razão que foram encontradas quantidades diferentes de neutrófilos tóxicos em animais com a mesma doença, assim como alterações morfológicas diferentes.

Foram encontradas quantidades diferentes de neutrófilos tóxicos em animais com a mesma doença, assim como alterações morfológicas diferentes. Na quantificação de neutrófilos, houve correlação com os resultados hematológicos e bioquímicos séricos. Nos animais com maior número de neutrófilos tóxicos, os valores de neutrófilos bastonetes e de uréia também foram maiores, entretanto, os valores de hemácias, hemoglobina, hematócrito, proteína plasmática e albumina foram menores. O número elevado de neutrófilos tóxicos indica severidade do processo inflamatório.

Assim, a anemia de cães com mais neutrófilos tóxicos será mais pronunciada porque doenças inflamatórias alteram o metabolismo do ferro, levando à anemia de doença crônica (ou anemia de doença inflamatória) (CANÇADO e CHIATTONE, 2002).

A diminuição da albumina também indica processo inflamatório. Esta proteína é chamada de proteína de fase aguda negativa, uma vez que ela diminui durante inflamações (ECKERSALL, 2008). Porém, durante processos infecciosos espera-se que haja o aumento das proteínas plasmáticas, causado pelo aumento na concentração de globulinas (TIZARD, 2009). No presente estudo, houve diminuição das proteínas plasmáticas quanto maior foi a quantificação de neutrófilos tóxicos. Isso pode ter ocorrido por baixa produção de globulinas decorrente da liberação endógena de glicocorticóides, corroborando com o relato de Aroch et al. (2005) de que cães com neutrófilos tóxicos encontram-se em estado de estresse. Outra possibilidade é a ocorrência de perda protéica, causada pela doença de base, como hemorragias ou lesão glomerular, levando à proteinúria.

O aumento do número de bastonetes ocorre durante inflamações agudas, quando há intensa migração de neutrófilos para os tecidos e aceleração da neutropoiese (SCHULTZE, 2010). Logo, quanto maior a quantidade de neutrófilos tóxicos, pior é o processo inflamatório e maior será o desvio nuclear de neutrófilos à esquerda.

O aumento da uréia encontrado em cães com altas quantidades de neutrófilos tóxicos pode ocorrer como nos casos de azotemia pré-renal. Esta é relatada em cães com neutrófilos tóxicos e parece ocorrer por desidratação ou hipertermia (AROCH et al., 2005).

A alteração tóxica mais observada neste estudo foi a basofilia citoplasmática. Segundo Gossett et al. (1985), a basofilia ocorre primeiro. Alguns cuidados devem ser tomados quanto ao tempo de execução do esfregaço sanguíneo após a coleta. De acordo com Gossett e Carakostas (1985), basofilia e vacuolização citoplasmáticas podem ser observadas em amostras expostas ao EDTA por um período mínimo de uma hora. Portanto, a realização do esfregaço sanguíneo logo após a coleta é essencial para a correta avaliação morfológica dos neutrófilos.

Apesar de a literatura citar que os corpúsculos de Döhle são infreqüentes em cães (GOSSETT et al., 1985), no presente estudo mais de 54% dos animais com neutrófilos tóxicos apresentaram estes corpúsculos. Os corpúsculos de Döhle representam gotas de retículo endoplasmático rugoso dissolvidas (PROKOCIMER e POTASMAN, 2008). Apesar de serem relatados com maior freqüência em gatos (SEGEV et al., 2006), podem ocorrer também em outras espécies como cães, cavalos e no homem (AL-GWAIZ e BABAY, 2007; LATIMER et al., 2003). Segundo Al-Gwaiz e Babay (2007), em seres humanos, o aparecimento destes corpúsculos é um achado sensível para infecções bacterianas. Não é possível determinar se todos os animais possuíam componente infeccioso envolvido, uma vez que não foram realizadas provas de cultura bacteriana de todos os animais. Este mesmo problema ocorreu nos casos de granulação tóxica, pois granulação está relacionada às infecções bacterianas (MUNKER, 2007), principalmente por bactérias gram-negativas (FRANSSON et al., 1997).

A granulação ocorre por retenção dos grânulos azurofílicos primários que contém uma variedade de proteínas antibacterianas (KIM et al., 2009; PROKOCIMER e POTASMAN, 2008). No presente estudo, cinco cães (5/16) apresentaram granulação tóxica e exame bacteriológico positivo. Assim, esta alteração tóxica não se mostrou sensível para o diagnóstico de infecção em cães. Na medicina, relata-se que a granulação ocorre em mais da metade dos pacientes em sepse; porém, que falta especificidade para doenças infecciosas uma vez que pode ser encontrado em uma variedade de condições reativas não infecciosas (KROFT, 2002).

A vacuolização citoplasmática possui ocorrência mais baixa do que as outras alterações tóxicas e acredita-se que seu aparecimento esteja ligado à liberação intracelular de enzimas autolíticas (LATIMER et al., 2003). Normalmente, a vacuolização está associada à basofilia citoplasmática (WEISS, 2006). Concordando com a literatura, no presente estudo, todas as vacuolizações foram vistas associadas às basofilias. Nos seres humanos, a vacuolização é a alteração tóxica mais útil para o diagnóstico de sepse, com especificidade acima de 90% (LIU et al., 1984). Em algumas situações, esta alteração morfológica pode preceder suspeita clínica de infecção bacteriana grave (KROFT, 2002). No presente estudo, ela não foi tão específica uma vez que apenas sete cães (7/16) com diagnóstico bacteriológico positivo apresentavam esta alteração. Assim, para cães, mais estudos deveriam ser realizados para avaliar essa relação entre vacuolização e sepse como há na medicina.

É importante lembrar que contadores automáticos não detectam alterações morfológicas nas células, tornando-se imprescindível a avaliação no esfregaço sanguíneo (ALLISON e MEINKOTH, 2007). Apesar de ser uma importante avaliação, a

reprodutibilidade da detecção de neutrófilos tóxicos é baixa, pois depende da qualidade da coloração e da habilidade do observador (SEEBACH et al., 1997).

Neste estudo verificou-se que os neutrófilos tóxicos estão associados à doenças de causas inflamatórias, neoplásicas, degenerativas, traumáticas, hormonais, tóxicas, alérgicas e auto-imunes. O aparecimento de neutrófilos tóxicos circulantes é frequente e ocorre em situações onde há aceleração da neutropoese (STOCKHAM et al., 2003). Apesar de muitos autores correlacionarem o aparecimento de neutrófilos tóxicos com infecções bacterianas (SCHULTZE, 2010; LATIMER et al., 2003; LATIMER e RAKICH, 1989), acredita-se que outras doenças possam levar às alterações morfológicas em neutrófilos (KIM et al., 2009; WEISS, 2006; GOSSETT et al., 1985; MALCOLM et al., 1979; ITOGA e LASZLO, 1962).

No presente estudo verificou-se que outros tumores, além dos mamários, são capazes de favorecer o aparecimento de alterações tóxicas nos neutrófilos. Acredita-se que, mais importante do que a localização do tumor, seja: o tipo de tumor, o tamanho dele, a presença de ulceração e infecção secundária. Estes fatores podem estar mais relacionados com resposta celular de maior amplitude por inflamação local. Aroch et al. (2005) citaram diagnósticos semelhantes aos encontrados no presente estudo como causadores do aparecimento de neutrófilos tóxicos circulantes em cães, como tumores mamários.

Várias bactérias podem estar envolvidas no aparecimento destas alterações morfológicas. Foram isoladas bactérias gram positivas e negativas. O *Staphylococcus* foi a bactéria encontrada com maior frequência, sendo que oito eram coagulase negativa e duas coagulase positiva. Segundo Quinn et al. (2004), os *Staphylococcus* coagulase negativo (*S. epidermidis* e *S. saprophyticus*) são comensais e estão presente no ar, causando infecções oportunistas em humanos e animais, apesar de serem considerados não patogênicos. As bactérias *Staphylococcus* coagulase positivo (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*) são patogênicas, uma vez que existe boa correlação entre o teste de coagulase e a patogenicidade.

Dos bacilos gram negativos isolados, a *Escherichia coli* foi encontrada com maior frequência e esteve presente em infecções uterinas. O mesmo foi relatado por Fransson e Ragle (2003). Coggan (2005) descreveu que além da *E.coli* ser a principal bactéria isolada, outras como *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter diversus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* e *Staphylococcus* sp podem ser encontradas no útero de cadelas com piometra. No presente estudo, além dos quatro fragmentos uterinos cultivados, dois swabs vaginais de cadelas com secreção purulenta apresentaram crescimento de *Staphylococcus* sp e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas citadas na literatura (COGGAN, 2005).

Pseudomonas aeruginosa foi também isolada de abscesso infra orbitário. Esta bactéria pode ser encontrada na pele, em membranas mucosas e fezes de animais (QUINN et al., 2004).

Klebsiella pneumoniae e *Enterobacter aerogenes* são bactérias da família *Enterobacteriaceae* que estão no solo, água, plantas e no intestino de animais e humanos (QUINN et al., 2004). No presente estudo, *Klebsiella pneumoniae* foi isolada de um animal com cistite e outro com pneumonia, enquanto que *Enterobacter aerogenes* foi isolada no líquido ascítico de um cão com ruptura de intestino. Em cães, estas bactérias estão presentes em casos de piometra, cistite, prostatite, pneumonia, meningoencefalite, enterite, mastite, septicemia, abscesso hepático e otite (SONGER e POST, 2005).

A quantificação de neutrófilos tóxicos, pouco realizada na rotina laboratorial na veterinária, parece ser uma importante ferramenta para avaliação de prognóstico (AROCH et al., 2005). O presente estudo demonstrou que há diminuição na taxa de sobrevivência quando são encontradas quantidades superiores a 20% de neutrófilos tóxicos circulantes. Com 70% de neutrófilos tóxicos, as chances de sobrevivência de um cão são em torno de 50% e com 90% de neutrófilos tóxicos as chances são de 10%. Esses são dados importantes porque podem ser adotados na rotina clínica e cirúrgica de centros veterinários. Aroch et al. (2005) ainda citam que quantidades elevadas de neutrófilos tóxicos estão correlacionadas com maior tempo de hospitalização e custo elevado no tratamento. Alta porcentagem de neutrófilos tóxicos também foi relacionada com piores sinais clínicos e maiores alterações na temperatura retal (GOSSETT et al., 1985).

O aparecimento de neutrófilos tóxicos na circulação parece ser rápido. Um estudo feito por Gossett et al. (1985) demonstrou, após injeção intramuscular de turpentina em cães, que em oito horas houve o aparecimento de neutrófilos basofílicos e vacuolizados na circulação sanguínea. Com 16 horas da aplicação, o número de neutrófilos tóxicos atingiu o pico, mantendo-se por dois dias até atingir níveis de controle no sétimo dia. Concomitantemente, os autores realizaram avaliação da medula óssea dos cães. Verificaram que em oito horas da aplicação, havia mínimo aumento na produção de neutrófilos na medula, apesar do aparecimento de neutrófilos tóxicos na circulação. Isto talvez suporte o envolvimento de degeneração celular. Em 1977, Bibi et al. demonstraram que neutrófilos tóxicos podem apresentar alteração nas membranas celulares. Mais estudos devem ser realizados para esclarecer o comportamento medular, cinética dos neutrófilos e possíveis alterações na membrana dos neutrófilos circulantes.

5. CONCLUSÃO

Doenças de várias causas podem levar ao aparecimento de neutrófilos tóxicos em cães, como: inflamatórias, infecciosas, hormonais, traumáticas, degenerativas, neoplásicas, auto-imunes, alérgicas e tóxicas. Nas doenças infecciosas, bacilos Gram negativos e *Staphylococcus* sp normalmente são os agentes. As doenças podem gerar tipos diferentes de alterações morfológicas e em quantidades variáveis. A quantificação dos neutrófilos tóxicos tem valor importante na caracterização de severidade de alterações hematológicas e bioquímicas e na taxa de mortalidade, uma vez que quantidades superiores a 20% de neutrófilos tóxicos estiveram relacionadas com diminuição na taxa de sobrevivência dos animais.

6. REFERÊNCIAS

AL-GWAIZ, L.A.; BABAY, H.H. The diagnostic value of absolute neutrophil count, band count and morphological changes of neutrophils in predicting bacterial infections. **Medical Principles and Practice**, v.16, p.344-347, 2007.

ALLISON, R.W.; MEINKOTH, J.H. Hematology without the numbers: in-clinic blood film evaluation. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.37, p.245-266, 2007.

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

BIBI, S.S.; DeCHATELET, L.R.; McCALL, C.E. Human toxic neutrophils – IV. Incorporation of amino acids and uptake of 2-deoxy-n-glucose. **Journal of Infectious Diseases**, v.135, p.949-951, 1977.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, n.2, p.127-136, 2002.

CARTER, G.R. **Fundamentos de bacteriologia e micologia veterinária**. São Paulo: Roca, 1988.

COGGAN, J.A. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *E. coli* e o potencial risco à saúde humana. **Dissertação de Mestrado**, USP, 2005, 157p.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. *In*: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6^aEdição, San Diego: Academic Press. 2008, p.117-155.

FRANSSON, B. A; RAGLE, C. A. Canine Pyometra: an update on pathogenesis and treatment. **Compendium**, v. 25, n. 8, p. 602-611, 2003.

FRANSSON, B.; LAGERSTEDT, A.S.; HELLMEN, E.; JONSSON, P. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine diseases. **Journal of Veterinary Medicine**, v.44, p.417-426, 1997.

GIEGER, T.I.; CORREA, S.S.; TABOADA, J.; GROOTERS, A.M.; JOHNSON, A.J. Phenol poisoning in three dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, i.4, p.317-321, 2000.

GOSSETT, K.A.; CARAKOSTAS, M.C. Effect of EDTA on morphology of neutrophils of healthy dogs and dogs with inflammation. **Veterinary Clinical Pathology**, v.13, p.22-25, 1985.

GOSSET, K.A. & MacWILLIAMS, P.S. Ultrastructure of canine toxic neutrophils. **The American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n.9, p.1634-7, 1982.

GOSSETT, K.A.; MacWILLIAMS, P.S.; CLEGHORA, B. Sequential morphological and quantitative changes in blood and bone marrow neutrophils in dogs with acute inflammation. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.49, p.291-297, 1985.

ITOGA, T.; LASZLO, J. Döhle bodies and other granulocytic alterations during Chemotherapy with Cyclophosphamide. **Blood**, v.20, n.6, p.668-674, 1962.

KIM, Y.S.; PARK, H.H.; RHEE, H.W.; HONG, J.I.; HAN, K. Neutrophils with toxic granulation show high fluorescence with Bis Complex. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.39, n.2, p.114-119, 2009.

KROFT, S.H. Infectious diseases manifested in the peripheral blood. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.22, p.253-277, 2002.

LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **Duncan e Prasse's Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology**. Blackwell Publishing: Iowa. 4ªEdição, 2003 450p.

LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M. Clinical interpretation of leukocytes responses. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.19, p.6397-668, 1989.

LIU, C.H.; LEHAN, C.; SPEER, M.E. et al. Degenerative changes in neutrophils: An indicator of bacterial infection. **Pediatrics**, v.74, p.823-927, 1984.

MACHEVERSKY, A.M.; READ, R.A. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.77, p.232-237, 1999.

MALCOLM, I.D.; FLEGEL, K.M.; KATZ, M. Vacuolization of the neutrophil in bacteremia. **Archives of Internal Medicine**, v.139, p.675-676, 1979.

MUNKER, R. Leukocytosis, leucopenia, and other reactive changes of myelopoiesis. **Contemporary Hematology**, p.127-135, 2007.

PROKOCIMER, M.; POTASMAN, I. The added value of peripheral blood cell morphology in the diagnosis and management of infectious diseases – parte 1: basic concepts. **Postgraduate Medical Journal**, v.84, p.579-585, 2008.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. **Clinical Veterinary Microbiology**. Editora Mosby: London. 4^a edição, 2004. 646p.

SEEBACH, J.D.; MORANT, R.; RUEGG, R.; SEIFERT, B.; FEHR, J. The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. **The American Journal of Clinical Pathology**, v.107, p.582-591, 1997.

SCHULTZE, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. *In*: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.321-334.

SEGEV, G.; KLEMENT, E.; AROCH, I. Toxic neutrophils in cats: clinical and clinicopathologic features, and disease prevalence and outcome – a retrospective case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.20-31, 2006.

SONGER, J.G.; POST, K.W. **Veterinary Microbiology – Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease**. Elsevier Saunders: St. Louis. 1^a edição, 2005, 1483p.

STOCKHAM, S.L.; KEETON, K.S.; SZLADOVITS, B. Clinical assessment of leukocytosis: distinguishing leukocytoses caused by inflammatory, fglucocorticoid, physiologic, and leukemic disorders or conditions. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p.1335-1357, 2003.

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 8^a edição. Elsevier: Barcelona, 2009, 592p.

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. *In*: COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DeNICOLA, D.B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. Editora MedVet: São Paulo. 3^a Edição, 2009. p.390-422.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária nas Doenças. *In*: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Editora Roca: São Paulo. 1^a Edição, 2007, p.127-140.

WEISS, D.J. A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004). **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.955-961, 2006.

WEISS, D. & TVEDTEN, H. The complete blood count and bone marrow examination: general comments and selected techniques. *In*: WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H.; TURNWALD, G.H. **Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods**. Elsevier: Missouri, 4thEdição, 2004, p.14-37.

CAPÍTULO II

ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS

HEMATOLOGIC AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN DOGS WITH TOXIC NEUTROPHILS

RESUMO

A presença de alterações tóxicas em neutrófilos é indicativo de aceleração da neutropoiese e está associada à severos processos inflamatórios e bacterianos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a prevalência de alterações hematológicas e bioquímicas em cães com neutrófilos tóxicos. Parâmetros de 100 cães com neutrófilos tóxicos foram comparados aos de 60 cães saudáveis e 60 cães doentes sem neutrófilos tóxicos. Foi realizado hemograma e provas bioquímicas (ALT, FA, uréia, creatinina, albumina, globulina, proteína total, glicose e ferro) de todos os animais. Os cães com neutrófilos tóxicos apresentaram diminuição de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, eosinófilos, linfócitos, albumina e ferro quando comparados aos outros grupos; aumento de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, bastonetes, monócitos, FA, uréia e glicose; e VGM, CHGM, plaquetas, ALT, creatinina, proteína total e globulina igual aos outros grupos. Ainda, comparando aos valores de referência, verificou-se que cães com neutrófilos tóxicos podem ter resultados laboratoriais dentro da normalidade. Conclui-se que a verificação da quantidade de células no hemograma não é suficiente para o diagnóstico de processos inflamatórios graves, necessitando a verificação da presença de neutrófilos tóxicos e, ainda, que cães com neutrófilos tóxicos apresentam mais alterações laboratoriais do que cães doentes sem neutrófilos tóxicos circulantes.

PALAVRAS-CHAVE: basofilia, vacuolização, corpúsculos de Döhle, granulação.

ABSTRACT

The presence of toxic changes in neutrophils is indicative of neutropoiesis' acceleration and has been associated with severe inflammatory processes and bacterial infections. The aim of this study was to evaluate the prevalence of hematological and biochemical changes in dogs with toxic neutrophils. Parameters of 100 dogs with toxic neutrophils were compared to 60 healthy dogs and 60 sick dogs without toxic neutrophils. Blood count was performed and biochemical tests (ALT, ALP, BUN, creatinine, albumin, globulin, total protein, glucose and iron) of all animals. The dogs with toxic neutrophils have decreased erythrocyte, hemoglobin, globular volume, eosinophils, lymphocytes, albumin and iron when compared to the other groups; an increase of total leukocytes, segmented neutrophils, band cells, monocytes, ALP, BUN and glucose; and VGM, CHGM, platelets, ALT, creatinina, total protein and globulin equal to other groups. Also, comparing with reference values, it was found that dogs can have toxic neutrophils within normal laboratory results. It was concluded that the verification of the amount of cells in blood cell count is not sufficient for the diagnosis of serious inflammatory processes, requiring verification of the presence of toxic neutrophils, and also that these dogs showed more abnormalities than patients without toxic neutrophils circulating.

KEY-WORDS: basophilia, vacuolization, Döhle bodies, granulation

1. INTRODUÇÃO

O estímulo à medula óssea por processos inflamatórios induz a rápida produção de neutrófilos para suprir a demanda tecidual. Nesse processo são liberadas para a circulação células jovens, as quais contêm maior quantidade de organelas citoplasmáticas que as células maduras (WEISER, 2007). A presença deste maior número de organelas causa alterações morfológicas nos neutrófilos e pode ser visualizada durante a avaliação do esfregaço sanguíneo, sendo denominadas de “alterações tóxicas” ou “neutrófilos tóxicos”. A toxicidade em neutrófilos pode preceder alteração do número de neutrófilos e do aparecimento de bastonetes (GOSSETT et al., 1985), podendo ser utilizada como sensível achado adicional para caracterização do prognóstico e diagnóstico em cães (AROCH et al., 2005).

As alterações tóxicas que podem ser encontradas nos neutrófilos de mamíferos são: basofilia citoplasmática, decorrente de maior número de ribossomos e observa-se citoplasma claro, homogêneo e azul-roxeado nos neutrófilos (WEISER, 2007); vacuolização citoplasmática, decorrente de toxicidade sistêmica severa e da liberação intracelular de enzimas autolíticas (LATIMER, 2003); corpúsculos de Döhle, agregados de retículo endoplasmático, visualizados como precipitados azul-aczentados e indicam processo inflamatório sistêmico (WALKER, 2009); granulação tóxica representa os grânulos de mucopolissacarídeos retidos que normalmente se perdem na maturação dos neutrófilos e se apresentam como grânulos dispersos, pequenos e de coloração vermelho-rosada (SCHULTZE, 2010); núcleo em forma de anel, principal alteração nuclear tipicamente relacionada à sepse (WALKER, 2009); e os neutrófilos gigantes decorrentes de divisões mitóticas anormais durante o desenvolvimento das células precursoras de neutrófilos (AROCH et al., 2005).

A presença destas alterações tóxicas nos neutrófilos de cães está mais associada com inflamações de caráter sistêmico do que localizado e está constantemente relacionada à presença de infecções bacterianas, bacteremia, abscessos e septicemia (MARCHEVSKY e READ, 1999; SCHULTZE, 2010); severos processos inflamatórios (LATIMER e RAKICH, 1989) e toxicidade às drogas (GOSSETT e MacWILLIAMS, 1982; GIEGER et al., 2000; SCHULTZE, 2010).

Segundo estudo retrospectivo realizado por Aroch et al. (2005) em cães com neutrófilos tóxicos tendem a apresentar parâmetros hematológicos mais alterados que cães doentes sem neutrófilos tóxicos. Porém, o estudo não relata se estes cães doentes sem

neutrófilos tóxicos possuíam alteração em quantidade de leucócitos, não confirmando assim a presença de quadro inflamatório ou infeccioso.

Este estudo prospectivo tem como objetivo verificar se cães com neutrófilos tóxicos possuem maior prevalência de alterações hematológicas e bioquímicas do que cães doentes com leucograma inflamatório, porém, sem neutrófilos tóxicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Foram inclusos cães de todas as idades, sexos e raças atendidos na rotina clínico-cirúrgica do Hospital Veterinário da UFPR. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (certificado em anexo).

Critérios de Inclusão

Foram inclusos animais da espécie canina, independente da idade, sexo e raça. Os cães foram divididos em três grupos:

- Grupo 1 (G1) – cães clinicamente sadios e com exames hematológicos e bioquímicos normais (n=60, 40 fêmeas e 20 machos), encaminhados ao HV da UFPR para realização de procedimentos eletivos, como ovariossalpingohisterectomia e orquiectomia;
- Grupo 2 (G2) – cães clinicamente doentes, com alterações na quantidade de leucócitos totais e na contagem diferencial, porém sem neutrófilos tóxicos (n=60, 35 fêmeas e 25 machos);
- Grupo 3 (G3) – cães clinicamente doentes, com alterações na quantidade de leucócitos totais, na contagem diferencial e com neutrófilos tóxicos (n=100, 58 fêmeas e 42 machos).

Nos grupos 2 e 3, o diagnóstico final foi obtido pelo médico veterinário responsável pelo exame clínico e exames auxiliares (ultra-som, raio-x, exame microbiológico, histopatológico, sorologia, citologia de medula óssea, entre outros), conforme o clínico julgou necessário.

Exames Laboratoriais

As amostras de sangue para realização do hemograma foram colhidas em tubos à vácuo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por punção de veia cefálica ou jugular.

As amostras foram analisadas dentro de 30 minutos após coleta com a utilização de analisador automático (BC-2800, Mindray®, Nanshan, China), calibrado para sangue de cães. Os parâmetros hematológicos avaliados foram: contagem de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), grau de distribuição de células vermelhas (RDW), leucócitos totais, contagem de plaquetas, volume médio de plaquetas (MPV), grau de distribuição de plaquetas (PDW) e o plaquetócrito (PCT). O hematócrito foi confirmado por centrifugação do sangue total em tubo capilar durante cinco minutos em microcentrífuga a 11.000 rpm. A proteína plasmática total foi determinada por refratometria. As extensões sanguíneas foram coradas com Panótico® para avaliações dos eritrócitos e plaquetas, contagem diferencial e análises morfológicas dos leucócitos (100 células) em microscopia ótica. Nos leucogramas com valores de leucócitos totais superiores a 25.000/ μ L e 35.000 / μ L, foram avaliadas 200 e 300 células, respectivamente, obtendo-se o valor médio. Os resultados de hemograma foram comparados à valores de referência citados em literatura por RIZZI et al. (2010).

Os neutrófilos tóxicos foram avaliados nos esfregaços sanguíneos corados. Foram avaliadas as seguintes alterações morfológicas: basofilia, vacuolização e granulação citoplasmáticas, presença de corpúsculos de Döhle, células gigantes, núcleo em forma de rosca e estágios da morte celular (picnose, cariorréxis).

Para realização dos exames bioquímicos, as amostras de sangue foram colhidas em tubos à vácuo sem anticoagulante e o soro foi obtido por centrifugação durante 5 minutos a 4.500 rpm. Os exames foram realizados por espectrofotometria automatizada (BS-200, Mindray®, Nanshan, China). Foram mensurados os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT – método cinético UV), fosfatase alcalina (FA – método cinético colorimétrico), albumina (método verde Bromocresol), uréia (método da urease GLDH), creatinina (método do Jaffé), proteína total (método de Biureto), globulina (diferença da proteína total e albumina), glicose (método colorimétrico enzimático) e ferro sérico (colorimétrico, utilizando Ferene). Os resultados obtidos nas provas bioquímicas foram comparados à valores de referência citados por KANEKO et al. (2008).

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows®, com os testes ANOVA e Tukey, considerando o nível de significância $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

A idade dos animais variou de dois meses a 11 anos no G1 ($2,25 \pm 2,24$ anos); de dois meses a 15 anos no G2 ($9 \pm 4,23$ anos); e de dois meses a 18 anos no G3 ($7 \pm 4,17$ anos). As idades dos animais dos grupos G2 e G3 foram diferentes das idades dos animais do grupo G1 (Gráfico 9).

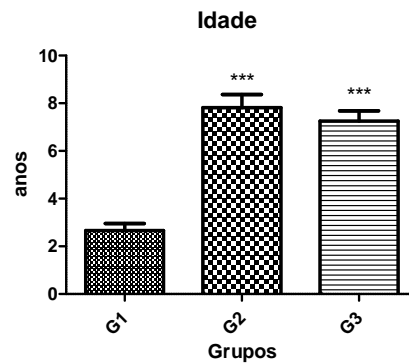


Gráfico 9 – Comparação entre as idades dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (**P<0,001 com relação ao G1).
NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Na tabela 3 estão apresentadas as médias e os desvios padrão dos valores hematológicos dos cães dos grupos G1, G2 e G3.

TABELA 3 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS DOS CÃES DOS GRUPOS G1, G2 E G3

	Grupo 1 (G1)	Grupo 2 (G2)	Grupo 3 (G3)
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	6,79 \pm 0,84 ^a	6,34 \pm 1,33 ^b	5,87 \pm 1,64 ^c
Hemoglobina (g/dL)	16,79 \pm 2,50 ^a	15,45 \pm 3,83 ^b	14,25 \pm 4,44 ^b
Hematócrito (%)	48,7 \pm 6,44 ^a	45 \pm 9,93 ^b	42 \pm 12 ^b
RDW (%)	15,03 \pm 0,56 ^a	15,2 \pm 2,16 ^a	15,3 \pm 3,05 ^a
VGM	72 \pm 6,10 ^a	70,78 \pm 5,83 ^a	71,9 \pm 8,94 ^a
CHGM	34,48 \pm 2,76 ^a	34,44 \pm 2,61 ^a	33,86 \pm 27,29 ^a
Leucócitos Totais (μL)	12.076,67 \pm 2.819,57 ^a	19.400 \pm 11.987 ^b	16.750 \pm 21.527,94 ^b
Segmentados (μL)	7.949,38 \pm 2.669,23 ^a	15.317 \pm 9.863,47 ^b	12.060 \pm 15.256,03 ^b
Bastonetes (μL)	2,52 \pm 19,49 ^a	390,5 \pm 1.175,3 ^a	2.094,5 \pm 5.616,61 ^b
Linfócitos (μL)	2.600,4 \pm 1.344,57 ^a	1.581 \pm 1.643,62 ^{ab}	1.291,5 \pm 1.340,97 ^b
Monócitos (μL)	634,37 \pm 438,39 ^a	1.090,5 \pm 1.200,37 ^{ab}	1.235,5 \pm 2.762,49 ^b
Eosinófilos (μL)	882,15 \pm 795,14 ^a	395 \pm 807,01 ^{ab}	246,5 \pm 778,89 ^b
Plaquetas (μL)	295.859,65 \pm 75.678,7 ^a	340.500 \pm 172.171,09 ^b	318.000 \pm 201.538,52 ^{ab}
MPV (fL)	8,9 \pm 0,82 ^a	8,5 \pm 1,06 ^a	9,2 \pm 1,3 ^{ab}
PDW	15,75 \pm 0,31 ^a	15,8 \pm 0,40 ^{ab}	15,9 \pm 0,49 ^b
PCT (%)	0,25 \pm 0,08 ^a	0,29 \pm 0,13 ^b	0,27 \pm 0,16 ^{ab}

G1 = cães saudáveis; G2 = cães clinicamente doentes com alteração em quantidade de células no leucograma; G3 = cães clinicamente doentes com alteração em quantidade e qualidade (neutrófilos tóxicos) de células no leucograma; RDW = grau de distribuição das células vermelhas; VGM = Volume Globular Médio; CHGM = Concentração de Hemoglobina Globular Média; MPV = Volume Médio de Plaquetas; PDE = grau de distribuição de plaquetas; PCT = plaquetócrito

Houve diferença estatística nos parâmetros hemácias, hemoglobina e hematócrito entre os grupos, conforme apresentado nos gráficos 10, 11 e 12, respectivamente. Esta diferença não foi verificada nos parâmetros VGM, CHGM e RDW.

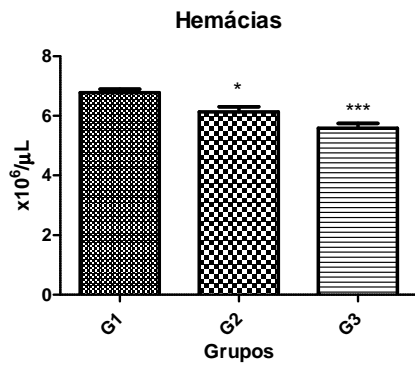


Gráfico 30 – Número de hemácias dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (*P<0,05 e **P<0,001). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

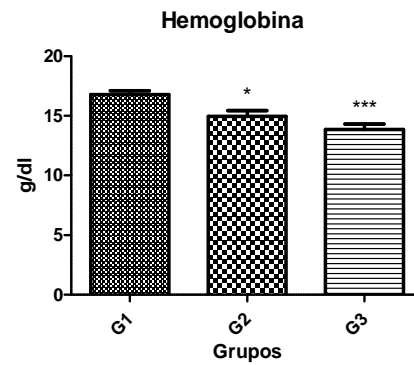


Gráfico 41 – Concentração de hemoglobina dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (*P<0,05 e **P<0,001). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

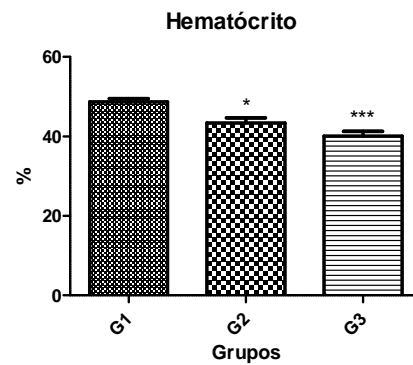


Gráfico 52 – Hematócrito dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (*P<0,05 e **P<0,001). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

No leucograma observou-se diferença estatística entre os grupos para os parâmetros leucócitos totais (Gráfico 13) e neutrófilos segmentados (Gráfico 14).

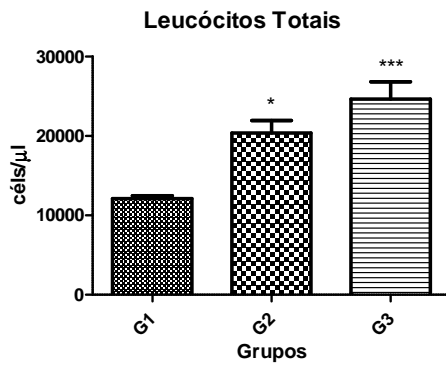


Gráfico 63 – Número de leucócitos totais dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (* $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

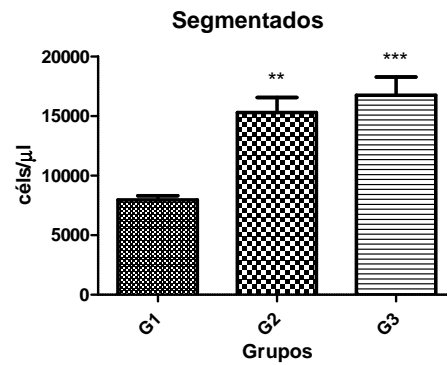


Gráfico 74 – Número de neutrófilos segmentados dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (** $P < 0,005$ e *** $P < 0,001$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Os parâmetros bastonete e monócitos apresentaram aumento significativo no G3 quando comparados aos demais grupos (Gráficos 15 e 16). Linfócitos e eosinófilos apresentaram diminuição também no G3 (Gráficos 17 e 18).

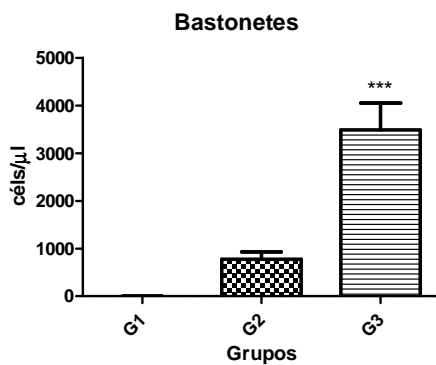


Gráfico 85 – Número de neutrófilos bastonetes dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (***) $P < 0,001$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

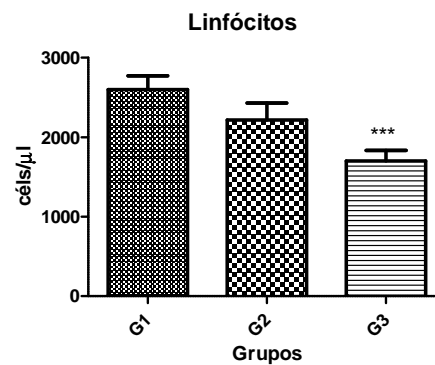


Gráfico 96 – Número de linfócitos dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (***) $P < 0,001$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

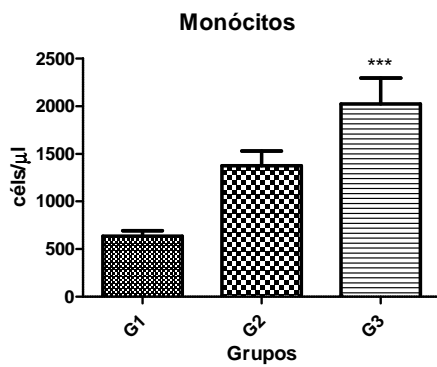


Gráfico 107 – Número de monócitos dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (**P<0,001). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

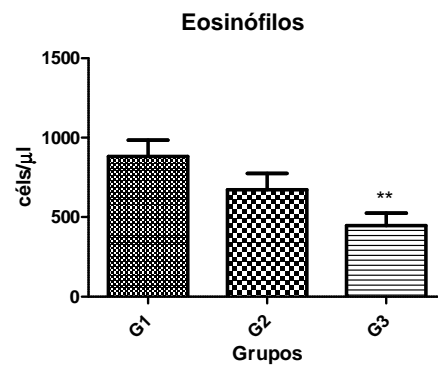


Gráfico 1811 – Número de eosinófilos dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (**P<0,005). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Os metamielócitos e mielóticos foram observados nos hemogramas dos cães do grupo 3, com valores médios de $0 \pm 2.304,84 /\mu\text{L}$ e de $0 \pm 676,29 /\mu\text{L}$, respectivamente.

A contagem de plaquetas apresentou aumento apenas no G2 quando comparado aos demais grupos (Gráfico 19).

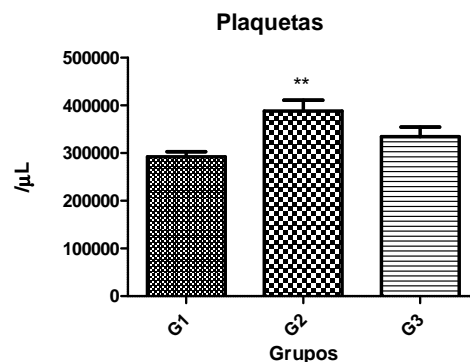


Gráfico 19 – Número de plaquetas dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (**P<0,005). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Os índices relacionados à contagem plaquetária, MPV, PDW e PCT apresentaram diferença entre os grupos. O MPV diferiu entre G2 e G3 (Gráfico 20), o PDW entre G1 e G3 (Gráfico 21), e o PCT entre G1 e G2 (Gráfico 22).

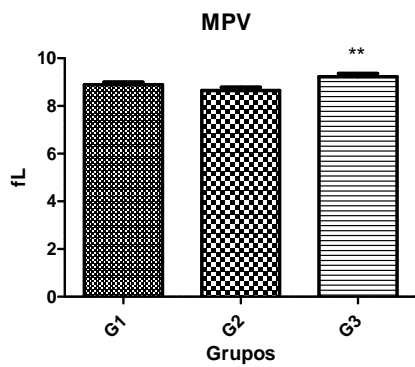


Gráfico 2012 – MPV dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (** $P < 0,005$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

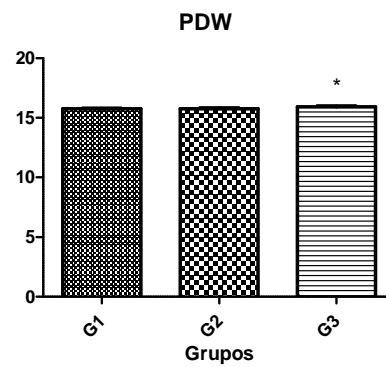


Gráfico 131 – PDW dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (* $P < 0,05$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

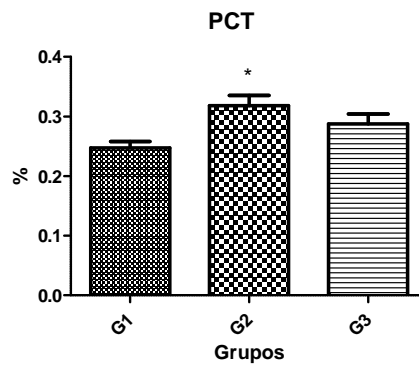


Gráfico 142 – PCT dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (* $P < 0,05$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

O valor de proteína plasmática médio do G1 foi de $7,0 \pm 1,12$ g/dL, do G2 de $7,3 \pm 1,20$ g/dL e do G3 de $6,90 \pm 0,62$ g/dL, não havendo diferença estatística entre os grupos.

Na tabela 4 encontram-se as médias e os desvios padrão dos parâmetros bioquímicos dos cães dos grupos 1, 2 e 3.

TABELA 4 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DOS CÃES DOS GRUPOS 1, 2 E 3.

	Grupo 1 (G1)	Grupo 2 (G2)	Grupo 3 (G3)
ALT (UI/L)	39,42 ± 0,26 ^a	44 ± 187,28 ^b	37,10 ± 169,86 ^{ab}
FA (UI/L)	59,76 ± 31,45 ^a	94,3 ± 174,67 ^{ab}	126 ± 879,28 ^b
Creatinina (mg/dL)	0,80 ± 0,26 ^a	0,9 ± 2,22 ^a	0,8 ± 2,47 ^a
Uréia (mg/dL)	36,33 ± 11,95 ^a	40 ± 127,85 ^b	42 ± 84,10 ^b
Proteína Total (g/dL)	6,53 ± 0,81 ^a	6,45 ± 1,65 ^a	6,3 ± 5,78 ^a
Albumina (g/dL)	3,48 ± 0,26 ^a	3,2 ± 0,47 ^b	3,1 ± 2,27 ^b
Globulina (g/dL)	3,04 ± 0,82 ^a	3,4 ± 1,4 ^a	3,2 ± 2,73 ^a
Glicose (mg/dL)	99,64 ± 24,58 ^a	103 ± 33,13 ^{ab}	110 ± 139,43 ^b
Ferro (µg/dL)	204,27 ± 75,38 ^a	154 ± 108,31 ^a	122,75 ± 92,64 ^b

G1 = cães saudáveis; G2 = cães clinicamente doentes e com alteração em quantidade de células no leucograma; G3 = cães clinicamente doentes e com alteração em quantidade de células no leucograma e presença de neutrófilos tóxicos; ALT = Alanina aminotransferase; FA = Fosfatase Alcalina

Houve diferença estatística nos valores da ALT entre os grupos 1 e 2 (Gráfico 23) e nos valores da FA entre os grupos 1 e 3 (Gráfico 24).

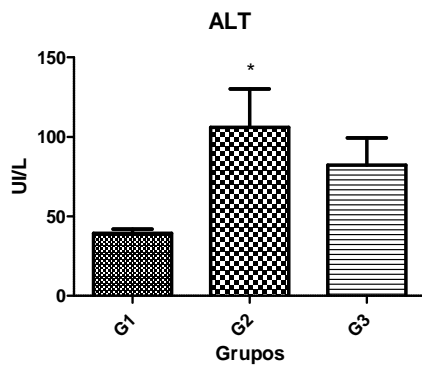


Gráfico 153 – ALT dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (*P<0,05). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

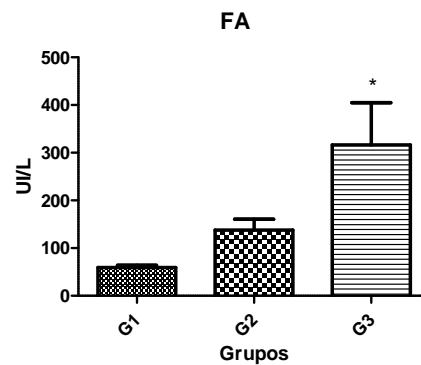


Gráfico 164 – FA dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (*P<0,05). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Não houve diferença para a creatinina entre os grupos (Gráfico 25), porém verificou-se diferença para a uréia nos grupos 2 e 3 (Gráfico 26).

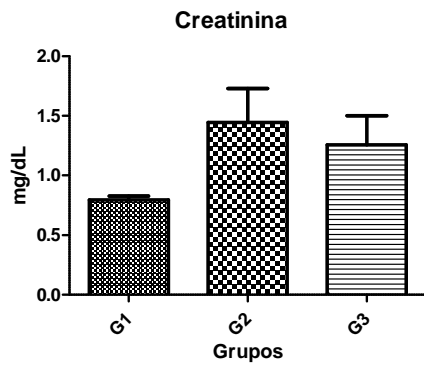


Gráfico 175 – Creatinina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

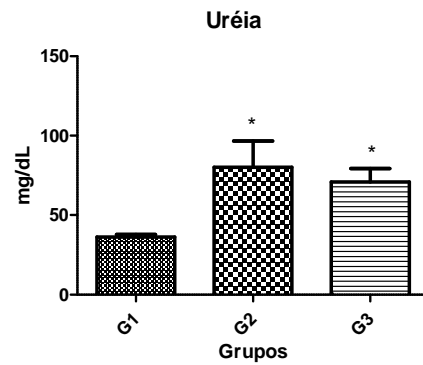


Gráfico 186 – Uréia dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (* $P < 0,05$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Nos parâmetros proteínas totais e globulina não foram verificadas diferenças entre os grupos. Nos valores da albumina houve diminuição nos grupos 2 e 3 (Gráfico 27). Houve aumento da glicose sérica apenas no G3 (Gráfico 28).

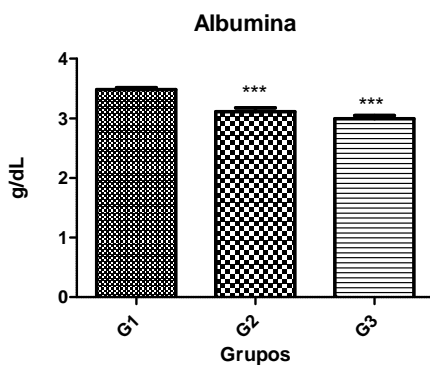


Gráfico 197 – Albumina dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (***) $P < 0,001$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

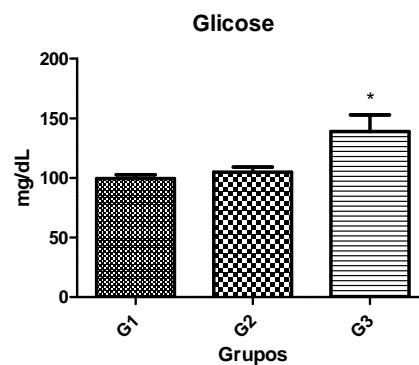


Gráfico 2820 - Glicose dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (* $P < 0,05$). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Houve diferença no ferro sérico entre os grupos 1 e 3, e entre 2 e 3 (Gráfico 29).

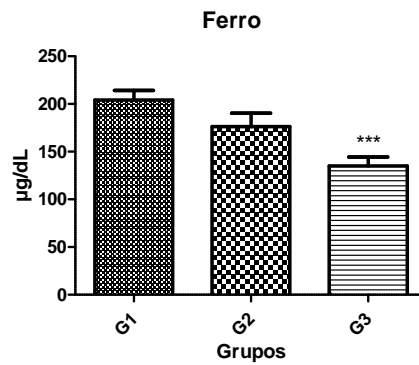


Gráfico 2921 - Ferro sérico dos cães dos grupos 1, 2 e 3 (**P<0,001). NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Com base nesses resultados foram estabelecidas as prevalências das alterações hematológicas e bioquímicas mais comuns dos cães com neutrófilos tóxicos (G3). Nos quadros 2 e 3 estão apresentadas a prevalência de diminuição, aumento ou normalidade dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos cães do G2 e G3.

Parâmetros	Diminuição %		Normalidade %		Aumento %	
	G2	G3	G2	G3	G2	G3
Hemácias	26,67	45	71,67	52	1,67	3
Hemoglobina	18,33	29	61,67	53	20	17
Hematócrito	21,67	34	68,33	57	10	9
VGM	3,33	04	85	73	11,67	23
CHGM	11,67	25	66,67	56	21,67	19
Leucócitos Totais	13,33	04	25	47	61,67	49
Neutrófilos Segmentados	10	03	30	44	60	53
Neutrófilos Bastonetes	0	0	38,33	11	61,67	89
Linfócitos	23,33	34	65	63	11,67	03
Monócitos	0	0	63,33	55	36,67	45
Eosinófilos	33,33	42	46,67	54	20	04
Proteína Plasmática	11,67	13	70	75	18,33	12
Plaquetas	21,67	24	70	58	8,33	18

Quadro 2 - Porcentagem de cães sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3) que apresentam diminuição, aumento ou normalidade nos parâmetros hematológicos

Parâmetros	Diminuição %		Normalidade %		Aumento %	
	G2	G3	G2	G3	G2	G3
Albumina	13,33	16	53,33	58	33,33	26
Globulina	26,67	25	58,33	62	15	13
Proteína Total	15	20	60	58	25	22
Creatinina	5	11	80	76	15	13
Uréia	6,67	7	68,33	67	25	26
ALT	10	22	71,67	54	18,33	24
FA	0	0	81,67	56	18,33	44
Glicose	8,33	12	56,67	42	35	46
Ferro	3,33	26	58,33	69	38,33	5

Quadro 3 - Porcentagem de cães sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3) que apresentam diminuição, aumento ou normalidade nos parâmetros bioquímicos

4. DISCUSSÃO

A idade média dos cães do G1 foi inferior que a dos demais grupos, porque o grupo G1 foi constituído por animais mais jovens em que foram realizados procedimentos eletivos como orquiectomia e ovariosalpingohisterectomia. Não foi encontrada diferença entre as idades de cães doentes sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3), conforme observado por Aroch et al. (2005). Não há prevalência de idade para o aparecimento de neutrófilos tóxicos, uma vez que tanto doenças de animais jovens (como gastroenterites) quanto de animais idosos (como neoplasias) podem levar à alteração tóxica em neutrófilos.

A diminuição dos parâmetros, eritrócitos, hemoglobina e hematócrito dos pacientes com neutrófilos tóxicos, associada aos valores iguais de VGM, CHGM e RDW quando comparados ao grupo controle, podem ser indicativos de tendência dos cães do G3 a desenvolverem anemia de caráter não regenerativo. As anemias de doença crônica, segundo Weiss (2000), são normocíticas e normocrômicas, discretas a moderadas e comuns em casos de infecções ou inflamações crônicas e neoplasias. Esta anemia ocorre por três principais mecanismos: diminuição na meia-vida das hemácias, resposta medular inadequada frente à anemia e distúrbio no metabolismo do ferro (MEANS e KRANTZ, 1992).

Neste estudo, observou-se que os cães sem neutrófilos tóxicos (G2) e com neutrófilos tóxicos (G3) apresentaram valores de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito diminuídos quando comparados aos cães controles (G1) e que esta diminuição ocorreu também nos valores do ferro sérico. Portanto, cães doentes tendem à anemia de doença crônica por

alteração no metabolismo do ferro promovida pela doença de base. Esta tendência à anemia foi observada com maior amplitude nos cães com neutrófilos tóxicos.

O ferro é um dos micronutrientes mais estudados, desempenhando importantes funções no metabolismo, tais como transporte e armazenamento de oxigênio, reações de liberação de energia na cadeia de transporte de elétrons, conversão de ribose e desoxirribose, co-fator de algumas reações enzimáticas e inúmeras outras reações metabólicas essenciais. Apesar de instável, a avaliação do ferro sérico também pode ser muito utilizada. A concentração do ferro sérico é alterada na presença de processos infecciosos, podendo diminuir em poucas horas após o desencadeamento de uma infecção (COOK et al, 1992). Isso ocorre porque durante inflamações ou infecções, há distúrbio na reutilização do ferro, o qual se mantém sob a forma de depósito. Este bloqueio deve-se ao aumento da síntese da lactoferrina, promovido pela interleucina-1 (IL-1), proteína que sinaliza para a síntese de transferrina, secretada pelos neutrófilos. A lactoferrina possui maior afinidade pelo ferro, não transfere o ferro às células eritropoéticas e é retida rápida e ativamente pelos macrófagos (CANÇADO e CHIATTONE, 2002). Desta maneira, instala-se a anemia de doença crônica. Neste estudo, sugere-se que esta seja a principal anemia dos animais com neutrófilos tóxicos, porque as concentrações de ferro encontraram-se diminuídas no G3 quando comparadas aos grupos controle (G1) e doentes sem neutrófilos tóxicos (G2).

Apesar do G2 ter sido composto por cães com alteração em quantidade de células no hemograma, verificou-se que mesmo assim os cães do G3 apresentam mais alterações hematológicas, uma vez que apresentaram leucocitose de maior magnitude, neutrofilia e desvio a esquerda mais importantes, linfopenia, eosinopenia e monocitose mais evidentes do que animais doentes sem neutrófilos tóxicos (G2). Todos estes parâmetros podem servir como marcadores da inflamação (SCHULTZE, 2010). Aroch et al. (2005) citaram que pacientes com neutrófilos tóxicos são clinicamente mais doentes e se encontram em estado maior de estresse, o que pode favorecer o aumento na quantidade de leucócitos, neutrófilos e monócitos, e diminuir as contagens de linfócitos e eosinófilos.

Durante situações de estresse, há liberação de adrenalina ou de glicocorticóides pelas glândulas adrenais. Quando a adrenalina é liberada, caracteriza-se o estresse agudo, que ocorre após estimulação do sistema simpática, levando às alterações no leucograma conhecidas por leucocitose fisiológica (KOCIBA, 2004). Esta é representada por leucocitose, neutrofilia, linfocitose e eosinofilia, e podem ocorrer em situações de medo, excitação ou punção venosa (MALM et al., 2005). Porém, em casos de dor persistente, trauma ou ambientes estressantes, o hormônio liberado é o glicocorticóide, a partir da estimulação do

eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Este hormônio leva às alterações no leucograma conhecidas por leucograma de estresse (YAGI et al., 2004). Este é caracterizado por leucocitose, neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e, de maneira menos evidente, monocitose (KERR, 2009). Essas alterações foram observadas nos cães do G3.

O aumento da glicose sérica evidenciado nos cães com neutrófilos tóxicos (G3) também pode ter relação com o cortisol endógeno liberado, como discutido anteriormente. Este hormônio possui importante função hiperglicemiante, uma vez que estimula a gliconeogênese hepática, convertendo aminoácidos em carboidratos (LEANDRO et al., 2006).

O desvio padrão de neutrófilos do G3 foi amplo uma vez que o grupo foi composto tanto por cães com neutropenia quanto neutrofilia. Ambas significam processo inflamatório, mas caracterizam-se em fases e severidades diferentes (LATIMER e RAKISH, 1989).

A cinética de neutrófilos pode ser dividida de acordo com o tempo do processo inflamatório, como: inflamação peraguda, aguda e crônica. A peraguda é caracterizada por neutropenia (ou leucopenia) detectada após 1 a 3 horas do insulto tecidual, principalmente causado por bactérias. Esta neutropenia é explicada pela elevada marginação de neutrófilos dentro do vaso sanguíneo (mediada por toxinas bacterianas), diminuição da meia-vida dos neutrófilos e aumentada migração de neutrófilos para o tecido. Já a inflamação aguda é caracterizada no leucograma por neutrofilia, vista de 6 a 8 horas após o insulto inicial. Leucocitose, desvio nuclear de neutrófilos à esquerda (DNNE), linfopenia e eosinopenia podem acompanhar esta fase, assim como o aparecimento de neutrófilos tóxicos. A neutrofilia é causada pela aceleração da hematopoiese, ultrapassando a quantidade de neutrófilos da demanda tecidual. A linfopenia e a eosinopenia são conseqüências da liberação de glicocorticóides endógenos.

A inflamação crônica ocorre nos processos inflamatórios estabelecidos há dias ou semanas, levando à leucocitose com DNNE brando ou ausente. A leucocitose ocorre por expansão dos *pools* de proliferação, maturação e estoque da medula óssea. Porém, a neutropenia pode ocorrer em qualquer uma das fases da inflamação quando houver diminuição da produção de neutrófilos, marginalização de neutrófilos circulantes ou consumo excessivo nos tecidos (SCHULTZE, 2010).

Portanto, o leucograma é transitório, podendo alterar rapidamente de acordo com a fase de instalação da doença de base. Por isso, a avaliação da presença de neutrófilos tóxicos pode contribuir para o diagnóstico de inflamação e, até mesmo de severidade da doença, do que as contagens absolutas de células brancas. Assim, para a correta avaliação hematológica do

paciente, deve-se somar número de leucócitos e contagem diferencial com presença ou ausência de alterações tóxicas em neutrófilos.

O desvio à esquerda mais evidente nos cães com neutrófilos tóxicos é um dado importante e pode ser fator influenciador no prognóstico de cães com neutrófilos tóxicos, pois quanto maior o número de bastonetes e metamielócitos, pior é o prognóstico (WEISER, 2007).

Não houve diferença no número de plaquetas entre G1 e G3. Porém, no G2 houve aumento. Durante processos inflamatórios e infecciosos, pode ocorrer aumento na produção de plaquetas, uma vez que interleucinas como a IL-6, IL-1 e IL-4 estimulam maturação e proliferação de megacariócitos (TOPPER e WELLES, 2003). Além disso, os grânulos presentes nas plaquetas possuem características anti-inflamatórias (SCULTZE, 2010), justificando seu aumento durante processos inflamatórios, como ocorreu nos cães que compuseram o G2. Este aumento nas plaquetas possivelmente não foi encontrado nos cães do G3 pela compensação de animais com número de plaquetas aumentadas e diminuídas. Cães com inflamações locais ou sistêmicas podem apresentar aumento do consumo de plaquetas, uma vez que lesão às células do endotélio vascular expõe fator tissular para o meio intravascular, acarretando em formação de fibrina (RAU et al., 2007).

Através dos índices MPV, PCT e PDW, fornecidos por aparelhos automatizados, foi possível estabelecer o plaquetograma dos cães. Não existem valores de referência para estes índices na medicina veterinária até o momento e desconhece-se a acurácia destes parâmetros para animais, mesmo quando utilizados contadores automáticos veterinários.

O MPV relaciona-se com o tamanho médio das plaquetas dos animais. O volume plaquetário é uma variável biológica que determina a função e atividade plaquetária (NASCIMENTO, 2011). Normalmente, MPV aumentado ocorre acompanhado de trombocitopenia, caracterizando resposta medular à diminuição da contagem plaquetária (BERTAZZOLO et al., 2007). No G3 houve aumento nos valores de MPV quando comparado aos outros grupos. Este aumento pode ser explicado pelos casos de trombocitopenia que ocorrem em maior quantidade no G3.

O PDW mostra o grau de heterogeneidade dos volumes plaquetários, sendo diretamente proporcional ao MPV (NASCIMENTO, 2011). No presente estudo, apenas o G3 apresentou aumento na quantificação do PDW, podendo ser explicado pelo aumento concomitante no MPV. Um estudo sobre endotoxemia obteve resultados semelhantes para o aumento de MPV e PDW quando utilizados modelos caninos, corroborando com a hipótese de que cães com

processos inflamatórios instalados apresentam resposta medular à alta demanda plaquetária (YILMAZ et al., 2008).

O plaquetócrito (PCT) é calculado através dos resultados do MPV e da contagem de plaquetas, indicando a massa de plaquetas no sangue circulante (NASCIMENTO, 2011). No presente estudo, o G2 foi o único grupo que apresentou aumento do PCT, provavelmente por apresentar aumento na contagem de plaquetas concomitante.

Nos parâmetros bioquímicos verificou-se que no G2 houve aumento da enzima ALT por apresentar alguns animais com valores extremos (acima de 800 UI/L), elevando a média do grupo e também o desvio padrão e, assim, a correlação entre os grupos. O G3 também foi composto por valores de FA muito variados, o que elevou o desvio padrão e, com isso, não houve diferença entre a FA do Grupo 1. A FA é indicadora de colestase em cães, apesar de não ser hepatoespecífica. Ela possui isoenzimas em tecido ósseo, rins, intestino e placenta (HOFFMANN e SOLTER, 2008). Acredita-se que o seu aumento nos animais do G2 e G3 se deve ao maior número de casos de hiperadrenocorticismo, fraturas, neoplasias com caráter maligno (com possível infiltração hepática), distocia e gastroenterites.

Neste estudo foram observados casos de azotemia no G2 e no G3, insuficientes para que houvesse diferença estatística entre estes grupos. Porém, a média da creatinina no G3 não ultrapassou o valor máximo de referência enquanto que a média da uréia ultrapassou. Uréia elevada com creatinina dentro da normalidade é um indício de azotemia pré-renal. Aroch et al. (2005) relataram a ocorrência de azotemia pré-renal em pacientes com neutrófilos tóxicos devido à desidratação ou hipertermia e azotemia renal ligada à doença renal aguda. Neste estudo foram observados casos de azotemia no G2 e no G3, insuficientes para que houvesse diferença estatística entre estes grupos.

Não houve diferença na mensuração de proteínas totais e globulina dos pacientes doentes (G2 e G3) com o grupo controle (G1). Acredita-se que os cães do G1, por serem animais jovens e saudáveis, podem ter passado por vacinações recentes e, com isso, apresentavam concentrações de globulina elevadas. O aumento de globulinas é esperado em pacientes com processos inflamatórios, infecciosos, traumáticos ou neoplásicos. Porém, a dosagem de proteínas totais e albumina, obtendo assim o valor de globulina, não é o melhor método para avaliação das proteínas séricas, sendo a técnica de eletroforese indispensável para a completa compreensão das alterações protéicas destes animais doentes (ECKERSALL e BELL, 2010).

A albumina foi menor no G3 em comparação com o G1 e G2, assim como relataram Aroch et al. (2005). Acredita-se que a hipoalbuminemia em cães com neutrófilos tóxicos pode

estar relacionada à reação de fase aguda, porque algumas doenças dos cães do G3 estão associadas à resposta inflamatória aguda. A albumina é uma proteína de fase aguda negativa, pois a sua concentração diminui durante processos inflamatórios ou infecciosos, podendo ser mais evidente com a cronicidade da doença (ECKERSALL, 2008).

Observou-se que leucócitos totais, neutrófilos segmentados, bastonetes e glicose estavam acima dos valores de referência em mais de 50% dos animais testados. Todos os demais parâmetros avaliados obtiveram a maior parte dos animais dentro da normalidade. Assim, verificou-se que os pacientes com neutrófilos tóxicos (G3) podem apresentar resultados laboratoriais bem diversificados. Não há um conjunto de alterações evidentes em todos os animais com neutrófilos tóxicos. Isso significa que não é a quantidade de leucócitos, por exemplo, que revela se há de fato processo inflamatório instalado ou não. O que determina o diagnóstico de inflamação é o aparecimento de neutrófilo tóxico circulante. Portanto, mesmo em cães com quantidade normal de leucócitos totais, deve-se investigar a fundo uma doença de base grave o suficiente para acelerar a neutropoiese, gerando, assim, neutrófilos tóxicos circulantes.

5. CONCLUSÃO

A quantificação de neutrófilos tóxicos é mais sensível para diagnóstico de processo inflamatório do que alterações no número de leucócitos. Os cães com neutrófilos tóxicos possuem maior prevalência de alterações hematológicas e bioquímicas. Verificou-se nos cães com neutrófilos tóxicos tendência à anemia de doença crônica, leucocitose, neutrofilia, DNNE, monocitose, eosinopenia, linfopenia, alteração no plaquetograma, aumento da atividade sérica da fosfatase alcalina, azotemia pré-renal, hipoalbuminemia, hiperglicemia e diminuição do ferro sérico, do que cães doentes sem neutrófilos tóxicos. A morfologia dos neutrófilos deve ser avaliada e incluída no hemograma para identificar inflamação/ gravidade de processo inflamatório.

6. REFERÊNCIAS

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

BERTAZZOLO, W.; COMAZZI, S.; SESSO, L.; SCARPA, P.; RU, G.; PALTRINIERI, S. Comparison of methods for determining platelet number and volume in cavalier King Charles spaniels. **Journal of Small Animal Practice**, v.48, p.556-561, 2007.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v.24, n.2, p.127-136, 2002.

COGGAN, J.A. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino e histopatológico de útero de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *E. coli* e o potencial risco à saúde humana. **Dissertação de Mestrado**, USP, 2005, 157p.

COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, v.5, p.189-202, 1992.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. *In*: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6ª Edição, San Diego: Academic Press. 2008, p.117-155.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, p.23-27, 2010.

EURIDES, D.; GONÇALVES, G.F.; MAZZANTI, A.; BUSO, A.M. Placa bacteriana dentária em cães. **Ciência Rural**, v.26, n.3, p.419-422, 1996.

GIEGER, T.I.; CORREA, S.S.; TABOADA, J.; GROOTERS, A.M.; JOHNSON, A.J. Phenol poisoning in three dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, i.4, p.317-321, 2000.

GOSSETT, K.A.; CARAKOSTAS, M.C. Effect of EDTA on morphology of neutrophils of healthy dogs and dogs with inflammation. **Veterinary Clinical Pathology**, v.13, p.22-25, 1985.

GOSSETT, K.A.; MacWILLIAMS, P.S.; CLEGHORA, B. Sequential morphological and quantitative changes in blood and bone marrow neutrophils in dogs with acute inflammation. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v.49, p.291-297, 1985.

KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6ed. San Diego: Academic Press, 2008. 936p.

KERR, Morag G. **Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia**. 2ed. São Paulo: Rocca, 2003.

KOCIBA, Gary J. Alterações leucocitárias na doença. *In*: ETTINGER, Stephen J.; FELDMAN, Edward.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. Vol.2, 2004.

LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **Duncan e Prasse's Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology**. Blackwell Publishing: Iowa. 4ªEdição, 2003 450p.

LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M. Clinical interpretation of leukocytes responses. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.19, p.6397-668, 1989.

LEANDRO, C.G. et al. Efeito da L-glutamina sobre o Perfil Leucocitário e a Função Fagocítica de Macrófagos de Ratos Estressados. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, 2006.

MACHEVERSKY, A.M.; READ, R.A. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.77, p.232-237, 1999.

MALM, C.; SAVASSI-ROCHA, P.R.; GHELLER, V.A.; OLIVEIRA, H.P.; LAMOUNIER, A.R.; FOLTYNEK, V. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina – III. Estresse pela análise do cortisol plasmático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.57, n.5, 9.584-590, 2005.

MEANS, R.T.Jr.; KRANTZ, S.B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. **Blood**, v.80, p.1639-1647, 1992.

NASCIMENTO, M.L.O. Plaquetogramas: faixas etárias e sexos. **Newslab**, v.106, p.210-224, 2011.

RAU, S. *et al.* Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Veterinary Clinical Pathology**, v.36, i.3, p.253-260, 2007.

RIZZI, T.E.; MEINKOTH, J.H.; CLINKENBEARD, K.D. Normal hematology of the dog. *In*: WEISS, D.J. e WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.321-334.

SANTOS, M.R.; AZEVEDO, J.S.; PETRUCCI, C.G.; FISHER, C.D.B.; OLIVEIRA, S.J. Suscetibilidade a antimicrobianos, de bactérias isoladas de diversas patologia em cães e gatos, nos anos de 2002 e 2003. **Veterinária em Foco**, v.2, n.2, p.157-164, 2005.

SCHULTZE, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. *In*: WEISS, D.J. e WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.321-334.

SEGEV, G.; KLEMENT, E.; AROCH, I. Toxic neutrophils in cats: clinical and clinicopathologic features, and disease prevalence and outcome – a retrospective case control study. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, p.20-31, 2006.

SIMIONATO, A.C.; RAMOS, M.C.C.; COUTINHO, S.D.A. Isolamento de bactérias aeróbias e sua sensibilidade a antimicrobianos em processos de osteomielite canina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.55, n.2, 2003.

TOPPER, M.J.; WELLES, E.G. Hemostasis. *In*: LATIMER, K.S.; MAHAFFEY, E.A.; PRASSE, K.W. **Duncan e Prasse's Veterinary Laboratory Medicine – Clinical Pathology**, 2003. 4^a Edição. Blackwell Publishing: Iowa. Capítulo 4, p.99-135

WALKER, D. Esfregaços de sangue periférico. *In*: COWEL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DeNICOLA, D.B. **Diagnóstico Citológico e Hematologia de Cães e Gatos**. Editora MedVet: São Paulo. 3ª Edição, 2009. p.390-422.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária nas Doenças. *In*: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Editora Roca: São Paulo. 1ª Edição, 2007, p.127-140.

WEISS, G. Advances in the diagnosis and management for the anemia of chronic disease. **Hematology**, p.42-45, 2000.

YAGI, Yukio; SHIONO, Hiroki; CHIKAYAMA, Yukio; OHNUMA, Aiko; NAKAMURA, Ichiro; YAYOU, Ken-Ichi. Transport stress increases somatic cell counts in milk, and enhances the migration capacity of peripheral blood neutrophils of dairy cows. **Journal of Veterinary Medical Science**, vol.66, p.381-387, 2004.

YILMAZ, Z.; ERALP, O.; ILCOL, Y.O. Evaluation of platelet count and its association with plateletcrit, mean platelet volume, and platelet size distribution width in a canine model of endotoxemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v.37, i.2, p.159-163, 2008.

CAPÍTULO III

PERFIL DAS PROTEÍNAS SÉRICAS DE CÃES COM NEUTRÓFILOS TÓXICOS

SERUM PROTEIN PROFILE OF DOGS WITH TOXIC NEUTROPHILS

RESUMO

A presença de neutrófilos tóxicos pode ser causada por inflamações, infecções e neoplasias. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil das proteínas séricas de cães com neutrófilos tóxicos. Os perfis das frações proteicas de 20 cães saudáveis (G1) foram comparados com os de 20 cães doentes sem neutrófilos tóxicos (G2) e com os de 40 cães doentes com neutrófilos tóxicos (G3). As doenças de base dos cães dos grupos G2 e G3 eram infecciosas (bacteriana), neoplásicas, inflamatórias não infecciosas, traumáticas, degenerativas, auto-imunes e hormonais. A proteína total foi obtida por espectrofotometria e a proteína-C reativa (PCR) por turbidimetria em látex. A metodologia utilizada para identificação das proteínas foi a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio. Foram obtidas 22 proteínas, sendo dez identificadas: IgA, IgG, ceruloplasmina, transferrina, albumina, haptoglobina, α 1-antitripsina, α 1-glicoproteína ácida e duas proteínas identificadas pelos seus pesos moleculares (PM) de 23.000 Da e 34.000 Da. Nos cães do G3 verificou-se elevação nas proteínas PCR, haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida e PM 34.000Da; diminuição nas proteínas transferrina, albumina e IgA; a IgG e ceruloplasmina não se alteraram. PM 23.000Da elevou-se apenas no G2. Foi encontrada correlação inversamente proporcional entre concentração de PCR e taxa de sobrevivência. Conclui-se que nos cães com neutrófilos tóxicos as proteínas de fase aguda alteram-se e suas mensurações podem ser utilizadas para avaliar severidade da doença de base.

PALAVRAS-CHAVE: eletroforese, proteína-C reativa, neoplasia, bactéria, inflamação

ABSTRACT

The presence of toxic neutrophils can be caused by inflammations, infections and neoplasms. The aim of this study was to evaluate the serum protein profile of dogs with toxic neutrophils. The serum protein profile of 20 healthy dogs (G1) were compared with the 20 sick dogs without toxic neutrophils (G2) and with 40 sick dogs with toxic neutrophils (G3). The underlying diseases of dogs in groups G2 and G3 were infectious (bacterial), neoplastic, inflammatory non-infectious, traumatic, degenerative, autoimmune and hormonal. Total protein was determined by spectrophotometry and C-reactive protein (CRP) by látex turbidimetry. The methodology used was electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecil sulfate. Were obtained 21 proteins and ten of them were identified: IgA, IgG, ceruloplasmin, transferrin, albumin, haptoglobin, α 1-antitrypsin, α 1-acid glycoprotein, and two proteins identified by their molecular weights of 23,000 Da and 34,000 Da. In dogs from G3 it was observed the elevation of some proteins, like CRP, haptoglobin, α 1-acid glycoprotein and 34,000 Da; decrease in proteins like transferrin, albumin and IgA; IgG and ceruloplasmin did not change. 23,000 Da protein rose only in G2. Inverse correlation was found between CRP concentrations and survival rates. It is concluded that in dogs with toxic neutrophils the acute phase proteins change up and their measurements can be used to assess severity of the underlying disease.

KEY-WORDS: electrophoresis, C-reactive protein, tumor, bacteria, inflammation.

1. INTRODUÇÃO

Os neutrófilos tóxicos são liberados da medula óssea antes de finalizar o processo de maturação completo. Isto ocorre quando a demanda tecidual de neutrófilos excede a quantidade circulante, estimulando a neutropoiese (WEISER, 2007). Estes neutrófilos podem ser evidenciados durante a avaliação do esfregaço sanguíneo, onde podem ser encontradas uma ou mais das seguintes alterações: basofilia citoplasmática, vacuolização citoplasmática, granulação tóxica e corpúsculos de Döhle (SCHULTZE, 2010).

A presença destas alterações tóxicas nos neutrófilos de cães está associada com inflamações, infecções bacterianas, bacteremia, abscessos e septicemia (MARCHEVSKY e READ, 1999; SCHULTZE, 2010); severos processos inflamatórios (LATIMER & RAKICH, 1989) e toxicidade à drogas (GOSSETT e MacWILLIAMS, 1982; GIEGER et al., 2000; SCHULTZE, 2010).

Processos inflamatórios, infecciosos ou traumáticos também são responsáveis por alterar as proteínas séricas, principalmente as Proteínas de Fase Aguda (PFA) (MURATA, 2004). Em cães, a mensuração das PFA pode ser considerada como um marcador bioquímico para inflamação, uma vez que suas concentrações podem ser consideradas mais sensíveis do que a contagem de leucócitos totais para detectar processos clínicos e subclínicos (SOLTER et al., 1991; MATIJATKO et al., 2007).

As principais PFA em cães são a proteína C reativa (PCR), α -1-glicoproteína ácida, amilóide sérica A, haptoglobina, ceruloplasmina, fibrinogênio e albumina. Além das PFA, a eletroforese detecta outras proteínas, como imunoglobulinas, lipoproteínas, antiproteases e proteínas carreadoras, como a transferrina (ECKERSALL, 2008).

Apesar dos estudos sobre proteínas séricas terem iniciado em meados de 1900 na medicina, foi apenas a partir de 1990 que iniciaram as investigações das PFA na medicina veterinária (CRAY et al., 2009). Desde então, muitas pesquisas estão sendo feitas com animais de companhia para validar a utilização das PFA no diagnóstico, e principalmente, no prognóstico de diversas doenças (ECKERSALL e BELL, 2010). Em cães, o perfil das PFA já foi descrita em doenças como: parvovirose, leishmaniose, babesiose, leptospirose, endotoxemia por *Escherichia coli*, doença intestinal inflamatória, doenças hematológicas, trauma cirúrgico, linfoma, pancreatite, hiperadrenocorticismos, carcinomas e sarcomas (CERON et al., 2005). Até o presente, inexistem estudos sobre a dinâmica das proteínas séricas de cães e sua relação com a presença de neutrófilos tóxicos circulantes.

O objetivo do presente estudo foi avaliar alterações no perfil das proteínas séricas de cães com neutrófilos tóxicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e no Laboratório de Apoio à Pesquisa do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária da Universidade Estadual Paulista (UNESP), *campus* Jaboticabal. Foram inclusos cães da rotina clínico-cirúrgica do Hospital Veterinário da UFPR. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPR (certificado em anexo).

Critérios de Inclusão

Foram inclusos animais da espécie canina, independente de sexo e raça. A idade mínima requerida era de dois anos. Os cães foram divididos em três grupos:

- Grupo 1 (G1) – cães clinicamente sadios e com exames hematológicos e bioquímicos normais (n=20, 18 fêmeas e 2 machos, $3 \pm 0,98$ anos), encaminhados ao HV da UFPR para realização de procedimentos eletivos, como ovariossalpingohisterectomia e orquiectomia;
- Grupo 2 (G2) – cães clinicamente doentes, com alterações na quantidade de leucócitos totais e/ou na contagem diferencial, porém sem neutrófilos tóxicos (n=20, 16 fêmeas e 4 machos, $9 \pm 3,67$ anos);
- Grupo 3 (G3) – cães clinicamente doentes, com alterações na quantidade de leucócitos totais, na contagem diferencial e com neutrófilos tóxicos (n=40, 22 fêmeas e 18 machos, $7 \pm 4,47$ anos).

Nos grupos 2 e 3, o diagnóstico final foi obtido pelo médico veterinário responsável pelo exame clínico e exames auxiliares (ultra-som, raio-x, exame microbiológico, histopatológico, sorologia, citologia de medula óssea, entre outros), conforme o clínico julgou necessário.

Coleta de dados

Foram avaliadas as fichas clínicas dos pacientes para obtenção de dados como raça, sexo, idade e diagnóstico. O diagnóstico final foi obtido através do histórico, exame clínico e

exames auxiliares requisitados pelo clínico responsável, como raio-x, ultrassom, hemograma, bioquímicos, cultura, histopatológico, sorologia, citologia de medula óssea. A evolução do caso foi obtida por meio de contato telefônico com os proprietários.

Avaliação dos Neutrófilos Tóxicos

Amostras de sangue para realização do hemograma foram colhidas em tubos à vácuo com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) por punção de veia cefálica ou jugular. As amostras foram analisadas dentro de 30 minutos após coleta com a utilização de analisador automático (BC-2800, Mindray®, Nanshan, China), calibrado para sangue de cães. O hematócrito foi confirmado por centrifugação do sangue total em tubo capilar durante cinco minutos em microcentrífuga a 11.000 rpm. A proteína plasmática total foi determinada por refratometria.

Os neutrófilos tóxicos e o diferencial leucocitário foram avaliados nas extensões sanguíneas coradas com Panótico®. Foram avaliadas as seguintes alterações morfológicas: basofilia, vacuolização e granulação citoplasmáticas, presença de corpúsculos de Döhle, células gigantes, núcleo em forma de rosca e estágios da morte celular (picnose, cariorréxis). Cem neutrófilos foram contados, obtendo-se a porcentagem (%) de neutrófilos tóxicos para cada paciente.

Exames Bioquímicos

Para realização dos exames bioquímicos, amostras de sangue foram colhidas em tubos à vácuo sem anticoagulante e o soro foi obtido por centrifugação em macrocentrífuga durante 5 minutos a 4.500 rpm. Os exames foram realizados através de espectrofotometria automática (BS-200, Mindray®, Nanshan, China). A concentração sérica de proteína total foi obtida pelo método de biureto. A proteína C reativa ultra-sensível foi mensurada por turbidimetria em látex com kit comercial (Biotechnica®). Para triagem dos grupos, foram realizados os seguintes testes: alanina aminotransferase (ALT – método cinético UV), fosfatase alcalina (FA – método cinético colorimétrico), albumina (método verde Bromocresol), uréia (método da urease GLDH), creatinina (método do Jaffé), globulina (proteína total – albumina). glicose (método colorimétrico enzimático) e ferro sérico (colorimétrico utilizando Ferene).

Fracionamento Protéico

A técnica de eletroforese vertical utilizou gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme técnica descrita por Laemmli (1970) (em anexo).

Após a separação, o gel foi corado durante duas horas em solução de azul de Coomassie e, em seguida, colocado em solução de ácido acético a 7% para retirar o excesso de corante, até que as frações protéicas fossem nítidas. As concentrações dessas frações protéicas foram determinadas em densitômetro computadorizado (CS 9301, Shimadzu®, Tokio, Japan), após escaneamento dos géis e avaliação de gráficos, os quais apresentavam a porcentagem de cada fração protéica no soro do animal. Sabendo a quantidade de proteína total, calculou-se a concentração de cada fração protéica identificada.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows®, com os testes de covariância (ANOVA), Tukey, Regressão Linear, Pearson e de Sobrevivência.

3. RESULTADOS

Os diagnósticos dos cães do G2 (n=20) foram: neoplasia (n=10), doença periodontal (n=5), piometra (n=2), cistite bacteriana (n=2) e pielonefrite (n=1). Das neoplasias identificadas neste grupo, estão: carcinoma simples (n=3), melanoma (n=2), adenoma simples (n=1), tumor misto benigno (n=1), mastocitoma (n=1), TVT (n=1) e carcinoma maligno (n=1). Não houve nenhum óbito no G2.

As doenças dos cães do G3 (n=40) foram: neoplasia (n=9), piometra (n=5), hiperadrenocorticismo (n=3), hemoparasita (*Ehrlichia* sp) (n=3), artrite auto-imune (n=2), fratura (n=2), necrose (pele e pâncreas) (n=2), peritonite séptica (n=2), pneumonia (n=2), gastroenterite (n=1), gastrite (n=1), hérnia diafragmática (n=1), doença de disco intervertebral (n=1), abscesso infra-orbitário (n=1), pancreatite (n=1), diabetes melittus (n=1), pênfigo (n=1), doença periodontal (n=1) e escoriações cutâneas pós atropelamento (n=1). Das neoplasias identificadas neste grupo, estão: carcinoma inflamatório (n=2), leucemia mielóide crônica (n=2), leiomioma (n=1), carcinoma simples (n=2), carcinoma anaplásico (n=1), sarcoma (n=1). Das hemoparasitoses diagnosticadas, duas foram Erlichiose e uma Leishmaniose. Das necroses observadas, uma foi em cauda e outra no pâncreas. Treze cães do G3 evoluíram à óbito (32,50%).

O valor de proteína total do G1 foi $6,70 \pm 0,72$ g/dL, do G2 foi $6,65 \pm 1,87$ g/dL e do G3 foi $5,80 \pm 1,45$ g/dL. Observou-se diminuição significativa no G3 (Gráfico 30).

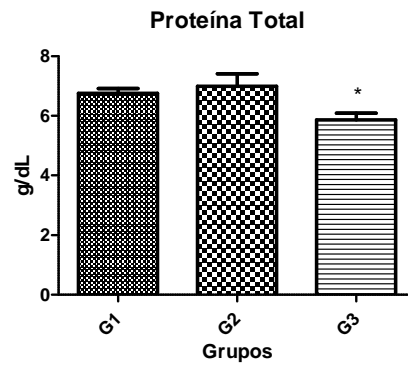


Gráfico 220 – Proteína total dos cães dos grupos 1, 2 e 3. * $P < 0,05$. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

O fracionamento de proteínas por eletroforese permitiu identificar 11 proteínas em todos os grupos, com pesos moleculares variando de 23 a 220 kDa. Destas, nove foram nominadas, sendo elas: imunoglobulina A (IgA), imunoglobulina G (IgG) de cadeia leve, IgG de cadeia pesada, albumina, ceruloplasmina, transferrina, alfa-1 antitripsina, haptoglobina e alfa-1 glicoproteína ácida. As demais foram obtidas através de seus pesos moleculares (PM), 34.000 e 23.000 Da. Na figura 8 está apresentado um gráfico com as proteínas observadas nos cães do G3.

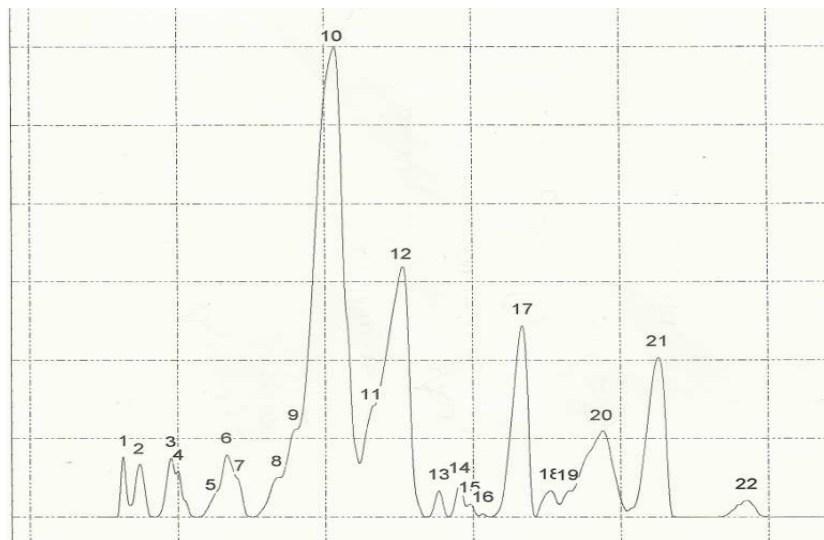


Figura 8 – Gráfico das proteínas fracionadas por eletroforese em gel de poliácridamida e densitometria em cães com neutrófilos tóxicos (G3). Proteínas de interesse: 2. IgA, 6. Ceruloplasmina, 8. Transferrina, 10. Albumina, 11. Alfa-1 antitripsina, 12. IgG (cadeia pesada), 14. Haptoglobina, 15. Alfa-1 glicoproteína ácida, 17. PM 34.000Da, 20. IgG (cadeia leve), 21. PM 23.000Da

Na tabela 5 estão os valores médios e os desvios padrão da concentração da proteína sérica total e de suas frações dos grupos G1, G2 e G3. O valor de IgG disposto é produto da soma dos valores de IgG de cadeia leve e pesada.

TABELA 5 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL E SUAS FRAÇÕES NOS CÃES DO G1, G2 E G3

Proteínas	G1	G2	G3
Proteína Total (g/dL)	6,70 ± 0,72 ^{ab}	6,65 ± 1,87 ^a	5,80 ± 1,45 ^b
IgA (mg/dL)	37,91 ± 16,39 ^a	35,12 ± 21,49 ^a	14,52 ± 12,39 ^b
IgG (mg/dL)	1386,33 ± 540,21 ^a	1136,62 ± 596,95 ^a	1306,69 ± 1035,03 ^a
Albumina (g/dL)	3,89 ± 0,55 ^a	3,48 ± 0,96 ^a	2,59 ± 0,70 ^b
Ceruloplasmina (mg/dL)	28,3 ± 9,76 ^a	35,86 ± 36,75 ^a	34,68 ± 26,50 ^a
Transferrina (mg/dL)	150,75 ± 70,59 ^{ab}	209 ± 80,84 ^a	137,87 ± 77,35 ^b
α-1-antitripsina (mg/dL)	358,05 ± 57,60 ^a	316,97 ± 771,17 ^a	242,88 ± 91,72 ^b
Haptoglobina (mg/dL)	11,72 ± 6,79 ^a	21,19 ± 11,52 ^{ab}	25,44 ± 20,61 ^b
α-1-glicoproteína ácida (mg/dL)	10,31 ± 6,75 ^a	25,99 ± 19,73 ^b	21,87 ± 22,56 ^b
34.000 (mg/dL)	123,37 ± 62,98 ^a	287,29 ± 206,70 ^b	423,39 ± 225,46 ^b
23.000 (mg/dL)	597,75 ± 185,70 ^{ab}	762,38 ± 325,31 ^a	440,79 ± 221,17 ^b

IgA – Imunoglobulina A; IgG – Imunoglobulina G. G1 – cães saudáveis, G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos, G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

Os valores de IgA, albumina, transferrina e α-1-antitripsina foram significativamente menores nos cães do G3 quando comparados aos demais grupos (Gráficos 31, 32, 33 e 34).

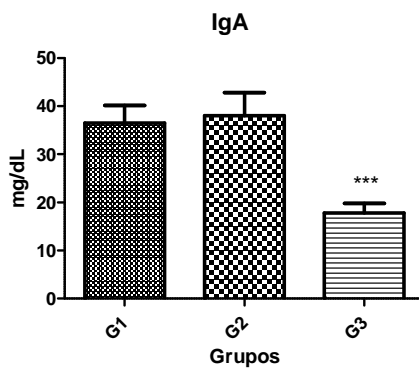


Gráfico 231 – Concentração sérica de Imunoglobulina A dos cães dos grupos 1, 2 e 3. ***P<0,001. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

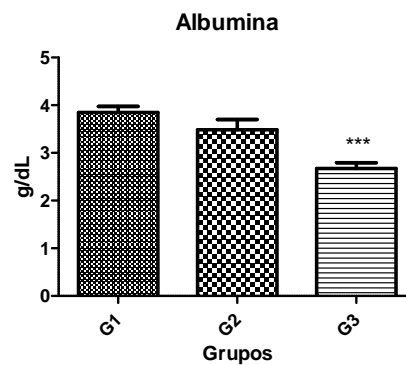


Gráfico 242 – Concentração sérica de albumina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. ***P<0,001. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

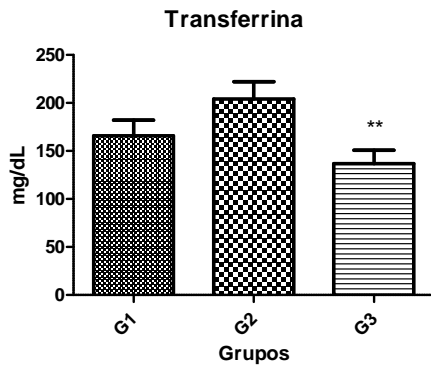


Gráfico 253 – Concentração sérica de transferrina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. * $P < 0,05$. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

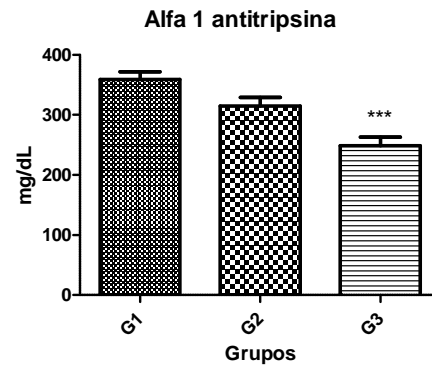


Gráfico 264 – Concentração sérica de $\alpha 1$ - antitripsina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. *** $P < 0,001$. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

Nas frações haptoglobina, α -1-glicoproteína ácida e PM 34.000 observou-se aumento significativo nos cães do grupo 2 e 3 em relação a G1, exceto haptoglobina, que apresentou diferença apenas entre G3 e G1 (Gráficos 35, 36 e 37). Como a haptoglobina é uma proteína sensível aos efeitos de corticosteróides e o G3 foi composto por três animais com diagnóstico de hiperadrenocorticism, estes animais foram retirados da estatística para diminuir a possibilidade de erros.

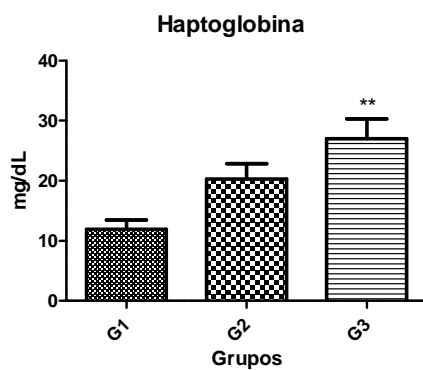


Gráfico 275 – Concentração sérica de haptoglobina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. ** $P < 0,01$. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

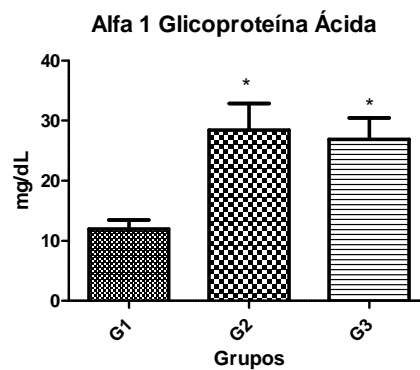


Gráfico 286 – Concentração sérica de α -1-glicoproteína ácida dos cães dos grupos 1, 2 e 3. * $P < 0,05$. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

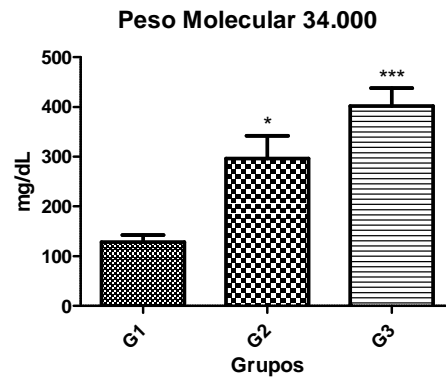


Gráfico 297 – Concentração sérica da proteína com peso molecular 34.000 Da dos cães dos grupos 1, 2 e 3. * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$.
 NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

Não houve diferença significativa entre os grupos nas frações IgG e ceruloplasmina (Gráficos 38 e 39).

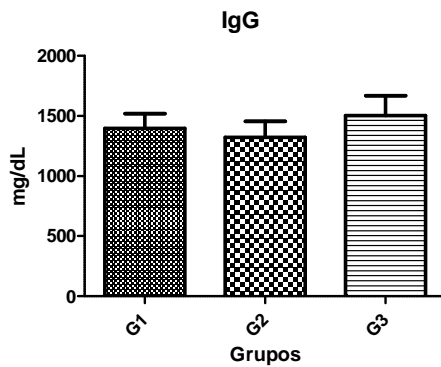


Gráfico 38 – Concentração sérica de IgG dos cães dos grupos 1, 2 e 3. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

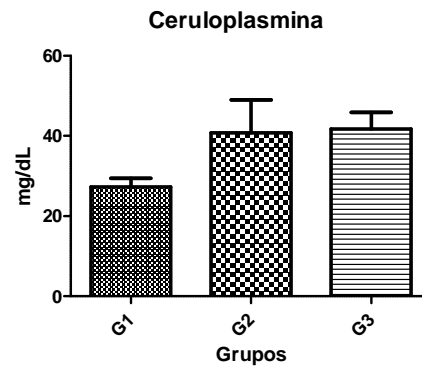


Gráfico 3930 – Concentração sérica de ceruloplasmina dos cães dos grupos 1, 2 e 3. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

A fração não identificada nominalmente, com PM 23.000 Da, aumentou apenas nos cães do grupo 2 quando comparados a G1 e G3 (Gráfico 40).

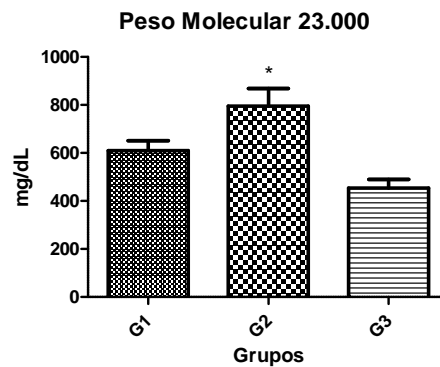


Gráfico 310 – Concentração sérica da proteína com peso molecular 23.000Da dos cães dos grupos 1, 2 e 3. *P<0,05. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

Os valores médios e desvio padrão de PCR foram: $0,12 \pm 0,39$ mg/dL no G1; $0,82 \pm 0,68$ mg/dL no G2; e $2,0 \pm 0,45$ mg/dL no G3. Houve diferença significativa entre os todos os grupos avaliados (Gráfico 41).

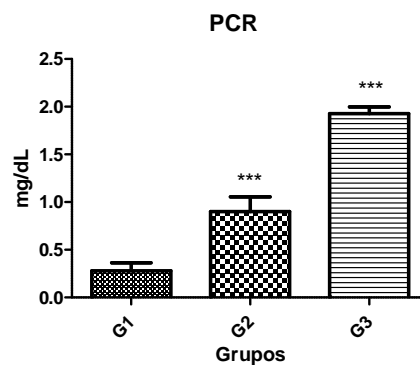


Gráfico 321 – Concentração sérica de Proteína C Reativa dos cães dos grupos 1, 2 e 3. ***P<0,001. NOTA: G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos.

Quatorze cães do G3 evoluíram à óbito e a concentração de PCR deles foi: 1,64; 1,83. 1,91. 1,95. 2,02; 2,07. 2,12; 2,12; 2,13; 2,22; 2,23; 2,23; 2,30 e 2,45. Assim, na análise entre a taxa de sobrevivência dos cães do G3 e as concentrações de PCR verificou-se relação inversamente proporcional, identificando que a concentração de 2mg/dL de PCR é um ponto crítico para cães com neutrófilos tóxicos (Gráfico 42).

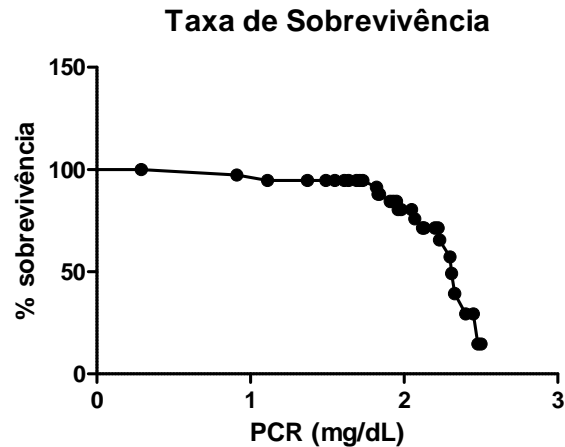


Gráfico 332 – Taxa de sobrevivência de cães com neutrófilos tóxicos de acordo com a mensuração de PCR

A quantidade de leucócitos, neutrófilos segmentados e bastonetes dos cães dos grupos 1, 2 e 3 está disposta na tabela 6.

TABELA 6 – MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DOS PARÂMETROS LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS SEGMENTADOS E BASTONETES DOS CÃES DO G1, G2 e G3.

	G1	G2	G3
Leucócitos Totais (μL)	11200 \pm 2256,48	14700 \pm 8965,05	23700 \pm 26645,57
Neutrófilos Segmentados (μL)	7053 \pm 2457,9	9658 \pm 6923,87	12795,5 \pm 17070,05
Neutrófilos Bastonetes (μL)	0 \pm 0	400 \pm 672,67	3351,5 \pm 8028,68

G1 – cães saudáveis; G2 – cães doentes sem neutrófilos tóxicos; G3 – cães doentes com neutrófilos tóxicos

Não foi encontrada correlação estatística entre o número de leucócitos, neutrófilos segmentados e bastonetes e quantidade de PCR dos cães com neutrófilos tóxicos.

A quantidade de neutrófilos tóxicos dos cães do G3 variou de 6 a 93% ($38 \pm 20,29$). Não houve correlação estatística entre a quantidade de neutrófilos tóxicos e a concentração de cada fração protéica.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, verificou-se aumento significativo na concentração sérica de algumas frações de proteínas nos pacientes doentes. Foi verificada alteração na concentração de algumas frações protéicas nos animais do G2, como: α -1-glicoproteína ácida, PM 34.000 Da, PM 23.000 Da e PCR. Porém, alterações com maior amplitude foram vistas nos cães

doentes com neutrófilos tóxicos circulantes (G3), como: PCR, haptoglobina, α -1-glicoproteína ácida e a proteína com PM 34.000. Com exceção da proteína com PM 34.000, todas as outras são citadas na literatura como importantes PFA da inflamação (ECKERSALL e BELL, 2010). Destas, a principal é a PCR (CRAY, 2009), conforme observado nesse estudo.

A proteína C reativa é produzida pelo fígado em resposta à inflamação, infecção ou destruição tecidual (HOLM et al., 2004). Após a instalação de uma infecção bacteriana, a PCR liga-se ao patógeno e ativa a via de complemento clássica, levando à opsonização da bactéria (ECKERSALL, 2008). Neste estudo, nos cães com neutrófilos tóxicos os valores de PCR foram superiores aos dos cães doentes sem neutrófilos tóxicos. Considerando-se que a produção de PCR é estimulada pelo fator de necrose tumoral alfa (FNT- α), interleucina (IL)-1 e IL-6, que são marcadores de inflamação sistêmica, e que a concentração circulante desta proteína possui relação com a severidade da doença de base (ECKERSALL, 2000), conclui-se que cães com neutrófilos tóxicos possuem alterações sistêmicas mais severas do que cães sem neutrófilos tóxicos.

Os animais do G3 possuíam doenças de diversas etiologias. Diversos trabalhos demonstraram aumento nas concentrações de PCR em cães com diferentes condições, como: pancreatite (HOLM et al., 2004), piometra (FRANSSON et al., 2004), pós-operatório (YAMAMOTO et al., 1993), infecções por *Staphylococcus aureus* (HAYASHI et al., 2001), neoplasias mamárias (TECLES et al., 2009), babesiose, leishmaniose, leptospirose, parvovirose (CERON et al., 2005), artrite, linfoma, doença inflamatória intestinal (JERGENS et al., 2003), inflamações, neoplasias hematológicas, epiteliais ou mesenquimais (TECLES et al., 2005), entre outras. Assim, a PCR pode ser usada como marcador inflamatório para diferentes doenças, mas que, de maneira geral, causem algum tipo de inflamação nos tecidos, podendo ser neoplásica, infecciosa, inflamatória, degenerativa, traumática, endócrina ou auto-imune, como observado no presente estudo.

Ainda, a magnitude do aumento da PCR nos cães do G3 em relação aos cães saudáveis (G1) foi superior à das outras proteínas. Esta resposta maximizada da PCR é relatada na literatura, a qual cita que o aumento da PCR sob estímulo inflamatório pode chegar a 10 ou 100 vezes seu valor basal (CALDIN et al., 2009). Por essa razão, a PCR é denominada a principal PFA da inflamação em cães.

Neste estudo, a PCR se comportou de fato como a principal PFA, demonstrando sua relação com o prognóstico. Quanto maior a quantidade de PCR, menor foi a taxa de sobrevivência dos cães com neutrófilos tóxicos. Relata-se a relação entre severidade da doença e a quantificação de PCR, podendo ser interpretada sua relação positiva ou negativa, de cura ou

de mortalidade (CRAY et al., 2009). Porém, em cães com neutrófilos tóxicos, este é o primo relato.

Não foi encontrada correlação entre a concentração de PCR com o número de leucócitos totais, neutrófilos segmentados e bastonetes dos cães com neutrófilos tóxicos. Pouca ou nenhuma correlação foi descrita anteriormente em estudo realizado com 900 cães com várias doenças inflamatórias diferentes (NAKAMURA et al., 2008). Acredita-se que cães com neutrófilos tóxicos demonstram quantidades de células muito variáveis, não estando relacionadas com a gravidade do processo inflamatório. Assim, a mensuração de PCR e a quantificação dos neutrófilos tóxicos podem ser mais utilizados para triar a gravidade da doença do que a contagem de leucócitos.

A haptoglobina, outra proteína que aumentou nos cães do G3, é classificada como PFA moderada e ela é sensível aos efeitos dos corticosteróides no cão. A sua principal função é ligar-se à hemoglobina livre no plasma (ECKERSALL, 2008). Níveis elevados de haptoglobina podem ser encontrados após tratamento com corticosteróides e no hiperadrenocorticismismo (McGROTTY et al., 2005; CALDIN et al., 2009). Mesmo quando excluídos os animais com diagnóstico de hiperadrenocorticismismo, esta elevação de haptoglobina nos cães com neutrófilos tóxicos encontrada no presente estudo pode suportar relato de Aroch et al. (2005), os quais citaram que cães com neutrófilos tóxicos são clinicamente mais doentes e em maior estado de estresse. Outras possíveis causas para o aumento de haptoglobina são: inflamações, doenças auto-imunes e neoplasias (ANDERSSON et al., 1998), causas presentes nos cães do G3.

A α -1-glicoproteína ácida, outra PFA moderada, aumentou significativamente nos cães doentes (G2 e G3) em relação aos cães saudáveis (G1). Sabe-se que esta proteína liga-se a numerosos metabólitos endógenos, como a heparina, histamina, serotonina, esteróides e catecolaminas (ECKERSALL, 2008). O aumento desta proteína ocorre durante condições inflamatórias (HOCHEPIED et al., 2003), infecciosas ou de injúria tecidual em humanos (FOURNIER et al., 2000), e em cães após injeção intramuscular de óleo de turpentina (HAYASHI et al., 2001). Assim como as outras PFA positivas, seu aumento era esperado nos cães doentes.

Algumas frações de proteínas avaliadas no presente estudo apresentaram suas concentrações significativamente diminuídas nos cães com neutrófilos tóxicos (G3), como: a albumina, transferrina, α -1-antitripsina e IgA. A albumina e a transferrina são conhecidas como PFA negativas, uma vez que suas concentrações diminuem em pacientes com processos inflamatórios, infecciosos ou neoplásicos (ECKERSALL, 2008; ECKERSALL e BELL,

2010). A diminuição destas frações ocorre por aumento da síntese hepática de proteínas anti-inflamatórias, diminuindo a síntese de frações protéicas menos ativas durante inflamações (ECKERSALL, 2008).

A α -1-antitripsina, proteína que diminuiu no G3, é uma PFA que normalmente aumenta durante processos inflamatórios, agindo como inibidora de proteases formadas no local da injúria, protegendo o tecido do ataque da esterase neutrofílica (MURATA et al., 2004). Porém, o papel da α -1-antitripsina como PFA positiva não é bem estabelecido na veterinária. Apesar de estudo mostrar aumento desta proteína em rebanho de bovinos com infecção experimental por *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* e administração de endotoxinas (CONNER et al., 1989), outro estudo mostrou que não houve diferença nos valores de α -1-antitripsina de cães doentes hospitalizados e saudáveis não hospitalizados (HUGHES et al., 1995).

No presente estudo, os cães com neutrófilos tóxicos apresentaram concentração diminuída de IgA quando comparados ao grupo controle e não observou-se diferença na concentração de IgG entre os grupos. Estas imunoglobulinas são produzidas por plasmócitos, células derivadas da ativação de linfócitos B, após estímulo por citocinas produzidas no local da inflamação a partir de linfócitos T-*helper* ativados (TIZARD, 2009). Em cães com doenças infecciosas, ou após vacinação, seria esperada a alteração nessas globulinas. No presente estudo, estas proteínas pouco se alteraram possivelmente porque os cães com neutrófilos tóxicos sofreram influencia do cortisol, como confirma o aumento de haptoglobina. Em concentrações sanguíneas elevadas de cortisol, há seqüestro de linfócitos em órgãos linfóides, alterando seu padrão de recirculação (JAIN, 1993). Com isso, há diminuição na produção e na liberação de imunoglobulinas (LEANDRO, 2006).

Não foi observada diferença na mensuração de ceruloplasmina entre os grupos de cães neste estudo. Esta proteína é uma PFA positiva moderada que parece aumentar na circulação em casos de inflamação antes dos leucócitos apresentarem alterações (SOLTER et al., 1991; CERON et al., 2005). Em cães, sugere-se que ela pode ser usada como diagnóstico precoce de gravidez (VANNUCCHI et al., 2002). Outro estudo que avaliou dois grupos de cães, sendo um com doenças inflamatórias e outro com anemia hemolítica imunomediada, e mostrou que no grupo inflamatório as proteínas que elevaram-se foram a haptoglobina e a PCR, enquanto que no grupo hemolítico foi a ceruloplasmina (TECLES et al., 2005). Assim, a ceruloplasmina não age como uma importante proteína para o diagnóstico de inflamação e, em cães com neutrófilos tóxicos, não deve ser usada como marcador da severidade do processo inflamatório, como sugerido por Solter et al. (1991). Porém, sua mensuração deve

ser relacionada com a causa do aparecimento de neutrófilos tóxicos para correta avaliação. Outro dado importante é que Tecles et al. (2005) encontraram concentrações de ceruloplasmina de 55g/dL, valor muito diferente do encontrado no presente estudo. Isso pode ocorrer principalmente pela aplicação de metodologias diferentes. Portanto, é essencial realizar a determinação das concentrações de proteínas de animais sadios junto à dos doentes.

A proteína com PM 23.000 Da aumentou nos cães do G2, e no G3 não diferiu do G1. Este aumento no G2 sugere que esta proteína pode ser uma PFA positiva e seu aumento estar relacionado com as doenças diagnosticadas nos cães do G2, como infecções bacterianas e neoplasias. Mais estudos devem ser feitos para confirmar esta hipótese. Além disso, trata-se de proteína ainda não identificada nominalmente nos animais.

Não foi encontrada correlação entre a quantidade de neutrófilos tóxicos e a concentração das frações protéicas avaliadas neste estudo. Assim, tanto a quantificação de neutrófilos tóxicos e quanto a mensuração de proteínas devem ser realizadas para a correta triagem e avaliação de severidade e prognóstico de cães com neutrófilos tóxicos.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que a eletroforese das proteínas séricas de cães com neutrófilos tóxicos é importante para auxiliar na triagem da severidade de doenças. Nos cães sem neutrófilos tóxicos, poucas alterações nas concentrações das proteínas foram encontradas, sendo que a principal proteína que aumentou nestes pacientes doentes foi a PCR. Nos cães com neutrófilos tóxicos houve aumento das PFA positivas, como haptoglobina, PCR e α 1-glicoproteína ácida; diminuição de PFA negativas, como transferrina e albumina. Houve diminuição da IgA e a IgG não apresentou alterações, possivelmente devido à linfopenia por ação do cortisol. A proteína α 1-antritripsina diminuiu e ceruloplasmina manteve-se igual à de cães saudáveis, não sendo indicadas como marcadoras de inflamação em cães com neutrófilos tóxicos. Os valores de PCR acima de 2,0 mg/dL em cães com neutrófilos tóxicos indicam diminuição na taxa de sobrevivência.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSSON, M.; STENSTROM, M.; VATNE, M.; et al. Disease-related variations of the glycosylation of haptoglobin in the dog. **Journal of Comparative Pathology**, v.119, p.227-238, 1998.

AROCH, I.; KLEMENT, E.; SEGEV, G. Clinical, biochemical and hematological characteristics, disease prevalence and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.64-73, 2005.

CALDIN, M.; TASCA, S.; CARLI, E.; BIANCHINI, S.; FURTANELLO, T.; MARTINEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J.J. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. **Veterinary Clinical Pathology**, v.38, p.63-68, 2009.

CERON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARLYNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats, current knowledge and future perspective. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p.85-99, 2005.

CONNER, J.G.; ECKERSALL, P.D.; WISEMAN, A.; BAIN, R.K.; DOUGLAS, T.A. Acute phase response in calves following infection with *Pasteurella haemolytica*, *Ostertagia ostertagi* and endotoxin administration. **Research in Veterinary Science**, v.47, p.203-207, 1989.

CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N.H. Acute Phase Response in Animals: a review. **Comparative Medicine**, v.59, n.6, p.517-526, 2009.

ECKERSALL, P.D. Proteins, proteomics, and the dysproteinemias. *In*: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 6ª Edição, San Diego: Academic Press. p.117-155, 2008.

ECKERSALL, P.D. Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. **Reveu de Medicine Veterinaire**, v.151, n.7, p.577-584, 2000.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, p.23-27, 2010.

FOURNIER, T.; NEJT MEDJOUBI, N.; PORQUET, D. Alpha-1-acid glycoprotein: review. **Biochimica e Biophysica Acta**, v.1482, p.157-171, 2000.

FRANSSON, B.A.; KARLSTAM, E.; BERGSTROM, A.; LAGERSTEDT, A.S.; PARK, J.S.; EVANS, M.A.; RAGLE, C.A. C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.40, n.5, p.391-399, 2004.

GIEGER, T.I.; CORREA, S.S.; TABOADA, J.; GROOTERS, A.M.; JOHNSON, A.J. Phenol poisoning in three dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.36, i.4, p.317-321, 2000.

GOSSET, K.A.; MacWILLIAMS, P.S. Ultrastructure of canine toxic neutrophils. **The American Journal of Veterinary Research**, v. 43, n.9, p.1634-7, 1982.

HAYASHI, S.; JINBO, T.; IGUCHI, K.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; NOMURA, M.; ISHIDA, Y.; YAMAMOTO, S. A comparison of the concentrations of c-reactive protein and alfa 1 acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary Research Communication**, v.25, n.2, p.117-120, 2001.

HOCHEPIED, T.; BERGER, F.G.; BAUMANN, H.; et al. α 1-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. **Cytokine Growth Factor Review**, v.14, p.25-34, 2003.

HOLM, J.L.; ROZANSKI, E.A.; FREEMAN, L.M.; WEBSTER, C.R.L. C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v.13, n.3, p.183-186, 2004.

HUGHES, D.; ELLIOTT, D.A.; WASHABAU, R.J.; KUEPPERS, F. Effects of age, sex, reproductive status, and hospitalization on serum alpha 1-antitrypsin concentration in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p.568-572, 1995.

JAIN, N.C. **Essentials of Veterinary Hematology**. 1ed. Philadelphia:Lea & Febiger, 1993.

JERGENS, A.E.; SCHREINER, C.A.; FRANK, D.E.; NIYO, Y.; AHRENS, F.E.; EXCKERSALL, P.D.; BENSON, T.J.; EVANS, R. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v17, p.291-297, 2003.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LATIMER, K.S.; RAKICH, P.M. Clinical interpretation of leukocytes responses. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.19, p.6397-668, 1989.

LEANDRO, C.G.; NASCIMENTO, E.; AZEVEDO, M.M.; VIEGAS, A.; ALBUQUERQUE, C.; CAVALCANTI, C.B.; MANHAES-DE-CASTRO, R.; CASTRO, C.M.M.B. Efeito da L-glutamina sobre o Perfil Leucocitário e a Função Fagocítica de Macrófagos de Ratos Estressados. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, 2006.

MACHEVERSKY, A.M.; READ, R.A. Bacterial septic arthritis in 19 dogs. **Australian Veterinary Journal**, v.77, p.232-237, 1999.

MATIJATKO, V.; MRLJAK, V.; KIS, I.; KUCER, N.; FORSEK, J.; ZIVICNJAK, T.; ROMIC, Z.; SIMEC, Z.; CERON, J.J. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. **Veterinary Parasitology**, v.144, p.242-250, 2007.

McGROTTY, Y.L.; ARTEAFA, A.; KNOTTENBELT, C.M.; RAMSEY, L.K.; ECKERSALL, P.D. Haptoglobin concentrations in dogs undergoing trilostane treatment for hyperadrenocorticism. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, p.255-258, 2005.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v.168, p.28-40, 2004.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOGUCHI, A.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.70, p.127-131, 2008.

SCHULTZE, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. *In*: WEISS, D.J. & WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. Wiley-Blackwell: Iowa. 6th edição, 2010, p.321-334.

SOLTER, P.F.; HOFFMAN, W.E.; HUNGERFORD, L.L.; SIEGEL, J.P.; St DENIS, S.H.; DORNER, J.L. Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, p.1738-1742, 1991.

TECLES, F.; CALDIN, M.; ZANELLA, A.; MEMBIELA, F.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SUBIELA, S.M.; CERÓN, J.J. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p.214-219, 2009.

TECLES, F.; SPIRANELLI, E.; BONFANTI, U.; CERON, J.J.; PALTRINIERI, S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematological and neoplastic diseases of the dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.19, p.865-870, 2005.

TIZARD, I.R. **Introdução à Imunologia Veterinária**. 8^aed. Elsevier: Barcelona, 2009. 592p.

VANNUCCHI, C. MIRANDOLA, R.; OLIVEIRA, C. Acute-phase protein profile during gestation and diestrous: proposal for an early pregnancy test in bitches. **Animal Reproduction Science**, v.74, p.87-99, 2002.

WEISER, G. Interpretação da Resposta Leucocitária nas Doenças. *In*: THRALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. Editora Roca: São Paulo. 1^aEdição, 2007, p.127-140.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; MIYAJI, S.; SANTSUKA, H.; FUJISE, H.; MUKAWA, K.; FURUKAWA, E.; NAGAE, T.; NAIKI, M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical trauma. **Veterinary Research Communications**, v.17, n.2, p.85-93, 1993.

ANEXOS

Descrição da técnica de eletroforese vertical em gel de poliacrilamida utilizada no capítulo III

1. Pipetar 30 μ L de PBS em frascos tipo *eppendorf* vazios.
2. Adicionar 10 μ L de soro do animal avaliado
3. Preparar o gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
4. Adicionar 20 μ L de *mix* aos frascos tipo *eppendorf*
5. Colocar os frascos em banho-maria com temperatura de fervura da água em um suporte, sendo que as amostras tenham contato apenas com o vapor produzido pela água fervente, durante 5 a 10 minutos.
6. Pipetar 6 μ L das amostras nos pocinhos feitos no gel.
7. Ligar o suporte do gel à corrente elétrica (95V) com líquido tampão entre as placas. Ao iniciar a corrida das proteínas, passar para 200V e 120mA. Deixar ligado em torno de 6 horas.
8. Ventilar o sistema para não superaquecer.
9. Após a corrida, desligar o suporte da fonte, despejar o tampão e retirar as placas do suporte.
10. Colocar os géis em cubas preenchidas com corante e deixar agitando por duas horas.
11. Despejar o corante.
12. Colocar descorante e deixar agitando por dez minutos para tirar o excesso.
13. Despejar o descorante.
14. Preencher novamente com descorante e deixar por 12 horas.
15. Despejar o descorante.
16. Preencher novamente com descorante, deixando até que o gel fique transparente e só as bandas apareçam em azul (aproximadamente duas horas).
17. Despejar o descorante.
18. Adicionar ácido acético.
19. Retirar os géis e colocá-los nas placas do densitômetro para leitura.