

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**HEMOGRAMA, METABOLISMO OXIDATIVO DOS
NEUTRÓFILOS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
CADELAS COM PIOMETRA POR *Escherichia coli***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Mauren Picada Emanuelli

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**HEMOGRAMA, METABOLISMO OXIDATIVO DOS
NEUTRÓFILOS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CADELAS
COM PIOMETRA POR *Escherichia coli***

por

Mauren Picada Emanuelli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de
Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em
Clínica Médica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS),
como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientadora: Sonia Terezinha dos Anjos Lopes

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**HEMOGRAMA, METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS E
PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CADELAS COM PIOMETRA POR
*Escherichia coli***

elaborada por
Mauren Picada Emanuelli

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Sonia T. dos Anjos Lopes, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Claudete Schmidt, Dr^a. (UFSM)

Valéria Maria Lara Carregaro, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 02 de fevereiro de 2007.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo apoio em meu estudo, pelos ensinamentos de vida e que sempre estiveram ao meu lado.

Ao Alfredo, que ao meu lado, sempre me apoiou incondicionalmente, sempre teve paciência e compreensão em todos os momentos.

À minha orientadora, Prof^a Sonia, pelos ensinamentos, confiança e amizade, minha eterna gratidão.

À toda equipe do Laboratório de Análises Clínicas, funcionários, estagiários, mestrandos, pelo auxílio nos experimentos, nas análises laboratoriais e em toda atividade que precisasse.

À toda equipe do HCV, setor de atendimento clínico e cirúrgico, pela colaboração durante a coleta do material para o experimento.

Aos Professores do HCV e PPGMV, que não só nos transmitem ensinamentos, mas também nos ensinam a buscar o conhecimento com as nossas próprias mãos.

Ao NIDAL, em especial a professora Tatiana e sua equipe.

Ao CNPq pela bolsa.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

HEMOGRAMA, METABOLISMO OXIDATIVO DOS NEUTRÓFILOS E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA EM CADELAS COM PIOMETRA POR *Escherichia coli*

AUTORA: MAUREN PICADA EMANUELLI
ORIENTADORA: PROF^a. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES
Santa Maria, 02 de fevereiro de 2007

Piometra é uma doença que ocorre com maior frequência em cadelas adultas durante o diestro. É causada por uma infecção bacteriana intra-uterina que resulta em bacteremia e toxemia discretas a intensas, determinando uma série de alterações sistêmicas. Os parâmetros hematológicos geralmente revelam acentuada leucocitose e anemia. Objetivando-se avaliar o hemograma, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos, pelo teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) e a peroxidação lipídica por meio da mensuração da concentração dos produtos de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), foram utilizados 20 cães fêmeas, adultas, com idade entre 2 e 14 anos. Os animais foram separados em dois grupos, o grupo 1 formado por 12 fêmeas com diagnóstico de piometra por *Escherichia coli* e o grupo 2 por 8 fêmeas clinicamente saudáveis. Os valores na contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina nas cadelas com piometra foram significativamente inferiores aos do grupo controle. A proteína plasmática total e leucócitos totais, segmentados, bastonetes e monócitos estavam significativamente mais elevados nas cadelas com piometra que no grupo controle. Para o NBT houve aumento no grupo com piometra em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos para o teste de TBARS. Os resultados mostraram que cadelas com piometra por *E. coli* apresentam anemia normocítica normocrômica e leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda. O aumento no NBT indicou um incremento na atividade neutrofílica.

Palavras-chave: piometra, hemograma, NBT, peroxidação lipídica, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Master's dissertation
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

COMPLETE BLOOD COUNT, NEUTROPHILS OXIDATIVE METABOLISM AND LIPID PEROXIDATION IN BITCHES WITH PYOMETRA BY *Escherichia coli*

AUTHOR: MAUREN PICADA EMANUELLI

ADVISER: PROF. SONIA TEREZINHA DOS ANJOS LOPES

Santa Maria, february 02nd, 2007

Pyometra is an infectious disease predominating in adult female dogs during diestrus. It is caused by an intra uterine bacterial infection leading from a mild to a severe bacteremia and toxemia. In hematological parameters a severe leukocytosis and anemia usually are presents. The objective of this study was to evaluate complete blood count, neutrophil oxidative metabolism by nitroblue tetrazolium test (NBT) and lipid peroxidation using thiobarbituric acid reactive substances assay (TBARS). Twenty adult female dogs from 2 to 14 years old were used. All animals were allocated in two different groups. In group 1 *E. coli* pyometra diagnosed animals (n=12) and in group 2 only clinically healthy female dogs (n=8). There were significant lower values in red blood cell, packed cell volume and hemoglobin in group 1 animals than those in group 2 (control). A significant increase in total plasma protein and total leukocytes (segmented and band neutrophils and monocytes) occurred in group 1 when comparing to control. In NBT there was also an increase in group 1. But TBARS did not show a significant difference between groups. These results evidenced that adult female dogs with pyometra by *E.coli* show a normocytic normocromic anemia and leukocytosis characterized by neutrophilia with a left shift. The NBT raise only indicate a neutrophil activity increased.

Key words: pyometra, complete blood count, NBT, lipid peroxidation, *Escherichia coli*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Coleta de conteúdo uterino de cadela com piometra..... 29
- FIGURA 2** – Neutrófilo segmentado com precipitado no citoplasma de coloração azul enegrecido conhecido como formazan..... 30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Médias e desvios padrão do hemograma do grupo de cadelas com piometra por <i>E. coli</i> e do grupo controle.....	31
TABELA 2 – Médias e desvios padrão do metabolismo oxidativo dos neutrófilos não estimulado (NBT-NE) e estimulado (NBT-E) e da peroxidação lipídica (TBARS) do grupo de cadelas com piometra por <i>E. coli</i> e do grupo controle.....	32

SUMÁRIO

RESUMO	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	7
1 – INTRODUÇÃO	9
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3 – ARTIGO CIENTÍFICO: Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por <i>Escherichia coli</i>	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	18
Material e Métodos	21
Resultados e Discussão	22
Conclusão	25
Referências	25
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1 - INTRODUÇÃO

Piometra é uma doença relativamente comum em cadelas não castradas. Apresenta-se como uma infecção bacteriana intra-uterina que determina uma série de alterações sistêmicas. Esse distúrbio desenvolve-se com maior frequência em cadelas adultas durante ou logo após a fase lútea do ciclo (diestro), período em que o endométrio está sob maior ação da progesterona (NELSON & COUTO, 2006). A resposta exagerada e anormal do endométrio à exposição crônica e repetida à progesterona permite o acúmulo de secreções glandulares uterinas, que proporcionam um excelente meio para crescimento bacteriano (FELDMAN, 2004). A fonte de bactérias é a flora normal da vagina, sendo a *Escherichia coli* a que está mais associada a essa doença (FRANSSON et al., 1997; DHALIWAL et al., 1998; NOAKES et al. 2001).

As alterações hematológicas caracterizam-se por leucograma inflamatório com acentuado aumento na contagem total de leucócitos e desvio à esquerda regenerativo devido à infecção e septicemia (FELDMAN, 2004). Linfopenia e monocitose também podem estar presentes (SEEBACH et al., 1997).

As doenças inflamatórias, muitas vezes causadas por infecções bacterianas, como no caso da piometra, também podem resultar em anemia. Esta anemia é classicamente leve a moderada, normocítica, normocrômica e não regenerativa, e resulta da diminuição na produção e sobrevivência dos eritrócitos (STOCKHAM, 2000).

Os neutrófilos têm papel fundamental na fagocitose e morte de bactérias (KITAGAWA et al., 1980). Durante a fagocitose ocorre a ativação do metabolismo oxidativo (“explosão respiratória”), que leva a um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos, gerando substâncias altamente oxidantes (radical superóxido e peróxidos). Esses produtos oxigenados gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias capazes de destruir bactérias e outras células (BABIOR, 1984; ZINKL & KABBUR, 1997).

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ser avaliado pelo teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) a formazan (MILLER & KAPLAN, 1970). Em trabalho publicado por FEIGIN et al. (1971) pacientes com infecções bacterianas tiveram depósitos de formazan aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis ou com outras enfermidades de

origem não bacteriana, o que faz do teste do NBT um método simples para avaliar a capacidade bactericida dos neutrófilos. Além disso, ainda pode ser utilizado no prognóstico das doenças infecciosas, uma vez que, se pode avaliar a eficiência da terapia antimicrobiana.

Embora os metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano, estes radicais livres produzidos podem lesar o neutrófilo e os tecidos ao seu redor (WEISS & LOBUGLIO, 1982). Esses radicais livres produzidos podem induzir a peroxidação de lipídios na membrana do eritrócito, que diminui sua capacidade de deformabilidade, sendo removidos da circulação precocemente (PFAFFEROTT et al., 1982; CLASTER et al., 1984). Segundo WEISS & KLAUSNER (1988), os radicais livres podem ainda modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, o que permite a ligação de imunoglobulinas resultando em destruição eritrocitária. Para WEISS & MURTAUGH (1990) esses metabólitos são considerados potenciais na destruição dos eritrócitos nas anemias das doenças inflamatórias. No entanto, não foram encontradas avaliações sobre o seu envolvimento na anemia que acompanha a piometra.

A peroxidação de lipídios pode ser determinada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um dos principais produtos finais da peroxidação, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) resultando em uma coloração rosa medida em espectrofotômetro a 535nm (OHKAWA et al., 1979; YOSHIOKA et al., 1979). Por isso, o teste de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é usado para determinar o MDA, pode ser utilizado para se determinar a extensão do dano oxidativo de membranas de células, inclusive dos eritrócitos.

Como a piometra é uma doença caracterizada por acentuada resposta inflamatória, frente a infecção bacteriana instalada, se espera que ocorra um aumento no metabolismo oxidativo dos neutrófilos para combater a infecção. Porém, os radicais livres gerados podem induzir a peroxidação lipídica na membrana do eritrócito o que poderia ser uma das causas da anemia que ocorre nesta doença. Considerando a ausência de informações à respeito da função oxidativa dos neutrófilos e das causas de anemia em cadelas com piometra por *E. coli*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e a peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *E. coli*.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piometra

Piometra é a afecção uterina mais comum observada em cadelas adultas durante o diestro. Em 1959, DOW identificou o que chamamos de complexo hiperplasia endometrial cística (HEC)-piometra. Essa condição ocorre em cadelas adultas de mais idade e resulta de uma resposta exagerada e anormal do endométrio à exposição crônica e repetida à progesterona.

Cadelas adultas mais jovens (menos de 6 anos) também podem desenvolver piometra, no entanto, não estão expostas a secreção crônica de progesterona; nesses casos, acredita-se que a causa mais comum seja o uso de progestágenos para supressão do estro (SMITH, 2006), ou a administração de estrógenos para interromper a gestação (BOWEN et al., 1985).

A progesterona mantém o crescimento endometrial e a secreção glandular e, ao mesmo tempo, suprime a atividade do miométrio, permitindo um acúmulo de secreções glandulares uterinas, que proporcionam um excelente meio para crescimento bacteriano. Um útero repleto de líquido estéril é comumente referido como hidrometra ou mucometra, no entanto, se ocorrer contaminação bacteriana, se desenvolve a piometra, que é o distúrbio mais comum de acontecer (FELDMAN, 2004).

A contaminação bacteriana do útero durante o proestro e o estro sem desenvolvimento de piometra parece ser um evento normal. Doença uterina ou algum outro fator como exposição à progesterona ou estrógeno favorecem o aparecimento da piometra. A fonte de bactérias é a flora normal da vagina, sendo a *Escherichia coli* a que está mais associada a essa doença (SANDHOLM et al., 1975; FRANSSON et al., 1997; DHALIWAL et al., 1998; NOAKES et al. 2001).

A piometra pode se apresentar de duas maneiras: de cérvix aberta, que se caracteriza pela presença de corrimento sanguinolento a mucopurulento proveniente da vagina; e de cérvix fechada, que não demonstra nenhum sinal facilmente identificado e precoce da doença. Devido a essa particularidade, a piometra de cérvix aberta pode ser detectada mais facilmente pelos proprietários, o que ajuda no diagnóstico precoce (FELDMAN, 2004).

Os sinais clínicos incluem corrimento vaginal, depressão, letargia, inapetência/anorexia, poliúria e/ou polidipsia, vômito, noctúria, diarréia e distensão abdominal (SMITH, 2006).

Ao exame clínico pode-se evidenciar depressão, desidratação, febre, aumento palpável do útero e corrimento vaginal se a cérvix estiver aberta. A febre está associada à infecção bacteriana, entretanto, a temperatura retal pode estar normal ou, nos casos de septicemia ou toxemia, pode estar diminuída (FELDMAN, 2004).

O hemograma geralmente revela leucograma inflamatório com acentuado aumento na contagem total de leucócitos e desvio à esquerda regenerativo devido à infecção e septicemia. Nos casos mais severos ou crônicos, pode ocorrer desvio à esquerda degenerativo com neutrófilos tóxicos. Embora a leucocitose seja comum, pode ocorrer contagem total de leucócitos normal. O eritrograma é marcado, em muitos casos, por anemia normocítica normocrômica, que ocorre nas doenças crônicas (FELDMAN, 2004).

A neutrofilia com desvio à esquerda, freqüentemente está associada a linfopenia e pode estar acompanhada por monocitose, características de inflamação aguda (SEEBACH et al., 1997). A linfopenia é comum em uma resposta inflamatória devido ao fato dos mediadores inflamatórios estimularem o movimento dos neutrófilos, durante a inflamação aguda, estimulando também o movimento dos linfócitos do sangue para o tecido inflamado e tecido linfóide (IMHOF & DUNON, 1995).

2.2 Metabolismo oxidativo dos neutrófilos

Os neutrófilos têm papel fundamental na fagocitose e morte de bactérias. Nas reações inflamatórias, os monócitos e/ou linfócitos T ativados secretam várias citocinas, tais como a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon γ que estimulam as células endoteliais e/ou fibroblastos a secretarem o fator estimulador de colônias de granulócito (G-CSF) e o fator estimulador de colônias granulócito-monócito (GM-CSF) que, por sua vez, ativam os neutrófilos (KITAGAWA et al., 1988).

A ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos é modulada por vários mediadores inflamatórios como o peptídeo N-formilado (KITAGAWA et al., 1980), os leucotrienos (GAY et al., 1984), o fator ativador de plaquetas (DEWALD & BAGGLIONI, 1985), o G-CFS (KITAGAWA et al., 1987; YOU et al., 1987), o GM-CFS (LOPEZ et al., 1986), o interferon γ (PERUSSIA et al., 1987) e o TNF (BERKOW et al., 1987).

O aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos durante a fagocitose é conhecido como “explosão respiratória”. Essa é iniciada pela ativação da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase) que está normalmente inativa. A ativação depende de vários componentes, alguns dos quais estão ligados a membrana e outros podem ser translocados do citoplasma para a membrana.

A NADPH oxidase ativada está localizada na membrana plasmática e torna-se incorporada ao vacúolo fagocítico. Essa catalisa a redução do O_2 para formar superóxido ($O_2^{\bullet-}$), sendo o NADPH, oriundo da via das pentoses fosfato, o doador específico de elétrons para essa reação. O superóxido formado é um radical livre, que por reação de dismutação, catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O H_2O_2 formado, embora não seja um radical livre, é uma espécie reativa de oxigênio que pode reagir com outro ânion superóxido e formar o radical hidroxila ($\bullet OH$), que é o radical livre mais reativo e não há enzima que catalise sua remoção. O H_2O_2 e o $O_2^{\bullet-}$ podem difundir-se do vacúolo fagocítico para o citoplasma da célula, por isso, a enzima que remove o $O_2^{\bullet-}$ (SOD) e as enzimas que removem o H_2O_2 (catalase e glutathione peroxidase) devem agir em conjunto para evitar dano oxidativo no neutrófilo ou outras células do organismo (MEYER & HARVEY, 1998).

Os produtos oxigenados gerados pela “explosão respiratória” são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem um papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias de descarboxilação oxidativa, desaminação oxidativa, peroxidação e halogenação, capazes de destruir bactérias e outras células (ZINKL & KABBUR, 1997).

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ser avaliado pelo teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT), isto é feito observando-se a capacidade desses granulócitos reduzirem espontaneamente o NBT (prova não estimulada – NBT-NE). PARK & GOOD (1970) desenvolveram uma técnica que avalia a capacidade dos neutrófilos reduzirem o NBT, na presença de um estimulante à base de extrato bacteriano inativado, conhecido como teste estimulado de redução do NBT (prova estimulada – NBT-E), com a finalidade de descartar resultados falso negativos.

O NBT é um corante supravital amarelo claro que se transforma em formazan (azul escuro) após a sua redução pelo superóxido, produzido pelo metabolismo oxidativo do neutrófilo (MILLER & KAPLAN, 1970). O formazan é o tetrazólio incolor transformado por redução pelo superóxido, produzido pelo metabolismo oxidativo do neutrófilo em um

precipitado de cor azul escuro, que pode ser visualizado dentro do citoplasma das células redutoras (PARK & GOOD, 1970). Assim, o metabolismo oxidativo (produção de superóxido) do neutrófilo pode ser avaliado, utilizando-se a microscopia óptica e calculando-se o percentual de células NBT-positivas (com presença citoplasmática de formazan).

Depósitos de formazan aumentados foram características de pacientes com infecções bacterianas, quando comparados com indivíduos saudáveis ou com outras enfermidades de origem não bacteriana (FEIGIN et al., 1971).

Em estudo realizado por POLI et al. (1973), em 70 cães saudáveis, foi observado um percentual de neutrófilos redutores de NBT variando de 2 a 14%, com média de 8,7%. Esses valores não variaram daqueles observados em humanos por PARK et al. (1968), cuja percentagem média foi de 8,5%; e por FEIGIN et al. (1971), cuja média foi de 8,75%.

Em 1974, POLI & MANTELLI estudaram em várias espécies a capacidade de os neutrófilos reduzirem o NBT em animais considerados clinicamente saudáveis. Nesse estudo, em 70 cães entre 1 e 5 anos de idade, observaram que o percentual de neutrófilos redutores de NBT variou de 2-14%, com média de 8,75%, semelhante aos valores encontrados por POLI et al. (1973).

POLI et al. (1973), também avaliaram 134 cães doentes, desses, os que apresentavam infecções bacterianas foram os que tiveram uma maior percentagem de neutrófilos NBT positivos. Em 23 cães com piodermite severa, a média foi de 29,6%, enquanto que em 12 cães com outras infecções bacterianas (abscessos, cistite, laringite) a média foi de 34,6%. Isso demonstra a eficiência do teste do NBT no diferencial das doenças bacterianas de outras doenças.

O teste do NBT é mais confiável que a contagem total de leucócitos como indicativo de infecção bacteriana, uma vez que, condições de estresse também podem levar a um quadro de leucocitose (WINTROBE, 1939). Ao contrário, as modificações enzimáticas que ocorrem nos leucócitos, e são detectadas na reação do teste do NBT, que aparecem durante as infecções, são independentes de leucocitose (BEISEL, 1967).

A capacidade de os neutrófilos reduzirem o NBT em cães também foi avaliada na síndrome granulocitopática (RENSHAN & DAVIS, 1979), na discinesia ciliar congênita (MADDUX et al., 1991) e no Diabetes Mellitus (LECHOWSKI et al., 1991).

FEIGIN et al. (1971), avaliaram 247 pacientes humanos em relação a percentagem de neutrófilos NBT positivos, os que estavam sendo tratados para infecções bacterianas tiveram um percentual de 22,7%; os não tratados um percentual de 41,3%; e os que não responderam a terapia um percentual de 54,9%. Esse estudo sugere que o teste do NBT também pode ser

utilizado no prognóstico das doenças infecciosas, uma vez que, se pode avaliar a eficiência da terapia antimicrobiana.

2.3 Peroxidação Lipídica

Embora os metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano, estes radicais livres produzidos podem lesar o neutrófilo e os tecidos ao seu redor (WEISS & LOBUGLIO, 1982). Segundo WEISS & MURTAUGH (1990), esses metabólitos podem causar alterações na membrana do eritrócito, sendo considerados potenciais na destruição dos eritrócitos nas anemias das doenças inflamatórias. A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio induz citotoxicidade, lesão de membrana, peroxidação de lipídios, mutagênese e carcinogênese (DATTA et al., 2000).

Os ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares são degradados pela peroxidação lipídica, com subsequente alteração na integridade da membrana, sugerindo que a peroxidação de lipídios, mediada pelos radicais livres, é uma importante causa de dano e destruição das membranas celulares. A injúria oxidativa na membrana do eritrócito é evidenciada pelo aumento na formação de malondialdeído (MDA) durante o avanço da infecção (FREEMAN & CRAPO, 1982).

A peroxidação de lipídios pode ser determinada por um processo em que o malondialdeído, produto final da peroxidação dos ácidos graxos, reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando em uma coloração rosa medida em espectrofotômetro a 535nm (OHKAWA et al., 1979; YOSHIOKA et al., 1979).

WEISS & KLAUSNER (1988) concluíram em estudo, que os radicais livres produzidos também podem modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, e essa alteração permite a ligação de imunoglobulinas na membrana que resulta em destruição eritrocitária.

3 – CAPÍTULO 1: ARTIGO CIENTÍFICO

Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli*

Complete blood count, neutrophils oxidative metabolism and lipid peroxidation in bitches with pyometra by *Escherichia coli*

Emanuelli, M.P.; Lopes, S.T.A.; Emanuelli, T.; Vargas, A.C.; Maciel, R.M.; Wolkmer, P.; Garmatz, B.C.; Costa, M.M.; Albiero, M.

De acordo com normas para publicação em:

Ciência Rural

Hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *Escherichia coli*

Complete blood count, neutrophils oxidative metabolism and lipid peroxidation in bitches with pyometra by *Escherichia coli*

Mauren Picada Emanuelli^{I*}; Sonia Terezinha dos Anjos Lopes^{II}; Tatiana Emanuelli^{III}; Agueda Castagna de Vargas^{IV}; Roberto Marinho Maciel^I; Patrícia Wolkmer^I; Bruna Carolina Garmatz^V; Marcio Machado Costa^V; Marisandra Albiero^V

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o hemograma, o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e a peroxidação lipídica plasmática em cadelas com piometra por *Escherichia coli*. Foram utilizadas 20 fêmeas, adultas, com idade entre 2 e 14 anos. Os animais foram separados em dois grupos, o grupo 1 formado por 12 animais com diagnóstico de piometra por *E. coli* e o grupo 2 por 8 animais clinicamente saudáveis. Os valores na contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina, nas cadelas com piometra foram significativamente inferiores aos do grupo controle. A proteína plasmática total e leucócitos totais, segmentados, bastonetes e monócitos estavam significativamente mais elevados no grupo 1 que no grupo 2. Para o NBT houve aumento no grupo com piometra em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa entre os grupos para o teste de TBARS. Os resultados mostraram que cadelas com piometra por *E. coli* apresentam anemia normocítica normocrômica e leucocitose por neutrofilia com desvio a esquerda. O aumento no NBT indicou um incremento na atividade neutrofílica.

Palavras-chave: piometra, hemograma, NBT, peroxidação lipídica, *Escherichia coli*.

^I Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brasil. * Autor para correspondência. Rua José Crivelaro, 215 apt 201 – Km 3, 97095-330, Santa Maria, RS, Brasil. maurenvet@hotmail.com

^{II} Departamento de Clínica de Pequenos Animais, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{III} Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^{IV} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^V Aluno de Graduação do curso de Medicina Veterinária, UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate complete blood count and neutrophil oxidative metabolism and lipid peroxidation in bitches diagnosed for pyometra by E. coli. Twenty adult female dogs from 2 to 14 years old were used. All animals were allocated in two different groups. In group 1 E. coli pyometra diagnosed animals (n=12) and in group 2 only clinically healthy female dogs (n=8). Red blood cell counting, packed cell volume and hemoglobin were significant lower in group 1 animals than those in group 2 (control). A significant increase in total plasma protein and total leukocytes (segmented and band neutrophils and monocytes) occurred in group 1 when comparing to control. In NBT there was also an increase in group 1. But TBARS did not show a significant difference between groups. These results evidenced that adult female dogs with pyometra by E.coli show a normocytic normochromic anemia and leukocytosis characterized by neutrophilia with a left shift. The NBT raise only indicate a neutrophil activity increased.

Key words: *pyometra, hemogram, NBT, lipid peroxidation, Escherichia coli.*

INTRODUÇÃO

Piometra é uma doença que ocorre com maior frequência em cadelas adultas durante o diestro. É causada por uma infecção bacteriana intra-uterina que resulta em bacteremia e toxemia discretas a intensas, determinando uma série de alterações sistêmicas. A resposta exagerada e anormal do endométrio à exposição crônica e repetida à progesterona permite um acúmulo de secreções glandulares uterinas, que proporcionam um excelente meio para crescimento bacteriano (FELDMAN, 2004). A fonte de bactérias é a flora normal da vagina, sendo a *Escherichia coli* a que está mais associada a essa doença (FRANSSON et al., 1997; DHALIWAL et al., 1998; NOAKES et al. 2001; COGGAN et al., 2004).

As alterações hematológicas caracterizam-se por leucograma inflamatório com acentuado aumento na contagem total de leucócitos e desvio à esquerda regenerativo devido à infecção e septicemia (FELDMAN, 2004). Linfopenia e monocitose também podem estar presentes (SEEBACH et al., 1997).

As doenças inflamatórias, muitas vezes causadas por infecções bacterianas, como no caso da piometra, também podem resultar em anemia. Esta anemia é classicamente leve a moderada, normocítica, normocrômica e não regenerativa, e resulta da diminuição na produção e sobrevivência dos eritrócitos (STOCKHAM, 2000).

Os neutrófilos têm papel fundamental na fagocitose e morte de bactérias (KITAGAWA et al., 1980). Durante a fagocitose ocorre a ativação do metabolismo oxidativo que leva a um aumento no consumo de oxigênio pelos neutrófilos, gerando substâncias altamente oxidantes (radical superóxido e peróxidos). Esses produtos oxigenados gerados são de extrema importância para a função bactericida dos neutrófilos e possuem papel fundamental na destruição do tecido inflamatório, uma vez que essas formas reativas de oxigênio provocam reações secundárias capazes de destruir bactérias e outras células (BABIOR, 1978; ZINKL & KABBUR, 1997).

O metabolismo oxidativo dos neutrófilos pode ser avaliado pelo teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) a formazan (MILLER & KAPLAN, 1970). Segundo WINTROBE (1939), o teste do NBT é mais confiável que a contagem total de leucócitos como indicativo de infecção bacteriana, uma vez que, condições de estresse também podem levar a um quadro de leucocitose. Já as modificações enzimáticas detectadas na reação do teste do NBT, que aparecem durante as infecções, são independentes de leucocitose (BEISEL, 1967). Em trabalho publicado por FEIGIN et al. (1971) pacientes com infecções bacterianas tiveram depósitos de formazan aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis ou com outras enfermidades de origem não bacteriana, o que faz do teste do NBT um método simples para avaliar a capacidade bactericida dos neutrófilos. Além disso, ainda pode ser utilizado no prognóstico das doenças infecciosas, uma vez que, se pode avaliar a eficiência da terapia antimicrobiana.

Embora os metabólitos de oxigênio gerados pelos neutrófilos sejam necessários para o mecanismo de defesa antimicrobiano, estes radicais livres produzidos podem lesar o neutrófilo e os tecidos ao seu redor (WEISS & LOBUGLIO, 1982). Esses radicais livres produzidos podem induzir a peroxidação de lipídios na membrana do eritrócito, que diminui sua capacidade de deformabilidade, sendo removidos da circulação precocemente (PFAFFEROTT et al., 1982; CLASTER et al., 1984). Segundo WEISS & KLAUSNER (1988) os radicais livres ainda podem modificar a estrutura antigênica da membrana do eritrócito, o que permite a ligação de imunoglobulinas resultando em destruição eritrocitária. Para WEISS & MURTAUGH (1990) esses metabólitos são considerados potenciais na destruição dos eritrócitos nas anemias das doenças inflamatórias. No entanto, não foram encontradas avaliações sobre o seu envolvimento na anemia que acompanha a piometra.

A peroxidação de lipídios pode ser determinada pela quantificação do malondialdeído (MDA), um dos principais produtos finais da peroxidação, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) resultando em uma coloração rosa medida em espectrofotômetro a 535nm (OHKAWA et al., 1979; YOSHIOKA et al., 1979). Por isso, o teste de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que é usado para determinar o MDA, pode ser utilizado para se determinar a extensão do dano oxidativo de membranas de células, inclusive dos eritrócitos.

Como a piometra é uma doença caracterizada por acentuada resposta inflamatória, frente a infecção bacteriana instalada, se espera que ocorra um aumento no metabolismo oxidativo dos neutrófilos para combater a infecção. Porém, os radicais livres gerados podem induzir a peroxidação lipídica na membrana do eritrócito o que poderia ser uma das causas da anemia que ocorre nesta doença. Considerando a ausência de informações à respeito da função oxidativa dos neutrófilos e das causas de anemia em cadelas com piometra por *E. coli*, o objetivo deste trabalho foi avaliar o hemograma, metabolismo oxidativo dos neutrófilos e a peroxidação lipídica em cadelas com piometra por *E. coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 20 cadelas com suspeita de piometra sem tratamento prévio, com idade entre 2 e 14 anos. Esses animais foram provenientes da rotina do Hospital de Clínicas Veterinárias, da Universidade Federal de Santa Maria, RS. Realizou-se anamnese, exame físico e, quando necessário, ultra-sonografia para confirmação do diagnóstico.

As fêmeas com diagnóstico de hiperplasia endometrial cística – piometra foram submetidas a ovariosalpingoisterectomia e imediatamente após foi coletado, com seringa estéril, o conteúdo uterino em vários pontos da extensão do órgão (figura 1). O material foi acondicionado em gelo e enviado ao laboratório de bacteriologia e confirmação da piometra por *E. coli*. Das 20 fêmeas selecionadas, somente 12 apresentaram piometra por *E. coli*, formando o grupo 1. O grupo 2 (controle) foi constituído de 8 fêmeas não-castradas, clinicamente sadias, provenientes de residências do município de Santa Maria, RS.

As análises bacteriológicas das amostras coletadas foram cultivadas em ágar sangue de ovino (5%) e ágar MacConkey com incubação em aerobiose a 37° C com leituras nas 24-48 horas. Os microrganismos isolados foram identificados de acordo com suas características morfológicas, tintoriais e bioquímicas de acordo com QUINN et al. (1994).

Foram obtidos mediante punção venosa 2mL de sangue em tubo com anticoagulante EDTA (ácido etileno diaminotetracético, sal dissódico) para realização do hemograma. A contagem total de eritrócitos e leucócitos foi realizada em contador de células semi-automático, assim como a determinação da concentração de hemoglobina. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada manualmente com auxílio de microscópio de luz por profissional treinado. A determinação do volume globular foi efetuada pelo método do microhematócrito. A proteína plasmática total (PPT) foi mensurada em refratômetro.

Para determinação do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) foram coletados 500µL de sangue em tubos contendo 10µL de heparina^a. Para a avaliação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos foram utilizados os testes de redução do NBT estimulado (NBT-E) e

não estimulado (NBT-NE), no máximo, 30 minutos após a colheita do sangue, pelo método citoquímico descrito por PARK & GOOD (1970), utilizando-se “kit” comercial^b. Foi considerado neutrófilo positivo, quando este apresentou qualquer grânulo intracitoplasmático de cor azul a negro, independente do número e tamanho das granulações (figura 2).

Para realização do teste de TBARS foram coletados 4mL de sangue em tubo contendo lítio heparina, a amostra foi centrifugada a 2000 rpm por 10 minutos para separação do plasma e congelada a -20°C para posterior análise. A peroxidação lipídica foi avaliada pelo teste de formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em espectrofotômetro a 535nm, conforme descrito por YOSHIOKA et al. (1979).

Os dados foram analisados utilizando os testes não paramétricos de Mann Whitney para comparação das médias entre os grupos, e teste de correlação de Spearman para avaliar a relação entre as variáveis indicadoras de anemia e da produção de radicais livres e de peroxidação lipídica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 20 cadelas diagnosticadas clinicamente com piometra, foi confirmada infecção bacteriana uterina por *E. coli* em 12 animais (60%), seis (30%) apresentaram cultura negativa para crescimento bacteriano e dois (10%) foram positivos para *Staphylococcus* coagulase positiva. Estes achados são compatíveis com os de outros autores que também observaram maior predominância de *E. coli* na piometra (FRANSSON et al., 1997; DHALIWAL et al., 1998; NOAKES et al., 2001; COGGAN et al., 2004). Segundo SANDHOLM et al. (1975), a *E. coli* possui afinidade pelo endométrio sensibilizado pela progesterona, o que poderia ser a causa do maior número de isolados desta bactéria.

A média de idade das cadelas com piometra foi de oito anos, dados semelhantes aos descritos por DHALIWAL et al. (1998), NISKANEN & THRUSFIELD (1998), FUKUDA

(2001), o que caracteriza maior ocorrência em animais adultos, devido a exposição crônica e repetida a progesterona.

A média e os desvios padrão dos parâmetros do hemograma dos 12 animais com piometra por *E. coli* e do grupo controle encontram-se na Tabela 1. Todos os resultados do grupo controle apresentaram-se dentro dos valores de referência descritos por FELDMAN et al. (2000).

As contagens de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina foram significativamente inferiores nas cadelas com piometra com relação ao grupo controle. Os animais do grupo 1 apresentaram anemia normocítica normocrômica, o que, segundo FELDMAN (2004) ocorre, possivelmente, devido a septicemia e a toxemia associadas à síndrome, que poderiam atuar como supressores potentes da medula óssea.

A proteína plasmática total estava elevada nas cadelas com piometra comparando-se com as cadelas controle. Este aumento nas proteínas pode estar relacionado ao estado de desidratação em que alguns animais do experimento se encontravam, conforme citado por FELDMAN (2004) que atribui a elevação de PPT a hemoconcentração. Ainda, o aumento na permeabilidade vascular com subsequente perda de proteína para o sítio inflamatório ou um aumento na produção de gamaglobulinas nas inflamações crônicas, também poderiam resultar em hiperproteinemia e elevar os valores de PPT (FELDMAN et al., 2000).

As contagens de leucócitos totais, neutrófilos segmentados, bastonetes e monócitos foram significativamente maiores nas cadelas com piometra por *E. coli* que no grupo controle. Observou-se leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda regenerativo, o que conforme FELDMAN (2004) e SMITH (2006), reflete a resposta à infecção e septicemia. Nos casos mais severos ou crônicos, pode ocorrer desvio à esquerda degenerativo com neutrófilos tóxicos, o que não foi observado em nenhum animal. Embora a leucocitose seja comum, alguns animais apresentam contagem total de leucócitos normais (FELDMAN, 2004), como observado em três cadelas com piometra deste estudo.

Para os demais leucócitos, não houve diferença significativa comparando-se com o grupo controle, contrariamente a SEEBACH et al. (1997), que citam que neutrofilia com desvio à esquerda frequentemente está associada à linfopenia características de inflamação aguda. Porém, FRANSSON et al. (1997) também não observaram linfopenia em 26 cadelas com piometra.

Comparando-se os valores do NBT na tabela 2 verifica-se que os neutrófilos das cadelas com piometra por *E. coli* e do grupo controle, quando estimulados, aumentaram a sua capacidade de redução do NBT, o que é esperado, uma vez que a redução do NBT comprova a capacidade destes neutrófilos em gerar espécies reativas de oxigênio com propriedades bactericidas. Os valores de NBT do grupo controle foram semelhantes àqueles descritos por POLI et al. (1973) e POLI & MANTELLI (1974) para cães saudáveis.

Houve aumento significativo do depósito de formazan nas cadelas com piometra por *E. coli* em relação ao grupo controle, o que está de acordo com FEIGIN et al. (1971) que relataram ser uma característica de pacientes com infecções bacterianas. POLI et al. (1973), também verificaram uma maior percentagem de neutrófilos redutores de NBT em cães com infecções bacterianas, o que demonstra a eficiência do teste do NBT no diagnóstico diferencial das doenças bacterianas.

O teste do NBT é mais confiável que a contagem total de leucócitos como indicativo de infecção bacteriana, uma vez que, condições de estresse também podem levar a um quadro de leucocitose (WINTROBE, 1939). Ao contrário, as modificações enzimáticas que ocorrem nos leucócitos são detectadas na reação do teste do NBT, que aparecem durante as infecções e são independentes de leucocitose (BEISEL, 1967). FEIGIN et al. (1971) ainda sugerem que o teste do NBT também pode ser utilizado no prognóstico das doenças infecciosas, uma vez que, se pode avaliar a eficiência da terapia antimicrobiana.

O teste de peroxidação lipídica (TBARS) não apresentou diferença significativa entre os grupos, conforme tabela 2. Além disso, não foi observada correlação significativa entre NBT e TBARS, o que sugere que o aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos na piometra não

está provocando lipoperoxidação. Também não foi observada correlação significativa entre os parâmetros de anemia (hematócrito, eritrócitos e hemoglobina) e NBT ou TBARS, o que indica que a anemia na piometra não estaria relacionada a um estresse oxidativo.

Dessa forma, não houve comprovação do envolvimento dos radicais livres na anemia apresentada pelas cadelas com piometra por *E. coli*, o que poderia ter ocorrido pelo aumento compensatório na produção de antioxidantes, protegendo as células e tecidos da ação oxidante dos radicais livres produzidos por meio da “explosão respiratória” dos neutrófilos durante a fagocitose (BAEHNER et al., 1977; BAKER & COHEN, 1983; BABIOR, 1984).

CONCLUSÃO

Cadelas com piometra por *E. coli* apresentaram anemia normocítica normocrômica, leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda e aumento no metabolismo oxidativo dos neutrófilos, sem ocorrer aumento na peroxidação lipídica plasmática.

FONTES DE AQUISIÇÃO

^a Liquemine[®] 5000UI/mL, Roche, São Paulo, Brasil

^b NBT, Sigma Diagnostic, St. Louis, USA.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário, UFSM, RS; ao setor de clínica médica e cirúrgica do Hospital Veterinário, UFSM, RS e ao NIDAL, UFSM. RS.

REFERÊNCIAS

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v.73, n.3, p.599-601, 1984.

BAEHNER, R.L. et al. Autoxidation a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v.50, n.2, p.327-335, 1977.

BAKER, S.S.; COHER, H.J. Altered oxidative metabolism in selenium-deficient rat granulocytes. **J Immunol**, v.130, n.6, p.2856-2860, 1983.

BEISEL, W.R. Neutrophile alkaline phosphatase changes in tularemia, sandfly fever, Q fever and noninfectious fever. **Blood**, v.29, p.257-268, 1967.

BOWEN, R.A. et al. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. **J Am Vet Med Assoc**, v.186, n.8, p.783-788, 1985.

CLASTER, S. et al. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood**, v.64, n.5, p.1079-1084, 1984.

COGGAN, J.A. et al. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli*. **Arq Inst Biol**, v.71, p.513-515, 2004.

DHALIWAL, G.K.; WRAY, C.; NOAKES, D.E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **Vet Rec**, v.143, n.24, p.659-661, 1998.

FEIGIN, R.D. et al. Nitroblue tetrazolium die test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. **J Pediatr**, v.78, n.2, p.230-237, 1971.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia : Willians & Wilkins, 2000. 1344p.

FELDMAN, E.C. O complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em cadelas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária – doenças do cão e do gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. v.2, p.1632-1669, 2004.

FUKUDA, S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. **Exp Anim**, v.50, n.4, p.325-329, 2001.

FRANSSON, B. et al. Bacteriological finding, blood chemistry profiles and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine disease. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.44, n.7, p.417-426, 1997.

KITAGAWA, S.; TAKAKU, F.; SAKAMOTO, S.A. A comparison of the superoxide-releasing response in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **J Immunol**, v.125, n.1, p.359-364, 1980.

MILLER, D.R.; KAPLAN, H.G. Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. **Pediatrics**, v.45, n.5, p.861-865, 1970.

NISKANEN, M.; THRUSFIELD, M.V. Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in finnish dogs. **Vet Rec**, v.143, p.493-498, 1998.

NOAKES, D.E.; DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. **J Reprod Fertil Suppl**, v.57, p.395-406, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annal Biochem**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. NBT test stimulated. **Lancet**, v.2, n.7673, p.616, 1970.

PFAFFEROTT, C.; MEISELMAN, H.J.; HOCHSTEIN, P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood**, v.59, n.1, p.12-15, 1982.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Vet Lat**, v.3, n.2, p.215-239, 1973.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. Virginia: Wolfe, 1994. 648p.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTO, A.K. Pathogenesis of canine pyometra. **J Am Vet Med Assoc**, v.167, n.11, p.1006-10, 1975.

SEEBACH, J.D. et al. The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. **Am J Clin Pathol**, v.107, n.5, p.582-591, 1997.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v.66, p.610-612, 2006.

STOCKHAM, S.L. Hematologic changes due to bacterial infections. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia : Williams & Wilkins, 2000. Cap. 7, p.38-43.

WEISS, S.J.; LOBUGLIO, A.F. Phagocytic generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab Invest**, v.47, n.1, p.5-18, 1982.

WEISS, D.J.; KLAUSNER, J.S. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. **Vet Pathol**, v.25, n.6, p.450-455, 1988.

WEISS, D.J.; MURTAUGH, M.P. Activated neutrophils induce erythrocyte immunoglobulin binding and membrane protein degradation. **J Leukoc Biol**, v.48, n.5, p.438-443, 1990.

WINTROBE, M.M. Diagnostic significance of changes in leukocytes. **Bull N Y Acad Med**, v.15, p.223-240, 1939.

YOSHIOKA, T. et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. **Am J Obstet Gynecol**, v.135, n.3, p.372-376, 1979.

ZINKL, J.G.; KABBUR, M.B. Neutrophil function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. cap.11, p.285-302.

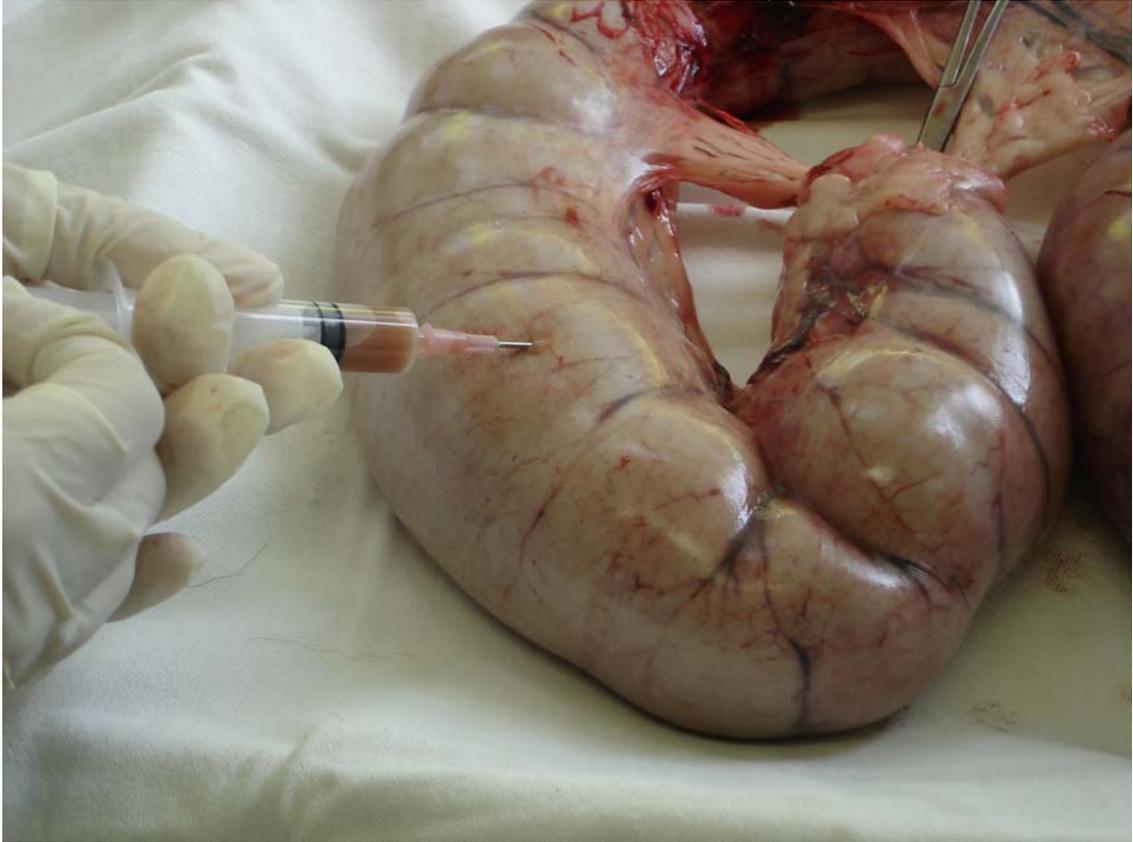


Figura 1 – Coleta do conteúdo do útero de cadela com piometra.

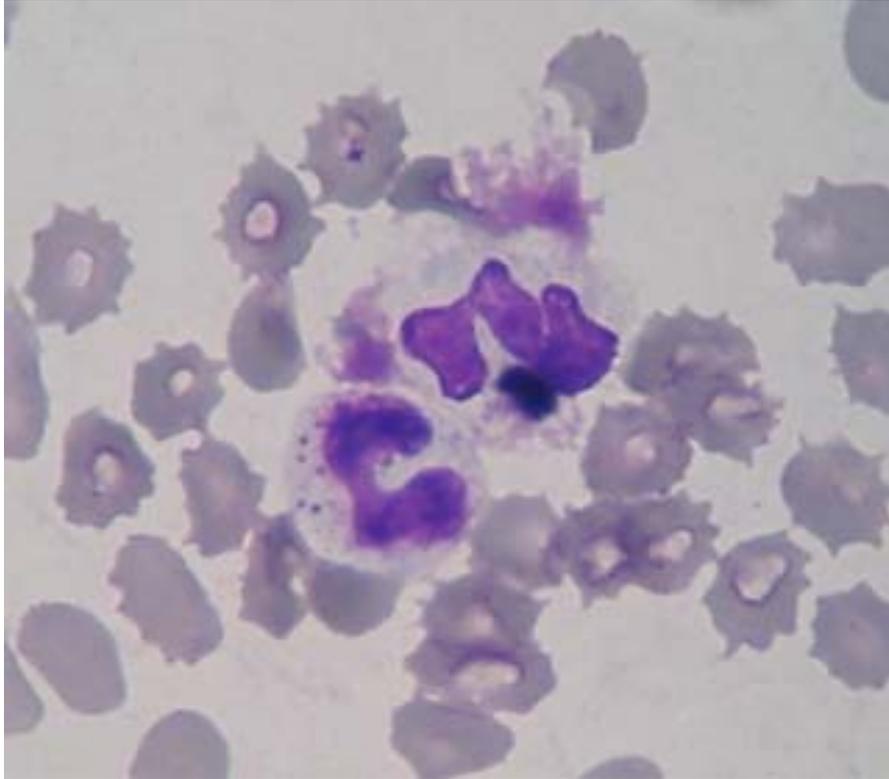


Figura 2 – Neutrófilo segmentado com precipitado azul enegrecido no citoplasma (formazan).

Tabela 1 – Médias e desvios padrão do hemograma de cadelas com piometra por *E. coli* e do controle

HEMOGRAMA	CONTROLE	CADELAS COM PIOMETRA	REFERÊNCIA [#]
Eritrócitos (x 10 ⁶ µL ⁻¹)	7,37 ± 0,92	5,02 ± 0,92*	5,50-8,50
Hematócrito (%)	48,62 ± 2,39	39,66 ± 6,64**	37,00-55,00
Hemoglobina (g dL ⁻¹)	16,80 ± 1,50	13,35 ± 2,23**	12,00-18,00
VCM (fL)	66,86 ± 8,47	76,94 ± 5,65**	60,00-77,00
CHCM (%)	34,42 ± 2,09	33,69 ± 1,37	32,00-36,00
PPT (g dL ⁻¹)	7,92 ± 0,57	9,34 ± 1,08**	6,00-8,00
Leucócitos Totais	10.075,00 ± 2.501,29	29.441,67 ± 15.554,04**	6.000,00-17.000,00
Bastonetes	90,25 ± 109,87	5.315,50 ± 6.903,27***	0-300,00
Segmentados	7.548,13 ± 2.553,72	19.170,00 ± 9.107,74**	3.000,00-11.500,00
Linfócitos	1.590,12 ± 481,58	2.527,50 ± 1.924,61	1.000,00-4.800,00
Monócitos	292,00 ± 238,78	1.167,50 ± 1.268,53	150,00-1.350,00
Eosinófilos	554,50 ± 360,83	888,41 ± 1.496,57	100,00-1.250,00
Metamielócitos	0	372,75 ± 647,00	0

* p < 0,001.

** p < 0,01.

*** p < 0,05.

VCM – volume corpuscular médio; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média; PPT – proteína plasmática total.

[#] FELDMAN et al. (2000).

Tabela 2: Médias e desvios padrão do metabolismo oxidativo dos neutrófilos não estimulado (NBT-NE) e estimulado (NBT-E) e da peroxidação lipídica (TBARS) de cadelas com piometra por *E. coli* e do grupo controle

	GRUPO CONTROLE	CADELAS COM PIOMETRA
NBT-NE (%)	8,25 ± 3,95	16,25 ± 6,65*
NBT-E (%)	12,25 ± 4,53	21,67 ± 9,82**
Plasma TBARS (μmol L ⁻¹)	15,65 ± 2,61	26,22 ± 19,64

* p < 0,01

** p < 0,05.

4 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BABIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J Clin Invest**, v.73, n.3, p.599-601, 1984.

BAEHNER, R.L. et al. Autoxidation a basis for altered function by polymorphonuclear leukocytes. **Blood**, v.50, n.2, p.327-335, 1977.

BAKER, S.S.; COHER, H.J. Altered oxidative metabolism in selenium-deficient rat granulocytes. **J Immunol**, v.130, n.6, p.2856-2860, 1983.

BEISEL, W.R. Neutrophil alkaline phosphatase changes in tularemia, sandfly fever, Q fever and noninfectious fever. **Blood**, v.29, p.257-268, 1967.

BERKOW, R.L. et al. Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor. **J Immunol**, v.139, n.11, p.3783-3791, 1987.

BOWEN, R.A. et al. Efficacy and toxicity of estrogens commonly used to terminate canine pregnancy. **J Am Vet Med Assoc**, v.186, n.8, p.783-788, 1985.

CLASTER, S. et al. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. **Blood**, v.64, n.5, p.1079-1084, 1984.

COGGAN, J.A. et al. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de cadelas com piometra e pesquisa de fatores de virulência em cepas de *Escherichia coli*. **Arq Inst Biol**, v.71, p.513-515, 2004.

DATTA, K.; SINHA, S.; CHATTOPADHYAY, P. Reactive oxygen species in health and disease. **Natl Med J India**, v.13, n.6, p.304-310, 2000.

DEWALD, B.; BAGGIOLINI, M. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB₄. **Biochem Biophys Res Commun**, v.128, n.1, p.297-304, 1985.

DHALIWAL, G.K.; WRAY, C.; NOAKES, D.E. Uterine bacterial flora and uterine lesions in bitches with cystic endometrial hyperplasia (pyometra). **Vet Rec**, v.143, n.24, p.659-661, 1998.

DOW, C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. **J Comp Pathol**, v.69, jul, p.237-250, 1959.

FEIGIN, R.D. et al. Nitroblue tetrazolium die test as an aid in the differential diagnosis of febrile disorders. **J Pediatr**, v.78, n.2, p.230-237, 1971.

FELDMAN, B.F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N.C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5.ed. Philadelphia : Willians & Wilkins, 2000. 1344p.

FELDMAN, E.C. O complexo hiperplasia endometrial cística/piometra e infertilidade em cadelas. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de medicina interna veterinária – doenças do cão e do gato**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. v.2, p.1632-1669, 2004.

FUKUDA, S. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. **Exp Anim**, v.50, n.4, p.325-329, 2001.

FRANSSON, B. et al. Bacteriological finding, blood chemistry profiles and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine disease. **Zentralbl Veterinarmed A**, v.44, n.7, p.417-426, 1997.

FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. **Lab Invest**, v.47, n.5, p.412-426, 1982.

GAY, J.C. et al. Enhancement of chemotactic factor stimulated neutrophil oxidative metabolism by leukotriene B₄. **Blood**, v.64, n.4, p.780-785, 1984.

IMHOF, B.A.; DUNON, D. Leukocyte migration and adhesion. **Adv Immunol**, v.58, p.345-416, 1995.

KITAGAWA, S.; TAKAKU, F.; SAKAMOTO, S.A. A comparasion of the superoxide-releasing response in human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **J Immunol**, v.125, n.1, p.359-364, 1980.

KITAGAWA, S. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor enhances superoxide release in human granulocytes stimulated by the chemotactic peptide. **Biochem Biophys Res Commun**, v.144, n.3, p.1143-1146, 1987.

KITAGAWA, S. et al. The respiratory burst of granulocytes: Modulation inflammatory mediators and its mechanism. **Tokai J Exp Clin Med.**, v.13, n.6, p.299-305, 1988.

LECHOWSKI, R. et al. Serum lysozyme activity and nitroblue tetrazolium reduction test in dogs with Diabetes Mellitus. **J Vet Med Assoc**, v.38, n.7, p.530-533, 1991.

LOPEZ, A.F. et al. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates *in vitro* mature human neutrophil and eosinophil function, surface receptor expression, and survival. **J Clin Invest**, v.78, n.5, p.1220-1228, 1986.

MADDUX, J.M. et al. Neutrophil function in dogs with congenital ciliary dyskinesia. **Vet Pathol**, v.28, n.5, p.347-353, 1991.

MEYER, D.J.; HARVEY, J.W. **Veterinary laboratory medicine**. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1998. 373p.

MILLER, D.R.; KAPLAN, H.G. Decreased nitroblue tetrazolium dye reduction in the phagocytes of patients receiving prednisone. **Pediatrics**, v.45, n.5, p.861-865, 1970.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. Hiperplasia endometrial cística e piometra. In: _____. **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier. p.840-843, 2006.

NISKANEN, M.; THRUSFIELD, M.V. Associations between age, parity, hormonal therapy and breed, and pyometra in finnish dogs. **Vet Rec**, v.143, p.493-498, 1998.

NOAKES, D.E.; DHALIWAL, G.K.; ENGLAND, G.C.W. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. **J Reprod Fertil Suppl**, v.57, p.395-406, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Annal Biochem**, v.95, n.2, p.351-358, 1979.

PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue tetrazolium reduction by neutrophils. A diagnostic acid. **Lancet**, v.2, n.7567, p.532-534, 1968.

PARK, B.H.; GOOD, R.A. NBT test stimulated. **Lancet**, v.2, n.7673, p.616, 1970.

PERUSSIA, B. et al. Immune interferon enhances functional properties of human granulocytes: role of Fc receptors and effects of lymphotoxin, tumor necrosis factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **J Immunol**, v.138, n.3, p.765-774, 1987.

PFAFFEROTT, C.; MEISELMAN, H.J.; HOCHSTEIN, P. The effect of malonyldialdehyde on erythrocyte deformability. **Blood**, v.59, n.1, p.12-15, 1982.

POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (N.B.T.) test nel cane. **Folia Vet Lat**, v.3, n.2, p.215-239, 1973.

POLI, G.; MANTELLI, F. Il "test" N.B.T. negli animali domestici: valori normali. **Clin Vet**, v.97, p.241-247, 1974.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary microbiology**. Virginia: Wolfe, 1994. 648p.

RENSHAW, H.W., DAVIS, W.C. Canine granulocytopeny syndrome: an inherited disorder of leukocyte function. **Am J Pathol**, v.95, n.3, p.731-744, 1979.

SANDHOLM, M.; VASENIUS, H.; KIVISTO, A.K. Pathogenesis of canine pyometra. **J Am Vet Med Assoc**, v.167, n.11, p.1006-10, 1975.

SCOTT, D.W. et al. **Muller & Kirk, dermatologia de pequenos animais**. 5.ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996. 1142p.

SEEBACH, J.D. et al. The diagnostic value of the neutrophil left shift in predicting inflammatory and infectious disease. **Am J Clin Pathol**, v.107, n.5, p.582-591, 1997.

SMITH, F.O. Canine pyometra. **Theriogenology**, v.66, p.610-612, 2006.

STOCKHAM, S.L. Hematologic changes due to bacterial infections. In: FELDMAN, B.F.; ZINKL, J.G.; JAIN, N.C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia : Williams & Wilkins, 2000. Cap. 7, p.38-43.

WEISS, S.J.; LOBUGLIO, A.F. Phagocytic generated oxygen metabolites and cellular injury. **Lab Invest**, v.47, n.1, p.5-18, 1982.

WEISS, D.J.; KLAUSNER, J.S. Neutrophil-induced erythrocyte injury: a potential cause of erythrocyte destruction in the anemia associated with inflammatory disease. **Vet Pathol**, v.25, n.6, p.450-455, 1988.

WEISS, D.J.; MURTAUGH, M.P. Activated neutrophils induce erythrocyte immunoglobulin binding and membrane protein degradation. **J Leukoc Biol**, v.48, n.5, p.438-443, 1990.

WINTROBE, M.M. Diagnostic significance of changes in leukocytes. **Bull N Y Acad Med**, v.15, p.223-240, 1939.

YOSHIOKA, T. et al. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against active-oxygen toxicity in the blood. **Am J Obstet Gynecol**, v.135, n.3, p.372-376, 1979.

YOU, A. et al. Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor repairs the abnormalities of neutrophils in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelogenous leukemia. **Blood**, v.70, n.2, p.404-411, 1987.

ZINKL, J.G.; KABBUR, M.B. Neutrophil function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. San Diego: Academic Press, 1997. Cap.11, p.285-302.