

VALOR DO TESTE DE REDUÇÃO DO TETRAZÓLIO NITROAZUL (NBT) NO DIAGNÓSTICO DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS CANINOS

VALUE OF NITROBLUE TETRAZOLIUM TEST (NBT) IN THE DIAGNOSTIC OF CANINE INFLAMMATORY PROCESSES

A. M. BOSCO¹, R. COUTO¹, P. P. PEREIRA¹, B. F. M. ALMEIDA¹, P. C. CIARLINI^{1*}

RESUMO

Objetivou-se estimar o valor clínico do teste de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) no diagnóstico dos processos inflamatórios de cães, comparando-o com o leucograma e a concentração plasmática de fibrinogênio. Para tal, determinou-se a porcentagem de neutrófilos redutores de NBT, a concentração plasmática de fibrinogênio e o leucograma de 242 cães, incluindo animais sadios e com quadro inflamatório, portadores ou não de hepatopatas, azotemia ou hipogamaglobulinemias. O uso do teste de redução do NBT permitiu confirmar 30,43% dos processos inflamatórios em cães. O uso associado do teste de redução do NBT com a determinação do fibrinogênio plasmático e leucograma possibilitou uma maior eficiência diagnóstica, identificando-se 84,35% dos processos inflamatórios. Não foi verificado um efeito significativo da hipogamaglobulinemia e da hepatopatia sobre a capacidade do neutrófilo reduzir o NBT em cães com doenças inflamatórias, porém os resultados obtidos sugerem que a azotemia possa afetar a capacidade do neutrófilo em reduzir o NBT. Conclui-se que o teste de redução de NBT é pouco sensível para o diagnóstico dos processos inflamatórios em cães, porém útil nos casos em que o fibrinogênio e o leucograma não são capazes de detectar a inflamação.

PALAVRAS CHAVES: Fibrinogênio. Inflamação. Leucograma. Função leucocitária. Cão.

SUMMARY

The purpose of the present study is to determine the clinical value of nitroblue tetrazolium reduction test (NBT) to diagnose inflammatory processes in dogs, and compare to white blood cell count (WBC) and concentration of plasma fibrinogen. To this end, we determined the percentage of NBT reducing neutrophils, concentration of plasma fibrinogen and WBC of 242 dogs, including both healthy dogs and animals with inflammation processes, with or without liver disease, azotemia or hypogammaglobulinemias. The NBT reduction test confirmed 30.43% of inflammatory diseases in dogs. The combined use of NBT reduction test, plasma fibrinogen and WBC was more efficient and identified 84.35% of inflammatory processes. Hypogammaglobulinemia and liver disease did not alter the ability of neutrophils to reduce NBT in dogs with inflammatory diseases, but results suggest that azotemia may affect the ability of neutrophils to reduce NBT. It can be concluded that NBT reduction test has low sensitivity for the diagnosis of inflammatory diseases in dogs, but it is useful in cases where the fibrinogen and WBC are not able to detect inflammation.

KEY-WORDS: Fibrinogen. Inflammation. Leucograma. Leukocyte function. Dog.

¹ Medico Veterinário, Faculdade de Medicina Veterinária (FMVA), UNESP, Araçatuba/SP, Brasil.

* Autor para correspondência: Clóvis Pestana 793, Jardim Dona Amélia, Araçatuba, SP 16050-680, Brasil, e-mail: ciarlini@fmva.unesp.br

INTRODUÇÃO

Diversas situações podem iniciar uma reação inflamatória, incluindo infecções, danos teciduais e neoplasias (PEPYS E HIRSCHFELD, 2003). Os principais componentes da resposta inflamatória são as citocinas, proteínas de fase aguda e os leucócitos (LIBBY, 2007; KIM et al., 2011). A resposta sistêmica é acompanhada pela presença de hipertemia e leucocitose (HARR, 2004), onde os neutrófilos e monócitos são as principais células liberadas durante uma inflamação aguda (KAPLANSKI et al., 2003).

Na Medicina Veterinária os recursos laboratoriais mais comumente utilizados para avaliação dos processos inflamatórios são o leucograma e a determinação do fibrinogênio plasmático, porém estes exames possuem pouca especificidade para distinguir as diferentes causas de inflamações (VECINA et al., 2006).

O fibrinogênio é uma proteína de fase aguda sintetizada pelo fígado, cuja concentração plasmática se eleva sob a ação estimuladora das interleucinas (IL-1 e -6) e do fator de necrose tumoral liberado pelo processo inflamatório, sendo assim, bom indicador de resposta a uma inflamação aguda (ANDREWS et al., 1994). Durante esta fase, a concentração plasmática de fibrinogênio aumenta por vários dias, chegando a um pico entre o quinto e sétimo dia (WEISS & WARDROP, 2010).

Durante os processos inflamatórios observa-se uma leucocitose por neutrofilia, aumento da relação neutrófilo: linfócito e desvio à esquerda dentro de aproximadamente 72 horas (FELDMAN, 2000). Esta resposta leucocitária varia de acordo com a causa, intensidade, localização da inflamação, espécie e idade do animal (SCHULTZE, 2000).

Os neutrófilos são células que integram a primeira linha de defesa do organismo (THRALL et al., 2007) quando ativados por mediadores da inflamação produzem muitas espécies reativas de oxigênio, incluindo o superóxido e seus derivados (HUIMIN et al., 2000) que possuem poder bactericida, viricida e fungicida (BABIOR, 2004).

Há várias décadas Park et al. (1968) desenvolveram o teste citoquímico de redução do tetrazólio nitroazul (NBT) que possibilita quantificar a produção de superóxido do neutrófilo. Posteriormente Gordon et al. (1973) observaram que as infecções bacterianas estimulam o metabolismo oxidativo dos neutrófilos e defendem o uso do teste de redução do NBT em hospitais humanos como procedimento laboratorial de triagem com fins de auxiliar o diagnóstico diferencial de desordens febris. Na mesma época Poli et al. (1973) utilizaram o teste de redução do NBT em cães acometidos por várias enfermidades, e concluíram que este teste também pode ser empregado com sucesso nesta espécie para distinguir as enfermidades de origem bacteriana e de outras causas.

Embora o teste de redução do NBT seja de baixo custo, fácil execução e passível de ser utilizado como exame de rotina em um laboratório clínico

veterinário, são poucas as investigações sobre o valor clínico deste teste na espécie canina. Estudos sugerem que as hepatopatias (FAN & ZHANG, 1997), azotemias (TREVELIN et al., 2008; SOEIRO, 2010; BARBOSA et al., 2010) e disproteinemias (POLI et al., 1973) podem interferir no metabolismo oxidativo dos neutrófilos e consequentemente interferir no teste de redução do NBT.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção neutrofilica de superóxido em cães por meio do teste de redução do NBT, assim como avaliar o valor clínico dessa metodologia no diagnóstico dos processos inflamatórios, comparando-o com o leucograma e a concentração plasmática de fibrinogênio, levando-se em consideração os efeitos das hepatopatias, azotemias e hipogamaglobulinemias.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os animais foram submetidos a exame clínico geral, conforme preconizado por Feitosa (2008), e aos seguintes exames laboratoriais: teste de redução do NBT por neutrófilos (prova estimulada e não estimulada), leucograma, fibrinogênio plasmático (F), níveis séricos de ureia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamil transferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), bilirrubina total, direta e indireta albumina, colesterol, proteína total (PPT) e globulinas.

De acordo com o exame clínico e avaliação laboratorial, foram selecionados 242 cães, adultos, com idade média de 7 anos, não tratados recentemente com qualquer vacina ou medicamento. Estes foram agrupados da seguinte forma:

Grupo Sadio (GS): Constituído de 48 animais sem alteração dos parâmetros do exame clínico geral ou qualquer alteração laboratorial indicadora de inflamação, azotemia, hepatopatia e hipogamaglobulinemia.

Grupo inflamação (GI): Constituído de 116 animais portadores de quadro inflamatório clínico evidente e/ou desvio à esquerda e/ou hiperfibrinogenemia associada a uma relação PPT/F menor que 10.

Grupo inflamação + hepatopatia (GIH): Constituído de 34 animais portadores das mesmas características do grupo GI associado à hepatopatia, caracterizada pela alteração do perfil bioquímico sérico (ALT, AST, bilirrubinas total, direta e indireta GGT, FA, PPT, albumina e colesterol).

Grupo inflamação + azotemia renal (GIA): Constituído de 34 animais portadores das mesmas características do grupo GI associado à elevação da concentração sérica de ureia e/ou creatinina (superiores a 2,5 vezes os valores de normalidade), excluindo-se causas de azotemia pós-renal.

Grupo inflamação + hipogamaglobulinêmicos (GIHG): Constituído de 10 animais portadores das mesmas características do grupo GI e associado à hipogamaglobulinemia.

Foram colhidos 10 ml de sangue por animal utilizando-se agulhas hipodérmicas descartáveis 25x0,8 mm, sendo 1 mL acondicionado em tubo plástico estéril contendo 10 U de heparina sódica², a fim de se realizar o teste de redução do NBT. Para a realização do leucograma e determinação da concentração plasmática de fibrinogênio utilizou-se 0,5 mL de sangue, onde foi acondicionado em tubo de plástico contendo 0,5 mg de EDTA-sódico. O restante do sangue colhido (8,5 mL) foi acondicionado em frasco de vidro sem anticoagulante, em temperatura ambiente, a fim de se obter o soro para as análises bioquímicas.

Para a determinação da produção de superóxido dos neutrófilos empregou-se o teste de redução tetrazólio nitroazul (NBT) pelo método citoquímico descrito por Park et al. (1968), com pequenas modificações. Resumidamente, foram acrescentados 50 µL de uma solução aquosa tamponada de NBT³ (1g/L) à 50 µL de sangue heparinizado em frascos plásticos estéreis tipo “ependorf”. Após resuspensão, a amostra foi mantida por 10 minutos à 37°C e posteriormente mantidas por mais 10 minutos em temperatura ambiente (22°C). Para fins de controle de ensaios falsos negativos o mesmo procedimento foi realizado na prova estimulada onde foram acrescentados 2,5 µL de estimulante comercial a base de extrato bacteriano⁴. A porcentagem de células redutoras de NBT foi estabelecida a partir da contagem de 100 neutrófilos.

A contagem total de leucócitos foi realizada com auxílio de contador semiautomático de células sanguíneas⁵. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com panótico rápido⁶ utilizando-se microscopia ótica. A concentração de fibrinogênio plasmático foi determinada pelo método indireto de precipitação pelo calor (56 – 58°C) e posterior leitura por refratometria⁷, conforme preconizado por Thrall et al. (2007).

Todas as determinações bioquímicas séricas foram realizadas à 37°C utilizando-se reagentes comerciais⁸ e leitura em analisador bioquímico automatizado⁹ previamente ajustados com calibradores¹⁰ e controles comerciais¹¹.

O fracionamento eletroforético das proteínas séricas foi realizado em cuba horizontal, por meio de semi-microaplicação (1,5 µL - 9 mm) em fitas de poliacetato de celulose de 2,5 x 16 cm, usando como tampão o veronal sódico 0,04M em pH 8,6, conforme descrito por Ciarlini et al. (1994). A identificação e a quantificação das diferentes frações eletroforéticas foram realizadas com auxílio de um densitômetro automático¹².

De todas as variáveis do leucograma, do teste de redução do NBT e da concentração de fibrinogênio dos cinco grupos experimentais foram determinadas as médias e as medianas como medidas de tendência central e as amplitudes e desvios-padrão como medidas de dispersão. Para avaliar as diferenças entre os grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e a prova de comparação múltipla de Dunn. Determinaram-se as frequências (%) das alterações laboratoriais associadas aos processos inflamatórios de cada espécie. As correlações entre as diferentes variáveis estudadas foram estimadas pelos cálculos dos coeficientes de Spearman. Para a realização das análises estatísticas supracitadas foi utilizado um programa estatístico computadorizado¹³, considerando-se significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do grupo de cães sadios (Tabela 1) estão de acordo com os valores de referência considerados por Schultze (2000) para o leucograma, por Poli et al. (1973) para o teste de redução do NBT e por Thrall et al. (2007) para o fibrinogênio plasmático, garantindo o estado de higidez dos animais.

Verificou-se uma grande dispersão dos valores do leucograma, fibrinogênio plasmático e da capacidade de redução do NBT em todos os grupos. A sobreposição desses valores entre os grupos (Tabela 1) indica que tais variáveis possuem valor limitado para o diagnóstico diferencial das diferentes condições inflamatórias investigadas.

Foi observada taxa de redução espontânea do NBT tão alta quanto 91 e 89% em cães dos grupos GI e GIH, porém não foi constatada diferença significativa entre os grupos estudados (Tabela 1). Poli et al. (1973) também constataram aumento da porcentagem de neutrófilos redutores de NBT em cães com processos inflamatórios, porém estes não consideraram fatores interferentes como hepatopatia, azotemia e imunodeficiências que pudessem confrontar com os resultados do presente estudo.

Já a porcentagem zero de neutrófilos redutores de NBT (Tabela 1) pode estar associada à presença de fatores inibidores do metabolismo oxidativo e/ou a reações inflamatórias incapazes de estimular suficientemente o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. É possível que em alguns casos inflamatórios estudados, o estresse causado pela dor tenha promovido a liberação de corticóide, que sabidamente inibe o teste de redução do NBT. Neste sentido, vários estudos realizados em outras espécies têm demonstrado o efeito inibitório dos corticóides sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos (ROTH & KAERBELE, 1981; HOEDEMAKER et al., 1992). No presente estudo a inflamação não promoveu aumento do metabolismo oxidativo dos neutrófilos na maioria dos casos. Menos de 1/3 dos casos de inflamação (Figura 1) apresentaram aumento da taxa

² Lique mine[®] 5000 U/mL, Roche, São Paulo - SP.

³ NBT vial, catalog n° 840-10, Sigma Diagnostic, St Louis, USA.

⁴ STIMULANT, catalog n° 840-15. Sigma Diagnostic, St. Louis, USA.

⁵ CELM CC 510, CELM, São Paulo, Brasil.

⁶ InstantProv, Newprov, Pinhais-PR.

⁷ Refratometre ATAGO[®] SPR-T2, ATAGO Co., LTD, Japan.

⁸ BioSystems S.A, Barcelona-Espana.

⁹ BTS-370 PLUS, BioSystems S.A., Barcelona-Espana.

¹⁰ BioSystems S.A, Barcelona-Espana.

¹¹ BioSystems S.A, Barcelona-Espana.

¹² Densitômetro DS-35, CELM, São Paulo, Brasil.

¹³ SAS/STA Software, Statistical Analysis System Institute, 1997, USA.

Tabela 1 – Resumo da análise estatística dos valores de neutrófilos redutores de NBT, concentração de fibrinogênio plasmático e valores absolutos do leucograma de cães clinicamente sadios (GS), com inflamação (GI), com inflamação e hepatopatia (GIH), com inflamação e azotemia (GIA), com inflamação e hipogamaglobulinemia (GIHG).

		Média	Desvio-padrão	Mediana	Amplitude
NBT(%)	GS	7,96	4,72	8 a	0 – 15
	GI	13,79	19,22	7 a	0 – 91
	GIH	12,82	20,72	8 a	2 – 89
	GIA	10,25	13,14	4,5 a	1 – 54
	GIHG	25,66	28,74	16 a	3 – 58
Fibrinogênio (g/dl)	GS	0,21	0,13	0,2 a	0,1 – 0,5
	GI	0,42	0,26	0,4 b	0,1 – 1,4
	GIH	0,37	0,29	0,2 ab	0,1 – 1,1
	GIA	0,42	0,21	0,4 ab	0,1 – 0,9
	GIHG	0,5	0,34	0,7 ab	0,1 – 0,9
Leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	11,12	3,03	10,50 a	6,6 – 17
	GI	12,20	6,6	11,45 a	1,7 – 37,8
	GIH	16,94	12,11	12,40 a	5 – 49,7
	GIA	12,77	12,77	12,05 a	2 – 29,1
	GIHG	19,20	19,2	11,70 a	7,6 – 38,3
Bastonetes ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	0,22	0,46	0 a	0 – 0,16
	GI	0,55	0,87	0,22 b	0 – 4,75
	GIH	2,18	4,69	0,93 b	0 – 19,87
	GIA	1,19	1,66	0,3 ab	0,73 – 6,51
	GIHG	0,51	0,84	0 ab	0 – 1,53
Segmentados ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	6,82	2,02	6,54 a	3,29 – 10,53
	GI	7,87	5,78	6,49 a	0,37 – 3,70
	GIH	11,10	7,18	7,99 a	2,90 – 24,75
	GIA	9,12	6,57	7,95 a	0,36 – 2,35
	GIHG	14,16	15,26	5,38 a	5,32 – 31,78
Linfócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	2,70	0,84	2,67 a	1,07 – 4,31
	GI	1,97	1,56	1,57 b	0,10 – 7,70
	GIH	1,61	1,43	1,18 b	0,05 – 4,97
	GIA	1,18	0,92	0,88 b	0,12 – 2,90
	GIHG	1,37	0,36	1,36 ab	0,98 – 1,75
Monócitos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	0,56	0,37	0,50 a	0 – 1,53
	GI	0,97	0,83	0,76 ab	0 – 5,37
	GIH	1,63	2,39	0,99 b	0 – 10,5
	GIA	1,01	0,66	0,97 ab	0,06 – 2,76
	GIHG	1,59	1,57	1,21 ab	0,11 – 3,83
Eosinófilos ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	GS	0,92	0,66	0,88 a	0,06 – 2,85
	GI	0,65	0,80	0,4 ab	0 – 4,23
	GIH	0,26	0,34	0,19 b	0 – 1,32
	GIA	0,24	0,29	0,23 b	0 – 1,10
	GIHG	1,08	2,16	0 ab	0 – 4,32
Relação N : L	GS	2,91	1,907	2,2 a	1,3 – 9
	GI	8,55	15,41	4,0 b	0,3 – 98
	GIH	18,24	24,42	6,6 b	1,5 – 87
	GIA	16,76	24,84	7,45 ab	0,7 – 81
	GIHG	12,06	13,58	5,5 ab	3,1 – 27,7

* Letras não coincidentes em uma mesma coluna indica diferença significativa ($p < 0,05$)

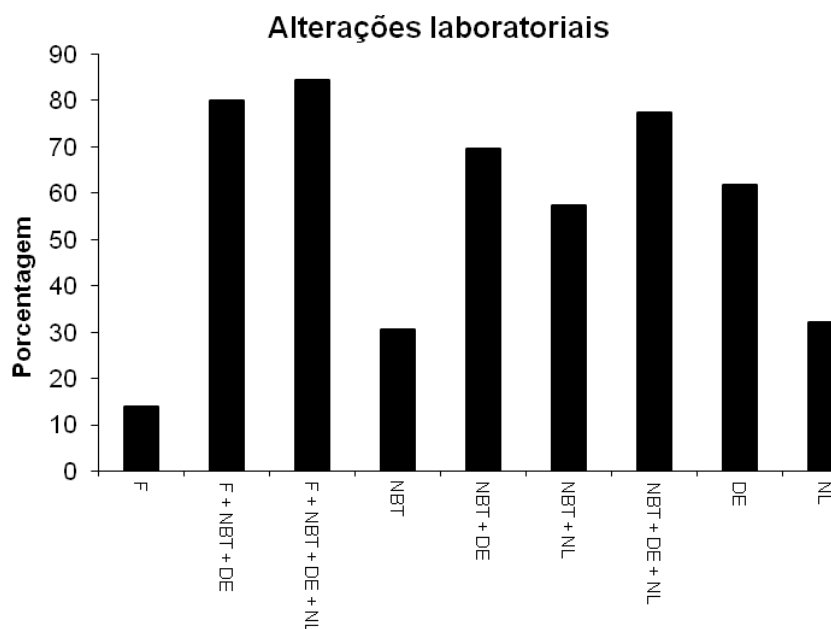


Figura 1 - Porcentagem de processos inflamatórios de cães detectados por diferentes exames laboratoriais: hiperfibrinogenemia (F), aumento de neutrófilos redutores de NBT (NBT), desvio à esquerda (DE) e aumento da relação neutrófilo: linfócito (NL) quando utilizados isoladamente e em associação.

de redução do NBT. Este resultado pode estar relacionado, em parte, com a presença de um grande número de animais portadores de enfermidades imunossupressoras como a leishmaniose visceral (32,62%) e erliquiose (5,17%).

A grande maioria dos cães portadores de leishmaniose visceral (84,62%) apresentaram valores de NBT dentro da normalidade ou diminuído. Somente 15,38% dos cães com esta infecção apresentaram uma maior produção de superóxido. Estes resultados podem ser explicado pela grande capacidade de a *Leishmania* sp. burlar a fagocitose neutrofílica (LASKAY et al., 2003; GÓMEZ-OCHOA et al., 2010). Já foi demonstrado *in vitro* que o mecanismo de evasão da *Leishmania* sp. previne a explosão respiratória, impossibilitando a formação de espécies reativas de oxigênio como o superóxido (LAUFS et al., 2002). Os mecanismos que faz a infecção por *Leishmania* sp. ativar ou inibir o metabolismo oxidativo dos neutrófilos está sob investigação. Recentemente foi constatado que o aumento ou a diminuição da taxa de redução do NBT em cães naturalmente infectados com leishmaniose visceral canina está relacionada com a carga parasitária de *Leishmania* sp. (Ciarlini et al., 2010).

Hasegawa (2005) demonstrou que cães infectados com *Ehrlichia* mantém a capacidade de reduzir NBT durante a fase aguda. No presente estudo o aumento da redução do NBT ocorreu somente em 16,6% dos cães com erliquiose, sugerindo que na

forma crônica dessa doença possa ocorrer uma menor produção de superóxido.

Os maiores valores de redução espontânea do NBT ocorreram em um caso de endometrite (91%), um caso de leishmaniose (89%), um caso de gastroenterite bacteriana (58%) e em dois casos de febre idiopática (91 e 74%). Infecções como otites, foliculites e panosteíte não promoveram elevação da taxa de redução do NBT nos cães estudados. Poli et al. (1973) igualmente observaram que o metabolismo oxidativo dos neutrófilos não é ativado em todos os casos de inflamação e que a taxa de redução do NBT varia com as diferentes causas inflamatórias, sendo maior nos processos bacterianos.

O valor de NBT do grupo GIH não diferiu dos demais grupos, o que contrapõe ao efeito inibidor das hepatopatias sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos verificado em humanos por Fan e Zhang (1997). Já os valores do teste de redução do NBT do GIA também não diferiram significativamente, porém ficaram em torno de duas vezes menor do que o grupo GI (Tabela 1), sugerindo que os compostos azotêmicos e urêmicos comprometem o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. Recentemente verificou-se que o plasma de cães saudáveis, quando enriquecido com ureia, promove a redução do metabolismo oxidativo dos neutrófilos (TREVELIN et al., 2008) e que os componentes presentes no plasma (SOEIRO, 2010) e no soro (BARBOSA et al., 2010) de cães com

insuficiência renal crônica igualmente inibem a produção de superóxido dos neutrófilos.

Segundo Cerone et al. (1997) a diminuição de imunoglobulinas prejudica a interação dos neutrófilos com receptores Fc e dessa maneira compromete a explosão respiratória responsável pelo aumento de produção de superóxido. Os cães do grupo GIHG apresentaram os maiores valores de redução do NBT, contrariando as afirmações feitas por Hansen et al. (1995) e Leino & Paape (1996) em que a hipogamaglobulinemia inibe o metabolismo oxidativo dos neutrófilos. Estes resultados sugerem que a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos nos processos inflamatórios estudados ocorreram por outras vias que independem da interação receptor-imunoglobulina.

Observou-se que 71,42% dos cães com elevação da taxa de redução do NBT apresentaram leucograma inflamatório (desvio à esquerda), porém, deste a hiperfibrinogenemia com PPT/F menor que 10 ocorreu em apenas 7,14%. Isso sugere que na maioria dos processos inflamatórios estudados, o mecanismo que induz à hiperfibrinogenemia antecede a ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos e as alterações leucocitárias.

A hiperfibrinogenemia ocorreu apenas em 13,91% dos animais com inflamação (Figura 1), indicando que este foi o parâmetro menos sensível para detecção dos processos inflamatórios, quando comparado ao leucograma e o teste de redução do NBT. Segundo Schalm et al. (1970) o aumento de fibrinogênio não é frequentemente observado em cães com inflamação, provavelmente porque esta proteína seja rapidamente consumida na fase inicial dos processos inflamatórios.

No presente estudo foi observado que 68,75% dos cães com elevada concentração de fibrinogênio plasmático (PPT/F < 10) tinham leucograma normal, resultado este que é similar aos de Sutton & Johnstone (1977) e Vecina et al. (2006). Estes resultados também fortalece o conceito de que a determinação do fibrinogênio plasmático seja um valioso instrumento clínico-laboratorial para o diagnóstico da fase inicial de inflamação em cães, quando ainda não é possível identificar esta condição pelo leucograma.

O desvio à esquerda foi o principal indicador de inflamação, detectando 61,73% dos casos inflamatórios, enquanto que o teste de redução do NBT detectou 30,43% dos casos de inflamação (Figura 1). O uso associado do teste de redução do NBT com o leucograma permitiu detectar 77,39% dos processos inflamatórios e esta sensibilidade aumentou para 84,35% dos casos (figura 1) quando tais exames foram associados à determinação do fibrinogênio. Entretanto, mesmo realizando a associação do teste de redução do NBT aos achados do leucograma e do fibrinogênio, 15,65% dos animais portadores de processos inflamatórios deixaram de ser identificados. Estes resultados ressaltam a importância do médico veterinário realizar uma boa avaliação clínica do paciente, uma vez que alguns processos inflamatórios não são acusados pelos exames laboratoriais de rotina testados.

CONCLUSÃO

O teste citoquímico de redução do NBT por neutrófilos apresentou-se como um exame pouco sensível para o diagnóstico dos processos inflamatórios de cães, porém, útil nos casos em que não há detecção de inflamação por meio do aumento do fibrinogênio plasmático e do leucograma. Isoladamente não há um efeito significativo da hipogamaglobulinemia e da hepatopatia sobre a capacidade do neutrófilo reduzir o NBT em cães com doenças inflamatórias, porém há indícios de que a azotemia possa afetar a capacidade do neutrófilo em reduzir o NBT.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos as unidades de fomento FAPESP e CAPES pelo subsídio necessário para o desenvolvimento da pesquisa científica.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, D. A.; REAGAN, W. J.; DeNICOLA, D. B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. **The Compendium.**, v.16, n.10, p.1349-57, 1994.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology.** v.16, n.1, p.42-47, 2004.
- BARBOSA, T. S.; MORI C. K.; CIARLINI, P. C. Efeito inibidor do soro urêmico sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.6, p.1352-358, 2010.
- CIARLINI, P. C. Proteinograma sérico de caprinos naturalmente infectados pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v.16, n.1, p.91-95, 1994.
- CIARLINI, P. C.; VALADARES, T. C.; IKEDA-GRACIA, F. A.; MARCONDES, M.; LIMA, V. M. F. L. Leucograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães com leishmaniose visceral antes e após o tratamento com antimoniato de meglumina e alopurinol. **Ciência Animal Brasileira**, v.11, p.359-375, 2010.
- CERONE, S. I.; SANSINANE, A. S.; STREITENBERGER, S. A.; GARCIA, M. C.; AUZA, N. J. The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. **Veterinary Research Communications**, v.22, n.1, p.47-57, 1998.
- FAN, X. G.; ZHANG, Z. The determination of neutrophil membrane fluidity in patients with hepatitis B: A fluorescence polarization study. **APMIS**, v.105, n.4, p.309-12, 1997.

- FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5^a ed., Baltimore: Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2000.
- FEITOSA F. L. F. **Semiologia: a arte do diagnóstico**. 2ed. Editora Roca, São Paulo, 2008.
- GÓMEZ-OCHOA, P.; LARAB, A.; COUTOC, G.; MARCENA, J. M.; PERISA, A.; GASCÓNA, M.; CASTILLO, J. A. The nitroblue tetrazolium reduction test in canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**. v.172, n.1-2, p.135-138, 2010.
- GORDON, A. M.; ROWAN, R. M.; BROWN, T.; CARSON, H. G. Routine application of NBT test in clinical laboratory. **Journal of Clinical Pathology**. v.26, p.52-56, 1973.
- HANSEN, P.; CLERCX, C.; HENROTEAUX, M.; RUTTEN, V. P.; BERNADINA, W. E. Neutrophil phagocyte dysfunction in a Weimaraner with recurrent infections. **Journal of Small Animal Practice**. v.36, n.3, p.128-31, 1995.
- HARR, K. E. **Diagnosis of systemic inflammatory disease in manatees (*Trichechus manatus latirostris*)** dissertação (mestrado) Florida: University of Florida, 2004.
- HASEGAWA, M. Y. **Dinâmica da infecção experimental de cães por *Ehrlichia canis*: Aspectos clínicos, laboratoriais e resposta imune humoral e celular**. Teste (mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, 2005.
- HOEDEMAKER, W.; LUND, L. A.; WAGNER, W. C. Influence of arachidonic acid metabolites and steroids on function of bovine polymorphonuclear neutrophils. **American Journal of Veterinary Research**, v.53, p.1534-1539, 1992.
- HUIMIN, J.; QINJUN, X.; PEIJUN, Z.; YANDE, D.; ZHENG, Z.; PEIQING, Y. Impaired GP-91PHOX gene expression and dysfunction of peripheral blood neutrophils in patients maintaining hemodialysis. **Chinese Medical Journal**. v.113, n.2, p.120-123, 2000.
- KAPLANSKI, G.; MARIN, V.; MONTERO-JULIAN, F.; MANTOVANI A.; FARNARIER, C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. **TRENDS in Immunology** v.24, n.1, 2003.
- KIM, M.; YANG, J.; UPADHAYA, S. D.; LEE, H.; YUN C.; HA, J. K. The stress of weaning influences serum levels of acute-phase proteins, iron-binding proteins, inflammatory cytokines, cortisol, and leukocyte subsets in Holstein calves. **Journal of Veterinary Science**, v.12, n.2, p.151-157, 2011.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes -Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **TRENDS in Microbiology**, v.11, n.5, p.210-214, 2003.
- LAUFS, H.; MÜLLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J. C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v.70, n.2, p.826-835, 2002.
- LEINO, L.; PAAPE, M. J. Regulation of activation of bovine neutrophil by aggregated immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**. v.57, n.8, p.1312-1316, 1996.
- LIBBY, P. Inflammatory Mechanisms: The Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, v.65, n.12, p.140-146, 2006.
- PARK, B. H.; FIKRIG, S. M.; SMITHWICK, E. M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils - a diagnostic aid. **Lancet**. v.292, p.532-534, 1968.
- PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **The Journal of Clinical Investigation**. v.12, n.12, p.1805-1811, 2003.
- POLI, G.; NICOLETTI, G.; FARAVELLI, G. Nitroblue tetrazolium (NBT) test nel cane. **Folia Veterinaria Latina**. v.3, p.215-39, 1973.
- ROTH, J. A.; KAEBERLE, M. L. Effects of *in vivo* dexamethasone administration on *in vitro* bovine polymorphonuclear leukocytes function. **Infection and Immunity**. v.33, p.434-41, 1981.
- SCHALM, O. W.; SMITH, R.; KANEKO, J. J. Plasma protein: Fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses. I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. **California Veterinary**. v.24, n.2, p.4-6, 1970.
- SCHULTZE, A. E. Interpretation of canine leukocyte response In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's Veterinary Hematology**. 5ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, cap.55, p.366-81, 2000.
- SOEIRO, C. S. **Mensuração do superóxido e apoptose neutrofílica em cães azotêmicos e urêmicos**. 52 f. Dissertação (Mestrado – Ciência Animal) – Universidade Estadual Paulista, Campus de Araçatuba, 2010.
- SUTTON, A. H.; JOHNSTONE, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leukocyte and neutrophil counts. **Journal of Small Animal Practice**. v.18, p.277-81, 1977.
- THRALL, M. A.; BAKER, D. C.; LASSEN, E. D.; DENICOLO, D.; FETTMAN M. J.; LASSEN, E. D.;

REBAR, A.; WEISER, G. **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**. 1 ed. Roca: São Paulo, 2007.

TREVELIN, S. C.; TRINCONI, C. M.; SOUSA, T.; CIARLINI, P. C. Efeito do plasma rico em uréia sobre o metabolismo oxidativo dos neutrófilos de cães. **Veterinária e Zootecnia**. V.15, n.2, p.97, 2008.

VECINA, J. F.; PATRICIO, R. F.; CIARLINI, P. C. Importância do fibrinogênio plasmático na identificação de processos inflamatórios de cães. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v.9, n.1, p.31-35, 2006.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Shalm's veterinary hematology**. 6 ed, Philadelphia: Wiley-Blackwell, p.1232, 2010.