

GONÇALO JORGE MOREIRA SIMÕES

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS
DE PROTEÍNA C REATIVA
EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL**

Orientador: Prof. Doutor João Requicha

Co-orientadora: Mestre Lisa Mestrinho

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016

GONÇALO JORGE MOREIRA SIMÕES

**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS
DE PROTEÍNA C REATIVA
EM CÃES COM DOENÇA PERIODONTAL**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária, no Curso de Mestrado
Integrado em Medicina Veterinária conferido pela
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Presidente: Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Prof. Doutor Carlos Viegas

Orientador: Prof. Doutor João Requicha

Co-orientadora: Mestre Lisa Mestrinho

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2016



“God...give life and health to my enemies, for
that they can watch to my victory standing up”

Desconhecido

Agradecimentos

À Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, na pessoa da sua Diretora, Prof.^a Doutora Laurentina Pedroso, pela possibilidade de realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao orientador Prof. Doutor João Requicha e à co-orientadora Mestre Lisa Mestrinho, um especial agradecimento por todo o apoio no desenvolvimento do estudo e por me aceitarem aturar.

Ao Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, ao Hospital Veterinário de São Bento (Lisboa) deixo a minha palavra de agradecimento por me permitirem aprender mais e fazer estágio extracurricular, não esquecendo especialmente o Mestre Antnio Martinho (ainda enquanto proprietário da Clínica Veterinária de São Nicolau, Santarém) que me deu as bases e me permitiu crescer nesta rea. À Clínica Veterinária AniAid e sua equipa que me permitiu o estágio curricular (talvez, um dia aparecerá um “Bil”, cão ou gato, mas aparecerá).

À Prof.^a Doutora Ins Viegas pelo esforço e dedicação à componente estatística deste estudo.

Às colaboradoras Maria Assunção e Ana Paula, da empresa Randox, pela disponibilidade e ajuda no processamento das amostras do estudo. O que se pensava fazer em duas horas ocupou um dia das 10 às 22 horas, mas isto, não foi sinnimo de tempo perdido.

Um especial agradecimento ao Instituto Nacional de Sude Dr. Ricardo Jorge, na pessoa da Prof.^a Doutora Mafalda Bourbon, pela disponibilização do equipamento para a realização da quantificação da proteína C reativa canina.

À Dr.^a Vera Pereira, apesar das amostras não serem processadas no laboratório onde labora, disponibilizou-se desde início, ainda com o projeto de dissertação um pouco cr, a colaborar em tudo o que fosse inerente à sua área e que estivesse ao seu alcance.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos os que colaboraram de forma direta ou indireta na realização deste estudo, sem eles a realização do mesmo não teria sido possível.

Agradeço  minha família, aos meus avs, pelo apoio incondicional não só na realização da Dissertação, mas durante todo o meu percurso acadmico, por me terem apoiado em todos os momentos.

Aos meus pais, que sem eles não era o que sou hoje, por estarem sempre comigo e me levantarem mesmo quando pensava que não era possível. Muito obrigado. Gosto muito de vocês.

À minha namorada, Diana Menino, por estar incondicionalmente ao meu lado. Ontem conhecemo-nos, saímos juntos e na despedida apaixonámo-nos. Hoje estamos a construir a nossa vida e amanhã seremos uma família com um futuro à nossa frente. Fazes-me todos os dias feliz. Amo-te muito (PS: ainda espero o *Simposium*).

Resumo

A doença periodontal é um processo inflamatório do periodonto bastante prevalente em cães e associado a um estadio crónico de inflamação sistémica, podendo este ser alterado após tratamento adequado. A proteína C reativa (CRP) é uma proteína de fase aguda utilizada como diagnóstico de doença sistémica.

O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos sistémicos da doença periodontal através do doseamento da CRP sérica e avaliar o impacto do tratamento periodontal em cães doentes, comparando os níveis de CRP com cães saudáveis, sem doença periodontal (grupo controlo).

A população estudada incluiu os animais atendidos nos serviços de Medicina Dentária da Clínica Veterinária AniAid e da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, durante o período compreendido entre 1 de setembro e 31 de dezembro de 2015. Estes animais foram submetidos a exame físico e estomatológico-dentário, análises hematológicas e radiografia intra-oral. Para o estudo foram selecionados 39 cães divididos entre dois grupos: (i) grupo controlo constituído por 28 animais com idade inferior a 2 anos e sem qualquer doença inflamatória, incluindo doença periodontal e (ii) grupo com doença constituído por 11 animais com mais de 2 anos de idade e com doença periodontal. O doseamento da CRP sérica foi realizado com recurso ao kit Canine-CRP (Randox, República da Irlanda). No grupo controlo, obteve-se uma amostra de sangue e no grupo com doença, duas amostras (uma antes e outra 30 dias após o tratamento periodontal).

Diferenças significativas ($p=0,001$) foram encontradas entre o grupo controlo ($2,947 \pm 1,428$ mg/L) e pré-tratamento ($13,824 \pm 17,273$ mg/L), no entanto, entre o grupo controlo e pós-tratamento, não existiram diferenças significativas ($3,376 \pm 1,235$ mg/L). Os valores de CRP entre o grupo controlo e pós-tratamento foram significativamente mais baixos que os obtidos no grupo pré-tratamento.

O doseamento de CRP em cães com doença periodontal foi avaliado em estudos anteriores, incluindo pré e pós-tratamento. Contudo, os valores de CRP reportados na presença de doença periodontal nunca foram comparados com um grupo de controlo. Este estudo permitiu caracterizar a associação entre a doença periodontal e o estadio inflamatório sistémico. A análise utilizada neste estudo foi de elevada especificidade para o cão, permitindo uma determinação mais precisa dos valores séricos, sendo que, de acordo com o conhecimento dos autores, não foi utilizada anteriormente em estudos clínicos de doença periodontal em cães.

Palavras-chaves: Doença periodontal, cão, proteína C reativa, inflamação.

Abstract

Periodontal disease is an periodontium inflammatory process highly prevalent in dogs and associated with a chronic systemic inflammatory status. Appropriate treatment for PD can cause a shift of this status. C reactive protein (CRP) is an acute phase protein used as a diagnostic indicator of systemic disease.

The present study aimed to determine the systemic effects of periodontal disease through the measurement of serum CRP and to evaluate the impact of periodontal treatment in diseased dogs comparing CRP levels with healthy dogs without periodontal disease (control group).

The study population includes dogs selected during the period between September 1st and December 31th of 2015, from two veterinary centers in Lisbon. These dogs were subjected to a detailed physical examination and dental charting, haematological analysis and intra-oral radiography. For the study were selected 39 dogs divided into two groups: (i) control group comprised 28 animals under 2 years old without any inflammatory condition, including periodontal disease and (ii) the disease group comprised 11 animals over 2 years old diagnosed with periodontal disease. Serum CRP measurement was performed using the kit Canine-CRP (Randox, Ireland). In the control group there was obtained a blood sample and in the disease group, two samples (one before and another 30 days after periodontal treatment).

Significant differences ($p=0.001$) were found between the control (2.947 ± 1.428 mg/L) and pre-treatment diseased group (13.824 ± 17.273 mg/L) but not between the control and post-treatment diseased group (3.376 ± 1.235 mg/L). CRP values between control and post-treatment disease group were significantly lower than those obtained in pre-treatment diseased group.

CRP measurement has been previously assessed in the dog with periodontal disease, including pre and post periodontal treatment. However, the CRP values reported were always in the presence of periodontal disease and never have been compared with a control group. This study allowed a more accurate establishment of the association between periodontal disease and systemic inflammatory status by comparing the values with a normal control group. Additionally, the specific analytical sort used in this study was highly specific for this species, allowing a more accurate determination of all values, not being, as for the author's knowledge, previously used in clinical studies of periodontal disease in dogs.

Keywords: Periodontal disease, dog, C reactive protein, inflammation.

Índice Geral

Resumo	5
Abstract	6
Índice Geral	7
Índice de Tabelas.....	9
Índice de Figuras.....	10
Índice de Gráficos.....	11
Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acrónimos	12
I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR	14
1. Casuística da área de clínica médica.....	14
2. Meios complementares de diagnóstico.....	16
3. Casuística da área de clínica cirúrgica	17
II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Anatomia dentária e periodontal	19
1.2. Doença Periodontal.....	21
1.2.1. Fator determinante etiológico da doença periodontal	21
1.2.2. Fatores predisponentes da doença periodontal.....	23
1.2.3. Fatores perpetuadores da doença periodontal	24
1.2.4. Diagnóstico da doença periodontal.....	25
1.2.5. Estádios da doença.....	26
1.2.5.1. <i>Estadio I: Gengivite</i>	26
1.2.5.2. <i>Estadio II: Periodontite leve</i>	26
1.2.5.3. <i>Estadio III: Periodontite moderada</i>	27
1.2.5.4. <i>Estadio IV: Periodontite grave</i>	27
1.2.6. Efeitos sistémicos da doença periodontal.....	30
1.2.7. Mecanismo inflamatório da doença periodontal.....	30
1.3. Resposta de fase aguda	31
1.3.1. Proteínas de fase aguda.....	32
1.3.1.1. <i>Proteínas de fase aguda positiva</i>	32

1.3.1.2. Proteínas de fase aguda negativa.....	33
1.4. Proteína C reativa	34
1.4.1. Estrutura da CRP	35
1.4.2. Síntese da CRP	36
1.4.2.1. Mediadores de inflamação indutores da síntese da CRP.....	37
1.4.3. Função da CRP na ativação da cascata do complemento	39
1.4.4. Doseamento da CRP	40
1.4.4.1. Eletroimunoensaio.....	41
1.4.4.2. Imunodifusão.....	41
1.4.4.3. Ensaio de imunoabsorção enzimática.....	41
1.4.4.4. Imunoturbidimetria.....	42
1.4.4.5. Aglutinação em látex capilar reversa passiva.....	42
1.4.4.6. Imunocromatografia.....	42
1.4.5. Doseamento da CRP em outras espécies animais.....	43
1.4.6. Variações fisiológicas dos níveis de CRP	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1. Objetivos	47
2.2. População estudada.....	47
2.3. Critérios de seleção.....	47
2.4. Exame estomatológico-dentário	47
2.5. Tratamento periodontal.....	48
2.6. Recolha de amostras	49
2.7. Doseamento da proteína C reativa	49
2.8. Análise estatística	50
3. RESULTADOS	51
3.1. Caracterização da amostra estudada	51
3.2. Resultados do doseamento da CRP	54
4. DISCUSSÃO.....	59
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	I

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Distribuição dos animais observados, em relação à espécie e ao sexo.....	14
Tabela 2 – Distribuição relativa das consultas observadas.....	15
Tabela 3 – Distribuição relativa das consultas de tratamento e reavaliação.....	15
Tabela 4 – Distribuição relativa das consultas de clínica médica.....	16
Tabela 5 – Distribuição relativa das consultas de imunoprofilaxia em relação à espécie.....	16
Tabela 6 – Distribuição relativa dos meios complementares de diagnóstico ou dos procedimentos de recolha de amostra observados.....	17
Tabela 7 – Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas realizadas durante o estágio...	18
Tabela 8 – Valores e particularidades da proteína C reativa em outras espécies animais (gato, bovino, coelho, rato e Homem).....	43
Tabela 9 – Descrição do grupo controlo de acordo com a raça, idade, sexo, peso vivo e estadio de doença periodontal.....	51
Tabela 10 – Descrição do grupo com doença de acordo com a raça, idade, sexo, peso e estadio de doença periodontal.....	52
Tabela 11 – Distribuição dos cães estudados relativamente ao sexo.....	52
Tabela 12 – Distribuição dos dados estatísticos da amostra relativamente à raça.....	53
Tabela 13 – Concentração de CRP obtida nos cães do grupo de controlo.....	55
Tabela 14 – Concentração de CRP obtida nos cães do grupo com doença (pré e pós-tratamento periodontal), melhoria e diminuição percentual.....	55
Tabela 15 – Resultados da análise estatística inferencial dos dois grupos de estudo (grupo controlo e grupo com doença, pré e pós-tratamento periodontal).....	57

Índice de Figuras

Figura 1 – Exemplo de odontograma do cão.....	19
Figura 2 – Representação esquemática da anatomia dentária e periodontal.....	21
Figura 3 – Ilustração esquemática do biofilme dentário.....	22
Figura 4 – Descrição dos estadios da doença periodontal de acordo com o aspeto macroscópico, perda óssea, deposição de cálculo, sulco gengival, aspeto radiográfico e prognóstico.....	29
Figura 5 – Representação gráfica das alterações, nas concentrações de proteínas de fase aguda, após um estímulo inflamatório.....	33
Figura 6 – Representação esquemática da ativação do sistema do complemento pela CRP, através da via clássica.....	40
Figura 7 – Documentação fotográfica pré e pós-tratamento periodontal de um caso clínico do grupo com doença e respetivo raio-x intraoral.....	56

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição da frequência relativa dos cães estudados, em relação à idade.....	52
Gráfico 2 – Distribuição da frequência relativa dos cães estudados em relação ao peso vivo.....	53
Gráfico 3 – Distribuição da frequência relativa dos cães do grupo controlo (A) e do grupo com doença periodontal (B), em relação ao peso vivo.....	54
Gráfico 4 – Distribuição da melhoria percentual dos cães do grupo com doença, após o tratamento periodontal.....	56
Gráfico 5 – Média da concentração da proteína C reativa canina nos diferentes grupos estudados.....	58

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Acr nimos

ACTH – Hormona adrenocorticot rica (do Inglês, “*adrenocorticotropic hormone*”)

Bid – Duas vezes por dia (do Latim, “*bies in die*”)

C – Dente canino

CI – Intervalo de confiança (do Inglês, “*confidence interval*”)

CRP – Proteína C reativa (do inglês, “*C reactive protein*”)

CRPLA – Aglutinação em látex capilar reversa passiva (do Inglês, “*capillary reversed passive latex agglutination*”)

DP – Doença periodontal

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática (do Inglês, “*enzyme linked immunosorbent assay*”)

HDL – Lipoproteína de alta densidade (do Inglês, “*high density lipoprotein*”)

I – Dente incisivo

IL – Interleucina

IM – Intramuscular

Kg – Kilograma

L – Litro

LDL – Lipoproteína de baixa densidade (do Inglês, “*low density lipoprotein*”)

M – Dente molar

mL – Mililitro

mm – Milímetros

NaCl – Cloreto de sódio

nm – Nan metro

PAAF – Punção aspirativa por agulha fina

PFA – Proteínas de fase aguda

PG – Prostaglandina

PM – Dente pré-molar

PO – Via oral (do Latim, “*per os*”)

rpm – rotações por minuto

Sid – Uma vez por dia (do Latim, “*semel in die*”)

SIRS – Síndrome de resposta inflamatória sist mica (do Inglês, “*systemic inflammatory response syndrome*”)

SRD – Sem raça definida

STD – Desvio padrão (do Inglês, “*standart deviation*”)

TC – Tomografia computadorizada

TNF – Fator de necrose tumoral (do Inglês, “*tumor necrosis factor*”)

µg – Micrograma

µm – Micrómetro

I. DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular foi realizado na Clínica Veterinária AniAid (Lisboa) na área da clínica médica e cirúrgica de animais de companhia. Este decorreu de setembro de 2015 a janeiro de 2016 sob a orientação científica da Mestre Lisa Mestrinho. Os seus objetivos principais incluíram a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de Medicina Veterinária e a aquisição de novos conhecimentos, tendo sido atribuído um horário de acordo com o período de funcionamento de modo a possibilitar o acompanhamento de todo o tipo de situações clínicas, incluindo urgências médicas e cirúrgicas. Foram acompanhadas as diferentes especialidades, tendo participado na anamnese, no exame clínico e na realização de exames complementares de diagnóstico. No internamento, foi possível acompanhar alguns casos, monitorizando cada animal, administrando a medicação necessária e realizando os exames necessários. Por último, na área de cirurgia, foi possível efetuar o acompanhamento pré-cirúrgico, cirúrgico e pós-cirúrgico de cada animal, realizando a avaliação pré-cirúrgica e/ou pré-anestésica e o protocolo de anestesia e sua monitorização anestésica. Foi também possível auxiliar nos procedimentos cirúrgicos enquanto ajudante de cirurgião e acompanhando o animal no período pós-cirúrgico.

A apresentação da casuística clínica está dividida em três áreas: casuística da área de clínica médica, meios complementares de diagnóstico e casuística da área de clínica cirúrgica.

1. Casuística da área de clínica médica

De entre os animais que se apresentaram à consulta, a espécie felina foi a mais observada, seguida da canina e dos animais exóticos. Foram observados mais machos do que fêmeas tanto no caso dos gatos como dos cães. Dos animais exóticos destacaram-se os lagomorfos relativamente às aves (periquitos) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição dos animais observados, em relação à espécie e ao sexo.

Animais	Percentagem	Sexo	Percentagem
Gatos	52%	Machos	62%
		Fêmeas	38%
Cães	47%	Machos	57%
		Fêmeas	43%
Exóticos	1%		

Durante o estágio, foi possível assistir a diferentes tipos de consultas, que se dividiram em consultas de medicina interna (ex: Endocrinologia, Nefrologia, Gastroenterologia, etc.), imunoprofilaxia e outras intervenções que incluem tratamentos e reavaliações (Tabela 2). Estes últimos tiveram mais pontos percentuais atribuídos, seguindo-se a patologia clínica, que concentrou uma grande parte dos animais que se apresentaram à consulta, uma vez que a Clínica Veterinária AniAid   uma referência na área da Estomatologia e da Medicina Dentária (Mestre Lisa Mestrinho). Deve-se ainda ter em conta, que existiram animais que se apresentaram aos três tipos de consultas.

Tabela 2 – Distribuição relativa das consultas observadas.

Consultas	Percentagem
Tratamento/Reavaliação	44%
Medicina Interna	43%
Imunoprofilaxia	13%

As consultas de tratamento e de reavaliação (Tabela 3) incluíram a revisão ou tratamento dos animais após intervenções cirúrgicas ou de consultas prévias. Neste grupo também se incluíram algumas intervenções que não foram realizadas durante a consulta propriamente dita, mas que estavam relacionadas com ela, como por exemplo a eutanásia, a necrópsia, a transfusão sanguínea e a algaliação.

Tabela 3 – Distribuição relativa das consultas de tratamento e reavaliação.

Tipo de intervenção	Percentagem
Medicação injetável / Fluidoterapia subcutânea	78%
Remoção de pontos/ agafos	12%
Eutanásia	3%
Necrópsia	3%
Pensos	2%
Transfusão sanguínea	1%
Algaliação	1%

Durante o estágio foi possível assistir a consultas de medicina interna e de diferentes especialidades médicas (Tabela 4), de entre as quais se realçaram as de Estomatologia e Medicina Dentária, principalmente na espécie felina. É de notar que, cada animal, pode

apresentar mais do que uma patologia, sendo por isso observado em mais do que uma especialidade.

Tabela 4 – Distribuição relativa das consultas de clínica médica.

Consultas	Percentagem	Patologia Clínica	Percentagem
Medicina Dentária	36%	Pneumologia	5%
Reprodução	11%	Gastrenterologia	5%
Oncologia	7%	Dermatologia	4%
Otorrinolaringologia	7%	Ortopedia	3%
Hematologia / Doenças Infeciosas	6%	Outros	3%
Endocrinologia	6%	Neurologia	1%
Urologia e Nefrologia	5%	Cardiologia	1%

As consultas de imunoprofilaxia foram observadas em todas as espécies animais, com maior incidência nos cães (Tabela 5). Dentro do grupo dos animais exóticos apenas foram observadas vacinações em lagomorfos. Foi durante as consultas de imunoprofilaxia que também foram realizadas colheitas sanguíneas para doseamento da proteína C reativa em animais saudáveis (grupo controlo).

Tabela 5 – Distribuição relativa das consultas de imunoprofilaxia em relação à espécie.

Animais	Percentagem
Cães	67%
Gatos	31%
Exóticos	2%

2. Meios complementares de diagnóstico

Os exames complementares de diagnóstico são, na maioria dos casos, imprescindíveis para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo e para a monitorização de um animal em tratamento. A Tabela 6 apresenta os meios complementares de diagnóstico realizados durante o período de estágio. Embora determinados meios de diagnóstico sejam realizados na clínica (como ecografia ou raio-x), existem análises específicas que são efetuadas em laboratórios externos. Alguns animais foram sujeitos a mais do que um meio complementar de diagnóstico.

Tabela 6 – Distribuição relativa dos meios complementares de diagnóstico ou dos procedimentos de recolha de amostra observados.

Exame ou procedimento	Percentagem	Exame ou procedimento	Percentagem
Análises clínicas (Hemograma/Bioquímicas sanguíneas)	36%	Punção de medula óssea	2%
Exames radiográficos	28%	Punção aspirativa por agulha fina	2%
Ecografia abdominal	9%	Eletrocardiograma	2%
Análise de urina	5%	Raspagem de pele	1%
Testes rápidos de diagnóstico	3%	Pesquisa de dermatófitos	1%
Biopsia	3%	Ecocardiografia	1%
Tomografia computadorizada	3%	Medição da pressão arterial	1%
Zaragatoa	2%	Reação em cadeia da polimerase	1%

3. Casuística da área de clínica cirúrgica

A  rea de clínica cirúrgica encontra-se dividida em três tipos de intervenções (Tabela 7): procedimentos médico-cirúrgicos realizados em anestesia geral, cirurgia geral e cirurgia ortopédica (Tabela 7). As pequenas cirurgias tiveram maior impacto, pois incluíram cirurgias   cavidade oral que foram as mais realizadas durante o período de estágio. Nas cirurgias de tecidos moles, as cirurgias mais realizadas foram estereliza es. No entanto, na fase final de estágio, surgiram alguns animais com pólipos auditivos.

Tabela 7 – Distribuição relativa das intervenções cirúrgicas realizadas durante o estágio.

Cirurgias		Percentagem
Procedimentos médico-cirúrgicos realizados sob anestesia geral 70 %	Tratamentos dentários	49%
	Cistocentese	7%
	Toracocentese	3%
	Biopsia	5%
	Abdominocente	2%
	Suturas	2%
	Remoção de cavilhas	1%
	Pericardiocentese	1%
Cirurgia geral 28 %	Aparelho reprodutor feminino	7%
	Aparelho reprodutor masculino	7%
	Ouvido	5%
	Mastectomia	4%
	Exérese de neoplasias	3%
	Aparelho urinário	1%
	Aparelho gastrointestinal	1%
Cirurgia ortopédica		2%

II. DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia dentária e periodontal

Os cães possuem uma dentição primária ou decídua e dentição secundária ou permanente. A dentição decídua desenvolve-se durante a fase embionária a fetal, e a dentição permanente a partir da fase fetal e neonatal. A odontogênese compreende as fases de espessamento do epitélio oral, lâmina dentária, botão, capuz e sino (Tutt, 2006). Inicialmente existe uma fase de indução e interações de tecidos embriológicos na cavidade oral primitiva, levando a uma diferenciação dos tecidos, dando origem ao dente. (Getty e Sisson & Grossman, 1981).

Os dentes são estruturas que se encontram localizadas nos alvéolos dos ossos incisivos, do osso maxilar e da mandíbula. Os cães nascem edêntulos e por volta das 2 a 4 semanas erupcionam os dentes decíduos, num total de 28 (6 incisivos, 2 caninos e 6 pré-molares, tanto na arcada superior como na inferior (Fahrenkrug, 2007)). Mais tarde, a partir dos 3 meses de idade, erupcionam os dentes definitivos, 42 dentes: 12 incisivos (I), 4 caninos (C), 16 pré-molares (PM) e 10 molares (M) (Penman, 1992).

A dentição é dividida em quatro quadrantes, segundo o sistema modificado de Triadan, que utiliza números para classificação dos dentes (Figura 1). De acordo com este sistema, o primeiro algarismo refere-se ao quadrante dentário (1: quadrante superior direito, 2: quadrante superior esquerdo, 3: quadrante inferior esquerdo e 4: quadrante inferior direito) e os dois algarismos seguintes refere-se à posição do dente em relação ao ponto interincisivo. Assim, o dente incisivo central superior direito recebe o número 101 e o dente canino inferior esquerdo recebe o número 304. Para dentes decíduos, os quadrantes são respectivamente os números 5, 6, 7 e 8, pela mesma ordem (Gioso, 2007).

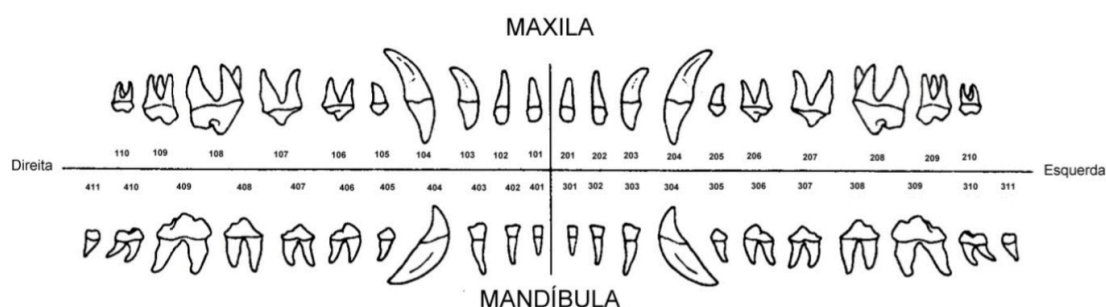


Figura 1 – Exemplo de odontograma do cão. Adaptado do Laboratório de Odontologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Apesar da variação do tamanho, da forma e da função de cada dente, a composição e estrutura dentária é semelhante (Figura 2). Um dente saudável é dividido em coroa e em raiz, podendo o dente ser uni-, bi- ou trirradicular. O colo do dente corresponde à união entre a coroa e a raiz, sendo o local de inserção do epitélio juncional da gengiva.

O osso alveolar, circunda a raiz e é o tecido de sustentação do dente onde se inserem as fibras de colagénio do ligamento periodontal. Este, liga o cemento ao osso alveolar, tendo na sua constituição fibras de Sharpey dando sustentação ao dente (Albuquerque *et al.*, 2008a). O cemento é um tecido avascularizado e mineralizado que recobre a dentina radicular (Albuquerque *et al.*, 2007). A gengiva, é o tecido epitelial, com função essencialmente de proteção e que reveste o osso alveolar, inserindo-se entre esta e o dente, o epitélio juncional (Albuquerque *et al.*, 2008a). Estas quatro estruturas (osso alveolar, ligamento periodontal, cemento e gengiva) que circundam e fixam o dente, constituem o periodonto.

A coroa dentária é a porção do dente acima do colo e é coberta por esmalte. A raiz é a porção do dente abaixo do colo e é coberta por uma fina camada de tecido conjuntivo duro e avascular, cemento, no qual se inserem as fibras do ligamento periodontal (Logan, 2006). A região anatómica de um dente multiradicular, onde a coroa diverge para formar a raiz é denominada por furca (Gioso, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008a). A dentina é o tecido que dá forma ao dente e circunscreve a cavidade (ou câmara) pulpar. Esta é formada por tecido mineralizado cuja composição é 67% de substância inorgânica (na maioria formada por cristais de hidroxiapatita), 20% de substância orgânica (composta por fibras de colagénio e glicosaminoglicanos) e 13% de água (Albuquerque *et al.*, 2007). Ao nível da coroa, a dentina é revestida pelo esmalte e ao nível da raiz pelo cemento.

A cavidade pulpar contém a polpa dentária, que é um tecido conjuntivo laxo, rico em vasos sanguíneos e linfáticos e em fibras nervosas. Contém células especializadas, denominadas odontoblastos, responsáveis pela formação contínua de dentina durante toda a vida do animal (Penman, 1992; Gioso, 2007; Albuquerque *et al.*, 2008b). Sob o ponto de vista anatómico, é constituída por uma câmara pulpar (correspondente à coroa) e um ou vários canais pulpares correspondentes a cada raiz. Na extremidade terminal da raiz, encontra-se o orifício apical por onde penetram os nervos e os vasos sanguíneos. No cão, observa-se um delta apical dado que o canal se divide em múltiplos canalículos acessórios próximo do ápice (Wiggs & Lobprise, 1997).

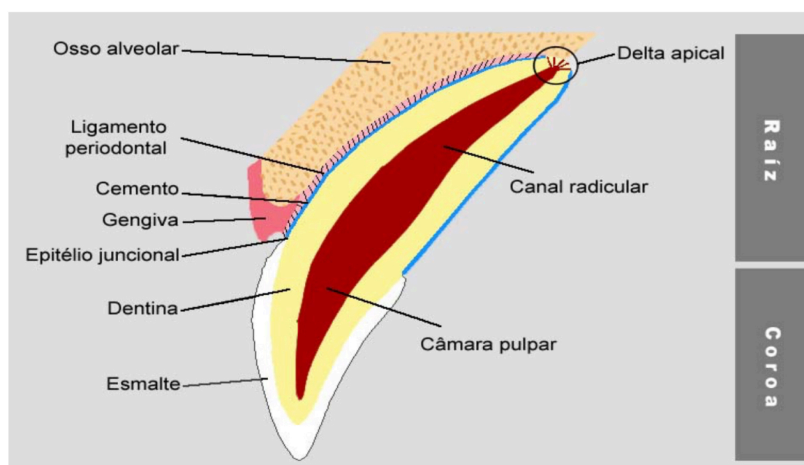


Figura 2 – Representação esquemática da anatomia dentária e periodontal. Adaptado de Penman (1992) e Gioso (2007).

1.2. Doença periodontal

A doença periodontal (DP) envolve um processo inflamatório do periodonto cujo fator determinante é a placa bacteriana, estando associado a um est dio cr nico de inflamação sist mica. A esta, o organismo hospedeiro responde imunológica e individualmente (Gorrel, 2000), que posteriormente será descrita.

A doença periodontal é bastante frequente nos carnívoros domésticos, sendo que a prevalência pode ultrapassar os 80% em cães com mais de 3 anos de idade (Kortegaard *et al.*, 2008).

1.2.1. Fator determinante etiológico da doença periodontal

O fator determinante etiológico da doença periodontal é a placa bacteriana, que se trata de um biofilme dentário (Figura 3). Esta é composta por agregados bacterianos, componentes salivares, células epiteliais e células inflamatórias e tem uma consistência pegajosa e coloração amarelada, que se forma sobre o esmalte dentário (Gorrel, 2000). Pode não ser visível no exame geral da cavidade oral, mas pode ser evidenciada com recurso a soluções reveladoras de placa, como a fucsina (Rezende *et al.*, 2004; Gioso, 2007).

A formação de placa inicia-se pela colonização primária por bactérias, principalmente do g nero *Streptococcus* sp. e *Actinomyces* sp., com propriedades aderentes (Niemiec, 2008). Posteriormente, outras bactérias colonizam o biofilme, formando micro-col nias, numa matriz de polímeros de origem microbiana (Hennet 2004; Rezende *et al.*, 2004). Existem canais de fluidos que penetram nessa matriz e através dos quais, atravessam os nutrientes, as enzimas, os metabolitos e o oxig nio (Hennet, 2004). As bactérias presentes

no biofilme comunicam entre si através de sinais químicos, levando à produção de proteínas e enzimas nocivas (Hennet, 2004). Durante a colonização e maturação, o biofilme torna-se mais estratificado, resultando numa organização complexa da placa bacteriana, fazendo com que as bactérias se tornem 1000 a 1500 vezes mais resistentes a antiss ticos e a antibióticos (Niemiec, 2008). Este tipo de organização mostra a importância da rutura mecânica do biofilme dentário no controlo da doença periodontal e explica a ineficácia da antibioterapia (Hennet, 2004).

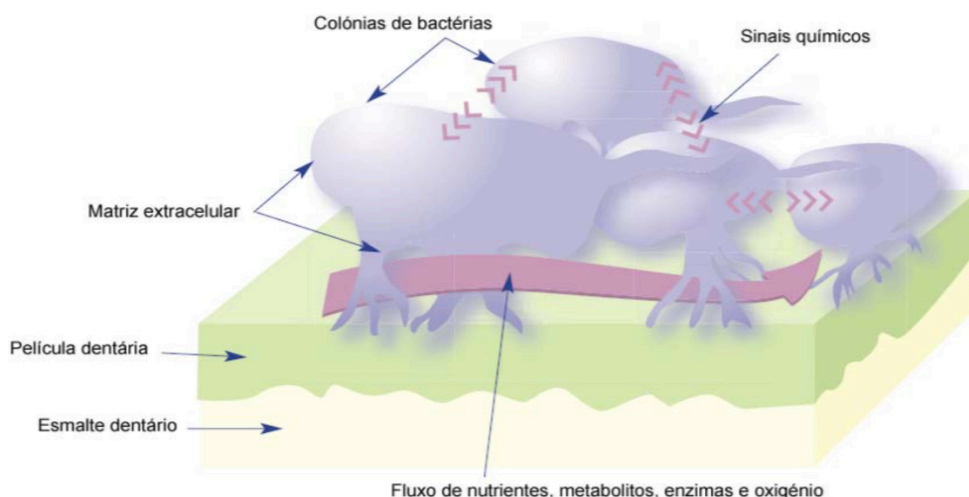


Figura 3 – Ilustração esquemática do biofilme dentário. Adaptado de Hennet (2005).

As bactérias que se instalam na placa dentária demoram cerca de 24 a 48 horas a organizar-se em placa bacteriana, podendo, posteriormente, causar lesão periodontal. Ao fim de uma cerca de uma semana podem originar gengivite, detetável no exame clínico (Gioso, 2007).

Inicialmente, a deposição de placa   supragengival (Gorrel, 2004). As bactérias aqui localizadas, essencialmente aeróbias gram-positivas e sem mobilidade, têm a capacidade de adesão   película dentária através de fímbrias, de hemaglutininas e de polissacarídeos. Os polissacarídeos ou glicanos produzidos por estas bactérias, formam o glicocálix, no qual se agregam novas bactérias. Os agentes nocivos, tais como enzimas e toxinas, libertados pelas bactérias da microbiota oral, parecem ser o estímulo inicial da reação inflamatória gengival (Wiggs & Lobprise, 1997; Hennet, 2005; Carvalho & Cabral, 2007).   medida que a gengivite se desenvolve, entre a margem gengival livre e o sulco gengival, a placa dentária prolifera subgengivalmente e as bactérias aeróbias consomem oxig nio, o potencial redox diminui, tornando o ambiente mais propício ao crescimento das espécies anaeróbias, gram-negativas, filamentosas e com mobilidade (Gorrel, 2004). Um pH alcalino favorece a calcificação do cálculo dentário, o que explica a razão pela qual os animais de companhia

têm maior quantidade de cáculo do que outras espécies, pois o seu pH oral é de, aproximadamente, 7,5 a 9,0, diferente do valor de 7,2 nos humanos (Gioso, 2007).

As bactérias anaeróbias são as responsáveis pelas alterações patológicas que conduzem à destruição e perda da força de união periodontal (Gioso, 2007). A incidência de bactérias anaeróbias aumenta de 25%, num animal saudável, para 95% num animal com doença periodontal (Hennet & Harvey, 1992).

A microbiota subgengival associada à periodontite consiste, essencialmente, em *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp. (Harvey & Emily, 1993; Braga *et al.*, 2005;), sendo que determinadas espécies bacterianas específicas do biofilme subgengival demonstraram maior relevância etiológica na iniciação e progressão da periodontite, entre elas, *Porphyromonas gulae*, *P. salivosa* e *P. denticanis*, *P. gingivalis* e *Bacteroides forsythus* (Hardham *et al.*, 2005; Niemiec, 2008). Estas possuem enzimas e outros fatores de virulência que contribuem para a progressão e agravamento da doença periodontal (Harvey, 1998).

Os efeitos patog nicos da placa bacteriana são exacerbados pela precipitação de sais minerais, como o carbonato de cálcio e o fosfato de cálcio provenientes da saliva. Estes formam o cáculo dentário, o qual pode ser supra ou subgengival (Harvey & Emily, 1993; Harvey, 1998; Kyllar & Witter, 2005). A placa e o cáculo podem conter acima de 100×10^9 bactérias por grama (Niemiec, 2008).

O cáculo dentário supragengival dos cães não provoca um efeito irritante na gengiva, sendo formado por fosfato de cálcio e quantidades variadas de carbonato de cálcio e fosfato de magnésio, que se podem organizar sob a forma de fosfato octoc lcio, fosfato de tricálcio e de hidroxiapatita. (Legeros & Shannon, 1979). O cáculo supragengival   de coloração cinzento-acastanhado, volumoso, quebradiço e de fácil remoção (Gorrel, 2004). Já o cáculo subgengival, que atinge as raízes dos dentes, é escuro ou mesmo preto devido à incorporação de pigmentos de ferro resultantes da cataboliza o da hemoglobina e da produção de pigmentos pelas bactérias subgengivais (Harvey & Emily, 1993). Os dentes que acumulam cáculo supragengival em maior quantidade localizam-se na maxila, sendo o 4.  pré-molar e o 1.  molar os mais afetados, uma vez que se encontram mais próximos do local onde desembocam os ductos das glândulas salivares par tida e zigomática (Hennet & Harvey, 1992; Eurides *et al.*, 1996; Kortegaard *et al.*, 2008).

1.2.2. Fatores predisponentes da doença periodontal

A gravidade da doença periodontal é influenciada por fatores que podem ser intrínsecos, tais como a genética (espécie, raça, outros), a idade, os hábitos de mastigação e a resposta imunológica do indivíduo (Klein, 2000), e os extrínsecos ao animal, como a

dieta, a consistência do alimento, os agentes irritantes locais (Cleland 2000; Telhado *et al.*, 2004).

Os animais com maloclusão dentária ou esquelética (prognatismo ou braquignatismo) ou com retenção de dentes decíduos, têm um maior risco de doença periodontal (Klein, 2000) dado que há um favorecimento da acumulação de placa bacteriana (Ettinger & Feldman, 2010).

1.2.3. Fatores perpetuadores da doença periodontal

Um dos fatores perpetuador da doença periodontal é o cálculo que, por si só, pode dar origem a áreas ou superfícies onde a remoção de placa bacteriana é difícil (Rezende *et al.*, 2004). Outro exemplo são as pseudobolsas periodontais associadas às neoformações orais, tais como tumores ou hiperplasias, que alteram o ambiente do dente e da gengiva, contribuindo para a doença (Klein, 2000). A hiperplasia gengival inflamatória, consiste numa resposta prolongada à placa dentária. As condições idiopáticas que lhe dão origem são frequentes em cães de raça Boxer, Collie, Doberman, Pincher e Dálmatas, no entanto, pensa-se que possam ter uma base hereditária. A excessiva respiração pela boca, é apontada como uma possível causa de hiperplasia por um mecanismo de desidratação continua da gengiva (Ettinger & Feldman, 2010). Apesar disso, fármacos como bloqueadores dos canais de cálcio, ciclosporina A, e anticonvulsivos, podem conduzir a estadios de hiperplasia gengival (Ettinger & Feldman, 2010).

A saliva contém fatores antibacterianos, anticorpos e antiproteases que ajudam no controlo da população bacteriana oral e na sua ação no periodonto. A xerostomia pode levar a um aumento de acumulação de placa e do estadio da doença periodontal e a um aumento de estirpes de bactérias virulentas, que são responsáveis pela perda de aderência (Niemiec, 2008). Uma dieta pastosa está igualmente relacionada e é considerada uma causa de acumulação de placa bacteriana, colonizada por bactérias (Kyllar & Witter, 2005). No entanto, Egelberg, em 1965 (citado por Watson, 2006), realizou um estudo no qual se alimentaram cães por entubação e verificou que a deposição de placa e o exsudado gengival, ocorrem tanto quando a comida passa pela cavidade oral como quando não passa, ou seja, não são os restos alimentares, os responsáveis pela formação de placa dentária e pelo desenvolvimento da doença periodontal, mas sim o exsudado gengival que teve tendência a aumentar, sugerindo que a mastigação possa ter tido algum efeito de limpeza e proteção da cavidade oral (Watson, 2006).

1.2.4. Diagnóstico da doença periodontal

A maioria dos proprietários não se apercebem de alterações no seu animal, a não ser nos est dios avançados da doença, sendo o sinal mais comum e mais facilmente detetado pelo proprietário, a halitose, resultante da necrose dos tecidos e da fermentação bacteriana no sulco gengival ou na bolsa periodontal (Penman & Harvey, 1992; Gorrel, 2004).

O diagnóstico e a classificação da doença periodontal baseia-se apenas na observação de sinais clínicos: gengivite, deposição de cáculo dentário, profundidade do sulco gengival e nas alterações radiográficas, que permitem verificar a destruição dos tecidos de suporte, como a perda óssea. Informações estas que devem ser registadas de forma individual para cada dente. As estruturas extraorais (lábios, face, articulação temporomandibular) devem ser examinadas e avaliadas, bem como os tecidos e as estruturas intraorais, incluindo a mucosa, músculos da mastigação, soalho da boca, língua, glândulas salivares, palato e orofaringe. O exame dentário deve incluir a observação dos dentes, mobilidade e posicionamento dentário, condição oclusal, relações interdent rias, desgaste por atrito, exposição de furcas, periodonto (avaliação da presença e do tipo de exsudado) e quantidade/distribuição de placa e cáculo. Deve ainda ser determinada, a profundidade das bolsas, retração gengival, nível de adesão ao ep t lio juncional, presença de hemorragia pós-sondagem e relação dos tecidos mucogengivais com as estruturas adjacentes.

Além do exame clínico e radiográfico, pode-se justificar a utilização de outros meios complementares de diagnóstico que incluem avaliação histológica, microbiológica, imagiológica, entre outros. O exame radiográfico intraoral permite de forma indireta, avaliar o estado do ligamento periodontal e o grau de destruição do osso alveolar e detetar o cáculo supra e subgengival (Holmstrom *et al.*, 2007) sendo uma base para o planeamento do tratamento.

A doença periodontal não   contínua nem progressiva. Varia conforme a competência do sistema imunitário do animal, podendo apresentar-se numa forma quiescente ou ativa (Mitchell, 1997; Logan *et al.*, 2002). A primeira pode observar-se em animais com grande quantidade de cáculo, mas sem evidência clínica ou radiográfica de doença, podendo passar despercebida (Gorrel, 1998; Gioso, 2007), sendo que na forma ativa da doença verifica-se gengivite e periodontite e caracteriza-se pelo aprofundamento rápido das bolsas periodontais e pela separação das fibras periodontais do cimento da raiz (Gorrel, 1998). Quando se quebra o equilíbrio entre as defesas do animal e a patogenicidade bacteriana, inicia-se a inflamação e conseqüente destruição, culminando

com a esfoliação do dente. A perda de osso alveolar desenvolve-se como resultado da alternância sucessiva de fases ativas e fases quiescentes da doença periodontal (Wiggs & Lobprise, 1997; Gorrel, 1998; Niemiec, 2008).

1.2.5. Est dios da doença periodontal

A doença periodontal pode ser dividida em est dios, no entanto a atribuição dos mesmos é subjetiva, podendo existir diferentes est dios de doença periodontal, que podem estar simultaneamente presentes em toda a boca ou em dentes individuais (Klein, 2000). Estes podem dever-se   bacteriemia periódica, lipopolissac ridos (membrana externa das bactérias gram-negativas) em circulação sang nea e citocinas pró-inflamatórias que são produzidos localmente na boca durante períodos ativos de destruição dos tecidos (Rawlinson *et al.*, 2011). Existe um sistema de cinco est dios para classificação da doença de 0 a IV, que incluem a designação respetivamente, do menor para maior est dio, por esta ordem, gengiva saudável (est dio 0), gengivite (est dio I), e três est dios de periodontite, leve (est dio II), moderada (est dio III) e grave (est dio IV) (Figura 4) (Holmstrom *et al.* 2007).

1.2.5.1. Est dio I: Gengivite

A gengivite é a primeira fase da doença periodontal e pode ser reversível no processo de doença, caso a placa bacteriana seja removida (Holmstrom *et al.* 2007), uma vez que a inflamação apenas está localizada ao nível da gengiva (Niemiec, 2008; Riggio *et al.*, 2011). A gengivite atinge os tecidos moles da gengiva e não está associada com a destruição de osso alveolar (Penman & Harvey, 1992; Gioso, 2007). Este est dio é caracterizado pela presença de halitose (Harvey & Emily, 1993; Klein, 2000) e a gengiva apresenta-se hiperêmica na margem gengival, edemaciada, com aumento de volume, friável e com perda da visualização dos vasos finos, invadindo a coroa do dente. Existe uma ligeira hemorragia   exploração por sonda e poder-se-  formar uma pseudobolsa periodontal, com profundidade de 0 a 2 mm (Klein, 2000), podendo haver uma ligeira acumulação de cáculo. Radiograficamente, não há alterações registáveis para o periodonto.

1.2.5.2. Est dio II: Periodontite leve

Se a gengivite não for controlada, a doença evolui para a fase de periodontite, na qual há destruição do ligamento periodontal, do cemento e do osso alveolar (Penman & Harvey, 1992; Brook & Niemiec, 2008). Verifica-se a destruição da porção coronal do ligamento periodontal, conduzindo a uma migração apical do ep t lio juncional da gengiva e

  formação de bolsa periodontal (Gioso, 2007). As bolsas periodontais têm as condições ideais   proliferação bacteriana tais como temperatura, ausência de luz, humidade e suporte nutricional (Harvey & Emily, 1993; Cleland, 2000). Os microrganismos locais geram proteases (com a capacidade de digerir o colagénio), elastina, fibronectina, fibrina e outros componentes da matriz extracelular. Libertam ainda produtos metabólicos tais como am nia, indol, sulfureto de hidrog nio e ácido butírico. Estes fatores podem lesar diretamente as células e os tecidos do hospedeiro, agravando a periodontite (Gorrel, 1998).

De forma semelhante   gengivite, existe um aumento da inflamação (edema gengival grave e desenvolvimento de placa subgengival). A margem gengival começa a ficar enrolada e irregular, mas contínua intacta (Klein, 2000). Os dentes apresentam placa e cálculo. Existe hemorragia dos sulcos   exploração com a sonda, com intervalos de profundidade que podem atingir os 5 mm (Kyllar & Witter, 2005). Ainda não existe exposição da raiz, mas já se verificam alterações radiográficas ligeiras (até 25% de perda óssea). Relativamente à perda de tecido ósseo, ainda não ocorre de forma significativa e toda a condição é ainda, reversível (Holmstrom *et al.*, 2007).

1.2.5.3. Estadio III: Periodontite moderada

Este é um estadio de doença incipiente, com gengivite, edema, em que a margem gengival perde a sua forma e pode começar a haver ligeira retração ou hipertrofia gengival (Holmstrom, 2007). Nesta etapa, começa a haver formação de bolsas e aumento da quantidade de placa e cálculo supragengival e subgengival. A gengiva sangra evidentemente   exploração por sonda, sendo que nas bolsas se regista uma profundidade que pode medir até 7 mm (Kyllar & Witter, 2005). O cálculo subgengival pode ser evidente e sobrepoem-se parcialmente   crista óssea, podendo ser observada radiograficamente (Holmstrom *et al.*, 2007). Neste estadio, considera-se que existe uma perda óssea numa percentagem de 30-50% (Klein, 2000).

1.2.5.4. Estadio IV: Periodontite grave

O estadio IV é caracterizado pela perda de mais de 50% da fixação das peças dentárias aos alvéolos e existe uma mobilidade marcada dos dentes, principalmente quando existe envolvimento dos dentes incisivos, derivada de uma fixação óssea mais fina e débil. A mobilidade dentária pode ou não, estar presente, devido ao processo de anquilose no interior do alvéolo (Klein, 2000). Nesta fase, existe uma inflamação grave com formação de bolsas muito profundas, retração gengival marcada, perda óssea, exposição de furcas dentárias e eventual presença de p s, associada ou não, a piorreia. A gengiva sangra de

forma fácil e frequente quando submetida à exploração por sonda. A profundidade do sulco   superior a 7 mm, ou pode noutros casos ser inferior a este valor, como consequência de retração gengival (Kyllar & Witter 2005). Radiograficamente, verifica-se perda óssea vertical (perda óssea que ocorre de forma oblíqua em relação ao eixo longo do dente) e horizontal (ocorre em toda a extensão da crista alveolar, com redução evidente de altura dentária, caracterizada por ser perpendicular ao eixo longo do dente) em 50% ou mais da área afetada, junto à raiz dentária (Holmstrom, 2007). Este est dio de periodontite predispõe a sequelas locais graves, como fístulas oronasais, abscessos, fraturas patológicas periodontais, inflamação periocular, neoplasias orais e osteomielite cr nica. (Niemiec, 2008).

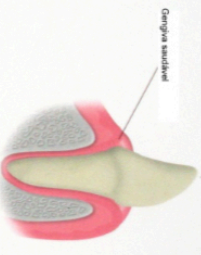
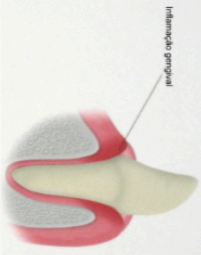
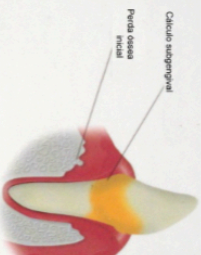
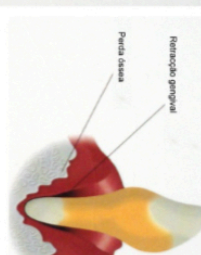
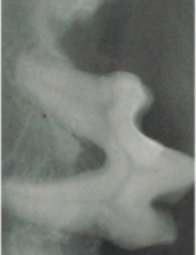
	Gengiva saudável	Gengivite	Periodontite leve	Periodontite moderada	Periodontite grave
Aspecto macroscópico	Gengiva rosada ou pigmentada segundo a coloração do animal. O tecido gengival apresenta-se firme e resistente com contorno bem definido	Gengiva apresenta inflamação, eritema e pode apresentar sangramento	Gengiva semelhante àquela que apresenta gengivite. Começa a notar-se a deposição de cálculo dentário e a retração ou hiperplasia gengival	Aumenta a inflamação e a deposição de cálculo dentário com exposição de furca evidente nos dentes multirradiculares	Inflamação grave da gengiva com retração gengival. Culmina com a exfoliação dos dentes
Perda óssea	0 %	0 %	< 25 %	30 - 50 %	> 50 %
Deposição de cálculo dentário					
Sulco gengival	< 1-2 mm	< 1-2 mm	pode medir até 5 mm	pode medir até 7 mm	pode ultrapassar os 7 mm
Aspecto radiográfico					
Prognóstico	----	Reversível	Irreversível	Irreversível	Irreversível

Figura 4 – Descrição dos estádios da doença periodontal de acordo com o aspeto macroscópico, perda óssea, deposição de cálculo, sulco gengival, aspeto radiográfico e prognóstico. Adaptado de Bellows (2004).

1.2.6. Efeitos sistêmicos da doença periodontal

A elevada carga bacteriana na placa dentária provoca uma resposta inflamatória ao nível dos tecidos periodontais, podendo também desencadear respostas sistêmicas pelo princípio de anacorese (Hennet, 2004). As bactérias e os seus metabolitos, ao entrarem na circulação sistêmica, podem atingir o pulmão e agravar doenças já existentes. Os sinais clínicos como a tosse podem melhorar após o tratamento da periodontite (Iwata *et al.*, 2009). As bactérias podem também atingir o coração e causar endocardite nos cães, podendo culminar em doença tromboembólica (Pavlica *et al.*, 2008; Glickman *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

Existem estudos em cães que demonstram a correlação entre a doença periodontal e alterações inflamatórias hepáticas e renais, levando à diminuição da função destes órgãos ao longo do tempo (Hennet, 2004; Glickman *et al.*, 2009). Outro estudo, realizado por Pavlica e colaboradores, em 2008, revelou haver um risco acrescido de alterações patológicas na válvula mitral, fígado e rim em associação com a área da superfície da bolsa periodontal em cães.

Alguns estudos em Medicina Humana sugerem a associação da doença periodontal e a Diabetes *mellitus*. Por um lado, a doença periodontal aumenta a resistência à insulina, o que leva ao incorreto controlo da endocrinopatia e aumenta a gravidade das complicações diabéticas. Por outro lado, foi demonstrado também que a diabetes é um fator de risco para a doença periodontal (Rajhans *et al.*, 2011; Saini *et al.*, 2011).

1.2.7. Mecanismo inflamatório da doença periodontal

Na doença periodontal, a cascata de eventos tem início com a presença das bactérias dentro do sulco gengival e com a libertação de enzimas e toxinas bacterianas (Niemić, 2008). Esses produtos induzem uma atividade proteolítica dos tecidos (Papadimitriou *et al.*, 2006) e a produção de mediadores inflamatórios locais, como as interleucinas 1 (IL-1 α e β) e 6 (IL-6), a prostaglandina E2 (PGE2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Gurgel *et al.*, 2004; Buttke *et al.*, 2005). Estes mediadores, tal como os leucócitos, migram para fora dos tecidos (espaço periodontal) devido ao aumento da permeabilidade vascular, aumentando o espaço entre as células epiteliais creviculares. Além da fagocitose, os leucócitos também libertam enzimas para destruir as bactérias que vão agravar a inflamação (Niemić, 2008). Desta forma, ocorre um aumento da atividade osteoclástica e uma inibição da função osteoblástica, levando à destruição do tecido conjuntivo, reabsorção óssea e perda de inserção do epitélio juncional da gengiva (Cleland, 2001; Gurgel *et al.*, 2004).

De facto, a progressão da doença é determinada pela virulência das bactérias combinada com a resposta do hospedeiro, conduzindo a complicações bastante significativas antes da exfoliação dentária (Niemiec, 2008).

Alguns estudos têm sido efetuados de forma a perceber o mecanismo da inflamação periodontal. Papadimitriou e colaboradores, em 2006, concluíram que existe uma associação estatística entre a gravidade da doença periodontal e a atividade enzimática do sistema ativador do plasminog nio, que é produzido nos tecidos gengivais e que tem um papel importante no processo de inflamação gengival e de destruição dos tecidos periodontais, incluindo o osso, o cemento e o líquido periodontal. Em 2011, Mourinha e colegas estudaram a associação de polimorfismos de nucle t do único no gene da IL-6 com a doença periodontal, no entanto não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os animais saudáveis e com doença periodontal.

1.3. Resposta de fase aguda

A homeostase é garantida por uma série de mecanismos neuroendócrinos, hematopoiéticos e metabólicos. As reações inflam t rias são exemplo de um destes mecanismos, em resposta a um estímulo infeccioso, ou não, cuja eliminação conduz à sua resolução (Moshage, 1997).

A primeira resposta do organismo a uma agressão   inata e não específica, precedendo-se reações imunológicas específicas. A resposta de fase aguda é uma reação complexa, sist mica, não específica, que ocorre rapidamente no organismo em resposta a distúrbios locais ou sist micos, causados por infeção, lesão tecidular, traumatismo/cirurgia, proliferação neoplásica ou outras alterações inflam t rias (Gruys *et al.*, 2005a). No local da lesão tecidular e/ou da invasão por microorganismos, a resposta é iniciada no próprio tecido, havendo libertação de citocinas pró-inflam t rias e ativação do sistema vascular e de células inflam t rias (Yashamita *et al.*, 1994). Estas respostas levam à libertação de mais mediadores inflam t rios que se difundem para o compartimento extracelular e passam para a circulação sanguínea. As citocinas atuam a nível de diferentes células-alvo, conduzindo a uma reação sist mica que resulta numa ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal, reduzindo a secreção da hormona de crescimento ou somatotropina (Gruys *et al.*, 2005a). Este fen meno é caracterizado por um conjunto de efeitos sist micos, que incluem febre, anorexia, aumento do catabolismo muscular, leucocitose, aumento dos níveis de cortisol, diminuição da concentração de tiroxina, entre outras alterações metabólicas (Yamashita *et al.*, 1994; Cerón *et al.*, 2005; Gruys *et al.*, 2005a). Muitas destas podem ser doseadas a nível laboratorial, tais como, diminuição de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) no plasma sanguíneo (Moshage, 1997), aumento dos níveis

séricos da hormona adrenocorticot rpica (ACTH) e de glucocorticoides, ativação do sistema do complemento e do sistema de coagulação sang neo, diminuição dos níveis séricos de zinco, ferro, retinol (vitamina A) e α -tocoferol e alteração da concentração de proteínas plasmáticas (proteínas de fase aguda) (Gruys *et al.*, 2005a).

A resposta de fase aguda visa evitar a progressão da lesão num determinado órgão, controlar o microorganismo invasor, remover moléculas e detritos do mesmo e ativar os mecanismos necessários para que ocorra um retorno dos órgãos ao seu funcionamento normal (Hirvonen, 2000).

1.3.1. Proteínas de fase aguda

As proteínas de fase aguda são proteínas sang neas plasmáticas, cuja quantificação permite avaliar a resposta inata do sistema imunitário a determinado estímulo (Eckersall, 2006b) – infeção, traumatismo, cirurgia, queimaduras, isquemia tecidular, neoplasia, etc. Nas situações cr nicas, também se verifica o seu aumento, mas de uma forma mais moderada (Petersen *et al.*, 2004), devido a uma insuficiência na síntese de mediadores ou a uma incapacidade hepática na resposta ao estímulo citoc nico (Gillet, 2002). No entanto, quando o processo inflamatório   mínimo, as concentrações destas proteínas mant m-se dentro dos valores de referência (Chambers *et al.*, 1991).

As proteínas de fase aguda podem ser definidas de acordo com cinco critérios:

1. Cinética de evolução rápida;
2. Aumento da concentração plasmática;
3. Variação independente da etiologia do processo inflamatório;
4. Variação estrita da reação inflamatória;
5. Possibilidade de uma dosagem rápida e precisa (Gillet, 2002).

As proteínas de fase aguda podem ser classificadas como proteínas de fase aguda positiva ou negativa, uma vez que a sua concentração aumenta ou diminui, respetivamente, pelo menos 25% em relação a valores basais (Eckersall, 2006a).

1.3.1.1. Proteínas de fase aguda positiva

As proteínas de fase aguda positivas são glicoproteínas sintetizadas maioritariamente ao nível dos hepatócitos, após ocorrer a libertação de citocinas pró-inflamatórias na corrente sang nea, tais como a IL-1, a IL-6 e o TNF- α . De entre as três citocinas, a IL-6 é considerada a principal no Homem, pois tem a capacidade de induzir sozinha a síntese de

haptoglobina ou, quando combinada com a IL-1, de induzir a síntese da CRP e da proteína sérica amilóide A.

No cão, as proteínas de fase aguda positivas podem ser divididas em três grupos (Figura 5) de acordo com o aumento da sua concentração aquando da reação inflamatória. No primeiro grupo, no qual se incluem a proteína C reativa (CRP) e a proteína amilóide sérica A, a concentração sérica é igual ou menor a 10 $\mu\text{g/ml}$, podendo aumentar até 100 ou 1000 vezes na presença de um estímulo inflamatório. Estas proteínas atingem um pico máximo entre as 24 e as 48 horas após o estímulo e retornam rapidamente para os valores normais. A α -glicoproteína sérica pertencente ao segundo grupo. É uma proteína de fase aguda moderada e que sofre um aumento de cerca de 5 a 10 vezes após o estímulo, atingindo um pico por volta do 2.é ou 3.  dia. O seu retorno a valores normais é mais lento do que nas proteínas pertencentes ao primeiro grupo. O terceiro grupo, ao qual pertence a haptoglobina, caracteriza-se por apresentar um aumento da concentração de cerca de duas vezes o valor normal (Eckersall, 2006a).

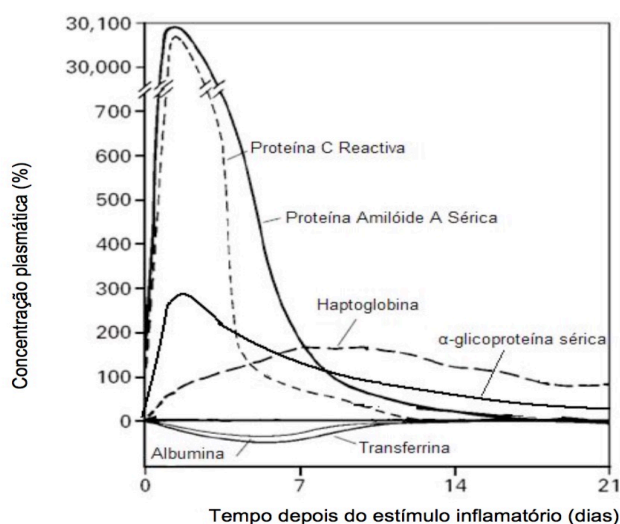


Figura 5 – Representação gráfica das alterações, nas concentrações de proteínas de fase aguda, após um estímulo inflamatório. Adaptado de Gitlin & Colten citado por Gabay & Kushner (1999).

1.3.1.2. Proteínas de fase aguda negativa

As proteínas de fase aguda negativas são aquelas cuja concentração diminui pelo menos 25% do seu valor basal. Neste grupo, inclui-se a albumina, a transferrina e a transtirretina. Para a síntese de albumina   necessário um elevado número de aminoácidos que são indispensáveis às proteínas de fase aguda positiva, levando assim, a uma diminuição da concentração da albumina sérica (Paltrinieri, 2007). Por outro lado, como a transtirretina inibe a produção de IL-1 pelos monócitos e macrófagos,   necessário haver

uma diminuição na sua síntese para haver produção das proteínas de fase aguda positivas (Gabay e Kushner, 1999).

1.4. Proteína C reativa

A proteína C reativa (CRP) foi descrita pela primeira vez por William Tillet e Thomas Francis, em 1930, durante um estudo no soro de pacientes humanos com infeções agudas de pneumonia pneumocócica (*Streptococcus pneumoniae*). O soro obtido apresentava uma substância que fazia precipitar o polissacarídeo C da parede celular do pneumococo. Foram realizados diversos estudos que verificaram que esta substância não era detetável em sujeitos saudáveis, mas que atingia concentrações muito elevadas nos indivíduos com infeções. Quando havia recuperação, os seus valores eram novamente indetetáveis. Esta substância também foi encontrada no sangue de pacientes com outras doenças febris, tais como infeção por *Streptococcus* hemolíticos, febre reumática e infeção por *Staphylococcus* spp. (Marnell *et al.*, 2005).

Mais tarde, esta fração C foi identificada como sendo um polissacarídeo da parede celular. Em 1941, Oswald Avery e Theodore Abernethy descobriram que essa substância reativa, responsável pela precipitação da fração C, era a CRP (Gotschlich, 1989)   qual teria sempre de se ligar o ião cálcio. Posteriormente, descobriu-se que esta reação não ocorria apenas na pneumonia pneumocócica, mas também noutras infeções (Clyne & Olshaker, 1999; Mold, 1999).

Em 1971, Volanakis e Kaplan identificaram em humanos um ligando específico para a CRP, a fosfocolina, que faz parte do ácido teicóico, constituinte da parede celular do pneumococo. Desde então, foram realizados diversos estudos em que se identificaram outros tipos de ligandos (Black, 2005). Em 1966, Dillman & Coles demonstraram a existência da CRP no cão, tendo sido apenas isolada nesta espécie, pela primeira vez, em 1972 por Riley e Zontine (Riley & Zontine, 1972).

A CRP no cão é a proteína de fase aguda mais importante (Skinner, 2001) e a que suscita maior interesse como marcador de doença e condições de desequilíbrio (Eckersall, 2000), como leptospirose, babesiose, parvovirose (Cerón *et al.*, 2005), leishmaniose (Martínez *et al.*, 2002), hepatite, prostatite aguda e peritonite (Riley & Zontine, 1972), traumatismo cirúrgico (Caspi *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1993b), neoplasias (nomeadamente, linfoma, hemangiossarcoma e tumores mamários) (Caspi *et al.*, 1984; Kjerlgaard-Hansen *et al.*, 2008), piómetra, anemia hemolítica imunomediada, glomerulonefrite (Kjerlgaard-Hansen *et al.*, 2008; Nakamura *et al.*, 2008), doença inflamatória intestinal (Cerón *et al.*, 2005), artrite reumatóide e poliartrites não erosivas (Caspi *et al.*, 1984). Contudo, em Medicina Veterinária os doseamentos de CRP não são

ainda realizados por rotina pelo que não existem estudos aprofundados sobre a sua concentração nas várias doenças (Nakamura *et al.*, 2008). A principal vantagem da determinação da CRP prende-se com o facto das suas alterações serem muito precoces (Eckersall & Conner, 1988).

Na fase aguda de uma doença ainda é controverso se a CRP é um marcador mais fiável do que a contagem de neutr f los para avaliar a gravidade da infeção (Hurter *et al.*, 2005). No entanto, Fransson e colaboradores (2006) demonstraram que a CRP, juntamente com a temperatura corporal e a frequência cardíaca são os parâmetros mais fiáveis no diagnóstico de síndrome de resposta inflamatória sist mica (SIRS), em relação a outros, como TNF- , IL-6, albumina, fosfatase alcalina, contagem de neutr f los, plaquetas, glóbulos brancos e frequência respiratória.

1.4.1. Estrutura da CRP

A CRP é uma proteína da família das pentraxinas, sendo constituída por cinco protômeros (subunidades idênticas), agregados numa forma pentam rica, simétrica, através de ligações não covalentes entre as subunidades, em torno de um poro central. O peso molecular desta proteína varia consoante o método utilizado para a sua deteção. Este, encontra-se entre os 100 000 Dalton (Eckersall & Conner, 1988 citado por Gillet, 2002) e 155.000 Dalton (Yamamoto *et al.*, 1992 citado por Gillet, 2002) com um valor médio de 115.000 Dalton (Caspi *et al.*, 1984). Cada protômero é formado por 206 aminoácidos (Volanakis, 2001; Ablij & Meinders, 2002), tendo a capacidade para se ligar a dois ões cálcio, os quais são indispensáveis para as ligações específicas da CRP a determinados ligandos (Volanakis & Kaplan, 1971). O ligando com maior afinidade para estas ligações cálcio-dependentes é a fosfocolina (constitu nte dos fosfolípidos da membrana celular e das lipoproteínas do plasma). Esta está presente na maioria dos polissacarídeos das bactérias e fungos, mas também na maioria das membranas celulares (Volanakis & Kaplan, 1971; Ablij & Meinders, 2002), sendo que a ligação da CRP a esta molécula apenas   estabelecida quando existe lesão da membrana plasmática que permita a sua exposição (Volanakis, 2001; Black, 2004). A CRP também se pode ligar através destas ligações cálcio-dependentes a outros constituintes membranares e celulares de células necróticas, como as histonas, cromatina e pequenas células ribonucleoproteicas (Volanakis, 2001; Ablij & Meinders, 2002).

No Homem, o tempo de semivida da CRP é cerca de 19 horas (Hanson & Lindquist, 1997 citado por Gillet, 2002), embora alguns autores refiram que seja apenas de 6 a 9 horas (Gewurz *et al.*, 1982 citado por Gillet, 2002). No cão, o tempo de semivida também   curto, entre 4-19h, dependendo dos autores (Clyne & Olshaker, 1999; Ablij & Meinders, 2002).

1.4.2. Síntese da CRP

Após uma lesão tecidular, inicia-se uma resposta de fase aguda local. As células mononucleares libertam mediadores inflam t rios, tais como citocinas, mediadores lipídicos, aminas vasoativas, proteases e óxido nítrico e ativam as cascatas do complemento e da coagulação (Olson *et al.*, 1995 e Monshouwer *et al.*, 1996 citados por Hirvonen, 2000). Estes mediadores de inflamação iniciam as reações inflam t rias locais e sist micas. Inicialmente, ocorre um aumento da permeabilidade capilar, permitindo o transporte de diferentes moléculas entre a circulação sanguínea e a área da lesão tecidular e ocorre uma infiltração de leucócitos na área de inflamação, regulada pela sua adesão ao endotélio na sequência da ativação de mediadores de inflamação (Hirvonen, 2000). Deste modo, são estas reações inflam t rias locais que influenciam indiretamente, a reação sist mica.

As citocinas são polipeptídeos segregados por diversos tipos de células que regulam e determinam a resposta imune, podendo ser divididas em três grupos, de acordo com a sua função:

- Citocinas que atuam como fatores de crescimento para diversas células: IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 e fator de estimulação de granulócitos-macrófagos;
- Citocinas com propriedades pr -inflam t rias: TNF- α/β , IL-1 α/β , IL-6, IFN- α/γ , IL-8 e proteína-1 inibidora de macrófagos;
- Fatores com atividade anti-inflam t ria: antagonistas dos receptores IL-1, recetores solúveis IL-1, proteína de ligação a TNF- α e proteína de ligação a IL-1 (Gruys *et al.*, 2005a).

As citocinas estimulam a expressão gen mica das proteínas de fase aguda (PFA), enquanto que os glucocorticoides e os fatores de crescimento modulam a atividade das citocinas (Ceciliani *et al.*, 2002). As concentrações plasmáticas destas moléculas são inferiores aos limites de deteção laboratorial e o seu tempo de semi-vida   curto, podendo apenas serem observadas sob a forma de ligeiros picos sanguíneos. Assim, não   possível utilizar estas moléculas para comprovar a presença ou ausência de resposta inflam t ria (Bienvenu *et al.*, 2000).

Depois de entrarem na circulação sanguínea, as citocinas chegam ao tecido hepático e através da ativação de recetores membranares nos hepatócitos (ativação que ocorre primeiro nos hepatócitos que estão prop nquos ao espaço porta, seguindo posterior e centr petamente, em direção à veia centrolobular) ocorre a expressão gen mica das PFA, que inicialmente é regulada a um nível transcrricional, levando à síntese de CRP (Ceciliani *et al.*, 2002). Esta sofre uma distribuição uniforme no sangue sem que ocorra uma fixação

significativa no tecido onde existe a inflamação (Hutchinson *et al.*, 1994). Após o início da resposta aguda, existe um aumento dos níveis desta proteína que atinge o seu pico em aproximadamente 48h após o aparecimento da lesão (Ablij & Meinders, 2002; Eckersall, 2006c), podendo manter-se durante toda a permanência do estímulo. Existe assim, uma forte correlação entre a duração e a intensidade do estímulo e o número de hepatócitos, aquando se inicia a síntese da CRP (Ablij & Meinders, 2002). A grande maioria da CRP é degradada também pelos hepatócitos, sendo apenas a porção que se encontra aderida a ligandos que é degradada por neutrófilos e macrófagos (Ablij & Meinders, 2002). Após a resolução da inflamação, os níveis séricos de CRP decrescem e normalizam, uma vez que deixa de existir estímulo para a sua síntese (Clyne & Olshaker, 1999; Ablij & Meinders, 2002).

Embora a síntese de CRP seja feita principalmente a nível hepático, também está descrita a sua síntese a nível dos neur nios, monócitos, linfócitos, adipócitos e células dendríticas intestinais (Eckersall, 2006b). Não há descrição dos mecanismos que regulam esta síntese, mas pensa-se que não influenciam os níveis séricos de CRP (Black, 2005).

1.4.2.1. Mediadores de inflamação indutores da síntese da CRP

Os principais mediadores de inflamação responsáveis pela síntese de CRP são a IL-6, a IL-1, o TNF-é, os glucocorticóides e os fatores de crescimento.

A IL-6 é uma fosfoglicoprote na produzida no local da lesão tecidular ou do traumatismo, por células como macrófagos, fibroblastos, monócitos, linfócitos B e T, células endoteliais, células epidérmicas, células sinoviais, queratinócitos, diversas células tumorais e condrócitos (Yamashita *et al.*, 1994). Seis horas após o estímulo inflamatrio, esta interleucina encontra-se em elevadas concentrações a nível hepático, podendo também encontrar-se no líquido sinovial, líquido cefalorraquidiano ou na urina, mas em concentrações inferiores (Nijsten *et al.*, 1987 citado por Gillet, 2002). As suas principais funções são a regulação da resposta imune (através da diferenciação de timócitos, linfócitos B e precursores de linfócitos T), estimulação da hematopoiese (através da proliferação de precursores dos granulócitos e macrófagos), mielopoiese, eritropoiese, aparecimento dos estados febris, ação endócrina (através da síntese de adrenocortic ides e glucocorticóides), síntese hepática das proteínas de fase aguda e inibição da síntese de TNF-  (Yamashita *et al.*, 1994). Num estudo experimental realizado por Nijsten e sua equipa, em 1987, verificou-se que existe um atraso entre o pico de IL-6 e o pico de CRP, devido ao tempo necessário para a estimulação hepática e posterior síntese da mesma. Quando o nível dos mediadores de inflamação circulantes diminui, não há estimulação hepática e consequentemente não

ocorre síntese de CRP. Verifica-se, então, que a resposta hepática depende da quantidade de IL-6 presente no sangue (Liu *et al.*, 2000).

A IL-1 é uma proteína que apresenta dois polipeptídeos (IL-1  e IL-1 ) com propriedades semelhantes. Esta molécula é sintetizada por monócitos, macrófagos, neutrófilos polinucleares, linfócitos B e T, células endoteliais, fibroblastos, queratinócitos, adipócitos e células dendríticas. As funções principais são: ação celular (ativação de neutrófilos, ativação de osteoclastos e destruição da matriz óssea e produção de prostaglandinas e colagenases pelas células sinoviais), ação endócrina (síntese de prostaglandinas e de leucotrienos envolvidos no mecanismo da febre e de vários sintomas de choque s tico (Bienvenu *et al.*, 2000) e secreção de IL-2 responsável pela ativação de linfócitos T) e ação sinérgica com a IL-6 na síntese hepática de CRP, amplificando a sua atividade (Yamashita *et al.*, 1994; Gillet, 2002).

O TNF-  é um polipept do não glicosado.   secretado por monócitos e macrófagos, através da estimulação por endotoxinas bacterianas (Gruys *et al.*, 1994 citado por Gillet, 2002). Este tem como principais funções o efeito citotóxico e citostático, inibição da lipoproteína lípase, que leva a uma diminuição da captação e armazenamento de triglicéridos exógenos pelos adipócitos, ativação de osteoclastos e destruição da matriz óssea, desenvolvimento de caquexia em caso de infeções cr nicas e neoplasias, aparecimento de sintomas relacionados com o choque s tico ao induzir alterações metabólicas, hemodinâmicas e tecidulares, ativação do metabolismo oxidativo dos neutrófilos polinucleados, acelerando a sua degradação e capacidade de adesão às células endoteliais e a síntese das proteínas de fase aguda, em associação com a IL-6 e IL-1 (Yamashita *et al.*, 1994).

Os glucocorticoides e os fatores de crescimento podem atuar diretamente na produção de proteínas de fase aguda ou atuar em sinergia com a IL-1 e a IL-6 (Ritchie e Navolotskaia, 1996 citado por Gillet, 2002). Inibem a expressão dos genes que codificam as citocinas, reduzindo assim, a sua libertação pelos macrófagos e monócitos. Isto leva a que haja um limite da toxicidade das interleucinas e do TNF- , diminuindo a síntese das proteínas de fase aguda. As citocinas, ao estimularem a produção de adrenocorticoides, desencadeiam um mecanismo de retroalimentação negativa pelo cortisol endógeno (Baumann & Gauldie, 1994 citado por Gillet, 2002). Assim, os glucocorticoides e os fatores de crescimento regulam a síntese de CRP ao modular a libertação de citocinas e a resposta hepática.

1.4.3. Função da CRP na ativação da cascata do complemento

Muitas das proteínas de fase aguda, incluindo a CRP, têm a capacidade de influenciar uma ou várias etapas do processo de ativação da resposta inflamatória (Gabay & Kushner, 1999). Além das capacidades mencionadas anteriormente, a CRP ativa também o sistema do complemento (pela via clássica), interage com recetores específicos em células fagocíticas e induz a produção de citocinas anti-inflamatórias (Du Clos & Mold, 2001 citado por Murata *et al.*, 2004), estimula a fagocitose e liga-se a recetores de imunoglobulinas IgG (Fc R) (Black, 2005).

O sistema de complemento   constituído por aproximadamente 30 proteínas diferentes, tendo um papel importante nos mecanismos de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos e na resposta inflamatória. A sua ativação pode ser efetuada através de três vias: via clássica, via alternativa e via da lectina. As proteínas C1-C9 são as principais componentes da cascata de ativação da via clássica, geralmente iniciada pela ligação de complexos imunológicos   C1q. A fase inicial gera, posteriormente, produtos de clivagem de C3 e C4, os quais atuam como opsoninas, facilitando a ação das células fagocíticas. Segue-se a ação de C5-C9, que são extremamente inflamatórias, gerando péptidos quimiotáticos que atacam as membranas celulares, ocorrendo l se bacteriana ou celular das células às quais se ligam (Black *et al.*, 2004). Quando se forma o complexo CRP-ligando, este complexo é reconhecido pela C1q (uma das três proteínas do complexo C1) e induz a formação da enzima C3 convertase (Mold *et al.*, 1999; Volanakis, 2001; Ablij & Meinders, 2002; Black *et al.*, 2004) a qual transforma a proteína C3 em C3a (ativada, que participa na desgranulação dos mastócitos) e em C3b. O complexo CRP-ligando-C3b, formado na superfície da célula-alvo, é reconhecido pelos macrófagos ao nível do recetor membran rio do C3b, sofrendo opsonização e fagocitose (Figura 6) (Black *et al.*, 2004).

A ativação do complemento por parte da CRP está limitada praticamente   C1-C4 (correspondente à fase inicial da via clássica) e com pouca ativação das proteínas C5-C9. Este facto deve-se   inibição da formação da enzima C5 convertase pela ligação do fator H, cuja função é controlar a taxa de formação e a atividade das convertases do complemento   proteína C3b (Mold *et al.*, 1999). Como resultado desta inibição, a resposta inflamatória associada com C5a e o complexo provocado por C5-C9 são limitados, o que leva a que a CRP participe no sistema de defesa do organismo, limitando os efeitos inflamatórios das últimas etapas do sistema do complemento (Volanakis, 2001; Black *et al.*, 2004; Black, 2005).

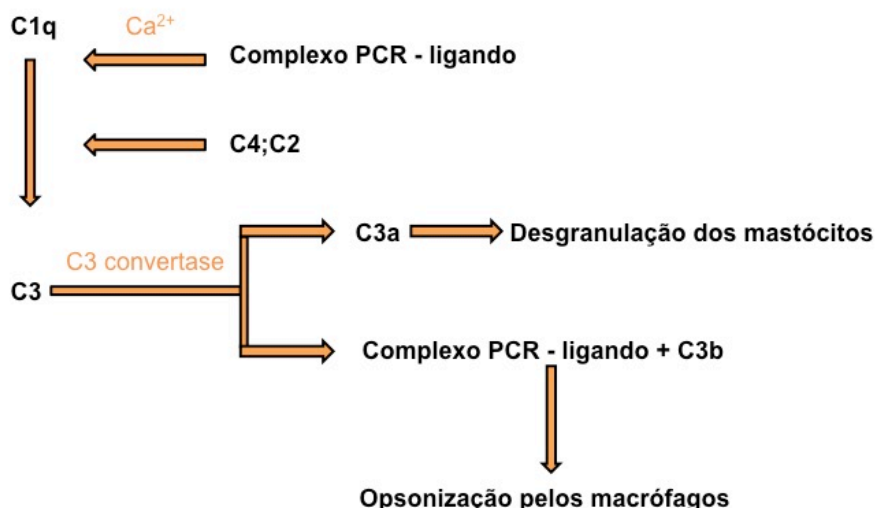


Figura 6 – Representação esquemática da ativação do sistema do complemento pela CRP, através da via clássica. Adaptado de Vergobbi (1999).

1.4.4. Doseamento da CRP

A monitorização da concentração sérica da CRP permite obter informações sobre a resposta imunitária inata do organismo. Atualmente, a CRP em cães torna-se um dos parâmetros laboratoriais mais importantes na obtenção de informação de diagnóstico da presença de lesões inflamatórias, infecciosas, auto-imunes ou neoplásicas, como também, na avaliação da resposta às terapêuticas instituidas (Parra *et al.*, 2005). A sua determinação é realizada principalmente no soro, embora existam alguns estudos em que a mesma é avaliada no líquido broncoalveolar (Casals *et al.*, 1998), plasma e saliva (Parra *et al.*, 2005), líquido cefalorraquidiano, urina (Cerón *et al.*, 2005), líquido sinovial (Hurter *et al.*, 2005; Bennett *et al.*, 2013) e diferentes tipos de efusões (Parra *et al.*, 2006b).

Em Medicina Veterinária, a deteção da CRP baseia-se na utilização de testes imunológicos, onde os mais utilizados são: o eletroimunoensaio, a imunodifusão, o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA, do Inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a imunoturbidimetria, a aglutinação em látex capilar reversa passiva (CRPLA, do Inglês, *Capillary Reversed Passive Latex Agglutination*) e a imunocromatografia (Hayashi *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2006a), sendo detalhadas a seguir. Como já foi referido anteriormente, os reagentes utilizados devem ser específicos para a proteína C reativa canina.

O sangue obtido a partir de uma veia periférica de forma assética deve ser colocado num tubo seco. Após centrifugação, colhe-se o soro (camada mais superficial), e a amostra deve ser refrigerada por um período máximo de 24 horas entre 2 C e 8 C. Se a análise não for efetuada durante este período, pode-se conservar o soro a uma temperatura inferior a -10 C (Caspi *et al.*, 1984) durante mais de três meses (Riley & Zontine, 1972 citado por

Kjelgaard-Hansen, *et al.*, 2003). A CRP é inativada quando exposta a 70 C durante 30 minutos, no entanto pode durar anos se conservada a -80 C (Dillman & Coles, 1966).

Para que não haja alterações nos valores de CRP, devem-se evitar amostras de sangue hemolisadas, lip micas ou bilirrubin micas. A hemólise leva a aumentos da concentração desta proteína e tanto a bilirrubina como a presença de triglicéridos levam a uma diminuição. Os anticoagulantes também podem alterar os valores, como por exemplo o citrato de sódio, que leva a uma diminuição significativa das concentrações de CRP (Martínez-Subiela & C ron, 2005).

1.4.4.1. Eletroimunoensaio

O eletroimunoensaio é um método simples, rápido e reprodu vel, que envolve a comparação da amostra de concentração desconhecida com várias diluições de uma concentração conhecida, da proteína em estudo. As amostras a serem comparadas são colocadas em poços, lado a lado, num gel de agarose que cont m o anticorpo monoespecífico. As amostras são submetidas a eletroforese (ocorre a interação ant g nio-anticorpo), começando a haver precipitação deste complexo, o qual assume a forma de foguete, cuja altura é proporcional ao logaritmo da concentração da proteína em estudo (Dore, 1994 citado por Gillet, 2002).

1.4.4.2. Imunodifusão

A imunodifusão é semelhante ao eletroimunoensaio, sendo que nesta a migração ant g nica não é acelerada por um campo elétrico.

O diâmetro do halo de precipitação obtido em torno do poço é diretamente proporcional ao teor de ant g nio colocado nos poços, sendo que, quanto maior o diâmetro maior a sua concentração (Prescott *et al.*, 1999).

1.4.4.3. Ensaio de imunoabsorção enzimática

Para a detecção da CRP, utiliza-se o método *sandwich*, sendo a microplaca revestida por ligandos para a proteína - anticorpos específicos (Yamamoto *et al.*, 1992 citado por Gillet, 2002) ou fosfocolina (Eckersall *et al.*, 1988 citado por Gillet, 2002). Após o revestimento da placa de poliestireno, adiciona-se o ant g nio e procede-se à lavagem. Os ant g nios livres são eliminados, permanecendo na placa os complexos ant g nio-ligando. Posteriormente, adiciona-se um complexo enzima-anticorpo (anti-CRP) que se vai unir ao primeiro complexo. Seguidamente, adiciona-se um substrato cromog nico, que vai sofrer

alterações na sua coloração por ação enzimática (Prescott *et al.*, 1999). A quantificação da CRP é feita por leitura da densidade  tica, num espectrofot metro a 414 nm (Gillet, 2002).

1.4.4.4. Imunoturbidimetria

A imunoturbidimetria   uma técnica que se baseia na junção do soro com anticorpos específicos para a CRP, que vão com esta formar complexos imunes. A formação dos complexos ant g nio-anticorpo é avaliada num espectrofot metro a 340 nm, a cada 25 segundos, durante quatro minutos e meio. A turvação produzida é proporcional   concentração da CRP no soro, obtendo-se assim, uma curva padrão com as concentrações em mg/L (Rogowski *et al.*, 2005). A imunoturbidimetria permite a deteção da CRP a partir de concentrações tão baixas quanto 1 mg/L (Eckersall *et al.*, 1991).

1.4.4.5. Aglutinação em látex capilar reversa passiva

Este método utiliza microesferas de látex com diâmetro de 0,12  m que são revestidas por imunoglobulinas G (IgG) de coelho anti-CRP canina. Após adição do soro previamente diluído, as microesferas são colocadas num tubo capilar que é submetido a centrifugação. A altura da coluna de látex precipitado permite realizar uma curva de calibração e assim determinar a concentração da CRP (Tagata *et al.*, 1996 citado por Gillet, 2002).

1.4.4.6. Imunocromatografia

A imunocromatografia é um teste rápido e qualitativo que utiliza anticorpos anti-CRP canina. Para realizar o teste, adiciona-se uma gota de soro com 1 ml de solução tampão e posteriormente, coloca-se no teste rápido uma gota dessa mistura com três gotas da solução tampão, esperando-se 5 minutos até obter o resultado. A presença de uma banda azul igual à banda controlo é indicativa de um resultado positivo, o que corresponde a uma concentração de CRP superior a 5  g/ml. Quando a intensidade da banda azul   menor que a da banda controlo, o teste é fracamente positivo, correspondendo a uma concentração entre 3 e 5  g/ml. Um teste negativo corresponde a uma concentração de CRP inferior a 3  g/ml (McGrotty *et al.*, 2004).

1.4.5. Doseamento da CRP em outras espécies animais

A CRP tem maior interesse clínico como proteína de fase aguda na espécie humana e canina, apresentando um padrão semelhante (Hirvonen, 2000), contudo pode também ser identificada na corrente sanguínea de outras espécies.

As concentrações basais da proteína C reativa variam em função do método utilizado para a sua deteção e dos indivíduos testados. De acordo com a literatura (Caspi *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1993b, Burton *et al.*, 1994, Ndung'u *et al.*, 1991 citado por Gillet, 2002), foram realizados diversos estudos em animais saudáveis.

A Tabela 8 apresenta as principais características da CRP em diferentes espécies animais. Ao contrário dos cães, a CRP não é o marcador ideal de inflamação nos felinos e nos bovinos, sendo que nos primeiros, o stresse influencia as concentrações de CRP, resultando em níveis aumentados. Deve-se, nestes casos, utilizar outras proteínas de fase aguda, como por exemplo a α -glicoproteína sérica e a proteína amiloide sérica A, respetivamente (Hirvonen, 2000; Eckersall, 2006a).

Tabela 8 – Valores e particularidades da proteína C reativa em outras espécies animais (gato, bovino, coelho, rato e Homem). Adaptado de Gillet (2002).

Espécie	Concentração sorológica		Particularidade
	Valor basal	Valor em est�dio inflamatório	
Gato	160,1 $\pm$ 27,5 μ g/ml	269,6 $\pm$ 81,6 μ g/ml	Não existe um aumento significativo na presença de inflamação; stresse provoca alterações da concentração
Bovino	10-30 μ g/ml	sem dados	Não tem significado como proteína de fase aguda
Coelho	9,1 $\pm$ 4,7 μ g/ml	118,8 $\pm$ 58,5 μ g/ml	Glicoproteína; sequência de aminoácidos semelhante � CRP humana
Rato	300 - 600 μ g/ml	até 900 μ g/ml	Sequência de aminoácidos semelhante � CRP humana
Homem	0,07 - 8 μ g/ml	40 μ g/ml	Cinco unidades não glicosadas

Em 1993, Yamamoto e colaboradores realizaram um estudo de forma a verificar se haviam reações cruzadas entre a CRP canina e a CRP humana. Nesse estudo demonstraram que se a concentração de CRP for menor do que 150 μ g/ml, não há qualquer tipo de reação cruzada. No entanto, em casos de elevados títulos, esta reação pode ocorrer. Por este motivo, os testes comerciais humanos não devem ser utilizados para amostras

caninas (Yamamoto *et al.* 1993a; Fujise, 1992), devendo utilizar-se anticorpos específicos, de forma a obter dados fidedignos (Maudsley & Pepys, 1987).

1.4.6. Variações fisiológicas dos níveis de CRP

Apesar dos diversos estudos realizados utilizando a CRP, os métodos efetuados para a obtenção da concentração sérica desta, não foram sempre os mesmos.

Em 1994, Yamamoto e colaboradores, administraram por via intrabrônquica uma suspensão de *Bordetella bronchiseptica* a 4 cães com 2 anos de idade e em 2001, Hayashi e colegas, inocularam *Staphylococcus aureus* por via intradérmica a 4 cães com um mês de idade. Estes dois estudos demonstraram que a síntese da CRP é ativada na presença de uma infeção bacteriana. A carga parasitária, tal como a bacteriana, também vai estimular a síntese de CRP, atingindo valores semelhantes (Shimada *et al.*, 2002), com a diferença no pico de concentração, que ocorre primeiro nas infeções bacterianas, uma vez que alguns parasitas são microorganismos intracelulares e a sua multiplicação no organismo é mais lenta do que no caso das bactérias (Shimada *et al.*, 2002), levando o organismo mais tempo a desenvolver uma resposta. A presença de infeções virais, por si só, não altera as concentrações de CRP (Jinbo *et al.*, 1999). Nas alterações neoplásicas, os valores de CRP são proporcionais à evolução do processo, estando relacionados com o estadió da neoplasia, com o prognóstico e com a taxa de sobrevivência (Mazhar & Ngan, 2006). Caspi e colaboradores, em 1984, concluíram que quanto mais grave é o tipo de tumor, mais elevadas serão as concentrações de CRP. Verificaram que em diferentes tipos de tumores mamários, as concentrações de CRP são significativamente mais elevadas em animais com neoplasias malignas do que com neoplasias benignas, sendo que nas primeiras, com a presença de metastização acrescida, os valores são superiores (Gillet, 2002).

Quanto à idade, num estudo efetuado por Hayashi *et al.* (2001), concluiu-se que na presença de um processo inflamatório, os métodos utilizados para a quantificação da CRP em cachorros com idade inferior a 3 meses devem ter uma sensibilidade elevada, de forma a poderem detetar concentrações baixas e os valores obtidos são inferiores aos valores normais. Nas idades posteriores, os valores de CRP mantêm-se dentro dos valores normais.

Apesar dos diferentes estudos realizados em animais saudáveis, com o objetivo de avaliar a influência do sexo nos níveis de CRP (Yamamoto *et al.*, 1994; Otabe *et al.*, 1998 e Kuribayashi *et al.*, 2003), verificou-se que não existem diferenças significativas entre machos e fêmeas nos valores de CRP.

Otabe e colegas, realizaram um estudo em 1998 com o objetivo de avaliar se as concentrações de CRP variavam ao longo de 24 horas ou de 4 semanas. Os resultados

obtidos foram constantes, indicando que a concentração desta proteína não varia ao longo do dia nem do mês.

Na gestação de cadelas, entre o 30.º e o 45.º dia após a ovulação (4.ª/5.ª semana), verifica-se um aumento da concentração da CRP sérica (até 80 µg/ml), que coincide com a implantação do embrião no endométrio uterino, provavelmente devido à presença de uma inflamação local. Uma vez que este aumento não se verifica em todas as cadelas e por ser limitado no tempo, esta proteína não deve ser utilizada para o diagnóstico de gestação. (Fransson *et al.*, 2004).

A influência da utilização de medicamentos sobre a concentração sanguínea da CRP ou a sua síntese ao nível do fígado permanece controversa. Alguns autores defendem que os corticosteroides administrados atuam como os seus análogos endógenos (diminuindo a libertação de citocinas pelos macrófagos e consequentemente, a síntese desta proteína pelo fígado (Hachulla, 1998 citado por Gillet, 2002)), enquanto que outros sugerem que as doses anti-inflamatórias ou imunossupressoras não têm qualquer efeito na síntese da CRP (Martínez-Subiela *et al.*, 2004). Em Medicina Humana, um estudo realizado por Hansson & Lindquist (1997), refere que os antibióticos podem alterar as concentrações de CRP, não existindo até ao momento qualquer estudo em Medicina Veterinária (Gillet, 2002). No entanto, o importante é que quando se quantifica a CRP se tenha em conta os fármacos que estão a ser administrados ao animal para uma adequada interpretação dos resultados.

Quando o objetivo é a monitorização de um tratamento, a quantificação contínua e regular da CRP é útil. Depois de se instituir a terapêutica adequada, podem surgir quatro cenários relativamente à concentração da CRP: (i) descida rápida e exponencial, indicativa de uma terapêutica adequada e da ausência de alterações, (ii) descida lenta e insidiosa, (iii) ausência de descida e (iv) existência de um segundo pico.

No primeiro cenário, o animal não necessita de monitorização contínua, sendo apenas necessário quantificar a CRP para verificar até quando se deve continuar a terapêutica. Nas duas situações seguintes, o animal necessita de uma monitorização cuidada, uma vez que pode haver suspeita de que o tratamento não seja o mais adequado ou que possam existir outras alterações concomitantes. Na última situação, deve haver uma monitorização constante do animal, com uma alteração do tratamento e uma recolha de novos sinais considerando a possibilidade de patologia concomitante. O prognóstico nesta situação é bastante reservado (Póvoa, 2000).

Em Medicina Humana, considera-se que quando há um aumento ou uma estabilização da concentração de CRP durante os três ou quatro dias após a instituição da terapêutica, há uma evolução desfavorável e o tratamento deve ser reconsiderado (Hansson & Lindquist, 1997 citado por Gillet, 2002). Em Medicina Veterinária, os estudos realizados

com o objetivo de avaliar a eficácia de um tratamento para determinada doença (Kjelgaard *et al.*, 2006; Sasanelli *et al.*, 2007; Matijatko *et al.*, 2007) permitiram concluir, que depois de se instituir uma terapêutica adequada e quantificando-se a CRP em intervalos de tempo definidos, esta apresenta concentrações progressivamente menores ao longo do tempo.

Os estudos em Medicina Humana são mais frequentes comparativamente aos estudos efetuados em Medicina Veterinária. Uma revisão de literatura feita por Loos, em 2005, sobre os níveis sist micos de marcadores inflamatórios utilizados na periodontite, demonstrou que os números totais de leucócitos e os níveis plasmáticos de CRP, estão constantemente mais elevados em pacientes com periodontite em comparação com controlos saudáveis. Estes marcadores têm também são considerados como marcadores preditivos de doenças cardiovasculares. Assim, as alterações destes marcadores na periodontite pode explicar a associação entre a periodontite e doenças cardiovasculares e/ou eventos cerebrovasculares. Noutra revisão, realizada por Linden e colaboradores, em 2013, permitiu concluir que existe uma heterogeneidade nos critérios utilizados para identificar a periodontite, apesar da maioria demonstrar associações entre a periodontite cr nica e doenças sist micas, como a diabetes.

Com o presente trabalho pretende-se contribuir para o conhecimento da utilização da CRP como exame complementar de diagnóstico na doença periodontal do cão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Objetivos

O estudo teve como objetivo determinar o est dio inflamatório da doença periodontal através do doseamento da CRP sérica e avaliar o impacto do tratamento periodontal em animais doentes, comparando esses níveis de CRP com os obtidos em cães saudáveis, sem doença periodontal (grupo controlo). O intuito foi verificar se os valores de CRP obtidos após o tratamento dos animais doentes, reduziam para valores basais e se se aproximavam ou igualavam aos valores do grupo de controlo.

2.2. População estudada

Os animais que compuseram a população estudada foram atendidos nos serviços de Medicina Dentária de dois Centros de Atendimento Médico-veterinários em Lisboa, na Clínica Veterinária AniAid e na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona, durante o período compreendido entre 1 de setembro e 31 de dezembro de 2015.

A realização deste estudo teve a autorização da Comissão de  tica e Bem-Estar Animal (CEBEA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona (Anexo I).

2.3. Critérios de seleção

Neste estudo foram incluídos os cães com análises pr -cirúrgicas realizadas e submetidos a anestesia ou sedação para avaliação oral completa.

Os cães atendidos que apresentavam alterações hematológicas compatíveis com uma doença sist mica, como por exemplo, neoplasia, doença renal ou hepática, doença infecciosa, entre outras, foram excluídos do estudo.

No grupo controlo, foram incluídos todos os cães que não revelaram sinais de doença periodontal nem doença sist mica, até aos dois anos de idade. No grupo com doença periodontal, apenas foram incluídos cães com idade superior a dois anos e que t mb m não apresentassem quaisquer doenças, exceto doença periodontal.

Todos os cães com alterações sist micas, tanto no grupo controlo como no grupo com doença, decorrentes à *posteriori* da colheita de sangue, foram excluídos do estudo.

2.4. Exame estomatológico-dentário

Todos os cães, incluindo os do grupo de controlo, foram submetidos a um exame estomatológico-dentário antes da recolha de sangue para doseamento da CRP. Este exame

foi realizado sob sedação ou anestesia geral no dia da intervenção. Apesar de efetuado um odontograma individual a cada animal, e por forma a facilitar a classificação e interpretação do estadio de doença periodontal, recorreu-se   classificação em cinco estadios representados na Figura 4: estadio 0 correspondente a gengiva saudável, I a gengivite, II a periodontite leve, III a periodontite moderada e IV a periodontite grave. A DP classificou-se com base no dente que apresentava o estadio mais grave da doença.

De forma caracterizar a doença, foram realizadas radiografias intraorais antes e após tratamento, com maior importância nos animais em que foi necessária extração dentária completa ou de raízes retidas.

Num odontograma de cão, foram registadas as alterações observadas em cada peça dentária, de entre elas: a ausência dentária, o grau de gengivite (0-3), a profundidade do sulco (medida em milímetros usando a sonda periodontal), o grau de mobilidade (0-3), o cáculo dentário (0-3), o grau de exposição de furca dentária (0-3), a hiperplasia gengival (mm) e a recessão gengival (mm).

2.5. Tratamento periodontal

Os cães em estudo foram pré-medicados com acepromazina (0,125 mg/Kg, IM) e metadona (0,5 mg/Kg, IM) e utilizou-se propofol (1 mg/Kg, IV) para indução, mantendo a anestesia com isoflurano (1,2% concentração alveolar mínima) misturado em oxig nio (100%) através de um circuito fechado/circular para cães com peso superior a 5 Kg e de um circuito semi-aberto para cães com peso inferior a 5 Kg. Realizou-se fluidoterapia intravenosa com cloreto de sódio isot nico (NaCl a 0,9%) na dose de manutenção cirúrgica (10 ml/Kg/hora).

Com o animal anestesiado, começou por se utilizar cloro exidina a 0,20% como antiss tico oral, deixando-a atuar durante 1-3 minutos antes de se iniciar o procedimento propriamente dito. Depois, utilizou-se um destartarizador ultrass nico com o objetivo de eliminar o cáculo dentário, sobretudo o cáculo da superfície dos dentes. Seguidamente, realizou-se curetagem subgengival e radicular se necessária, com uma cureta de Gracey. Posteriormente   destartarização, poliram-se os dentes de modo a tornar a sua superfície macia e a remover os resíduos de placa. Após a destartarização e o polimento, utilizou-se soro fisiológico para irrigação do sulco subgengival e das bolsas periodontais e aplicou-se de novo cloro exidina para garantir a assepsia final.

Nos estadios mais graves, foi necessário recorrer-se a tratamento cirúrgico para ter acesso às estruturas dentárias e periodontais, através de retalhos que permitissem uma destartarização e curetagem radicular a céu aberto, ou de forma a alterar a morfologia

gingival para facilitar o controlo pós-cirúrgico da placa bacteriana e permitir a regeneração do ligamento periodontal nos dentes viáveis.

Em exceções pontuais efetuaram-se extrações dentárias. Nestes casos, os cães realizaram antibioterapia com amoxicilina com ácido clavulânico na dose de 20 mg/kg, PO, Bid e anti-inflamatório não esteróide (meloxicam na dose de 0,02 mg/Kg, PO, Sid, no primeiro dia e 0,01 mg/Kg, PO, Sid, nos dias seguintes).

2.6. Recolha de amostras

Aos animais selecionados para este trabalho, foram realizadas colheitas de sangue periférico para um tudo seco, no seguimento da avaliação pré-anestésica de cirurgias eletivas no grupo controlo e de avaliação pré-anestésica e monitorização do tratamento periodontal no grupo com doença. Assim, o sangue colhido para realização dos exames pré-anestésicos destas cirurgias, foi também utilizado para o doseamento da proteína C reativa nos animais com doença periodontal.

O sangue obtido a partir de uma veia periférica de forma assética foi colocado num tubo seco. Após centrifugação a 2000 rpm durante 20 minutos, colheu-se o soro (camada mais superficial), tendo o mesmo sido congelado a -10°C até posterior doseamento da CRP.

Nos animais do grupo controlo foi realizada apenas uma colheita sanguínea e nos animais do grupo com doença periodontal, foram realizadas duas colheitas, antes e 30 dias após o tratamento anteriormente descrito.

2.7. Doseamento da proteína C reativa

O doseamento dos níveis de CRP foi realizado através do método de imunoturbidimetria, um método quantitativo que se baseia na junção do soro com anticorpos específicos para CRP e que vão com esta formar complexos imunes, com recurso ao kit de CRP canina espécie-específico da empresa Randox (República da Irlanda) (Anexo II). Este foi utilizado na máquina analítica modelo RX Daytona da mesma empresa, com uma linearidade de 220 mg/L e uma sensibilidade de aproximadamente 8,06 mg/L. A análise das amostras foi realizada em duplicado.

Antes do processamento de todas as amostras, o equipamento foi calibrado com recurso a três níveis de calibradores que permitiram a calibração do equipamento automatizado com utilização de uma pequena amostra, em função da pipetagem. Utilizou-se assim, um material de referência, com o objetivo de minimizar a ocorrência de erros.

A formação destes complexos antigénio-anticorpo, é avaliada num espectrofotómetro a 340 nm, a cada 25 segundos, sendo possível a deteção da CRP a partir de concentrações

de 1 mg/L). A máquina analítica pipeta 150 µL do 1.º reagente e 8 µL da amostra, incuba durante 3 a 5 minutos e é avaliada a absorvância a 340 nm. Seguidamente, foi incorporado o 2.º reagente (22 µL) e ocorre novamente a incubação durante 5 minutos. Finalmente, a última leitura de absorvância é realizada no mesmo comprimento de onda, obtendo-se assim o doseamento final de CRP da amostra.

2.8. Análise estatística

Procedeu-se à análise estatística inferencial baseada na comparação da quantificação da CRP para os grupos controlo, pré-tratamento e pós-tratamento. Para tal foi realizado um teste ANOVA. Na sua sequência foram realizados testes post-hoc de Bonferroni e de Tukey HSD, para identificar as diferenças estatísticas entre os três grupos. Foi ainda realizado um teste-t para amostras independentes, para verificar a significância entre o grupo controlo e o grupo pós-tratamento, avaliando se a diferença de doseamento de CRP, era ou não, verdadeiramente significativa.

Foram também realizados testes de chi-quadrado para verificação da relação entre as variáveis peso (inferior e superior a 13 Kg) e o estadio de doença, entre a raça e o estadio de doença e entre a idade (inferior e superior a 10 anos) e o estadio de doença.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da amostra estudada

No decorrer do período em estudo, obteve-se uma amostra constituída por 39 cães. No grupo controlo, foram incluídos 28 animais (Tabela 9) e no grupo com doença 11 animais (Tabela 10). De entre os 39 cães estudados, 22 eram machos (56,41%) e 17 eram fêmeas (43,59%), com um peso vivo médio de 19,86 Kg (Tabela 11).

Tabela 9 – Descrição do grupo controlo de acordo com raça, idade, sexo, peso e estadio de doença periodontal-

Cão	Raça	Idade (meses)	Sexo	Peso (Kg)	Estadio de Doença (0-IV)
1	Bulldog Francês	5	♂	9,2	0
2	SRD	12	♀	26,7	0
3	Labrador Retriever	12	♀	19	0
4	Galgo Afegão	12	♂	9,8	0
5	Labrador Retriever	12	♀	29	0
6	Labrador Retriever	12	♂	30	0
7	SRD	12	♀	23,4	0
8	Jack Russell Terrier	12	♂	7,3	0
9	Galgo Afegão	12	♀	26,3	0
10	Labrador Retriever	12	♂	21	0
11	SRD	9	♂	25,6	0
12	Dog Argentino	12	♀	38	0
13	SRD	12	♂	37,9	0
14	SRD	12	♂	23,7	0
15	Epagnuel Breton	12	♂	19	0
16	Epagnuel Breton	12	♀	16,9	0
17	Bulldog Francês	12	♀	8,85	0
18	Dog Argentino	12	♀	39,9	0
19	SRD	12	♂	25,5	0
20	SRD	6	♀	18,8	0
21	Jack Russell Terrier	12	♂	8,85	0
22	Rottweiler	12	♂	37,7	0
23	SRD	6	♂	20	0
24	Labrador Retriever	8	♀	25	0
25	SRD	12	♂	29	0
26	Bulldog Francês	12	♂	14,9	0
27	Labrador Retriever	6	♀	19,9	0
28	Epagnuel Breton	10	♂	17	0

Tabela 10 – Descrição do grupo com doença periodontal de acordo com raça, idade, sexo, peso e estadio de doença.

Cão	Raça	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Estadio de Doença (0-IV)
1	Basset Hound	11	♂	23,3	IV
2	Labrador Retriever	11	♀	38	IV
3	Yorkshire Terrier	7	♀	4,95	IV
4	Epagnuel Breton	7	♀	17	II
5	Yorkshire Terrier	6	♂	4,95	IV
6	SRD	15	♂	9,35	III
7	SRD	17	♂	5,5	IV
8	SRD	12	♂	14,6	IV
9	Papillon	7	♂	4,95	III
10	SRD	13	♀	19	IV
11	Spitz Alemão	5	♀	5	III

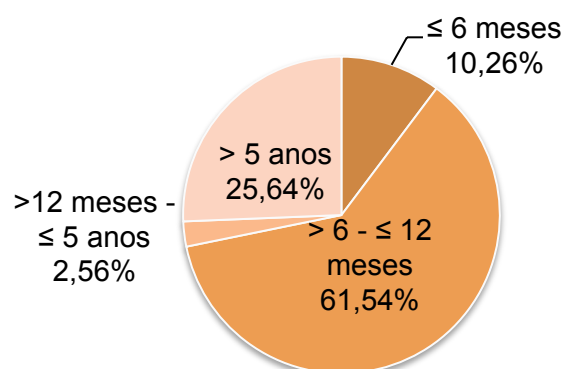
Tabela 11 – Distribuição dos cães estudados, relativamente ao sexo.

	Amostra estudada	Grupo Controlo	Grupo com Doença
Machos	56,41%	57,14%	54,55%
Fêmeas	43,59%	42,86%	45,45%

Relativamente à idade dos cães, verificou-se que mais de metade da amostra total, 61,54% (24/39 cães), tinha idade compreendida entre os 6 e os 12 meses, sendo possível constatar que em segundo lugar se encontram os cães com idade superior a 5 anos, 25,64% (10/39) (Gráfico 1).

No grupo de controlo, os cães incluídos eram todos jovens, sendo que não existia nenhum animal com idade superior a 12 meses. A maioria dos cães apresentava idade entre os 6 e os 12 meses, sendo de 85,71% (24/28).

No grupo dos cães com doença periodontal, a maioria apresentou idade superior a 5 anos (90,91%, 10 animais) e apenas um tinha 5 anos (9,09%).

**Gráfico 1** – Distribuição da frequência relativa dos cães estudados, em relação à idade.

Os cães de raça pura, representando 66,67% (26/39) do total da amostra, predominaram em relação aos cães sem raça definida (SRD) (33,33%, 13/39).

De entre as 11 raças puras observadas, as raças Labrador Retriever e Rotweiller foram as predominantes, representando cada uma 15,40% dos cães estudados (6/39) (Tabela 12).

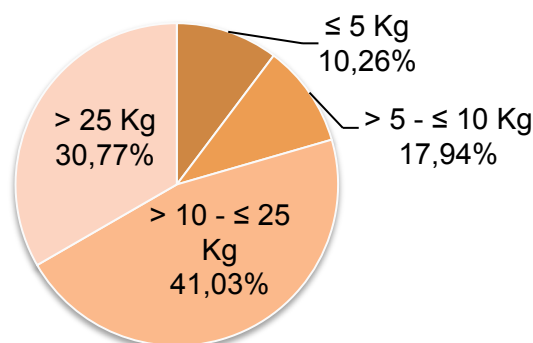
No grupo de controlo, os cães de raça pura tiveram maior predomin o (67,86%, 19/28), comparativamente aos cães SRD (32,14%, 9/28), tendo sido o Rotweiller o mais importante (21,43%, 6/28).

No grupo com doença periodontal, os cães de raça pura corresponderam a mais de metade da amostra do grupo com doença, representando 63,63% (7/11) comparativamente a 36,37% (4/11) dos cães SRD. Dos animais de raça pura, a raça Yorkshire Terrier foi a mais frequente (18,18%, 2/11), comparativamente com as restantes (9,09% de cada).

Tabela 12 – Distribuição relativa dos animais da amostra estudada relativamente à raça.

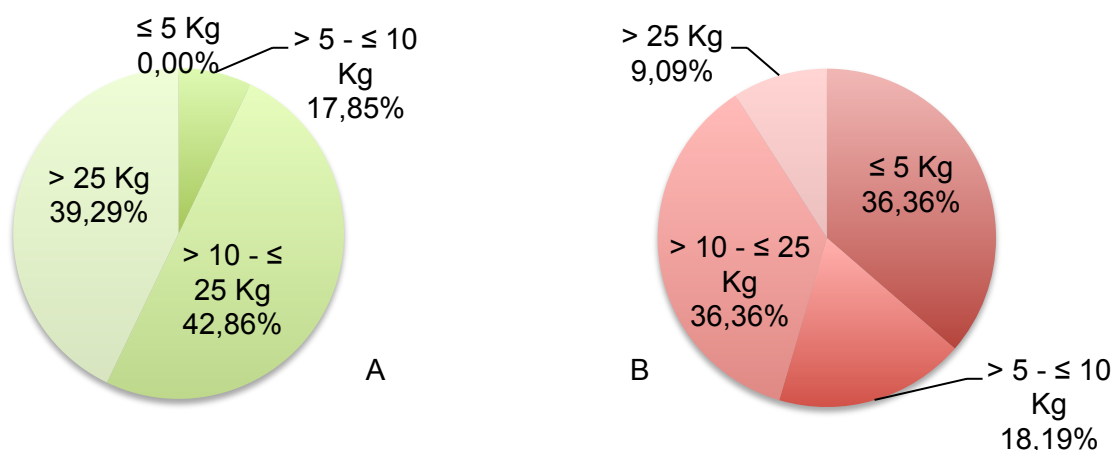
Raça	Frequência relativa
Sem raça definida	33,33%
Labrador Retriever	15,40%
Rotweiller	15,40%
Galgo Afegão	7,69%
Cão de Fila Argentino	7,69%
Yorkshire Terrier	5,13%
Basset Hound	2,56%
Epagnuel Breton	2,56%
Papillon	2,56%
Spitz Alemão	2,56%
Bulldog Francês	2,56%
Jack Russell	2,56%

Relativamente ao porte dos cães, verificou-se que 41,03% (16/39) dos cães eram de porte médio (maior que 10 Kg e menor ou igual a 25 Kg) (Gráfico 2).



Gráfico 2 – Distribuição da frequência relativa dos cães estudados em relação ao peso vivo.

O Gráfico 3 ilustra a distribuição dos cães do grupo de controlo (3A) e do grupo com doença (3B) relativamente ao peso vivo. No grupo controlo, 42,86% (12/28) dos cães eram de porte médio. No grupo com doença, 36,36% (4/11) dos cães eram de porte miniatura e de porte médio.



Gráfico 3 – Distribuição da frequência relativa dos cães do grupo controlo (A) e do grupo com doença periodontal (B), em relação ao peso.

3.2. Resultados do doseamento da CRP

Neste estudo, encontraram-se diferenças significativas ($p=0,001$) entre o grupo controlo ($2,947 \pm 1,428$ mg/L, intervalo de confiança (CI) 95%) e o grupo pré-tratamento periodontal ($13,824 \pm 17,273$ mg/L, CI 95%); no entanto, entre o grupo controlo e o grupo pós-tratamento periodontal, não se identificaram diferenças significativas ($3,376 \pm 1,235$ mg/L, CI 95%).

Tendo em conta a Tabela 14, que apresenta os resultados da concentração sérica de CRP nos 11 cães do grupo com doença, antes e após o tratamento, não foi observada associação estatística entre o peso (Kg) e o est dio de doença ($p=0,130$; CI 95%), bem como entre a raça e o est dio de doença ($p=0,114$; CI 95%). Não foi também identificada qualquer relação da idade com o est dio da doença ($p=0,28$; CI 95%).

Tabela 13 – Concentração de CRP obtida nos cães do grupo de controlo.

Cão	Concentração CRP (mg/L)		
	1ª Leitura	2ª Leitura	Média
1	1,5	1,39	1,445
2	1,39	1,39	1,390
3	5,95	3,09	4,520
4	3,65	3,04	3,345
5	5,48	3,09	4,285
6	3,11	2,96	3,035
7	6,74	5,47	6,105
8	2,21	1,39	1,800
9	2	2	2,000
10	2,25	2	2,125
11	2	2	2,000
12	5,24	4,74	4,990
13	4,52	3,88	4,200
14	4,87	4,71	4,790
15	5,77	3,87	4,820
16	3,6	3,2	3,400
17	4,94	4,39	4,665
18	3,9	2	2,950
19	1,5	1,04	1,270
20	1,7	1,54	1,620
21	2	1,39	1,695
22	2,1	2	2,050
23	4,83	4,72	4,775
24	2	2	2,000
25	2,1	1,5	1,800
26	2	1,5	1,750
27	2	1,39	1,695
28	2	2	2,000

Tabela 14 – Concentração de CRP obtida nos cães do grupo com doença (pré e pós-tratamento periodontal), melhoria e diminuição percentual.

Cão	Pré tratamento periodontal (mg/L)			Pós tratamento periodontal (mg/L)			Melhoria (mg/L)	Diminuição %
	1ª Leitura	2ª Leitura	Média	1ª Leitura	2ª Leitura	Média		
1	13,47	12,17	12,82	2,93	6,05	4,49	8,33	65%
2	35,15	32,72	33,935	1,96	3,6	2,78	31,155	92%
3	4,33	2,28	3,305	2,29	1,5	1,895	1,41	43%
4	6,97	5,62	6,295	6,78	2,6	4,69	1,605	25%
5	60,28	57,79	59,035	2,88	2,99	2,935	56,1	95%
6	5,61	3,3	4,455	1,5	1,04	1,27	3,185	71%
7	8,31	7,73	8,02	1,68	4,01	2,845	5,175	65%
8	8,75	4,7	6,725	6,52	3,75	5,135	1,59	24%
9	6,5	2,76	4,63	6,07	1,04	3,555	1,075	23%
10	9,36	4,57	6,965	3,09	6,12	4,605	2,36	34%
11	5,92	5,83	5,875	3,99	1,89	2,94	2,935	50%

O Gráfico 4 ilustra a melhoria percentual e individual dos cães do grupo com doença, após o tratamento periodontal realizado.

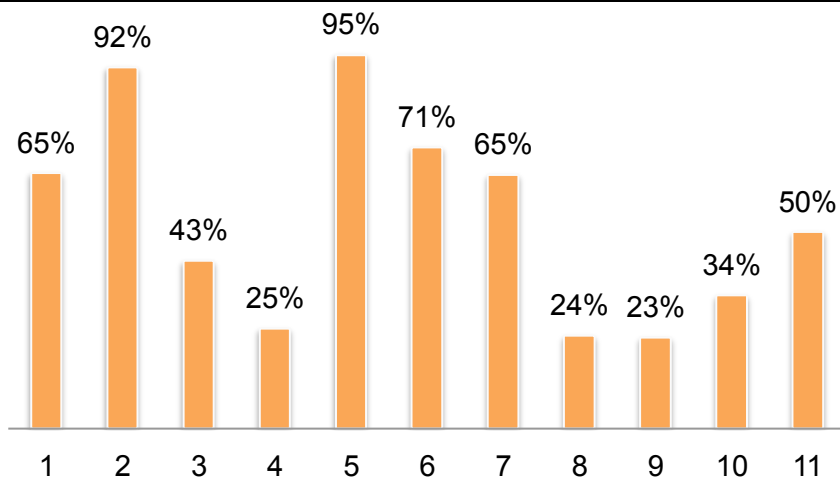


Gráfico 4 – Distribuição da melhoria percentual dos cães do grupo com doença, após o tratamento periodontal.

Esta melhoria pode ser evidenciada macroscopicamente, através de representação fotográfica de um dos casos clínicos do grupo com doença (Figura 7).

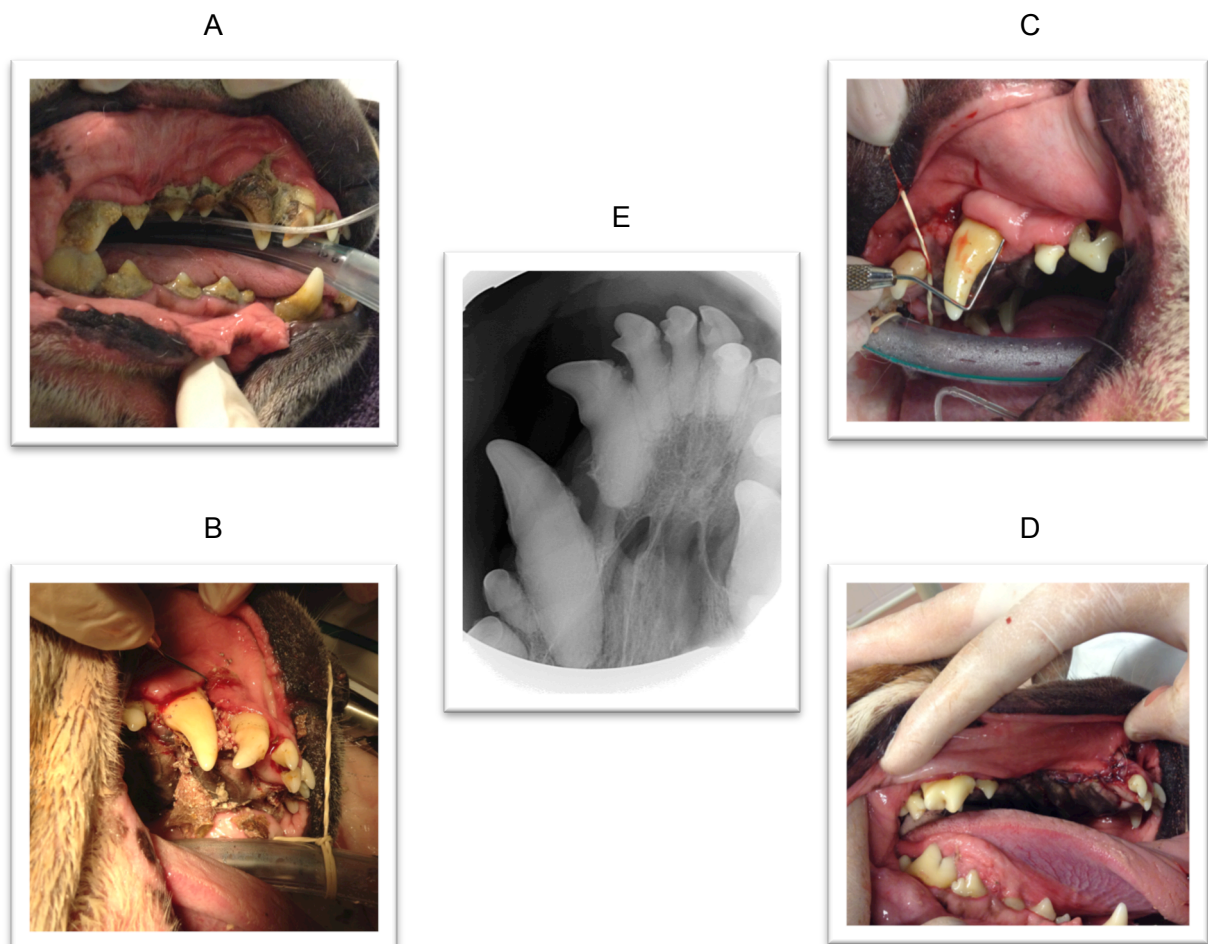


Figura 7 – Documentação fotográfica pré e pós-tratamento periodontal de um caso clínico do grupo com doença e respetivo raio-x intraoral. A- acumulação de cálculo, restos de comida e pêlos na vista latero-lateral direita. B- exploração com sonda periodontal do dente 404. C- hiperplasia gengival, exploração com sonda e exposição de furca do dente 206. D- vista latero-lateral direita após destartarização e extração dentária com realização de suturas. E- raio-x oclusal.

A Tabela 15 resume a comparação da quantificação da CRP para os grupos de controlo e com doença (pré e pós-tratamento periodontal). Foram encontradas diferenças significativas entre os três grupos ($F(2,47) = 7,649$; $p = 0,001$).

Os testes post-hoc de Bonferroni e de Tukey HSD indicaram que houve diferenças significativas entre os animais do grupo de controlo e os animais do grupo pré-tratamento, $p = 0,001$ (diferença média de 10,877 mg/L superior para os animais pré-tratamento do grupo com doença), bem como entre os animais pré e pós-tratamento (diferença média de 10,448 mg/L superior para os animais pré-tratamento).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os animais do grupo de controlo e os animais do grupo com doença após o tratamento (diferença média de 0,429 mg/L superior para os animais pós-tratamento). De facto, utilizando um teste-t para amostras independentes, podemos concluir que a diferença das m dias não é significativa ($p = 0,387$), sugerindo que os dois grupos são semelhantes para o parâmetro estudado.

Tabela 15 – Resultados da análise estatística inferencial dos dois grupos de estudo (grupo controlo e grupo com doença, pré e pós-tratamento periodontal).

		Grupo com Doença periodontal		
		Grupo Controlo	Pré-tratamento	Pós-tratamento
Média		2,947	13,824	3,376
95% Intervalo de confiança para a média	Limite inferior	2,393	2,220	2,546
	Limite superior	3,501	25,428	4,206
Desvio padrão		1,428	17,273	1,235
Valor mínimo		1,270	3,305	1,270
Valor máximo		6,105	59,035	5,135

O Gráfico 5 representa a média da CRP por grupo e demonstra a diferença estatística entre o grupo controlo e o pré-tratamento e o grupo pré-tratamento e pós-tratamento. Nesta imagem, percebe-se a semelhança entre o grupo de controlo e o pós-tratamento, uma vez que há uma redução significativa para valores basais muito próximos do grupo controlo, embora que não iguais, uma vez que se trataram de cães que estiveram previamente doentes.

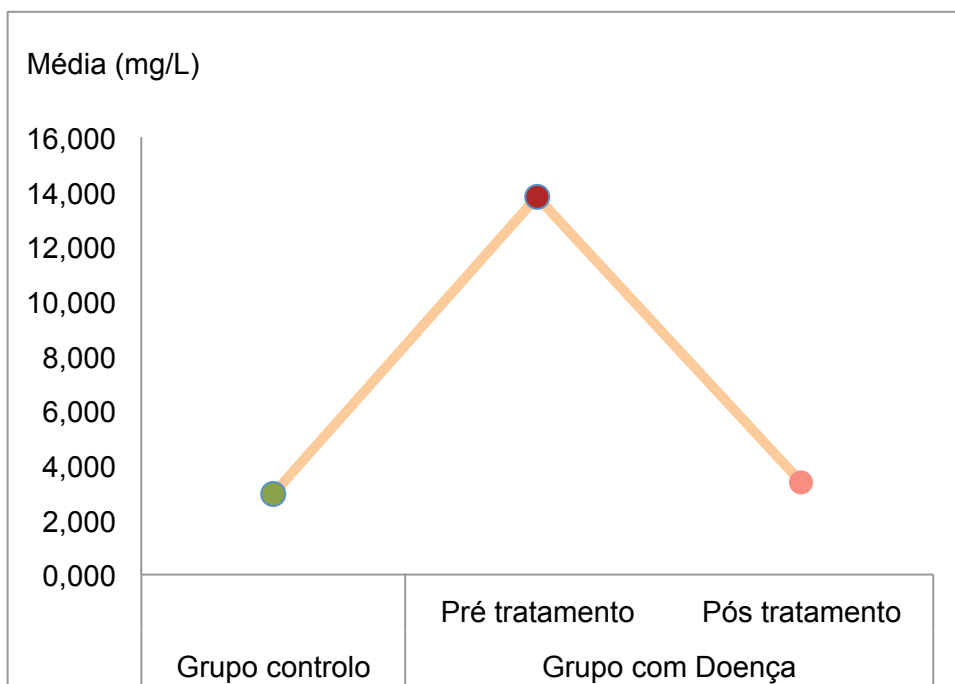


Gráfico 5 – Média da concentração da proteína C reativa canina nos grupos estudados.

4. DISCUSSÃO

Este estudo foi desenvolvido com o objetivo de demonstrar que a doença periodontal, está associada a um est dio cr nico de inflamação sist mica. Nesse sentido, foram realizados doseamentos de CRP em cães doentes e em cães saudáveis, utilizados como controlo.

O desenho do estudo foi do tipo caso-controlo prospetivo, de forma a melhor determinar o efeito provocado por um tratamento, eliminando a influência de co-morbilidades que poderiam causar viés, nomeadamente a presença de neoplasias, doença inflamatória articular, entre outras frequentemente diagnosticadas no animal geriátrico. A escolha dos controlos com menos de 2 anos de idade baseou-se em estudos anteriores nos quais a incidência de placa bacteriana   maior em cães a partir dessa idade e as raças de maior porte apresentam índices mais baixos de placa (Rezende *et al.*, 2004; Niemiec, 2008). Assim, na amostra do grupo controlo utilizada, nenhum cão tinha idade superior a um ano, sendo constituída por cães de raça pura e de porte médio, comparativamente com os animais de pequeno porte do grupo com doença. A impossibilidade de emparelhamento da amostra relativamente aos pesos e raças, deve-se ao facto de existir uma maior predisposição dos animais de raça pequena e miniatura para a doença e seus est dios mais avançados. A maior prevalência desta doença em animais com idade superior a 5 anos de raça pequena foi anteriormente relatada (Ettinger & Feldman, 2010; Rezende *et al.*, 2004), sendo que neste estudo, a raça Yorkshire Terrier foi a que apresentou maior número de animais no grupo com doença.

No presente estudo não foi observada uma associação estatística entre o peso e o est dio de doença, bem como entre a raça e o est dio da doença. Não foi identificada qualquer relação da idade com o est dio da doença. Assim, estes dados vão ao encontro de outros estudos anteriores que confirmaram a ausência de diferenças de acordo com os parâmetros clínicos, peso, raça e idade (Yamamoto *et al.*, 1994; Otabe *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2001 e Kuribayashi *et al.*, 2003).

A média de valores obtidos de CRP no grupo com doença assemelha-se aos valores anteriormente obtidos em estudos anteriores, embora as metodologias de doseamento tenham sido díspares (Rawlison *et al.*, 2011; Kouki *et al.*, 2013). Em termos absolutos, no estudo de Kouki *et al.*, 2013, foi utilizado o método de imunoturbidimetria anti-CRP humana, podendo justificar o valor ligeiramente superior, mas sobreponível, ou seja, de $28,900 \pm 23,840$ mg/L nos cães antes do tratamento periodontal comparativamente com $13,824 \pm 17,273$ mg/L para um CI de 95%, obtido neste estudo. Rawlinson *et al.*, 2011, utilizaram um ensaio de imunoabsorção enzimática canina. Aqui, os valores pré-tratamento foram

inferiores aos obtidos no presente estudo, 4,1 mg/L em contraste com $13,824 \pm 17,273$ mg/L mas semelhantes aos obtidos após tratamento, 2,98 mg/L face a $3,376 \pm 1,235$ mg/L para CI 95%. Apesar das diferenças de metodologia, foi possível apreciar a semelhança de resultados obtidos, especialmente as melhorias nos valores de CRP provocadas pelo tratamento periodontal. O presente estudo teve como principal vantagem a comparação dos valores obtidos após o tratamento com aqueles obtidos num grupo controlo, permitindo afirmar que a resolução da doença promove uma reversão do est dio inflamatório sist mico destes animais para valores basais e semelhantes aos obtidos em animais saudáveis.

Os animais com est dios mais avançados de doença periodontal apresentaram valores mais elevados de CRP. Na maioria dos casos, principalmente nos que apresentaram um est dio de doença periodontal mais grave (est dio IV), os níveis de concentração da proteína C reativa eram superiores. Esses foram mesmo os casos que revelaram melhorias mais acentuadas, isto é, superiores a 50% entre a CRP pós-tratamento e pré-tratamento. O cão que apresentou o est dio de DP mais leve (grau II de periodontite) apresendou a melhoria menos acentuada (23%) comparativamente aos restantes cães. Os resultados obtidos v o de encontro com os estudos realizados pelas equipas de Rawlinson (2011) e de Kouki (2013) que apontam para que o decréscimo da concentração de CRP após tratamento esteja diretamente relacionada com o est dio da DP. Assim, quanto menor o est dio de DP, menor as concentrações de CRP, porque menos exacerbada será a resposta hepática ao stress cr nico. Loos (2005) e Linden *et al.* (2013) referem que incrementos nas concentrações de CRP têm sido diretamente associados à doença periodontal em humanos.

Acredita-se que a bacteriémia per dica têm também ocorre em cães com doença periodontal. Além disso, produtos bacterianos incluindo toxinas são absorvidos na circulação sist mica e estimulam as defesas do hospedeiro para iniciar ambas as respostas imunes (inata e humoral). Uma resposta inflamatória sist mica, demonstrada por uma elevação da CRP, poderá ser atribuída à bacteriémia per dica, lipopolissac ridos em circulação sanguínea e citocinas pró-inflamatórias que são produzidos localmente na boca durante períodos ativos de destruição dos tecidos (Rawlinson *et al.*, 2011). Este fen meno poderá justificar porque é que em 2 animais foi possível observar um decréscimo de CRP de 92 e 95%, apresentando igualmente est dio de DP IV. Neste último caso, a presença de um abscesso dentário do dente carniceiro poderá ter justificado o maior decréscimo percentual.

Um dos cães do grupo com doença, com est dio IV (periodontite grave), apresentou um menor decréscimo percentual de CRP. Esta situação pode ter sido consequência de erros laboratoriais ou erros de pipetagem da própria máquina de processamento das amostras. No entanto, poderá existir um limiar para a produção de proteínas de fase aguda ou então existir uma deficiente resposta hepática (Kouki *et al.*, 2013). Existem outros

fenómenos por detrás das diferenças nos doseamentos obtidos e que resultam do tipo e número de microorganismos que causam bacteriemia e que não foram analisados e da susceptibilidade individual. É possível que a intensidade da reação inflamatória esteja relacionada com fatores de virulência bacteriana, componentes bacterianos ou metabolitos, capazes de causar perturbações ao nível dos mecanismos homeostáticos, levando à iniciação ou à progressão da doença (Kouki *et al.*, 2013).

Neste trabalho, os valores obtidos no grupo com doença após o tratamento foram comparados com um grupo controlo de animais saudáveis, tendo sido demonstradas semelhanças entre eles. Em nenhum estudo sobre o papel da CRP na DP canina, os seus valores foram comparados com um grupo controlo. Rawlinson e colegas (2011), apesar de terem observado uma diminuição significativa da concentração sérica deste parâmetro, não determinaram se a mesma atingiu os valores basais, dado que esses níveis não foram comparados com os de um grupo controlo. Kouki *et al.* (2013) referem existir uma relação estatisticamente significativa entre o grau de gengivite, a concentração de CRP e a fórmula leucocitária, possivelmente durante os períodos ativos de destruição dos tecidos periodontais. No mesmo estudo, os autores não verificaram qualquer associação entre a destruição periodontal e a ocorrência de anemia ou de hipoalbuminemia. Porém, os períodos ativos de inflamação periodontal em associação com os valores laboratoriais, sugerem uma resposta inflamatória sistémica.

Quaisquer medicações realizadas aos cães devem ser consideradas pelo clínico na avaliação dos níveis séricos de CRP, devendo aguardar pelo intervalo de segurança (período de tempo entre a última administração do medicamento veterinário, em condições normais de utilização), para que não ocorram alterações na concentração da proteína, principalmente no caso dos glucocorticoides (Hachulla, 1998 citado por Gillet, 2002).

Neste estudo optou-se pela realização de um doseamento imunoturbidimétrico, uma vez que é um método quantitativo e não qualitativo como o eletroimunoensaio ou a imunocromatografia. A imunoturbidimetria permite deteções de CRP a partir de 1 mg/L, ao contrário dos métodos anteriores (Eckersall *et al.*, 1991). Independentemente da comparação de metodologias não ter sido objeto de estudo, é importante salientar a instabilidade desta proteína a temperaturas elevadas e condições inapropriadas de armazenamento, que podem conduzir à desnaturação da mesma e a doseamentos imprecisos (Dillman & Coles, 1966).

Este estudo contribuiu para o conhecimento da doença periodontal e para a caracterização do papel da CRP como parâmetro de diagnóstico e de monitorização de tratamento da doença periodontal, bem como provar o impacto direto da higiene profissional da cavidade oral sobre o estado sistémico do indivíduo.

5. CONCLUSÃO

A CRP é uma proteína de fase aguda com utilidade na avaliação do impacto sist mico da doença periodontal no cão.

Neste estudo, foi demonstrado que,   semelhança do verificado em humanos, esta proteína aumenta na presença de doença periodontal e está relacionada com grau da mesma. Nos animais submetidos ao tratamento periodontal metódico e sistemático, observou-se uma diminuição dos níveis deste parâmetro inflamatório, atingindo valores próximos aos de um indivíduo saudável.

A análise laboratorial realizada neste estudo foi bastante específica para a espécie canina, permitindo uma determinação mais precisa dos valores séricos, sendo que, de acordo com o conhecimento dos autores, não foi utilizada anteriormente em estudos clínicos sobre a doença periodontal do cão.

Este estudo reforça a necessidade do tratamento e do controlo da doença periodontal no cão, no sentido de reverter o seu impacto sist mico. No entanto, são necessários mais estudos que avaliem os efeitos sist micos da doença e reforcem a necessidade de uma higiene oral regular nesta espécie.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdalla, S.L., Silva, M.F.A., Pereira, A.R.C., Azevedo, F.D., Fernandes, J.I., Minono, G.P., Botelho, R.P., *et al.* (2009). Quantificação computadorizada dos índices de placa e cálculo dentais da imagem digital da superfície vestibular dos dentes de cães. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(8),666-672.

Ablij, H.C. & Meinders, A.E. (2002). C-reactive protein: history and revival. *European Journal of Internal Medicine*, 13,412-422.

Albuquerque, B., Capelas, J.A., Ferreira, M.M., Ginjeira, A. & Paulo, S. (2007). Glossário de termos endodônticos – parte I. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 48,247-255.

Albuquerque, B., Capelas, J.A., Ferreira, M.M., Ginjeira, A. & Paulo, S. (2008a). Glossário de termos endodônticos – parte II. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 49,57-62.

Albuquerque, B., Capelas, J.A., Ferreira, M.M., Ginjeira, A. & Paulo, S. (2008b). Glossário de termos endodônticos – parte III. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 49,119-125.

Bellows, J. (2004). Smile Book IV - Small Animal Dental Anatomy, Pathology and Charting. Pfizer Animal Health, Nova York.

Bennett, D., Eckersall, P.D., Waterston, M., Marchetti, V., Rota, A., McCulloch, E., Sbrana, S. *et al.* (2013). The effect of robenocoxib on the concentration of C-reactive protein in synovial fluid from dogs with osteoarthritis. *BMC Veterinary Research*, 9(42).

Bienvenu, J.M., Monneret, G., Fabien, N., & Revillard, J.P. (2000). The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 39(4),267-285.

Black, S.G., Kushner, I. & Samols, D. (2004). C-reactive protein. *Journal of Biological Chemistry*, 179(47),48487-48490.

Black, S.G. (2005). *C-reactive protein: a study of its functional domains using transgenic mice*. Tese de Doutorado do Departamento de Bioquímica da Case Western Reserve University.

Burton, S.A., Honor, D.J., Mackenzie, A.L., Eckersall, P.D., Markham, R.J. & Horney, B.S. (1994). C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. *American Journal of Veterinary Research*. 55(5),613-8.

Buttke, T.M., Shipper, G., Delano, E.O., & Trope, M. (2005). C-reactive protein and serum amyloid A in a canine model of chronic apical periodontitis. *Journal Endodontic*, 31(10),728-732.

Braga, C.A., Resende, C.M., Pestana, A.C., Carmo, L.S., Costa, J.E., Sila, L.A., Assis, L.N., *et al.* (2005) Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça pastor alemão. *Ciência rural*, 35(2),385-390.

Braga, S., Braga, D. & Soares, S. (2009). Diabetes mellitus e periodontite – um caso de saúde oral. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 50,111-117.

Brook, A. & Niemiec, D.V.M. (2008). Periodontal disease – topical review. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2),72-80.

Casals, C., Varela, A., Ruano, M.L.F., Valiño, F., Pérez-Gil, J., Torre, N., Jorge, E., *et al.* (1998). Increase of C-reactive protein and decrease of surfactant protein A in surfactant after lung transplantation. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 157,43-49.

Caspi, D., Baltz, M.L., Snel, F., Gruys, E., Niv, D., Batt, R.M., Munn, E.A., *et al.* (1984). Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*, 53,307-313.

Ceciliani, F., Giordano, A., & Spagnolo, V. (2002). The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and Peptid Letters*, 9,211-223.

Cerón, J.J., Eckersall, P.D. & Martínez-Subiela, S. (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 34(2),85-99.

Chambers, R.E., Hutton, C.W., Dieppe P.A., & Witcher, J.T. (1991). Comparative study of C reactive protein and serum amyloid A protein in experimental inflammation. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 50,677-679.

Cleland, W.P.Jr. (2000). Nonsurgical periodontal therapy. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 15(4),221-225.

Cleland, W.P.Jr. (2001). Opportunities and obstacles in veterinary dental drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 50(3),261-275.

Clyne, B. & Olshaker, J.S. (1999). The C-reactive protein. *The Journal of Emergency Medicine*, 17(6),1019-1025.

Dillman, C.R. & Coles, E.H. (1966). A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *American Journal Veterinary Research*, 27,1769-1775.

Eckersall, P.D. & Conner, J.G. (1988). Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 12,169-178.

Eckersall, P.D., Conner, J.G. & Harvie, J. (1991). An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, 15,17-24.

Eckersall, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 151,577-584.

Eckersall, P.D. (2006a). Acute phase proteins as biomarkers of disease in companion and laboratory animals. Livro de resumos do congresso anual do American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson, EUA.

Eckersall, P.D. (2006b). Acute phase proteins: form, function and analysis. Livro de resumos do congresso anual do American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson.

Eckersall, P.D. (2006c). Measurement of acute phase proteins as biomarkers of disease. Livro de resumos do congresso anual do American College of Veterinary Pathologists and American Society for Veterinary Clinical Pathology, Tucson.

Ettinger, S.J. & Feldman, E.C. (2000). Textbook of veterinary internal medicine. (5th ed.). Philadelphia: Saunders.

Eurides, D., Gonçalves, G.F., Mazzanti, A., & Buso, A.M. (1996). Dental bacterial plaque in dogs. *Ciência Rural*, 26(3),419-422.

Fahrenkrug, P. (2013). Problemas dentales en el perro joven. *SEVC-AVEPA Conference Proceedings, Barcelona*, 15-18.

Fransson, B.A., Karlstam, E., Bergstrom, A., Lagerstedt, A., Park, J.S., Evans, M. A., Ragle, C.A., *et al.* (2004). C-reactive protein in the differentiation of piómetra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40,391-399.

Fransson, B.A., Karlstam, E., Lagerstedt, A., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J.S., Chew, B. *et al.* (2006). C-reactive protein, tumor necrosis factor α , and interleukin-6 in dogs with piómetra and SIRS. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, doi: 10.1111/j.1476-4431.2006.00203.1-9.

Fujise, H., Takanami, H., Yamamoto, M., Ohta, I., Yamamoto, S., Fukase, T., Naiki, M., *et al.* (1992). Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54(1),165-167.

Gabay, C. & Kushner, I. (1999). Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 340,448-455.

Garcia, Z. & Dias, G.G. (2008). Doença periodontal em cães. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 11.

Getty, R., Sisson & Grossman (1981). Anatomia dos Animais domésticos. Rio de Janeiro, Editora Interamericana, 7 (100-107).

Gillet, A. (2002). *La protein C-reactive chez le chien. Etude bibliographique et essai d'un kit utilisant une technique ELISA*. Tese de Doutorado da Ecole Nationale Veterinaire de Lyon.

Gioso, M.A. (2007). *Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais*. (2^a edição). São Paulo-Brasil: Manole, 1(1-23), 10(91-100).

Glickman, L.T., Glickman, N.W., Moore, G.E., Goldstein, G.S. & Lewis, H.B. (2009). Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs. *Journal American Veterinary Medical Association*, 234(4),486-494.

Gorrel, C. (1998). Radiographic evaluation. *Veterinary Clinics North America: Small Animal Practice*, 28(5), 1089-1110.

Gorrel, C. (2000). Home care: products and techniques. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 15(4), 226-231.

Gorrel, C. (2004). Periodontal disease in veterinary dentistry for the general practitioner (pp.87-109). Philadelphia: Elsevier Saunders.

Gotschlich, E.C. (1989). C-reactive protein. A historical overview. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 557,9-18.

Gurgel, B.C.V., Pinto, F.R., Sallum, E.A., Notici Jr., F.H., Casati, M.Z. & de Toledo, S. (2004). Perspectives on the use of nonsteroidal antiinflammatories on periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 12(2),12-16.

Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A. & Koopmans, S.J. (2005a). Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, 6(11),1045-1056.

Hardham, J., Reed, M., Wong, J., King, K., Laurinat, B., Sfintescu, C., Evans, R.T., et al. (2005). Evaluation of a monovalent companion animal periodontal disease vaccine in an experimental mouse periodontitis model. *Vaccine*, 23(24),3148-56.

Harvey, C.E. & Emily, P.P. (1993). *Small Animal Dentistry*. EUA, Mosby.

Harvey, C.E. (1998). Periodontal disease in dogs. Etiopathogenesis, prevalence, and significance. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 28(5),1111-1128,vi.

Hayashi, S., Jinbo, T., Iguchi, K., Shimizu, M., Shimada, T., Nomura, M., Ishida, Y., et al. (2001). A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein in the serum of Young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary Research Communications*, 25,117-126.

Hennet, P.R. & Harvey, C.E. (1992). Natural development of periodontal disease in the dog: A review of clinical anatomical and histological features. *Journal of veterinary dentistry*, 9(3),13-19.

Hennet, P.R. (2005) Understanding periodontal disease. *Periodontal disease in dogs*. Paris, 1: 9-15. .

Hirvonen (2000). *Acute Phase Response in Dairy Cattle*. Tese de Doutorado da Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.

Holmstrom, F. & Eisner (2007). *Veterinary Dental Techniques*. Philadelphia, Saunders.

Hurter, K., Spreng, D., Rytz, U., Schawwalder, P., Ott.Knusel, F. & Schmokel, H. (2005). Measurements of C-reactive protein in serum and lactate dehydrogenase in serum and synovial fluid of patients with osteoarthritis. *The Veterinary Journal*, 169, 281-285.

Hutchinson, W.L., Noble, E.G., Hawkins, P.N. & Pepys, M.B. (1994). The pentraxins, C- reactive protein and serum amyloid P component, are cleared and catabolized by hepatocytes in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 94,1390-1396.

Iwata, T., Yamato, M., Tsuchioka, H., Takagi, R., Mukobata, S., Washio, K., Okano, T., *et al.* (2009). Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheets in a canine model. *Biomaterials*, 30(14),2716-2723.

Jinbo, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Kobune, F., Ro, S., Niki, M., Iguchi, M., *et al.* (1999). Concentrations of C-reactive protein in normal monkeys (*Macaca irus*) and in monkeys inoculated with *Bordetella bronchiseptica* R-5 and measles virus. *Veterinary Research Communications*, 23,265-274.

Kim, H.S., Kim, K.H., Kim, S.H., Kim, Y.S., Koo, K.T., Kim, T.I., Seol, Y.J., *et al.* (2010). Immunomodulatory effect of canine periodontal ligament stem cells on allogenic and xenogenic peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 40(6),265-270.

Kjelgaard-Hansen, M., Kristensen, A.T. & Jensen, A.L. (2003). Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C- reactive protein in canine serum. *Journal of Veterinary Medicine*, 50,164-168.

Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L., Houser, G.A., Jensen, L.R. & Kristensen, A. T. (2006). Use of serum C-reactive protein as an early biomarker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1),9.

Kjerlgaard-Hansen, M., Stadler, M. & Jensen, A.L. (2008). Canine serum C-reactive protein detected by means of a near-patient test for human C-reactive protein. *Journal of Small Animal Practice*, 49, 282-286.

Klein, T. (2000). Predisposing factors and gross examination findings in periodontal disease. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 15(4),189-196.

Kortegaard, H.E., Eriksen, T. & Baelum, V. (2008). Periodontal disease in research beagle dogs-an epidemiological study. *Journal of Small Animal Practice*, 49(12),610-616.

Kouki, M.I., Papadimitriou, S.A., Kazakos, G.M., Savas, I. & Bitchava, D. (2013). Periodontal Disease as a Potential Factor for Systemic Inflammatory Response in the Dog. *Journal of Veterinary Dentistry*, 30 (1).

Kuribayashi, T., Shimada, T., Matsumoto, M., Kawato, K., Honjyo, T., Fukuyama, M., Yamamoto, *et al.* (2003). Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental Animals*, 52(5),387-390.

Kyllar, M. & Witter, K. (2005). Prevalence of dental disorders in pet dogs. *Veterinary Medicine*, 50(11),496-505.

Legeros, R.Z. & Shannon, I.L. (1979). The Crystalline Components of Dental Calculi: Human vs. Dog. *Journal of Dental Research*, 58(12),2371-2377.

Lima, V., Bezerra, M.M., Leit o, R.F.C., Brito, G.A.C., da Rocha, F.A.C., & Ribeiro, R.A. (2008). Main Inflammatory mediators involved in the physiopathology of peridontitis: role of pharmacological modulators. *Periodontia*, 18(3),7-19.

Liu, Q., Djuricin, G., Nathan, C., Gattuso, P., Weinstein, R.A., & Prinz, R.A. (2000). The effect of interleukin-6 on bacterial translocation in acute canine pancreatitis. *International Journal of Pancreology*, 27(2),157-165.

Linden, G.J., Lyons, A. & Scannapieco, F.A. (2013). Periodontal systemic associations: review of the evidence. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(14), S8–S19.

Logan, E.I., Finney, O. & Hefferren, J.J. (2002). Effects of a dental food on plaque accumulation and gingival health in dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 19(1),15-18.

Logan, E.I. (2006). Dietary influences on periodontal health in dogs and cats. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 36,1385-1401.

Loos, B.G. (2005). Systemic markers of inflammation in periodontitis. *Journal of Periodontology*, 76(11), S2106.

Lund, E.M., Armstrong, P.J., Kirk, C.A., Kolar, L.M. & Klausner J.S. (1999). Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(9),1336-1341.

Marnell, L., Mold, C. & Du Clos, T.W. (2005). C-reactive protein: ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology*, 117,104-111.

Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Eckersall, P.D. & Cer n, J.J. (2002). Serum concentration of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Veterinary Record*, 150,241-244.

Martínez-Subiela, S., Ginel, P.J. & C ron, J.J. (2004). Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *The Veterinary Record*, 154,814-817.

Martínez-Subiela, S. & C ron, J.J. (2005). Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruplasmin assays. *The Canadian Veterinary Journal*, 46(7),625-629.

Matijatko, V., Mrljak, V., Kis, I., Kucer, N., Forsek, J., Zivicnjak, T., Romic, Z., *et al.* (2007). Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology*, 144,242-250.

Maudsley, S. & Pepys, M.B. (1987). Immunochemical cross-reactions between pentraxins of different species. *Immunology*, 62,17-22.

Mazhar, D. & Ngan, S. (2006). C-reactive protein and colorectal cancer. *Quarterly Journal of Medicine*, 99(8),555-559.

McGrotty, Y.L., Knottenbelt, C.M., Ramsey, I.K., Reid, S.W.J. & Eckersall, P.D. (2004). Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Record*, 154,175-176.

Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T.W. (1999). Regulation of complement activation by C- reactive protein. *Immunopharmacology*, 42,23-30.

Morinha, F., Albuquerque, C., Requicha, J., Dias, I., Leit o, J., Gut, I., Guedes-Pinto, H., *et al.* (2011). Detection and characterization of interleukin-6 gene variants in *Canis familiaris*: association studies with periodontal disease. *Gene*, 485(2),139-145.

Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. (2004). Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168,28-40.

Moshage, H. (1997). Cytokines and hepatic acute phase response. *Journal of Pathology*, 181,257-266.

Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujina Y., *et al.* (2008). C-reactive protein concentration on dogs with various diseases. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70,127-131.

Niemiec, B.A. (2008). Periodontal disease. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23(2),72-80.

Otabe, K., Sugimoto, T., Jinbo, T., Honda, M., Kitao, S., Hayashi, S., Shimizu, M., *et al.* (1998). Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications*, 22,77-85.

Paltrinieri, S., (2007). Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase protein. *Veterinary Research Communications*, 31,125-129.

Papadimitriou, S., Tsantarliotou, M., Makris, G., Papaioannou, N., Batzios, Ch., Kokolis, N., Dessiris, A., *et al.* (2006). A clinical study of plasminogen activator activity in gingival tissue in dogs with gingivitis and periodontitis. *Research in Veterinary Science*, 80(2),189-193.

Parra, M.D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S. & C ron, J.J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17,139-144.

Parra, M.D., Tuomola, M., Cabezas-Herrera, J. & C ron, J.J. (2006a). Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Veterinary Research Communications*, 30,113-126.

Parra, M.D., Papasouliotis, K. & C ron, J. J. (2006b). Concentrations of C-reactive protein in effusions in dogs. *The Veterinary Record*, 158,753-757

Pavlica, Z., Petelin, M., Junt s, P., Erzen, D., Crossley, D.A. & Skaleric, U. (2008). Periodontal disease burden and pathological changes in organs of dogs. *Journal of Veterinary Dentistry*, 25(2),97-105.

Pennman, S. (1992). Oral-dental anatomy, function and eruption. In Harvey, C.E. & Orr, H.S. (2  edic o). *Manual of Small Animal dentistry* (pp.11-17). West Sussex: KCO.

Pennman, S. & Harvey, C.E. (1992) Periodontal disease. In Harvey, C.E. & Orr, H.S. (2  edic o). *Manual of Small Animal dentistry* (pp.37-48). West Sussex: KCO.

Petersen, H.H., Nielsen, J.P. & Heegaard, P.M.H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35,163-187.

P voa (2000). Marcadores da sepsis. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, 9,249-250.

Prescott, L., Harley, J.P. & Klein, D. (1999). *Microbiology* (4th ed.). EUA: McGrall-Hill.

Rajhans, N.S., Kohad, R.M., Chaudhari, V.G. & Mhaske, N.H. (2011). A clinical study of the relationship between diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 15(4),388-392.

Rawlinson, J.E., Goldstein, R.E., Reiter, A.M., Attwater, D.Z. & Harvey, C.E. (2011). Association of periodontal disease with systemic health indices in dogs and the systemic response to treatment of periodontal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 238(5).

Rezende, R.J.S., Carneiro e Silva, F.O.V., Milken, V.M.F., Lima, C.A.P. & Lima, T.B.F. (2004). Frequency of dental bacterial plate in dogs. *Journal of Biosciences*, 20(2),113-118.

Riggio, M.P., Lennon, A., Taylor, D.J., & Bennett, D. (2011). Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Veterinary Microbiology*, 150(3-4),394-400.

Riley, R.F. & Zontine, W. (1972). Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 80,698-703.

Rogowski, O., Vered, Y., Shapira, I., Hirsh, M., Zakuf, V. & Berliner, S. (2005). Introducing the wide range C-reactive protein (wr-CRP) into clinical use for the detection of microinflammation. *Clinica Chimica Acta*, 358,151-158.

Saini, R., Saini, S. & Sugandha, R.S. (2011). Periodontal disease: The sixth complication of diabetes. *Journal of Family Community Medicine*, 18(1),31.

Sasanelli, M., Paradies, P., Caprariis, D., Greco, B., Palo, P., Palmisano, D., Carelli, G. *et al.* (2007). Acute-phase proteins in dogs naturally infected with *Leishmania infantum* during and after long-term therapy with allopurinol. *Veterinary Research Communications*, 31,335-338.

Shimada, T., Ishida, Y., Shimizu, M., Kawato, K., Iguchi, K. & Jinbo, T. (2002). Monitoring C- reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, 26,171-177.

Skinner, J.G. (2001). Special report. International standardization of acute phase proteins. *Veterinary Clinical Pathology*, 30,2-7.

Telhado, J., Junior, A.M., Diele, C.A. & Marinho, M.S. (2004). Incid ncia de cálculo dentário e doença periodontal em c es de raa Pastor Alem o. *Ciência Animal Brasileira*, 5(2),99-104.

Tutt, C. (2006). *Small Animal Dentistry*. Ames, Blackwell Publishing.

Volanakis, J.E. & Kaplan, M.H. (1971). Specificity of C-reactive protein for choline phosphate residues of pneumococcal C-polysaccharide. *Proceedings of the Society Experimental Biology Medicine*, 136,612-614.

Volanakis, J.E. (2001). Human C-reactive protein: expression, structure, and function. *Molecular Immunology*, 38,189-197.

Watson, A.D.J. (2006). Diet and periodontal disease in dogs and cats. *Australian Veterinary Journal*, 71,313-318.

Wiggs, R.B. & Lobprise, H.B. (1997). Periodontology. *Veterinary dentistry principles & practice* (pp. 186-231). Filad lfia, Lippincott-Raven.

Yamamoto, S., Miyaji, S., Abe, N., Otabe, K., Furukawa, E. & Naiki, M. (1993a). Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. *Veterinary Research Communications*, 17,259-266.

Yamamoto, S., Shida, T., Miyaji, S., Santsuka, H., Fujise, H., Mukawa, K., Furukawa, E., *et al.* (1993b). Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 17,85-93.

Yamashita, K., Fujinaga, T., Miyamoto, T., Hagio, M., Izumisawa, Y. & Kotni, T. (1994). Canine Acute Phase Response: Relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 56 (3),487-492.

ANEXOS

Anexo I - Parecer de aprovação do estudo pela Comissão de Ética e Bem-estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona.



Anexo 4 - CEBEA-ULHT – Approval document

Lisbon, 30th September 2015

Dear Professor João Filipe Martins Freire Requicha,

The Animal Welfare and Ethics Committee of Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias is pleased to announce that the project entitled "Evaluation of C-reactive protein levels in dogs with periodontal disease" registered under the number 70-2015, is considered approved.

This approval is valid during one year and can be used for publication purposes.


Ana Margarida Oliveira
Coordinator CEBEA-ULHT


Manuel Pequito
Secretary CEBEA-ULHT

Anexo II - Folheto informativo do *kit Canine CRP* (ensaio imunoturbidimétrico) do Laboratório Randox (República da Irlanda).



CANINE CRP

IMMUNOTURBIDIMETRIC ASSAY FOR CANINE CRP GENERAL INSERT

INTENDED USE

For the quantitative *in vitro* determination of CRP in canine serum.

Cat. No.

CP 2798	R1.	Assay Buffer	7 x 20 mL
	R2.	Antibody Reagent	2 x 12 mL
	CAL.	Standards (Levels 1-6)	6 x 1 mL

FOR VETERINARY USE ONLY. Not for use in diagnostic procedures.

BIOLOGICAL SIGNIFICANCE

CRP is one of the proteins commonly referred to as acute phase reactants. CRP is distinguished by its rapid response to trauma or infection. Increased CRP levels have been found in dogs with arthritis, proctitis or thrombophlebitis¹. Dogs with an increased number of leukocytes had significantly higher CRP levels than dogs with non-inflammatory leukograms². In addition, increased CRP levels have been documented in dogs infected with *Ehrlichia canis*³ or *Bordetella bronchiseptica*⁴.

PRINCIPLE

Sample is reacted with specific antiserum to form a precipitate that is measured turbidimetrically at 340 nm.

SAMPLE COLLECTION AND STORAGE

CRP remains stable in canine serum for 24 hours at +2 to +8°C. For long-term storage, samples should be stored at -20°C. Frozen samples should be thawed at room temperature and mixed thoroughly before use. Refreezing thawed samples is not recommended.

REAGENT COMPOSITION

Contents	Initial Concentrations in the Test
R1. Assay Buffer	
Polyethylene Glycol	maximum 4%
Tris/HCl buffer	20 mmol/L, pH 7.4
Sodium Chloride	150 mmol/L
R2. Antibody Reagent	
Anti (human) CRP	
CAL. Standard	
C-Reactive Protein	See lot-specific insert sheet

SAFETY PRECAUTIONS AND WARNINGS

For *in vitro* use only. Do not pipette by mouth. Exercise the normal precautions required for handling laboratory reagents.

Solution R1 and the standards in this kit contain Sodium Azide. Avoid ingestion or contact with skin or mucous membranes. In case of skin contact, flush affected area with copious amounts of water. In case of contact with eyes or if ingested, seek immediate medical attention.

Sodium Azide reacts with lead and copper plumbing, to form potentially explosive azides. When disposing of such reagents flush with large volumes of water to prevent azide build up. Exposed metal surfaces should be cleaned with 10% sodium hydroxide.

Health and Safety Data Sheets are available on request.

The reagents must be used only for the purpose intended by suitably qualified laboratory personnel, under appropriate laboratory conditions.

STABILITY AND PREPARATION OF REAGENTS

R1. Assay Buffer

Supplied ready for use. Stable up to the expiry date when stored at +2 to +8°C.

R2. Antibody Reagent

Supplied ready for use. Stable up to expiry date when stored at +2 to +8°C in the original closed container.

CAL. Standards

Supplied ready for use. Stable up to expiry date when stored at +2 to +8°C.

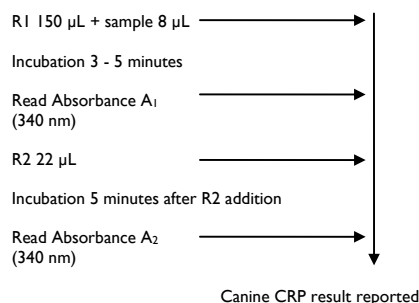
MATERIALS PROVIDED

Assay Buffer
Antibody Reagent
Standards

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

0.9% (w/v) NaCl Solution
Randox Canine CRP Controls:
Level 2 Cat. No. CP 2803
Level 3 Cat. No. CP 2804

PROCEDURE





GENERAL INSERT CP 2798

CALIBRATION

This assay should be calibrated using the Canine CRP Calibration Series supplied with the kit. This assay uses a spline calculation.

A new calibration should be performed when indicated by QC procedures and with each new lot of reagent.

QUALITY CONTROL

Randox Canine CRP Controls Levels 2 and 3 are recommended for daily quality control to monitor accuracy and precision. Two levels of controls should be assayed at least once a day. Values obtained should fall within a specified range. If these values fall outside the range and repetition excludes error, the following steps should be taken:

1. Check instrument settings and light source.
2. Check cleanliness of all equipment in use.
3. Check water. Contaminants, i.e. bacterial growth, may contribute to inaccurate results.
4. Check reaction temperature.
5. Check expiry date of kit and contents.
6. Contact Randox Laboratories Customer Technical Services, Northern Ireland + 44 (0) 28 9445 1070.

SPECIFICITY/INTERFERENCE

The antiserum is monospecific for C-Reactive Protein and has not been shown to cross-react with other serum proteins under the conditions of the assay. Lipaemia interferes with the assay. Extremely haemolytic samples and high levels of ionic detergents may interfere in the assay.

NORMAL RANGES

It is recommended that each laboratory establish its own normal range. The clinical reference range for C-reactive protein may vary depending on a variety of genetic and environmental factors.

SPECIFIC PERFORMANCE CHARACTERISTICS

The following performance characteristics were obtained using an RX Daytona analyser.

ASSAY RANGE

8 to 200 mg/L (0.8 to 20.0 mg/dL). This range may vary, depending on the lot specific values of the calibrators in use.

Samples with levels of CRP greater than 200 mg/L or 20 mg/dL should be diluted with 0.9% (w/v) NaCl in a ratio of 1 + 3. The result is multiplied by 4.

SENSITIVITY

The minimum detectable concentration of CRP with an acceptable level of precision was determined as 8 mg/L.

PRECISION**Intra Assay**

	Level 1	Level 2
Mean (mg/L)	25.6	42.1
SD	1.49	1.87
CV (%)	5.81	4.43
n	20	20

REFERENCES

1. Ganrot K. (1973): Plasma protein response in experimental inflammation in the dog. Res. Exp. Med **161**(4), 251-261
2. Burton, S., Honor, D., MacKenzie, A., Eckersall, P., Markham R. and Haorney, B. (1994): C-reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. Am J Vet Res. **55**(5), 613-618
3. Rikihis, Y., Yamamoto, S., Kwak, I., Iqbal, Z., Kociba, G. Mott, J and Chichanasiriwithaya, W. (1994): C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. J. Clin. Microbiol. **32**, 912-917
4. Yamamoto S., Shida T., Honda M., Ashida Y., Rikihis Y., Odakura M., Hayasi S., Nomura M. and Isayama Y. (1994): Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (phase I cells) Vet. Res. Commun. **18** (5), 347-357

Revised 10 Dec 14 ml
Rev: 002